

复合生物酶液处理低次烟叶制备烟用香料

许春平, 杨琛琛, 王铮, 缪光耀

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001)

摘要:为探讨使用复合酶液处理低次烟叶制备烟用香料的方法及评价反应产物的效果,采用单因素法分别对复合纤维素酶和木瓜蛋白酶的用量进行了优化.以混合酶解液为主要氮源,将红糖、丙二醇和乙醛作为主要碳源,通过美拉德反应制备烟用香料;采用气相色谱-质谱联用法分析产物化学成分,并评价其感官效果.结果表明:1)每g烟末复合纤维素酶与木瓜蛋白酶的最佳用量分别为1 000 U/g和5 500 U/g. 2)反应产物对于降低卷烟烟气刺激性、协调香味等具有较明显的效果. 3)用GC-MS分析得到38种主要挥发性成分,其中包括3-羟基- β -大马酮、巨豆三烯酮、2,5-二甲基吡嗪和紫罗兰酮等对烟草香气品质贡献较大的化合物.

关键词:低次烟叶;酶解;美拉德反应;烟用香料;复合生物酶液

中图分类号:TS49 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2014.02.007

The preparation of tobacco flavor from discarded tobacco leaf by multi-bioenzyme

XU Chun-ping, YANG Chen-chen, WANG Zheng, MIAO Guang-yao

(College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: To investigate the application of multi-bioenzyme to treat discarded tobacco leaf for making flavor and checking product performance, the concentration of cellulose and protease were optimized firstly. After enzymolysis, brown sugar, propanediol and acetaldehyde were added to the concentrated hydrolysate solutions for Maillard reaction to prepare the flavor. The components of the flavor was tested by using GC-MS analysis, and its sensory effects were evaluated. The result showed: 1) The optimal conditions were cellulase 1 000 U/g, protease 5 500 U/g. 2) The flavor could reduce irritation and coordination fragrance. 3) GC-MS analysis showed that 38 main volatile components in the flavor, including 3-hydroxy- β -damascenone, megastigmatrienone, 2,5-dimethyl pyrazine, and ethyl octanoate, gave more contribution to the tobacco flavor substances.

Key words: discarded tobacco leaf; enzymolysis; Maillard reaction; tobacco flavor; multi-bioenzyme

0 引言

我国烟草种植面积和产量均居世界首位,在烟草加工过程中约有25%的烟末和低次烟叶不能用于卷烟生产^[1].通过研究美拉德反应的反应条件和

原料,并将其应用到烟用香料的生产中,可提高烟叶的利用率^[2].然而,传统方法使用的反应原料大多以单糖、二糖或者某些单糖的混合物作为反应的羰基源,以单一氨基酸或某几种氨基酸的混合物为反应的氮源,因此所得产物的增香效果一般,无法

收稿日期:2013-09-06

基金项目:国家人社部“留学人员科技项目择优支持计划”(豫留学函[2010]16号)

作者简介:许春平(1977—),男,河南省焦作市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为生物催化与烟草工程.

满足今天卷烟的增香需求. 酶解液中含有更为丰富的羰基源, 有利于在美拉德反应的产物中体现出烟叶的本香, 所得的反应产物能够与烟香更加协调, 提高增香效果, 同时也有利于提高低次烟叶的综合利用率^[3]. 鉴于此, 本文拟以复合纤维素酶和木瓜蛋白酶处理低次烟叶, 以混合酶解液为主要氮源, 将红糖、丙二醇和乙醛作为主要碳源, 通过美拉德反应制备烟用香料; 采用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)分析产物的化学成分, 并评价其感官效果, 以期为提高美拉德反应产物的增香效果提供参考.

