



齐汉如, 欧阳少丰, 李玉, 等. 果胶酶粗酶液与漆酶粗酶液复配酶解膨胀梗丝的工艺优化[J]. 轻工学报, 2025, 40(4): 96-107.
QI H R, OUYANG S F, LI Y, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis process for expanded tobacco cut stem using combined crude enzymes of pectinase and laccase[J]. Journal of Light Industry, 2025, 40(4): 96-107.
DOI: 10.12187/2025.04.011

果胶酶粗酶液与漆酶粗酶液复配酶解膨胀梗丝的工艺优化

齐汉如¹, 欧阳少丰¹, 李玉², 杨雪鹏¹, 赵建国²

1. 郑州轻工业大学 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001;
2. 郑州轻工业大学 环境污染治理与生态修复河南省协同创新中心, 河南 郑州 450001

摘要: 对从烟田土壤和腐朽烟梗中筛选获得产果胶酶菌株 TS-1 和产漆酶菌株 TS-2 进行形态学观察和分子生物学鉴定, 通过单因素试验优化二者的产酶条件, 并将果胶酶粗酶液与漆酶粗酶液复配酶解膨胀梗丝, 研究膨胀梗丝感官品质及致香成分的变化。结果表明: 菌株 TS-1 和 TS-2 分别鉴定为黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*), 二者最优产果胶酶和漆酶条件分别为烟梗粉质量浓度 50 g/L、发酵温度 30 ℃、发酵 pH 值 6.0 及烟梗粉质量浓度 50 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度 0.6 g/L、发酵温度 30 ℃。果胶酶粗酶液、漆酶粗酶液酶解膨胀梗丝中果胶和木质素的最优条件分别为果胶酶粗酶液添加量 240 U/g、酶解时间 4.0 h、液质比 1:2、酶解温度 30 ℃ 及漆酶粗酶液添加量 2.0 U/g、酶解时间 3.5 h、液质比 1:2、酶解温度 30 ℃。膨胀梗丝酶解的最优粗酶液复配条件为果胶酶粗酶液添加量 170 U/g、漆酶粗酶液添加量 1.5 U/g、酶解时间 3.0 h, 酶解后其感官评吸得分较未酶解膨胀梗丝提高了 8.2 分, 致香成分含量明显增加。

关键词: 烟梗; 果胶酶; 漆酶; 酶解工艺; 膨胀梗丝; 感官品质; 致香成分

中图分类号: TS422 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2025)04-0096-12

0 引言

烟梗是烟草加工过程中不可避免的副产物, 其质量约占烟叶总质量的 25%, 如将其焚烧或随意丢弃, 可能会污染大气、水体、土壤等环境^[1]。现阶段, 烟梗主要用于制备膨胀梗丝和再造烟叶以提高卷烟产量, 增强卷烟的填充性和燃烧性, 降低卷烟

烟气中烟碱、一氧化碳、焦油等有害成分含量^[2]。然而, 烟梗中香味成分、香味前体物等的含量较低, 木质素、果胶、纤维素等大分子物质的含量较高, 将其应用于卷烟生产中会增加卷烟的木质气、杂气、刺激性等感官缺陷^[2]。另外, 烟梗中的木质素是卷烟燃烧过程中稠环芳烃、芳香胺、醛类等有害物质的主要来源^[3]。因此, 为提高烟梗在卷烟中的高质化利用水平, 需降低烟梗中木质素、果胶等物质的含量。

收稿日期: 2024-11-01; 修回日期: 2024-12-24; 出版日期: 2025-08-15

基金项目: 中国烟草总公司重点研发专项项目(110202102020); 河南省科技攻关项目(242102320122)

作者简介: 齐汉如(2000—), 女, 河南省信阳市人, 郑州轻工业大学硕士研究生, 主要研究方向为烟草微生物开发与利用。
E-mail: 2102704433@qq.com

