



引用格式:杨旭,魏涛,张志平,等. 强化微生物固态厌氧发酵对烟梗细胞壁组分的影响研究[J]. 轻工学报,2020,35(6):35-40.

中图分类号:TS41 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.06.005

文章编号:2096-1553(2020)06-0035-06

# 强化微生物固态厌氧发酵对烟梗细胞壁组分的影响研究

## Effect of enhanced microbial solid-state anaerobic fermentation on cell wall composition of tobacco stem

杨旭<sup>1,2</sup>, 魏涛<sup>1,2</sup>, 张志平<sup>1,2</sup>, 宋丽丽<sup>1,2</sup>, 王光路<sup>1,2</sup>, 马歌丽<sup>1,2</sup>  
YANG Xu<sup>1,2</sup>, WEI Tao<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhiping<sup>1,2</sup>, SONG Lili<sup>1,2</sup>, WANG Guanglu<sup>1,2</sup>,  
MA Geli<sup>1,2</sup>

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;
2. 郑州市代谢工程和系统生物学重点实验室, 河南 郑州 450001
1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. Zhengzhou Key Laboratory of Metabolic Engineering and System Biology, Zhengzhou 450001, China

**关键词:**  
烟梗; 固态厌氧发酵;  
细胞壁; 果胶

**Key words:**  
tobacco stem;  
solid-state anaerobic  
fermentation; cell wall;  
pectin

**摘要:**以烟梗为原料,通过强化微生物固态厌氧发酵方式,研究不同微生物(乳酸菌 RG、乳酸菌 MSA、乳酸菌 FL、芽孢杆菌 KC、芽孢杆菌 ND、芽孢杆菌 JD)对烟梗 pH 值和细胞壁组分(果胶、纤维素、半纤维素和木质素)的影响. 结果表明:固态厌氧发酵可不同程度地降低烟梗 pH 值,其中,乳酸菌发酵烟梗的 pH 值由 6.05 降至 4.50~4.60 之间;发酵 4 d 后,乳酸菌 RG 对果胶的降解效果最明显,果胶降解率可达 87.75%;乳酸菌 MAS 对纤维素的降解效果最明显,纤维素质量分数由 20.83% 降至 15.90%;芽孢杆菌 JD 有较好的分解木质素和半纤维素作用,木质素和半纤维素质量分数分别由 10.91% 和 10.66% 降至 5.55% 和 7.40%.

收稿日期:2020-04-21

基金项目:国家自然科学基金项目(21706244);河南省高等学校重点科研项目(20B416003);郑州轻工业大学博士科研启动基金项目(0123-13501050066)

作者简介:杨旭(1982—),男,河南省信阳市人,郑州轻工业大学讲师,博士,主要研究方向为食品生物技术.

**Abstract:** The effect of different microorganisms (lactic acid bacteria RG, lactic acid bacteria MSA, lactic acid bacteria FL, Bacillus KC, Bacillus ND, Bacillus JD) on the pH value and cell wall components (pectin, cellulose, hemicellulose and lignin) of tobacco stem was studied by enhancing the solid-state anaerobic fermentation of tobacco stem. The results showed that solid-state anaerobic fermentation could reduce the pH value of tobacco stem to varying degrees, and the pH value of tobacco stem fermented by lactic acid bacteria was reduced from 6.05 to 4.50 ~ 4.60. After 4 days of fermentation, the degradation effect of lactic acid bacteria RG on pectin degradation was the most obvious and the degradation rate of pectin in tobacco stem reached 87.75%. The degradation effect of lactic acid bacteria MAS on cellulose was the most obvious and the cellulose quality score decreased from 20.83% to 15.90%. Bacillus JD had better lignin and hemicellulose decomposition effect and the quality score of lignin and hemicellulose decreased from 10.91% and 10.66% to 5.55% and 7.40%, respectively.