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

材料: 吉林长春晒红烟 Y23, 产自吉林长春, 等级为 3 级, 蛋白质含量 15%, 还原糖含量 4.23%, 瑞升烟草技术(集团)有限责任公司提供, 40 °C 烘干、粉碎过 80 目筛; 纤维素复合酶, 阿玛诺天野酶制剂商贸有限公司产; 木瓜蛋白酶, 北京索莱宝科技有限公司产; 酒石酸钾钠、氢氧化钠、氢氧化钾均为 AR 级, 天津市瑞金特化学品有限公司产; 无水亚硫酸钠、1,2-丙二醇均为 AR 级, 天津市科密欧化学试剂有限公司产; 磷酸、苯酚、乙醛纯度均大于等于 85.0%, 开封化学试剂总厂产; 3,5-二硝基水杨酸(AR), 上海科丰化学试剂有限公司产; 酪氨酸(AR), 北京奥博星生物技术责任公司产.

仪器: HS-4 恒温水浴锅, 上海医疗器械五厂产; UV1700PC 紫外-可见分光光度计, 上海凤凰光科学仪器有限公司产; PL203 电子分析天平(感量: 0.001 g), 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产; DGX-9143 电热恒温鼓风干燥箱, 上海福玛设备有限公司产; CF-16RX II 冷冻离心机, HITACHI 日立集团产; QL-866 涡旋混合仪, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司产; PB-10 pH 计, 德国赛多利斯股份公司产; 6890 气相色谱仪/5973 质谱仪, 安捷伦科技有限公司产; JYT-5 QYC200 恒温振荡摇床, 上海福玛实验设备有限公司产.

1.2 方 法

1.2.1 纤维素复合酶浓度的优化 分别称取 1 g 烟末和 10 mL 蒸馏水放于 50 mL 三角瓶中, 搅拌均匀, 加入不同浓度的纤维素复合酶, 用 1 mol/L H_3PO_4 溶液和 1 mol/L KOH 溶液调 pH 为 5.0, 于 50 °C 水浴中反应 4 h, 之后进行灭酶处理. 在 8 000 r/min 条件下离心 15 min, 取 1 mL 上清液置于

100 mL 容量瓶中, 以蒸馏水定容, 4 °C 放置待测^[3]. 通过二硝基水杨酸法(DNS 法)检测待测液中还原糖的浓度以确定复合纤维素酶的用量^[4]. 以葡萄糖浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 标准曲线方程为 $y = 1.5135x - 0.0471$ ($R^2 = 0.998$). 分别取低次烟叶处理后的待测液 2.00 mL, 加入 2.00 mL DNS 显示剂^[5], 按标准液的处理方法测定吸光度, 从标准曲线上查出对应的浓度并计算总糖含量.

1.2.2 木瓜蛋白酶浓度的优化 在 50 mL 三角瓶中分别加入 1 g 烟末和 10 mL 蒸馏水, 搅拌后分别加入不同浓度的木瓜蛋白酶, 再将溶液的 pH 调至 7.5 左右, 放入恒温水浴锅中 50 °C 反应 10 h; 待反应完全后进行灭酶处理. 冷却至室温后, 以 8 000 r/min 离心 10 min, 取 1 mL 上清液置于 100 mL 容量瓶中, 以蒸馏水定容. 以水解液中的酪氨酸浓度代表蛋白质的降解程度^[6].

以酪氨酸浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线^[7], 标准曲线方程为 $y = 0.0111x - 0.0167$ ($R^2 = 0.998$). 取 1 mL 各待测液, 按照上述检测方法于 680 nm 处测定吸光度. 通过标准曲线查出对应的酪氨酸浓度, 得到蛋白质的降解程度.

1.2.3 低次烟叶酶解液的制备 将烟叶粉碎, 过 100 目筛. 按质量比 1:12 (烟末:水)加入蒸馏水, 充分浸泡 1 h; 加热至 100 °C 后保持 20 min, 然后降温冷却至 50 °C 左右; 用 H_3PO_4 调 pH 为 5.0, 每 g 烟末加入 1 000 U 纤维素复合酶酶解 4 h; 用 KOH 调 pH 为 7.0, 每 g 烟末加入 4 500 U 蛋白酶, 继续酶解 8 h; 待反应结束后在 100 °C 下加热 10 min, 灭酶处理, 冷却至 25 °C; 过滤除杂, 真空浓缩至可溶性固形物含量为 40% 左右^[8].