通信作者: 赵建国(1987—), 男, 山东省潍坊市人, 郑州轻工业大学讲师, 博士, 主要研究方向为微生物发酵。E-mail: 2016020@zzuli.edu.cn

酸/碱处理、微生物降解、生物酶酶解等方法均能破坏烟梗的细胞壁结构,降低烟梗中木质素、果胶、纤维素等物质含量^[4]。然而,酸/碱处理会引入多种化学试剂,且需对试剂定量、残留等进行深入研究^[4-5]。细菌、放线菌、真菌等微生物可用于降解烟梗中的木质素、果胶、纤维素等成分^[6-7],如霍氏肠杆菌和芽孢杆菌发酵可降低烟叶中果胶、烟碱、蛋白质等物质含量,提高巨豆三烯酮、大马酮等香味成分含量,显著提升烟叶感官品质^[8-9];黑曲霉代谢过程中会分泌果胶酶等胞外酶,可促进茶叶和烟叶中多酚类物质的释放,提高香气物质含量^[10-11];利用白腐真菌菌液发酵烟梗,可降低烟梗中的木质素含量,增加糖类物质含量,提升烟梗在卷烟中的利用效率^[12]。然而,温度、pH 值、底物等条件会影响微生物的代谢,导致烟梗的发酵条件难以控制^[7-9]。已有研究^[6,13]证实,微生物代谢过程中分泌的漆酶、过氧化物酶、果胶酶等胞外酶是酶解烟梗中木质素、果胶等物质的主要酶系。相较于微生物发酵,直接利用微生物分泌的胞外酶酶解烟梗更简便,其酶解条件也更易控制。此外,目前关于胞外酶酶解烟梗后致香成分变化和感官品质评价的报道仍较少。

基于此,本文拟对从烟田土壤和腐朽烟梗中筛选获得的产果胶酶菌株 TS-1 和产漆酶菌株 TS-2 进行形态学观察和分子生物学鉴定,优化二者发酵烟梗粉产果胶酶和漆酶的条件,研究最优条件下所得果胶酶粗酶液与漆酶粗酶液单独或复配酶解膨胀梗丝中果胶和木质素的最优条件,分析酶解后膨胀梗丝的感官品质及致香成分变化,以期在不引入其他外源成分的前提下降低烟梗中果胶、木质素等的含量,进而提高烟梗的高质化利用水平。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂与仪器

主要材料:菌株 TS-1(产果胶酶)和 TS-2(产漆酶),分别从河南烟田土壤和腐朽烟梗中筛选获得;烟梗粉,打叶复烤的烟梗经切断和筛分后,研磨过 200 目筛获得;膨胀梗丝,来自河南中烟生产线。

主要试剂:D-半乳糖醛酸(标准品),果胶、2,2'-

联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、吡啶、 α -萘酚、愈创木酚、乙酸、乙醇,均为分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司;3,5-二硝基水杨酸试剂(DNS 试剂)、马铃薯提取物(生物试剂),上海源叶生物科技有限公司;(NH₄)₂SO₄、MgSO₄、CoCl₂、葡萄糖、尿素、NH₄NO₃、乙酸钠、盐酸,均为分析纯,天津市大茂化学试剂厂;Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒,上海生工生物工程股份有限公司;木质素含量检测试剂盒(乙酰化法),北京索莱宝科技有限公司。

主要仪器:GR85DA 型高压蒸汽灭菌锅,致微仪器有限公司;DGG-9140 型电热恒温鼓风干燥箱,上海森信实验仪器有限公司;SHP-150 型生化培养箱,上海森信实验仪器有限公司;SW-CJ-ID 型超净操作台,苏州净化有限公司;KBF240 型恒温恒湿箱,上海捷沪仪器仪表有限公司;ZQWY-200S 型恒温摇床,上海知楚仪器有限公司;UV-PC 1800 型紫外-可见分光光度计,上海精密仪器仪表有限公司;5975C 型气相色谱-质谱联用(GC-MS)仪,美国安捷伦公司。