## 0 前言

烟梗是烟叶的重要组成部分,占烟叶质量的20%~25%<sup>[1]</sup>.烟梗中的非水溶性物质主要是细胞壁,其成分包括果胶、木质素、纤维素、半纤维素等<sup>[2]</sup>.合理利用烟梗,减少香烟烟雾中的有害化学物质,对降低吸烟造成的健康危害具有重要意义.烟梗主要用于制作烟草薄片<sup>[3]</sup>,其细胞壁组分经过热解和燃烧会产生甲醇、甲醛、甲酸等物质,不仅使烟气带有刺激性,而且对人体有害,故而烟草薄片中的烟梗添加量有限<sup>[4]</sup>.若能适当降解烟梗中的细胞壁组分,使烟梗品质更符合卷烟生产的要求,则烟梗的利用率、吸食品质和安全性将会得到有效提高.

利用微生物发酵分解烟梗中的有害生物大分子,提高烟草品质和卷烟吸食品质,降低卷烟吸食危害<sup>[5]</sup>,是当前烟草行业研究的热点.较传统物理化学处理方法,使用生物技术处理烟梗更为科学,可操作性更强.开发低危害性烟草薄片是烟草行业的一个重要研究方向,赵梦醒等<sup>[6]</sup>研究了生物复合酶(纤维素酶和半纤维素酶)处理对烟梗浆料纤维特性的影响,该方法对提升烟草薄片强度和抄造性能均有一定效果,且采用生物复合酶预处理烟梗浆料可有效降低打浆能耗.为降低烟草薄片中的果胶含量,郝辉等<sup>[7]</sup>考察了微紫青霉产果胶酶对果胶降解效果的影响,发现将酶解后的烟梗添加于卷烟

中,可使烟气香气量增加、杂气量减少,卷烟的吸食品质明显提高.

在香烟中添加烟梗会影响吸食品质,现阶段烟梗多添加于低端香烟中<sup>[8]</sup>.利用微生物发酵能对烟梗细胞壁组分进行一定程度的降解,不仅能改善烟梗的吸食品质,提高原料利用率,降低香烟的生产成本,还能降低烟梗中的焦油含量,减少对吸烟者的危害.目前,利用微生物对烟梗进行处理的相关研究较少,且大部分都是采用单一或复合酶制剂对烟梗进行处理,而利用强化微生物固态厌氧发酵处理烟梗的方式尚未见报道.鉴于此,本文拟利用强化微生物(乳酸菌和芽孢杆菌)固态厌氧发酵的方式处理烟梗,以降解其细胞壁组分(果胶、纤维素、半纤维素和木质素),达到改善烟梗吸食品质,提高其在烟草行业利用率的目的.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

烟梗原料,由河南许昌天昌集团有限责任公司提供,阴凉通风处储存备用;葡萄糖标准品、木糖标准品、阿拉伯糖标准品,上海阿拉丁生化科技股份有限公司产;其他化学试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司产.

### 1.2 主要仪器与设备

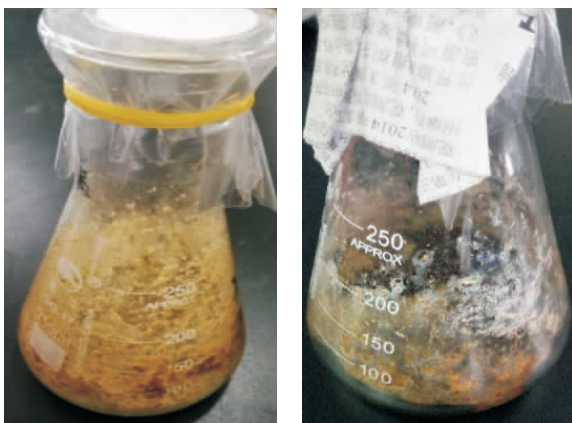
DL29102型真空包装机,得力仪器责任有限公司产;LDZF-30KB-III型高压灭菌锅,上