1.2.4 美拉德反应制备烟用香料 按照质量比 20:25:1.5:70 (红糖:固形物:乙醛:丙二醇)称取各物质, 混合均匀, 并将该混合物的 pH 调为 7.5, 电油锅加热至 125 °C 左右, 充分反应 3 h, 自然冷却至室温^[9-10].

1.2.5 卷烟样品的制备 分别按照 1:1 和 1:2 (蒸馏水:烟用香料)的比例配制香料. 称取一定量的配方烟丝, 将上述 2 种配制好的烟用香料按烟丝质量的 5% 添加到配方烟丝中, 用喷雾器均匀喷洒, 以没有添加该香料的烟丝作为空白对照. 然后分别将喷好的烟丝放在温度 (22 ± 1) °C 和湿度 (60 ± 2)% 的恒温恒湿箱中平衡 48 h. 使用手动卷烟器卷制样品卷烟.

1.2.6 卷烟加香评吸 卷烟评吸由郑州轻工业学院调香实验室 15 位评吸人员,按照国标 GB/T 5606.4—2005^[11]对 3 组卷烟的感官品质进行评吸.感官指标为光泽(5 分)、香气(32 分)、谐调(6 分)、杂气(12 分)、刺激性(20 分)、余味(25 分).所使用的烟丝为配方烟丝.

1.2.7 美拉德反应产物的前处理及 GC-MS 分析

准确移取 10 mL 香料样品于微量萃取器中,加入 5 mL CH_2Cl_2 ,摇匀,时间约 3 min,使两相充分接触.130 r/min 摇床机械振荡 10 min,静置分层后分离 CH_2Cl_2 相,60 °C 浓缩至 1 mL,进行 GC-MS 分析.分析条件如下:

色谱柱:HP-5MS(50 m×0.25 mm×0.25 μm)毛细管柱;升温程序:50 °C(1 min),5 °C/min,250 °C(5 min);载气:He;进样温度:250 °C;进样模式:不分流进样;流速:1 mL/min;传输线温度:250 °C;离子源:EI 源;电子能量:70 eV;扫描范围:50 ~ 650 amu.

2 结果与讨论

2.1 纤维素复合酶浓度优化

以纤维素复合酶浓度为横坐标、还原糖浓度为纵坐标,在坐标图上反映出不同纤维素复合酶浓度下还原糖浓度的变化情况,如图 1 所示.由图 1 可知,还原糖浓度的变化与纤维素复合酶量的变化呈正相关.在一定范围内,随着纤维素复合酶使用量的增加,还原糖浓度呈上升趋势.当每 g 烟末纤维素复合酶的用量为 1 000 U 时,还原糖浓度趋于最大值.再继续增加纤维素酶量,还原糖浓度逐渐趋于平稳,并维持在 0.31 mg/mL 左右.因此,综合考虑,选择每 g 烟末纤维素复合酶的用量为 1 000 U.

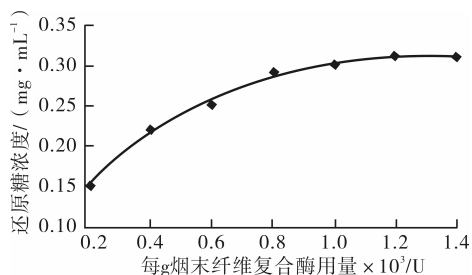


图 1 纤维素复合酶浓度优化曲线

2.2 木瓜蛋白酶浓度优化

烟草蛋白质被蛋白酶部分水解为氨基酸,可通过分光光度计测定水解液中酪氨酸浓度的变化来判断蛋白质的降解程度.以蛋白酶浓度为横坐标、

酪氨酸浓度为纵坐标作图(见图 2).由图 2 可知,蛋白酶浓度与酪氨酸正相关,即与蛋白质的降解程度正相关.随着蛋白酶浓度的增加,酪氨酸浓度呈先上升后平稳的趋势.在每 g 烟末木瓜蛋白酶的使用量为 5 500 U 时,酪氨酸浓度基本达到最大,为 39.00 mg/L.综合考虑,选择每 g 烟末木瓜蛋白酶的使用量为 5 500 U.