1.2 主要培养基

PDA 培养基:马铃薯提取物 4 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1000 mL。

产果胶酶固体培养基:果胶 20 g、马铃薯提取物 4 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1000 mL。

产漆酶固体培养基:愈创木酚 0.4 g、马铃薯提取物 4 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1000 mL。

产果胶酶液体培养基:烟梗粉 40 g、蒸馏水 1000 mL。

产漆酶液体培养基:烟梗粉 40 g、(NH₄)₂SO₄ 0.4 g、K₂HPO₄ 0.4 g、NaH₂PO₄ 0.2 g、微量元素溶液 20 mL、蒸馏水 1000 mL。

微量元素溶液:MgSO₄ 1 g、NaCl 1 g、FeSO₄·7H₂O 0.2 g、CuSO₄ 0.7 g、MnSO₄ 0.6 g、CoCl₂ 0.1 g、蒸馏水 1000 mL。

上述培养基均在 121 ℃ 条件下灭菌 20 min。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株形态学观察和鉴定 将菌株 TS-1 接种

至产果胶酶固体培养基上,30 ℃条件下培养 72 h;将菌株 TS-2 接种至产漆酶固体培养基上,30 ℃条件下培养 96 h。观察菌株 TS-1 和 TS-2 的形态特征。

采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒分别提取菌株 TS-1 和 TS-2 的基因组 DNA,利用引物 ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)和 ITS4(TCCTCGCTTATTGATATGC)进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。切割电泳图谱中的目的条带,采用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化扩增 DNA 后,由生工生物工程(上海)股份有限公司测序并将基因提交至 NCBI 数据库进行 BLAST 比对。利用 MEGA 6.0 软件构建菌株 TS-1 和 TS-2 的系统发育树。

1.3.2 产果胶酶粗酶液条件优化 将菌株 TS-1 接种至 PDA 固体培养基上,35 ℃条件下培养 3 d 后,加入灭菌生理盐水,用棉签轻轻刮下孢子后转移至试管中,将孢子振荡分散后用无菌水稀释至 OD_{650} 为 1.00 ± 0.05 。将孢子液按照 1% 的接种量接种至 100 mL 产果胶酶液体培养基后,于 30 ℃、200 r/min 恒温摇床中发酵 120 h,每隔 24 h 取适量混匀的发酵液,在 4 ℃、8000 r/min 条件下离心 5 min,上清液即为果胶酶粗酶液,测定果胶酶活性以优化发酵时间。

通过测定粗酶液中果胶酶活性探究影响菌株 TS-1 发酵的单因素条件。首先,调整产果胶酶液体培养基中烟梗粉质量浓度分别为 40 g/L、50 g/L、60 g/L 和 70 g/L,于 30 ℃、200 r/min 条件下发酵 72 h,确定最优烟梗粉质量浓度;其次,控制培养基中烟梗粉质量浓度为 50 g/L,调整发酵温度分别为 25 ℃、30 ℃、35 ℃和 40 ℃,于 200 r/min 条件下发酵 72 h,确定最优发酵温度;再次,控制培养基中烟梗粉质量浓度为 50 g/L,调整发酵 pH 值分别为 3.0、4.5、6.0 和 7.5,于 30 ℃、200 r/min 条件下发酵 72 h,确定最优发酵 pH 值。

1.3.3 产漆酶粗酶液条件优化 将菌株 TS-2 接种至 PDA 固体培养基平板中,35 ℃培养 5~7 d,待菌丝完全覆盖平板后,取边缘 4 cm² 的菌丝接种至 100 mL 产漆酶液体培养基中,于 30 ℃、200 r/min

恒温摇床中发酵 192 h,每隔 24 h 取适量混匀的发酵液,在 4 ℃、8000 r/min 条件下离心 5 min,上清液即为漆酶粗酶液,测定漆酶活性以优化发酵时间。