海申安医疗器械厂产; THZ - 100 型摇床、TY2014003876 型无菌操作台, 上海一恒科学仪器有限公司产; YQX 型厌氧培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司产; TDL - 5 - A 型高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂产; Agilent 1260 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技公司产; TY2014003872 型 pH 计, 郑州仪电科学仪器有限公司产。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 实验菌种的选择** 预实验采用固态好氧发酵方式, 菌种选择黑曲霉和米曲霉。由于烟梗不能进行高温灭菌处理, 所以采用生料强化固态发酵方式将烟梗原料不经过灭菌而直接接种微生物孢子悬液进行发酵。烟梗原料接种后, 置于 30 °C 恒温培养箱发酵, 第 3 d 取样时, 发现烟梗形态出现较大改变(如图 1 所示), 染菌现象严重, 烟梗颜色发生变化, 无法满足烟草行业生产要求, 故放弃固态好氧发酵方式, 改用固态厌氧发酵方式。本实验所用微生物包括乳酸菌 RG、乳酸菌 MSA、乳酸菌 FL、芽孢杆菌 KC、芽孢杆菌 ND 和芽孢杆菌 JD, 均由郑州轻工业大学食品与生物工程学院保存。

**1.3.2 种子培养基的制备** 乳酸菌活化培养



a) 米曲霉发酵烟梗 b) 黑曲霉发酵烟梗

图 1 曲霉固态好氧发酵烟梗效果

Fig. 1 Effect of solid-state anaerobic fermentation of tobacco stem products by *Aspergillus*

基(1000 mL): 蛋白胨 10.0 g, 牛肉膏 10.0 g, 酵母膏 5.0 g, 柠檬酸氢二铵 2.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 吐温 1.0 mL, 乙酸钠 5.0 g,  $K_2HPO_4$  2.0 g,  $MgSO_4$  0.58 g,  $MnSO_4$  0.25 g, 琼脂 18.0 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, 调节 pH 值至 6.2~6.6, 121 °C 灭菌 30 min。

芽孢杆菌活化培养基(1000 mL): 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, NaCl 10.0 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, 使用 5 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 值至 7.2, 121 °C 灭菌 30 min。

**1.3.3 种子液的培养** 乳酸菌液体种子液的培养: 将 3 种乳酸菌菌种分别接入已冷却至室温的乳酸菌活化培养基中, 于 37 °C, 180 r/min 条件下摇床培养 16 h。

芽孢杆菌液体种子液的培养: 将 3 种芽孢杆菌菌种分别接入已冷却至室温的芽孢杆菌活化培养基中, 于 30 °C, 180 r/min 条件下摇床培养 16 h。

**1.3.4 烟梗的固态厌氧发酵** 在种子液中加入适量蒸馏水, 混匀后加入烟梗原料中(最终发酵原料的含水率保持在 50%), 菌种的接种量控制在每克烟梗原料  $1 \times 10^6$  CFU。强化微生物固态厌氧发酵烟梗方式为: 将物料搅拌混匀后装入真空包装袋中, 利用真空包装机封口以达到厌氧发酵的目的(如图 2 所示), 置于 30 °C 恒温培养箱中培养发酵。每种微生物发酵烟梗作 4 个平行样品, 每天定时取出一个样品袋, 考



图 2 烟梗强化微生物固态厌氧发酵方式

Fig. 2 Enhanced microbial solid-state anaerobic fermentation of tobacco stem

查不同发酵时间对样品品质的影响. 发酵后的样品放入冰箱中冷冻保存, 备用.

## 1.4 检测方法

**1.4.1 pH值的检测** 每份样品取1 g置于三角瓶中, 加入50 mL去离子水, 室温下静置2 h, 用pH计检测溶液的pH值.

**1.4.2 果胶降解率的检测** 分别称取5.000 g发酵前后的烟梗样品, 粉碎后过100目筛, 然后参考杨海健等<sup>[9]</sup>的方法对样品中的果胶质量分数进行检测和定量分析. 果胶降解率 $Y$ 的计算公式如下:

$$Y = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

其中,  $A_1$  为发酵后烟梗中的果胶质量分数/%;  $A_0$  为发酵前烟梗中的果胶质量分数/%.