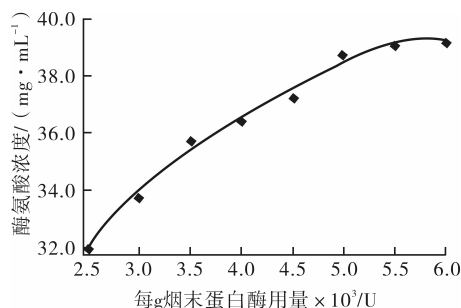


图 2 蛋白酶浓度优化曲线

2.3 卷烟样品感官评吸对比

对 3 种卷烟样品进行感官质量评价,其中卷烟 I 号为未添加烟用香料的成品卷烟(空白对照),卷烟 II 号为添加蒸馏水与烟用香料比例为 1:1 的成品卷烟,卷烟 III 号为添加蒸馏水与烟用香料比例为 1:2 的成品卷烟.结果见图 3.由图 3 可以看出,使用由低次烟叶生物酶解制备的烟用香料后,卷烟在香气、谐调、杂气、刺激性及余味方面均有一定程度的提升.综合来看,卷烟 II 号的效果较好.

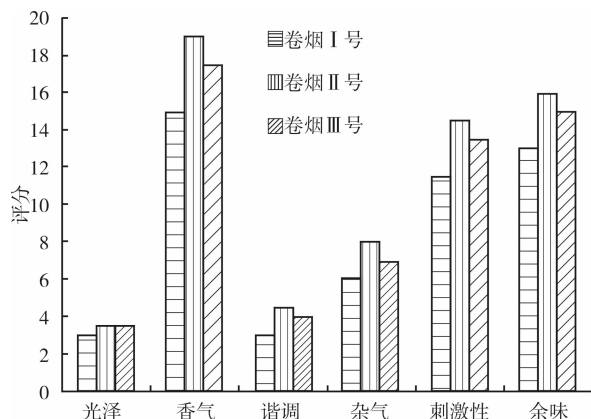


图 3 卷烟样品评吸得分示意图

2.4 美拉德反应产物的 GC-MS 分析结果

美拉德反应产物的 GC-MS 分析结果见表 1.该香料中的主要香味成分有 38 种,包括酯类 10 种、酮类 8 种、杂环类 8 种、醛类 3 种、烃类 3 种、醇类 2 种、醚类 2 种、酚类 1 种和有机酸 1 种.其中酮类占总量的 18.83%,含氮杂环类占 53.71%,有机酸类

占 4.06%。这些产物对卷烟的感官质量可起到不同程度的作用,例如,酮类物质如 3-羟基- β -大马酮和巨豆三烯酮为烟草中的主要致香成分,两者的相对百分含量达到 1.56%,可以增强烟草的成熟气息;含氮杂环类化合物如吡啶、吡咯、吡嗪等物质,大多由美拉德反应生成,可赋予卷烟特征以烘烤香、花香、果香,对烟草的香味具有较好的修饰作用,