通过测定粗酶液中漆酶活性探究影响菌株 TS-2 发酵的单因素条件。首先,调整产漆酶液体培养基中烟梗粉质量浓度分别为 40 g/L、50 g/L、60 g/L 和 70 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度为 0.4 g/L,于 30 ℃、200 r/min 条件下发酵 7 d,确定最优烟梗粉质量浓度;其次,控制培养基中烟梗粉质量浓度为 50 g/L,氮源分别选用尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、酵母浸粉,其质量浓度均为 0.4 g/L,于 30 ℃、200 r/min 条件下发酵 7 d,确定最优氮源类型;再次,控制培养基中烟梗粉质量浓度为 50 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度分别为 0.2 g/L、0.4 g/L、0.6 g/L 和 0.8 g/L,于 30 ℃、200 r/min 条件下发酵 7 d,确定最优 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度;最后,控制培养基中烟梗粉和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度分别为 50 g/L 和 0.6 g/L,调整发酵温度分别为 25 ℃、30 ℃、35 ℃和 40 ℃,于 200 r/min 条件下发酵 7 d,确定最优发酵温度。

1.3.4 果胶酶和漆酶活性测定 果胶酶活性的测定采用 DNS 试剂法^[13]。取 0.1 mL 稀释 5 倍的果胶酶粗酶液和 0.9 mL 果胶溶液(1 g/L),混匀后在 50 ℃水浴预热 5 min,反应 30 min 后加入 1.5 mL DNS 试剂,沸水浴 10 min,冷却至室温后定容至 10 mL,测定其在 540 nm 处吸光度,对照组为灭活果胶酶粗酶液。1 mL 果胶酶粗酶液 1 min 水解果胶生成 1 μg D-半乳糖醛酸定义为 1 个酶活单位,其计算公式如下:

$$\text{果胶酶活性} = \frac{\Delta OD \times N \times 1000 \times (V_{\text{总}}/V_{\text{酶}})}{t}$$

式中, ΔOD 为实验组与对照组的吸光度差值, N 为稀释倍数, $V_{\text{总}}$ 为反应液总体积/mL, $V_{\text{酶}}$ 为稀释后果胶酶粗酶液体积/mL, t 为反应时间/min。

漆酶活性的测定采用 ABTS 法^[14]。将 0.274 g ABTS 溶于 100 mL pH 值为 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液中混匀,取 0.6 mL 混合液和 0.3 mL 漆酶粗酶液混匀,30 ℃水浴反应 3 min 后,测定 540 nm 处吸光度,对照组为灭活漆酶粗酶液。1 mL 漆酶粗酶液 1 min 氧化 1 nmol 底物 ABTS 所需的漆酶量定义为

1 个酶活单位,其计算公式如下:

$$\text{漆酶活性} = \frac{\Delta OD \times V_{\text{总}} \times 10^9}{\varepsilon \times d \times V_{\text{样}} \times t}$$

式中, ε 为 ABTS 摩尔消光系数($36\,000\text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$), d 为比色皿光径(1 cm), $V_{\text{样}}$ 为漆酶粗酶液体积/ mL 。

1.3.5 膨胀梗丝中主要化学成分测定 将洗涤后的待测膨胀梗丝样品于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下干燥至恒重,研磨过 40 目筛。果胶的测定采用酸解法^[13]。木质素的测定参考 Solarbio 木质素含量检测试剂盒(乙酰化法)操作说明。纤维素、半纤维素、淀粉和蛋白质的测定参照烟草行业标准中的方法执行^[15-17]。

1.3.6 2 种粗酶液单独酶解膨胀梗丝条件优化

将果胶酶粗酶液和漆酶粗酶液分别均匀喷洒至膨胀梗丝表面进行酶解,期间覆盖保鲜膜以防止水分散失,设置喷洒灭活粗酶液为对照组。酶解结束后,将膨胀梗丝置于 $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥 5 min 后,于温度(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度(60 ± 2)% 恒温恒湿箱中平衡 24 h,分别考查粗酶液添加量、酶解时间、液质比(反应液体积与膨胀梗丝质量之比, mL/g ,下同)和酶解温度对降解膨胀梗丝中果胶和木质素的影响。