**1.4.3 半纤维素、纤维素和木质素质量分数的检测** 将烟梗样品于105 °C条件下烘干至恒重, 测定样品的干重. 根据美国国家可再生能源实验室提供的两步水解方法<sup>[10]</sup>进行组分分析: 准确称取烘干至恒重的烟梗样品0.300 0 g, 加入3 mL体积分数为72%的 $H_2SO_4$ 溶液, 于30 °C条件下水解反应60 min; 量取84 mL蒸馏水, 将水解液冲洗干净并全部转入100 mL螺口瓶中, 再放入高压灭菌锅中, 于121 °C条件下保温60 min. 待水解液冷却后, 用漏斗抽滤, 采用液相色谱分析滤液中的葡萄糖( $C_{glu}$ )、木糖( $C_{xyl}$ )和阿拉伯糖( $C_{ara}$ )的质量分数, 进而计算纤维素和半纤维素的质量分数. 将滤渣于105 °C条件下烘干至恒重, 记为 $W_1$ , 然后在马弗炉中于550 °C条件下灼烧2 h, 冷却后称重, 记为 $W_2$ , 进而计算木质素的质量分数. 计算公式如下:

$$C_{\text{纤维素}} = \frac{C_{\text{glu}} \times 87 \times 0.90 \times 10^{-3}}{0.3000} \times 100\% \quad (1)$$

$$C_{\text{半纤维素}} = \frac{(C_{\text{xyl}} + C_{\text{ara}}) \times 87 \times 0.88 \times 10^{-3}}{0.3000} \times 100\% \quad (2)$$

$$C_{\text{木质素}} = \frac{W_1 - W_2}{0.3000} \times 100\% \quad (3)$$

液相色谱分析的具体程序为: 液体样品经0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 进样量为20  $\mu\text{L}$ ; 分析柱为Biorad Aminex HPX-87H色谱柱(300 mm  $\times$  7.8 mm), 柱温为65 °C; 流动相为0.005 mol/L的 $H_2SO_4$ 溶液, 流速为0.5 mL/min; 用示差遮光检测器进行分析检测.

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵烟梗 pH 值变化分析

不同微生物固态厌氧发酵烟梗的pH值变化如图3所示. 由图3可以看出, 在固态厌氧发酵过程中, 烟梗的pH值均有不同程度的降低, 特别是由乳酸菌发酵的烟梗, pH值由6.05降至4.50~4.60之间. 这主要是厌氧发酵的特性所决定的: 原料中的微生物特别是乳酸菌在密闭条件下厌氧发酵, 产生的有机酸会使原料的pH值降低, 进而抑制其他有害杂菌(如各种好氧的腐败菌、霉菌等)的活动<sup>[11]</sup>, 这也解释了曲霉好氧发酵烟梗更容易染菌的原因. 另外, 徐峻等<sup>[12]</sup>研究发现, 烟草pH值的降低可使烟气的柔和程度明显上升. 因此, 经微生物固态厌氧发

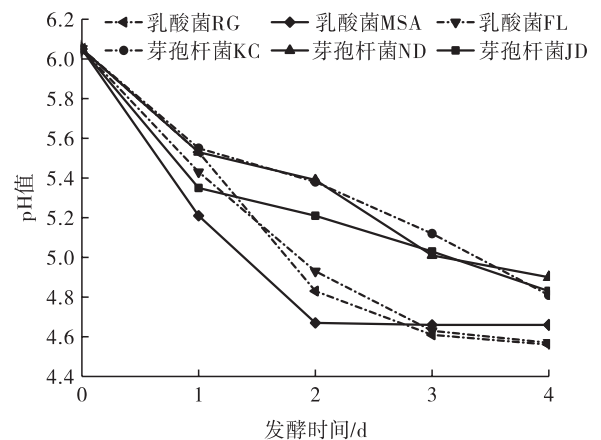


图3 不同微生物固态厌氧发酵烟梗的pH值变化  
Fig. 3 Changes of pH value of tobacco stem by solid-state anaerobic fermentation with different microorganisms

酵的烟梗样品,其吸食品质明显改善,在香烟生产过程中的利用率显著提高。

### 2.2 发酵烟梗果胶降解情况分析

烟草中的果胶是亲水性胶体,可改善烟草原料的吸湿性和弹性,但果胶在高温燃烧过程中可分解产生甲醇,对烟草的品质不利<sup>[13]</sup>;另外,果胶质量分数过高会产生呛咳、辛辣灼烧等感官刺激,对吸食者的健康不利<sup>[14]</sup>。因此,降低烟草制品中的果胶质量分数一直受到业内研究人员的重视。不同微生物固态厌氧发酵烟梗的果胶降解情况如图4所示。由图4可以看出,经微生物厌氧发酵处理后,芽孢杆菌KC对果胶的降解无明显作用;乳酸菌RG对果胶的降解效果最为明显,发酵2 d后,果胶降解率可达66.73%,发酵4 d后,果胶降解率可达87.75%。

