



引用格式:宋丽丽,张永良,张志平,等.白腐菌液体发酵降解烟梗木质素的研究[J].轻工学报,2019,34(1):36-42.

中图分类号:TS49 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2019.01.005

文章编号:2096-1553(2019)01-0036-07

白腐菌液体发酵降解烟梗木质素的研究

Study on the degradation of lignin in tobacco stem by liquid fermentation with white rot fungi

宋丽丽,张永良,张志平,王光路,杨旭,张靖楠

SONG Lili, ZHANG Yongliang, ZHANG Zhiping, WANG Guanglu, YANG Xu, ZHANG Jingnan

郑州轻工业大学 食品与生物工程学院/烟草行业烟草工业生物技术重点实验室,河南 郑州 450001

College of Food and Biological Engineering/Key Laboratory of Biotechnology in Tobacco Industry, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

关键词:

烟梗;白腐菌;木质素;液体发酵;连续传代驯化

Key words:

tobacco stem; white rot fungi; lignin; liquid fermentation; continuous subcultivation and domestication

摘要:以白腐菌 *P. chrysosporium* 为对象,采用连续传代驯化的方法提升菌体对烟碱的耐受度.通过比较人工陈化与液体发酵对烟梗中木质素的降解效率,并对其发酵条件进行优化.结果表明,驯化后的白腐菌 *P. chrysosporium* 可有效定植于烟梗上,在 34 ℃,接种量 6% 的最适发酵条件下液体发酵 24 h,烟梗中木质素含量为 1.93%,降解了 23.11%,与人工陈化 3 个月烟梗木质素降解情况相当,总糖和葡萄糖含量分别增加 10.84% 和 4.86%,在一定程度上消除了蛋白质燃烧产生的不良气味,改善了烟梗燃烧时产生的木质气.

收稿日期:2018-08-16

基金项目:河南省科技攻关项目(152102110104);郑州轻工业学院博士基金项目(2013BSJJ005)

作者简介:宋丽丽(1987—),女,河南省信阳市人,郑州轻工业大学讲师,博士,主要研究方向为烟草废弃物综合利用.

Abstract: The white rot fungus (*P. Chrysosporium*) was subjected to continuous subcultivation and domestication to improve the nicotine tolerance of the fungus. The degradation efficiency of lignin in tobacco stem was compared between artificial aging and liquid fermentation to obtain the optimal fermentation conditions. The results showed that the domesticated white rot fungi was effectively planted on tobacco stems. The content of lignin in tobacco stems reached 1.93%, decreasing by 23.11% after 24 h of liquid fermentation under the optimum fermentation conditions of 34 °C and 6% inoculation, which was comparable to the degradation of lignin in tobacco stems after three months of artificial aging. The content of total sugar and glucose increased 10.84% and 4.86% respectively, which eliminated the unpleasant odor of protein burning to certain extent and improved the wood gas in tobacco stem burning.

0 引言

烟梗是烟叶的重要组成部分,通过梗叶分离,可得到占烟叶总重 25% 左右的烟梗^[1]. 我国是烟草大国,每年通过打叶复烤产生大量的烟梗,但目前这部分烟草副产物的综合利用程度较低^[2-3]. 烟梗中总糖和烟碱含量较低,而纤维素和木质素等细胞壁物质含量高,造成了糖碱比的失调,燃吸时产生强烈的刺激性和杂气,涩口,香气量少^[4]. 因此,改善烟梗及其制品的内在品质,提高梗丝的香气、吃味和梗丝填充值成为烟草工业研究的热点.

烟草中的木质素是由芥子醇、香豆醇和松柏醇等苯丙烷衍生物单体构成的一种结构复杂、无定型且具有生物多态性的生物大分子,它填充在半纤维素和纤维素的空隙之间且紧密结合,共同形成了细胞壁的致密结构^[5-6]. 木质素作为生物质的三大主要成分之一,在热解时会产生甲基酚、二甲基酚和儿茶酚等有害物质. 减少烟草薄片中的木质素含量既有利于减少烟草薄片燃烧时产生的有害物质,也能改善烟草薄片的吸味^[7-8]. 同时,烟梗中糖碱比失调造成的吸食品质不佳也限制了烟梗在卷烟中的添加比例^[9]. 利用微生物的方法对烟梗进行发酵是提高烟梗利用价值的一条有效途径. 微生物能够通过直接或间接利用烟叶或烟梗中的果胶、木质素、蛋白质和微量元素等,分解代谢合成出不同种类的生物酶,而生物酶能够催化底物分子内部某些化学链的断裂,加速底物大分子的降

解和某些有害物质的分解,进而通过特定微生物的吸收、利用、转化,形成一系列有益小分子化合物,在烟草行业减毒加香方面具有广阔的应用前景^[10-11].