针对果胶酶粗酶液酶解膨胀梗丝,首先,将果胶酶粗酶液分别以添加量 80 U/g 、 160 U/g 、 240 U/g 和 320 U/g 均匀喷洒至膨胀梗丝表面,于液质比 $1:2$ 和 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下酶解 3.0 h ,优化降解膨胀梗丝中果胶的果胶酶粗酶液添加量;其次,将果胶酶粗酶液(240 U/g)均匀喷洒至膨胀梗丝表面,于液质比 $1:2$ 和 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下分别酶解 2.5 h 、 3.0 h 、 3.5 h 和 4.0 h ,优化降解膨胀梗丝中果胶的酶解时间;再次,将果胶酶粗酶液(240 U/g)均匀喷洒至膨胀梗丝表面,调整其液质比分别为 $1:1$ 、 $1:2$ 、 $1:3$ 和 $1:4$,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下酶解 4.0 h ,优化降解膨胀梗丝中果胶的液质比;最后,将果胶酶粗酶液(240 U/g)均匀喷洒至膨胀梗丝表面,调整其液质比为 $1:2$,分别于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下酶解 4.0 h ,优化降解膨胀梗丝中果胶的酶解温度。

针对漆酶粗酶液酶解膨胀梗丝,首先,将漆酶粗酶液分别以添加量 0.5 U/g 、 1.0 U/g 、 1.5 U/g 和 2.0 U/g 均匀喷洒至膨胀梗丝表面,于液质比 $1:2$

和 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下酶解 3.0 h ,优化降解膨胀梗丝中木质素的漆酶粗酶液添加量;其次,将漆酶粗酶液(2.0 U/g)均匀喷洒至膨胀梗丝表面,于液质比 $1:2$ 和 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下分别酶解 2.5 h 、 3.0 h 、 3.5 h 和 4.0 h ,优化降解膨胀梗丝中木质素的酶解时间;再次,将漆酶粗酶液(2.0 U/g)均匀喷洒至膨胀梗丝表面,调整其液质比分别为 $1:1$ 、 $1:2$ 、 $1:3$ 和 $1:4$,于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下酶解 3.5 h ,优化降解膨胀梗丝中木质素的液质比;最后,将漆酶粗酶液(2.0 U/g)均匀喷洒至膨胀梗丝表面,调整其液质比为 $1:2$,分别于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下酶解 3.5 h ,优化降解膨胀梗丝中木质素的酶解温度。

1.3.7 2 种粗酶液复配条件优化

基于果胶酶粗酶液和漆酶粗酶液分别酶解膨胀梗丝中果胶和木质素的最优条件,以果胶酶粗酶液添加量(A)、漆酶粗酶液添加量(B)和酶解时间(C)为变量,以感官评吸得分(R)为指标,采用 Box-Behnken 响应面法优化 2 种粗酶液复配及酶解时间对膨胀梗丝感官质量的影响。具体而言,调整喷洒至膨胀梗丝表面的果胶酶粗酶液添加量($80\sim 240\text{ U/g}$)和漆酶粗酶液添加量($1.0\sim 2.0\text{ U/g}$),混合均匀后,在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下酶解 $2.0\sim 4.0\text{ h}$,酶解期间覆盖保鲜膜以防止水分散失。酶解结束后,将膨胀梗丝于 $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥 5 min ,而后置于温度(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度(60 ± 2)% 的恒温恒湿箱中平衡处理 24 h。

将平衡后的膨胀梗丝卷制成卷烟,于恒温恒湿箱中平衡水分 48 h,由经过正规培训的 7 位评吸人员根据《烤烟 烟叶质量风格特色感官评价方法》(YC/T 530—2015)^[18],从香气、协调性、杂气、刺激性和余味 5 个方面评价卷烟的感官品质,总分为 100 分。取所有评吸人员的平均分为最终评吸得分,分数越高表示膨胀梗丝的感官品质越好。为降低主观感觉对评吸得分的影响,设置未经复配粗酶液酶解的膨胀梗丝为对照组,处理条件与复配粗酶液酶解膨胀梗丝的条件一致,其评吸得分平均分为 63.0 分。采用 Design-Expert 13 软件分析实验数据。