### 2.3 发酵烟梗纤维素、半纤维素和木质素降解情况分析

烟梗固态厌氧发酵前后细胞壁组分的变化情况见表1。由表1可知,烟梗原料中纤维素质量分数最高,约占烟梗总质量的20.83%,其次为木质素和半纤维素,二者共约占烟梗总质量的21.57%。随着固态厌氧发酵的进行,样品中木质素、纤维素和半纤维素的质量分数都有一定程度的降低。其中,乳酸菌MAS降解纤维素

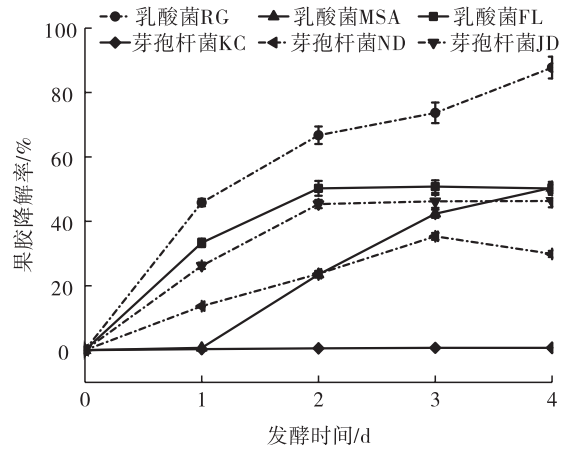


图4 不同微生物固态厌氧发酵烟梗的果胶降解情况

Fig. 4 Pectin degradation of tobacco stem by solid-state anaerobic fermentation with different microorganisms

最为明显,发酵4 d后,纤维素质量分数由20.83%降至15.90%;芽孢杆菌JD可较好地分解木质素和半纤维素,发酵4 d后,木质素和半纤维素质量分数分别由10.91%和10.66%降至5.55%和7.40%。这说明在强化微生物固态厌氧发酵过程中,微生物代谢产生了适量的纤维素酶、半纤维素酶和木质素降解酶系<sup>[15]</sup>。经过强化微生物固态厌氧发酵之后,烟梗细胞壁组分质量分数明显降低,可在一定程度上减

表1 烟梗固态厌氧发酵前后细胞壁组分质量分数的变化情况

Table 1 Changes of cell wall components in tobacco stem before and after solid-state anaerobic fermentation

组别	发酵时间/d	质量分数/%			组别	发酵时间/d	质量分数/%		
		木质素	纤维素	半纤维素			木质素	纤维素	半纤维素
原料	0	10.91	20.83	10.66	原料	0	10.91	20.83	10.66
乳酸菌RG	1	10.23	19.36	10.55	芽孢杆菌KC	1	9.62	20.10	9.92
乳酸菌RG	2	9.63	17.32	10.12	芽孢杆菌KC	2	7.48	19.36	8.87
乳酸菌RG	3	9.37	17.63	10.17	芽孢杆菌KC	3	7.09	19.42	8.96
乳酸菌RG	4	9.14	17.95	10.18	芽孢杆菌KC	4	6.99	19.38	8.67
乳酸菌MSA	1	10.53	17.64	10.52	芽孢杆菌ND	1	8.36	19.32	8.35
乳酸菌MSA	2	10.34	15.86	10.43	芽孢杆菌ND	2	6.46	19.60	7.94
乳酸菌MSA	3	10.21	15.88	10.33	芽孢杆菌ND	3	6.36	19.72	7.85
乳酸菌MSA	4	10.10	15.90	10.12	芽孢杆菌ND	4	6.25	19.75	7.71
乳酸菌FL	1	9.92	20.32	10.23	芽孢杆菌JD	1	10.31	19.83	9.37
乳酸菌FL	2	8.60	19.62	9.76	芽孢杆菌JD	2	10.26	19.13	7.67
乳酸菌FL	3	8.03	19.71	9.77	芽孢杆菌JD	3	6.45	17.29	7.52
乳酸菌FL	4	7.92	19.76	9.98	芽孢杆菌JD	4	5.55	16.97	7.40