白腐菌是对木质素具有较强降解能力的一类真菌,它能够通过分泌木质素降解酶系对木质素进行降解或改性,从而降低木质纤维素的结构屏障,使大分子化合物(纤维素、半纤维素、木质素)降解为低分子物质. 利用白腐菌这一特性可对秸秆等草类原料进行固体发酵处理,进而对木质素进行选择性的降解^[12-13]. 利用白腐菌降解烟梗中的木质素,不仅能够降低烟梗在抽吸时产生的刺激性及木质气,而且可以将大分子化合物改性降解,使小分子化合物有效释放,对改善烟气香味有着潜在的贡献^[14]. 迟建国^[15]利用白腐菌降低烟叶中木质素的含量,达到了降低卷烟烟气杂气、提升卷烟吸食品质的目的. 刘志昌等^[16]使用经白腐菌 *Coriolus versicolor* T42 处理后的烟梗制备重组烟叶,并将其添加至卷烟中,卷烟的香气、杂气、刺激性和协调性都得到了明显改善. 白腐菌由于具有选择性降解木质素的特性,在改善烟梗品质和提高烟梗利用率方面有极大的应用潜力. 黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium*)是白腐菌的模式菌株,在污水处理、土壤修复以及降解木质素方面均有广泛的应用^[6],但对烟梗木质素降解和品质改善等的研究还鲜有涉及. 鉴于此,本研究利用白腐菌模式菌株黄孢原毛平革菌(*P. chry-*

sposporium)降解烟梗中的木质素,参照人工陈化烟梗木质素的降解情况,选择适宜的白腐菌液体发酵烟梗条件,以快速降低烟梗中木质素的含量,达到改善烟梗内在品质、提升烟梗利用率、降低卷烟生产成本的目的。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

白腐菌 *P. chrysosporium*, 来源于郑州轻工业大学烟草行业烟草工业生物技术重点实验室, 4 °C 条件下斜面保存。

烟梗, 由河南中烟工业有限责任公司提供, 自然晾干后存放。

马铃薯琼脂培养基(PDA 培养基): 土豆 200 g/L, 蔗糖 20 g/L, 121 °C 下灭菌 20 min。

马铃薯肉汤培养基(PDB 培养基): 土豆 200 g/L, 蔗糖 20 g/L, 琼脂 20 g/L, 121 °C 下灭菌 20 min。

烟梗培养基: 将烟梗粉碎后过 40 目筛, 称取 10 g 置于 250 mL 三角瓶中, 加入 100 mL 蒸馏水 121 °C 下灭菌 30 min。

仪器: UV-1800 双光速紫外-可见光光度计, 上海欣茂仪器有限公司产; SW-CJ-1D 净化工作台, 苏州净化设备有限公司产; LRH-1500F 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司产; QYC-2012C 恒温摇床, 上海福玛实验设备有限公司产; Agilent7820A 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司产; MS205DU 分析天平, 瑞士梅特勒-托利多公司产; AA3 连续流动分析仪, 德国 SEAL 公司产; PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 白腐菌 *P. chrysosporium* 驯化

由于烟梗中的烟碱对微生物有毒害作用, 会抑制其生长, 因此采用逐级连续传代驯化法对初始菌株进行驯化, 得到可以在高浓度烟碱

条件下生长的白腐菌 *P. chrysosporium* 菌种。具体驯化过程见表 1。

表 1 菌种驯化过程

Table 1 The domestication process of strain

| 驯化次数 | 烟碱加入量/% | 培养基类型 | 驯化时间/d |
|------|---------|-------|--------|
| 1 | 0.02 | PDA | 7 |
| 2 | 0.04 | PDA | 7 |
| 3 | 0.06 | PDA | 7 |
| 4 | 0.08 | PDA | 7 |
| 5 | 0.10 | PDA | 7 |

1.2.2 烟梗人工陈化

将经过驯化的白腐菌 *P. chrysosporium* 制成孢子悬液 (7.50×10^8 个/mL), 均匀喷洒于烟梗表面, 控制烟梗湿度为 65%, 将烟梗置于郑州轻工业大学烟草实验室内进行人工陈化(室内温度 10 ~ 35 °C, 相对湿度 40% ~ 70%), 陈化过程中注意通风和防虫。分别在陈化 0 个月、1 个月、2 个月、3 个月时取样, 进行常规化学成分分析。