1.3.8 膨胀梗丝酶解后致香成分测定

利用 GC-MS 仪定量分析膨胀梗丝酶解后的致香成分,并与未酶解的膨胀梗丝进行对比分析。

膨胀梗丝的处理条件:取 1.0 g 平衡 48 h 的膨胀梗丝,粉碎后,于 5 mL pH 值为 3.0 的磷酸缓冲液中涡旋振荡 5 min,静置 20 min,加入 4.5 mL 二氯甲烷、0.5 mL 1.032 g/L 的乙酸苯乙酯内标,20 ℃ 静置 15 min,继续涡旋振荡 5 min,离心取有机相,加入适量无水 Na_2SO_4 后振荡,于 4 ℃、8000 r/min 条件下离心 5 min,过 0.22 μm 有机膜,待测。

GC-MS 条件:DB-5 MS 型色谱柱(50 m×0.25 mm×0.25 μm);进样口温度为 280 ℃;进样量为 10 μL ;进样方式为 1:5 分流;载气为氦气,恒流模式流速为 1.5 mL/min;程序升温过程为初始温度 75 ℃,保持 5 min,以 2 ℃/min 升温至 150 ℃,保持 1 min,以 2 ℃/min 升温至 260 ℃,保持 1 min,以 10 ℃/min 升温至 280 ℃,保持 10 min。

MS 条件:传输线温度为 270 ℃;电子轰击离子源(EI);电离能量为 70 eV;四级杆温度为 150 ℃;离子源温度为 250 ℃;扫描质量范围(z/m)为 150~550 amu。利用 NIST11 及 NIST 谱库检索膨胀梗丝中的致香成分。

1.4 数据分析

为保证数据的可靠性,每个实验操作均重复 3 次,采用 Excel 2021、SPSS 19.0、Origin 9.1 等软件对数据进行分析 and 绘图。

2 结果与讨论

2.1 菌株形态学鉴定结果分析

菌株 TS-1 和 TS-2 的形态特征如图 1 所示。由图 1 可知,培养 72 h 后,菌株 TS-1 的培养基中含有大量菌丝,整体呈黑褐色;培养 96 h 后,菌株 TS-2 整体光滑,呈白色,表面略粗糙。将鉴定的 DNA 序列进行 BLAST 比对并构建系统发育树,结果如图 2 所示。由图 2 可知,菌株 TS-1 和 TS-2 分别与黑曲霉 ATCC 16888(*Aspergillus niger* ATCC 16888)和黄孢原毛平革菌 ATCC24725(*Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725)亲缘关系最近。结合形态特征和测序结果,确定菌株 TS-1 和 TS-2 分别为黑曲霉和黄孢原毛平革菌。

2.2 菌株 TS-1 发酵烟梗条件优化结果分析

将菌株 TS-1 孢子液接种至产果胶酶液体培养基发酵,发现粗酶液中果胶酶活性在 72 h 时达到最

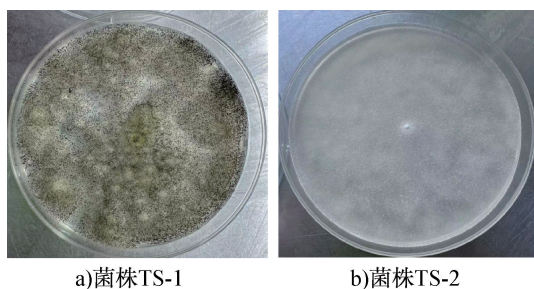


图 1 菌株 TS-1 和 TS-2 的形态特征
Fig. 1 Morphological characteristics of strains TS-1 and TS-2