表 1 美拉德反应产物中的主要挥发性香味成分

序号	保留时间/min	成分	相对含量/%
1	5.11	1,2-丙二醇	0.32
2	5.43	4,6-二甲基嘧啶	5.19
3	7.04	1-甲氧基-2-丙醇	0.34
4	7.11	甲基环戊烯醇酮	0.52
5	7.30	二丙二醇单甲醚	0.44
6	7.48	4-异丙基甲苯	4.62
7	7.87	苯乙醛	0.21
8	8.53	2-乙基-3,5-二甲基吡嗪	3.16
9	9.71	2-苜基(苯甲基)异氰化	0.19
10	9.98	十五烷	0.03
11	10.05	(R)-3-羟基丁酸甲酯	1.56
12	11.04	2-乙氨基-2-(3-甲氧基苄基)环己酮	1.25
13	11.19	香叶醛	0.23
14	11.88	2,5-二甲基吡嗪	5.32
15	12.21	己酸乙酯	0.45
16	12.96	庚酸乙酯	0.74
17	13.46	新烟碱	33.46
18	14.18	2-环己基哌啶	2.05
19	14.69	茴香脑	0.17
20	15.84	植酮	0.07
21	16.20	丁香酚	0.61
22	17.59	N,N-二甲基-4-氨基苯甲醛	0.19
23	18.40	3-羟基- β -大马酮	0.68
24	18.65	乙酸苯乙酯	1.10
25	18.99	紫罗兰酮	0.26
26	19.07	黄藤内酯	0.24
27	20.03	(-)-可替宁	6.54
28	20.16	辛酸乙酯	0.20
29	21.17	菠萝酮	10.06
30	21.49	十八碳三烯酸乙酯	0.25
31	23.37	叶酸	4.06
32	23.50	新植二烯	1.40
33	26.12	1-甲基-4-羧酸-5-(3-吡啶基)-2-吡咯烷酮	5.11
34	28.68	3-乙基-5-(2-乙基丁基)十八烷	0.64
35	29.35	邻苯二甲酸二异辛酯	6.13
36	29.60	苯甲酸苄酯	1.05
37	30.80	巨豆三烯酮	0.88
38	34.53	肉桂酸苄酯	0.28

丰满烟香;有机酸类物质可减轻刺激,使烟气变得醇和;其他少量的醇类、醛类、醚类等物质,也可以对烟气起到一定的修饰作用。因此,以烟叶酶解液为原料进行美拉德反应,所产生的烟用香料不仅能够保留烟草原有的香味,且能进一步改善卷烟的香气品质。

3 结论

通过优化分析得每 g 烟末纤维素复合酶的用量为 1 000 U,木瓜蛋白酶的用量为 5 500 U。感官评吸结果表明,由低次烟叶生物酶解制备的烟用香料,具有较明显的减轻杂气、降低刺激性、增加香气和协调香味的作用。对其进行 GC-MS 分析,得到主要的挥发性成分 38 种,其中包括 3-羟基- β -大马酮、巨豆三烯酮、2,5-二甲基吡嗪和紫罗兰酮等对烟草香气具有辅助效果的风味化合物。研究结果表明,通过该法制备烟用香料,其生产过程简单,能够改善烟气品质,具有较好的应用价值。

参考文献:

- [1] 饶国华,赵谋明,林伟锋,等.中国低次烟叶资源综合利用研究[J].资源科学,2005,27(5):120.
- [2] 余金恒,许明忠,黄锋林,等.烟用香精香料物质研究进展[J].河南农业科学,2011,40(2):16.
- [3] 文冬梅,伍锦鸣,赵谋明,等.烟叶末在酶解和美拉德反应过程中风味变化规律的研究[J].食品工业科技,2012,33(12):176.
- [4] 尹建雄,卢红,谢强,等.3,5-二硝基水杨酸比色法快速测定烟草水溶性总糖、还原糖及淀粉的探讨[J].云南农业大学学报,2007,22(6):829.
- [5] 许尧兴,姚晓红.两种测定程序对饲用 α -半乳糖苷酶活性检测结果的比较[J].浙江农业学报,2004,16(6):349.
- [6] 马林.利用生物技术改变烟叶化学组分提高其吸食品质和安全性的研究[J].郑州工程学院学报:自然科学版,2001,22(3):40.
- [7] 李建成.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994:168-170.
- [8] 李小斌,吕志峰,王科杰,等.加酶技术提高烟叶感官质量的研究[J].中国烟草科学,2007,28(6):9.
- [9] 庞登虹,李丹,熊国玺,等.酶法处理烟叶碎片制备烟草浸膏[J].江南大学学报:自然科学版,2009,8(5):607.
- [10] 唐胜,沈光林,饶国华,等.利用烟末酶解液制备烟用美拉德反应香精的研究[J].食品工业科技,2011,32(4):268.
- [11] GB/T 5606.4—2005,卷烟·第4部分:感官技术要求[S].