1.2.3 烟梗化学成分测定

按照烟草化学成分测定的行业标准, 采用连续流动分析仪测定烟梗中总糖、葡萄糖、总氮、烟碱^[17-19]。烟梗中纤维素和木质素含量的测定方法参照美国可再生能源实验室 NREL 制定的标准^[20]。有机酸测定采用王瑞新的方法^[21]。水溶液 pH 值采用 pH 计法测定^[22]。

1.2.4 白腐菌 *P. chrysosporium* 发酵烟梗

将白腐菌 *P. chrysosporium* 斜面菌种接种于 PDB 培养基, 在 30 °C, 150 r/min 条件下摇床培养 3 d, 在无菌条件下接种 6 mL 种子液于烟梗培养基中, 于 30 °C 下培养。

1.2.5 不同发酵条件下烟梗木质素含量的测定

1.2.5.1 发酵时间

吸取 6 mL 种子液加入烟梗培养基中, 将接种白腐菌 *P. chrysosporium* 后的烟梗培养基于 30 °C 下培养 40 h, 每隔 4 h 取样 1 次, 测定烟梗木质素含量。

1.2.5.2 培养温度 吸取 6 mL 种子液加入烟梗培养基中,将接种白腐菌 *P. chrysosporium* 后的烟梗培养基分别置于 25 °C, 28 °C, 31 °C, 34 °C, 37 °C 条件下培养 24 h, 测定烟梗木质素含量。

1.2.5.3 接种量 分别吸取 2 mL, 4 mL, 6 mL 和 8 mL 种子液加入烟梗培养基中,接种量为 2%, 4%, 6% 和 8%, 在最适温度下培养 24 h, 测定烟梗木质素含量。

2 结果与分析

2.1 菌种驯化结果

驯化处理前后烟梗培养基上菌种直径变化情况见表 2。由表 2 可知,经过适应性培养后,白腐菌 *P. chrysosporium* 在含有烟梗培养基上生长速度发生明显变化。经过驯化后,白腐菌 *P. chrysosporium* 在含 0.1% 烟梗的 PDA 培养基上生长速度显著提高,不仅延迟期明显缩短,而且生长速率加快。驯化前白腐菌 *P. chrysosporium* 需要 72 h 菌丝直径生长至 1.5 cm, 而驯化后只需要 24 h 直径就可以达到相同长度,培养时间明显缩短。因此,经过驯化后的菌种可以在烟梗培养基上较快生长,适合快速处理烟梗以降解其木质素。

表 2 驯化前后菌种直径变化情况

Table 2 Diameter changes of strain before and after domestication cm

| 处理 | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h | 96 h | 120 h |
|--------|-----|------|------|------|------|-------|
| 未驯化 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.5 | 2.1 | 2.9 |
| 驯化 5 代 | 1.0 | 1.5 | 2.5 | 5.2 | 8.6 | 9.0 |

注:培养皿直径为 9 cm

2.2 烟梗人工陈化结果

经过人工陈化后烟梗的化学成分会发生较大的变化,经不同陈化时间的烟梗,其化学成分含量的变化见表 3。由表 3 可知,烟梗木质素含量随着陈化时间的延长而呈现下降趋势。经过 3 个月的陈化,烟梗中总糖含量降低 14.58%, 葡萄糖含量降低 17.61%, 木质素含量降低 21.31%, 纤维素含量降低 1.44%, 有机酸含量增加 7.21%, 而烟碱和总氮含量基本没有变化。这与随着人工陈化过程中烟叶 pH 值的降低、有机酸含量逐渐增加^[11]的研究结果一致。说明人工陈化过程中白腐菌 *P. chrysosporium* 和烟梗中土著微生物菌群消耗利用掉烟梗中的糖类物质,同时木质素也有较大程度的降解,人工陈化过程对烟梗中各成分发生较大改变有一定影响。