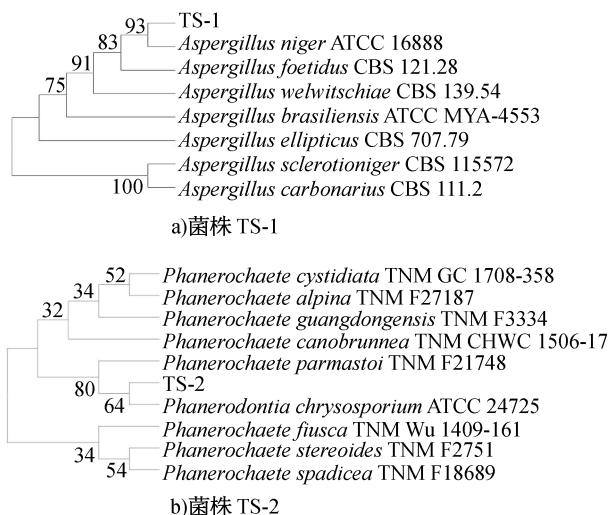


图 2 菌株 TS-1 和 TS-2 的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of strains TS-1 and TS-2

高值,为(672.3±16.2) U/mL,而后随着发酵时间的延长降低。已有研究发现,黑曲霉代谢产果胶酶的活性与发酵底物、培养条件等密切相关,优化以麸皮为碳源的发酵条件后,果胶酶活性可达 4000 U/mL^[19];而利用橘子皮为主要发酵底物,果胶酶活性最高为 264 U/mL^[20]。因此,确定发酵时间为 72 h。

菌株 TS-1 发酵烟梗粉产果胶酶单因素试验结果如图 3 所示。由图 3 可知,当烟梗粉质量分数为 50 g/L 时,果胶酶活性达到最高值,为(778.2±11.8) U/mL,继续提高烟梗粉质量分数,果胶酶活性降低。当发酵温度由 25 ℃ 提高至 40 ℃ 时,果胶酶活性呈现先升高后降低的趋势,30 ℃ 时达到最高值,为(787.9±12.1) U/mL,是 35 ℃ 和 40 ℃ 时的 1.3 倍和 1.5 倍,这表明发酵温度过高会抑制菌株 TS-1 产果胶酶的能力。当发酵 pH 值为 6.0 时,果胶酶活性达到最高值,为(780.5±11.3) U/mL,是 pH 值为 3.0 时的 1.5 倍,这表明菌株 TS-1 发酵产