轻抽吸时的刺激性<sup>[16]</sup>。

### 3 结论

本文利用不同微生物(乳酸菌和芽孢杆菌)对烟梗进行强化固态厌氧发酵处理,以降低烟梗原料细胞壁组分(果胶、纤维素、半纤维素和木质素)的质量分数。结果表明:固态厌氧发酵可降低烟梗样品的 pH 值,其中乳酸菌发酵烟梗的 pH 值由 6.05 降至 4.50~4.60 之间;固态厌氧发酵 4 d 后,乳酸菌 RG 对果胶的降解效果最明显,果胶的降解率可达 87.75%;固态厌氧发酵对纤维素、半纤维素和木质素均具有一定的降解作用,其中乳酸菌 MAS 降解纤维素最为明显,发酵 4 d 后,纤维素质量分数由 20.83% 降至 15.90%,而芽孢杆菌 JD 可较好地分解木质素和半纤维素,发酵 4 d 后,木质素和半纤维素质量分数分别由 10.91% 和 10.66% 降至 5.55% 和 7.40%。

本文通过强化微生物固态厌氧发酵烟梗,达到了降低烟梗细胞壁组分、改善烟梗吸食品质、提高烟梗适用性的目的。后续需要深入研究乳酸菌和芽孢杆菌在固态厌氧发酵过程中的产酶规律,明确和优化细胞壁组分降解的工艺条件,以达到同时最大化降解果胶、纤维素、半纤维素和木质素的目的。

### 参考文献:

- [1] 施林燕. 微生物发酵及酶解烟梗物料的研究[D]. 无锡:江南大学,2012.
- [2] XUE F, LI D L, FENG G L, et al. Effect of tobacco stem treated by steam explosion on the release of harmful chemicals in cigarette smoke[J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2014, 26(2): 451.
- [3] 许春平, 曲利利, 姜宇, 等. 微紫青霉果胶酶降解再造烟叶高浓混合浆中果胶的研究[J]. *轻工学报*, 2019, 34(1): 27.
- [4] 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.
- [5] 彭邱强. 天顺公司烟梗废弃物再利用方案研究[D]. 长沙:中南大学,2012.
- [6] 赵梦醒, 王燕燕, 王昊, 等. 生物酶预处理对烟梗浆料纤维特性的影响[J]. *中国造纸*, 2020, 39(7): 51.
- [7] 郝辉, 陈芝飞, 宋金勇, 等. 微紫青霉发酵产果胶酶降解烟梗果胶的条件优化及产物分析[J]. *西南农业学报*, 2015, 28(6): 2756.
- [8] 马海昌. 生物法处理烟梗制备天然烟用香料的研究[D]. 广州:华南理工大学,2013.
- [9] 杨海健, 丁红营, 于国东, 等. 咔唑比色法测定造纸法再造烟叶中的果胶含量[J]. *分析实验室*, 2012, 31(6): 2012.
- [10] SLUITER A, HAMES B, RUIZ R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass[R]. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2011.
- [11] HOLZER M, MAYRHUBER E, DANNER H, et al. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation[J]. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(6): 282.
- [12] 徐峻, 蔡兵. 烟草 pH 值对烟气烟碱的影响[J]. *广州化工*, 2010, 38(11): 119.
- [13] 李春光, 王需显, 郜海民, 等. 一种新的烟草感官品质对比评价方法[J]. *轻工学报*, 2020, 35(4): 34.
- [14] WANG Z Y, SHAO Y, ZHOU Q M, et al. The pectin and its influence on tobacco physiology and quality[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(1): 130.
- [15] 宋鹏. 微生物发酵降低卷烟烟气中有害成分及提高卷烟质量的研究[D]. 西安:西北大学,2008.
- [16] 韩迎迎. 果胶酶处理烟梗片基的研究[D]. 广州:华南理工大学,2014.