2.3 白腐菌 *P. chrysosporium* 液体发酵烟梗木质素含量变化情况

图 1 为白腐菌 *P. chrysosporium* 发酵后的烟梗。由图 1 可知,利用白腐菌 *P. chrysosporium* 液体发酵烟梗后,烟梗颜色及质地发生一定程度的变化。发酵 24 h, 烟梗中的木质素降解了 19.12%, 发酵 40 h 后,木质素含量进一步减少,同原料相比降解了 24.26%, 但是发酵 40 h 烟梗失去了本色。同烟梗人工陈化过程相比,白腐菌 *P. chrysosporium* 发酵 24 h 烟梗中木质素的含量与人工陈化 3 个月相当,说明白腐菌液体发酵可实现对烟梗中木质素的快速降解。

烟梗的人工陈化和液体发酵都可以在一定

表 3 不同陈化时间的烟梗化学成分

Table 3 Chemical composition of tobacco stems at different aging times

| 陈化时间/月 | 总糖含量/% | 葡萄糖含量/% | 木质素含量/% | 纤维素含量/% | 烟碱含量/% | 总氮含量/% | 有机酸含量/% | pH 值 |
|--------|--------|---------|---------|---------|--------|--------|---------|------|
| 0 | 21.95 | 7.61 | 2.51 | 27.04 | 0.75 | 1.53 | 9.99 | 5.34 |
| 1 | 19.19 | 7.13 | 2.43 | 26.89 | 0.74 | 1.53 | 10.25 | 5.21 |
| 2 | 17.86 | 6.23 | 2.27 | 26.77 | 0.74 | 1.52 | 10.65 | 5.16 |
| 3 | 18.75 | 6.27 | 1.97 | 26.65 | 0.73 | 1.51 | 10.71 | 5.15 |

程度上降解烟梗中木质素的含量,但是降解效率相差很大.人工陈化过程中,烟梗在较高的水分含量下会发生一定程度的霉变,降低烟梗的实用性,其间还要防止虫蛀的影响,如果加工不慎就会出现资源浪费的现象.而液体发酵可以快速降解木质素的含量,且发酵周期较短,故选择液体发酵来降解木质素的研究更有价值.



a)发酵24 h b)发酵40 h

图1 白腐菌 *P. chrysosporium* 发酵后的烟梗

Fig.1 Tobacco stem after fermentation by *P. chrysosporium*

2.4 白腐菌 *P. chrysosporium* 发酵烟梗不同条件测试与优选

白腐菌 *P. chrysosporium* 的生长过程及产酶条件受到多种环境条件的影响^[5],发酵时间、发酵温度和接种量是影响烟梗中木质素降解速率的重要因素,选择适合的条件进行烟梗生物处理,将会大大提高发酵效率.

2.4.1 发酵时间对烟梗木质素含量的影响

发酵时间的长短直接影响烟梗木质素的降解速率,在30℃,接种量6%条件下,考察发酵时间对烟梗木质素含量的影响,结果如图2所示.由图2可知,烟梗中木质素在发酵过程的前24h快速降解,在24h时烟梗中木质素含量为2.03%,降解了19.12%,24h后烟梗中木质素含量逐渐趋于平稳,白腐菌降解木质素为次级代谢反应^[5],而本研究中白腐菌 *P. chrysosporium* 经驯化后对烟梗的降解速率增快,缩短了发酵时

间.因此,选择24h作为最适发酵时间.

2.4.2 发酵温度对烟梗木质素含量的影响

发酵温度影响菌种的生长速率,同时木质素降解酶的活力高低也受到温度的影响,因此适宜的发酵温度是影响木质素降解的重要因素.在接种量6%条件下发酵24h,考察发酵温度对烟梗中木质素含量的影响,结果如图3所示.由图3可知,在低于34℃条件下,木质素的降解速率随发酵温度的增加而增加,34℃下发酵24h后,木质素含量为1.93%,降解率了23.22%.当超过34℃时,由于白腐菌 *P. chrysosporium* 生长受到抑制,烟梗中的木质素降解速率下降.因此,选择最适发酵温度为34℃.

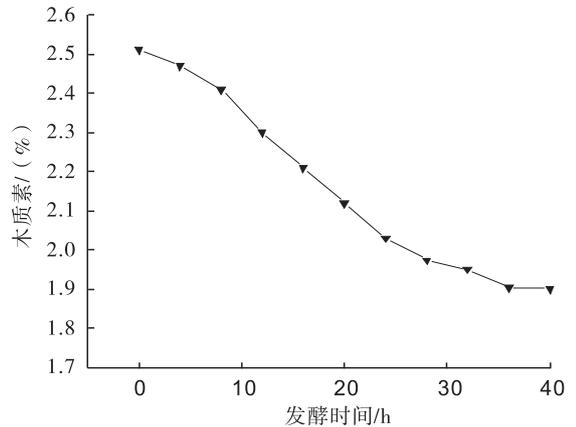


图2 发酵时间对烟梗木质素含量的影响

Fig.2 Effect of fermentation time on lignin content in tobacco stem

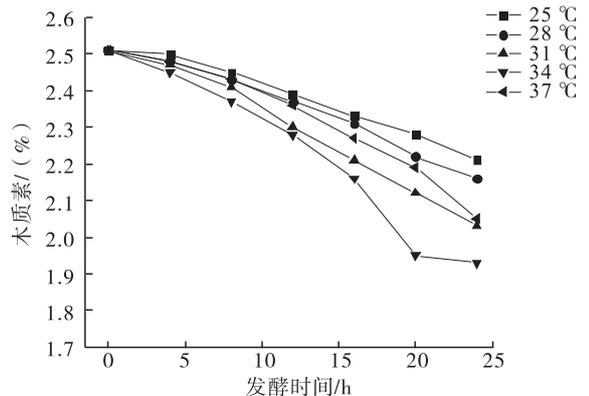


图3 发酵温度对烟梗木质素含量的影响

Fig.3 Effect of temperature on lignin content in tobacco stem

2.4.3 接种量对烟梗木质素含量的影响

在 34 °C 条件下发酵 24 h, 考察接种量对烟梗中木质素含量的影响, 结果如图 4 所示. 由图 4 可知, 在接种量小于 6% 条件下, 随着接种量的增加, 木质素的降解速率加快, 烟梗中木质素含量分别为 2.29%, 2.14%, 1.93%, 对应降解率为 8.76%, 14.74%, 23.11%. 当接种量超过 6% 后, 木质素的降解速率反而有所下降, 为 22.71%. 从节约成本考虑, 选择适宜的接种量为 6%.

2.5 白腐菌 *P. chrysosporium* 液体发酵后烟梗化学成分变化分析

在发酵温度 34 °C, 接种量 6% 条件下, 白腐菌 *P. chrysosporium* 发酵烟梗 24 h 后, 烟梗中化学成分变化如表 4 所示. 由表 4 可知, 白腐菌液体发酵后, 总糖和葡萄糖含量分别增加 10.84% 和 4.86%, 这是因为烟梗发酵过程中微生物需要消耗部分基质以供自身生长需要, 即通过从固形物中降解大分子底物(如纤维素)生成部分糖, 因此总糖和葡萄糖含量增加. 总糖含量的提高可以在一定程度上消除蛋白质燃烧产生的不良气味, 对烟梗的品质起到平衡作用. 木质素的含量减少 23.11%, 可明显降低

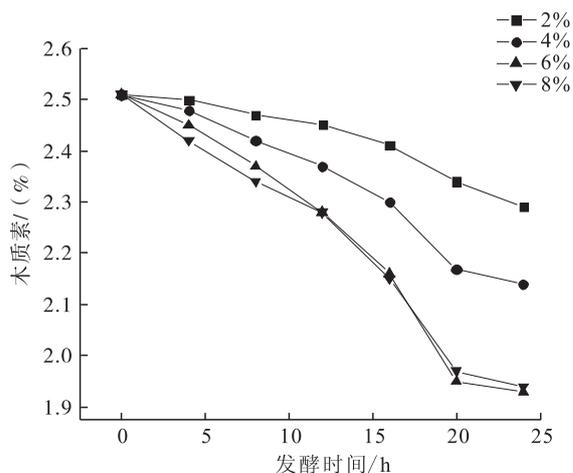


图 4 接种量对烟梗中木质素含量的影响

Fig. 4 Effect of inoculation amount on lignin content in tobacco stem

表 4 白腐菌 *P. chrysosporium* 发酵前后烟梗化学成分的变化

Table 4 Changes of chemicals in tobacco stem after fermentation with *P. chrysosporium*

| 处理 | 总糖含量/% | 葡萄糖含量/% | 木质素含量/% | 纤维素含量/% |
|-----|--------|---------|---------|---------|
| 发酵前 | 21.95 | 7.61 | 2.51 | 27.04 |
| 发酵后 | 24.33 | 7.98 | 1.93 | 24.15 |

| 处理 | 烟碱含量/% | 总氮含量/% | 有机酸含量/% | pH 值 |
|-----|--------|--------|---------|------|
| 发酵前 | 0.75 | 1.53 | 9.99 | 5.34 |
| 发酵后 | 0.74 | 1.52 | 10.57 | 5.18 |

烟梗在燃烧时产生的木质气, 提高烟草薄片的吸味. 总氮和烟碱含量并未发生明显变化, 有机酸含量增加, 与烟梗人工陈化 3 个月时间化学成分情况一致.

3 结论

本研究以驯化后的白腐菌 *P. chrysosporium* 处理烟梗, 利用液体发酵法降解烟梗中的木质素, 相较于人工陈化烟梗, 白腐菌 *P. chrysosporium* 液体发酵周期短, 对木质素的降解率较高. 通过优选发酵时间、发酵温度、接种量, 确定了 *P. chrysosporium* 降解烟梗木质素的最适发酵条件: 在 34 °C, 6% 接种量下发酵 24 h. 该条件下液体发酵烟梗中木质素含量为 1.93%, 降低了 23.11%, 总糖和葡萄糖含量分别增加 10.84% 和 4.86%, 在一定程度上消除了蛋白质燃烧产生的不良气味, 改善了烟梗燃烧时产生的木质气. 本研究可为烟草废弃物高效生物转化、提升烟梗利用效率、加快烟草副产物资源化综合利用, 提供参考和依据.

参考文献:

- [1] 黄志强, 包秀萍, 高锐. 烟梗及其制品提质处理的研究进展[J]. 河南农业科学, 2013, 42(10):1.
- [2] 周蓉, 陶红, 沈光林, 等. 碱氧与酶处理改善梗

- 丝性质的研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5):463.
- [3] 闫克玉, 闫洪洋, 李兴波, 等. 烤烟烟叶细胞壁物质的对比分析[J]. 烟草科技, 2005(10):6.
- [4] 张永良, 周晓微, 梁萌. 烟梗综合利用研究进展[J]. 现代农业科技, 2016(8):232.
- [5] 王娜, 李仙, 王定伟. 烟草木质素降解菌的筛选及在烟草中的应用[J]. 云南农业大学学报, 2008(1):64.
- [6] TUOMELA M, VIKMAN M., HATAKKA A, et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review[J]. Bioresource Technology, 2000, 72(2):169.
- [7] 杨虹琦, 周冀衡, 罗泽民, 等. 微生物和酶在烟叶发酵中的应用[J]. 湖南农业科学, 2004(6):63.
- [8] 黄静文, 段焰青, 者为, 等. 短小芽孢杆菌改善烟叶品质的研究[J]. 烟草科技, 2010(8):61.
- [9] 林凯. 酶法对烟梗丝降解效果的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(11):6500.
- [10] 周元清, 周丽清, 章新, 等. 用生物技术降解木质素提高烟梗使用价值初步研究[J]. 玉溪师范学院学报, 2006, 6(22):61.
- [11] 朱大恒, 韩锦峰, 周御风. 利用产香微生物发酵生产烟用香料技术及其应用[J]. 烟草科技, 1997(1):30.
- [12] GUERRA A, MENDONCA R, FERRAZ A, et al. Structural characterization of lignin during pinus taeda wood treatment with *Ceriporiopsis subvermispora*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(7):4073.
- [13] 徐海娟, 梁文芷. 白腐菌降解木素酶系及其作用机理[J]. 环境污染治理技术与设备, 2000, 1(3):51.
- [14] 陈兴, 申晓峰, 巩效伟, 等. 利用微生物制剂提高梗丝品质的研究[J]. 中国烟草学报, 2013, 19(3):83.
- [15] 迟建国. 白腐菌对烟叶木质素含量的影响[J]. 贵州农业科学, 2013, 41(7):138.
- [16] 刘志昌, 毛耀, 姚元军, 等. 烟梗木质素的白腐菌 *Coriolus versicolor* T42 降解研究[J]. 纸和造纸, 2012, 31(11):46.
- [17] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 水溶性糖的测定 连续流动法: YC/T 159—2002 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [18] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品总氮的测定 克达尔法: YC/T 33—1996 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [19] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品总植物碱的测定 光度法: YC/T 34—1996 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [20] SLUITER A, HAMES B, RUIZ R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass [J]. Laboratory Analytical Procedure, 2008, 1617:1.
- [21] 王瑞新, 韩富根. 烟草化学品质分析法[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 1990.
- [22] 李炎强, 张峻松, 贾会, 等. 烤烟水溶液值分析方法研究[J]. 烟草科技, 2003(11):24.