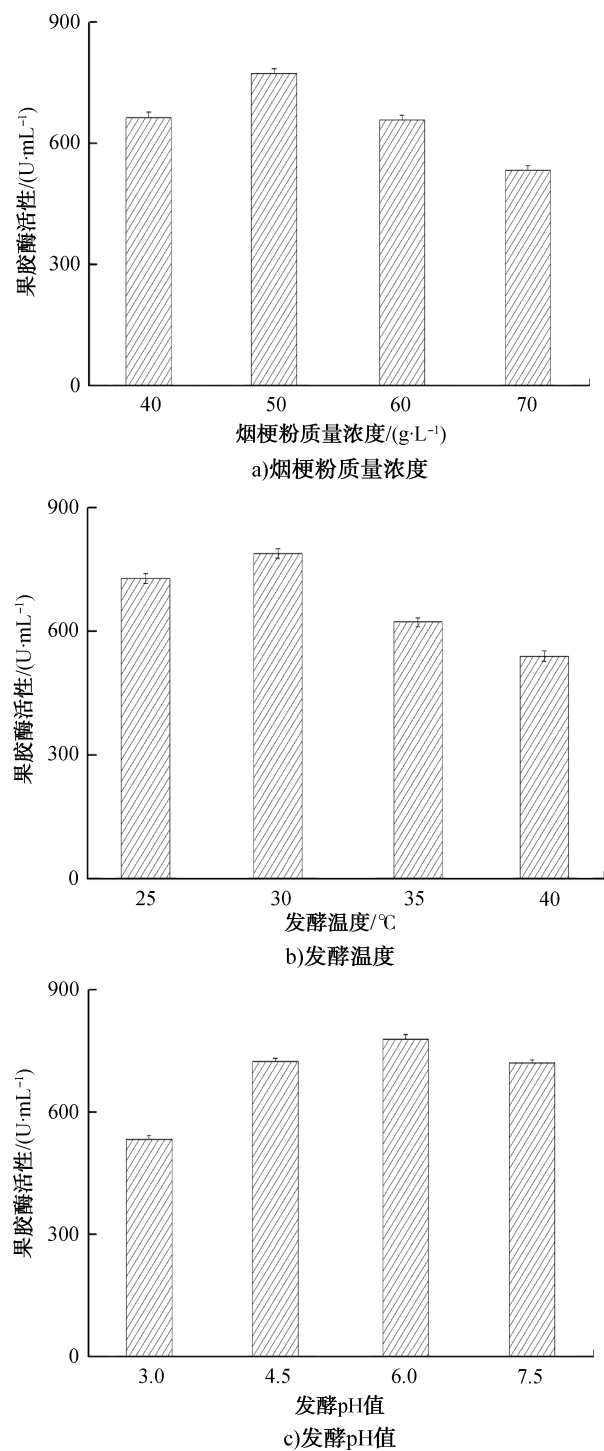


图3 菌株 TS-1 发酵烟梗粉产果胶酶单因素试验结果

Fig. 3 Single-factor optimization results for pectinase production by strain TS-1 using tobacco stem powder as substrate

果胶酶的最适 pH 值为 6.0。综上所述,菌株 TS-1 发酵烟梗粉的最优条件为烟梗粉质量分数 50 g/L、发酵温度 30 ℃和发酵 pH 值 6.0。

2.3 菌株 TS-2 发酵烟梗条件优化结果分析

菌株 TS-2 在产漆酶液体培养基中代谢较慢,在第 6 d 时粗酶液中漆酶活性最高,为(11.4±0.6) U/mL,这符合黄孢原毛平革菌降解木质素的特性^[14]。以木质素为唯一碳源时,黄孢原毛平革菌发酵 6 d 的漆酶活性达到最高值^[14],本研究结果与其基本一致。因此,确定发酵时间为 6 d。

菌株 TS-2 发酵烟梗粉产漆酶的单因素试验结果如图 4 所示。由图 4 可知,当烟梗粉质量浓度为 50 g/L 时,漆酶活性达到最高值,为(18.3±0.3) U/mL,继续提高烟梗粉质量浓度,漆酶活性降低,这可能与底物中过量烟碱会抑制该菌株代谢有关^[7,12]。当氮源为(NH₄)₂SO₄ 和 NH₄NO₃ 时,漆酶活性分别为(19.8±0.3) U/mL 和(15.3±0.2) U/mL,而当氮源为尿素和酵母浸粉时,漆酶活性均较低,分别为(5.2±0.2) U/mL 和(12.4±0.2) U/mL,这表明菌株 TS-2 优先利用无机氮源。当(NH₄)₂SO₄ 质量浓度由 0.2 g/L 升高至 0.8 g/L 时,漆酶活性先升高后降低,最高为(21.1±0.2) U/mL,此时(NH₄)₂SO₄ 质量浓度为 0.6 g/L。郑耀通等^[21]研究也发现,高质量浓度氮源会抑制黄孢原毛平革菌产漆酶的能力。当发酵温度为 30 ℃时,漆酶活性最高,为(21.0±0.3) U/mL,而当发酵温度升高至 40 ℃时,漆酶活性降至(8.3±0.2) U/mL,这表明温度过高会抑制菌株 TS-2 产漆酶的能力。综上所述,菌株 TS-2 发酵烟梗粉的最优条件为烟梗粉质量浓度 50 g/L、(NH₄)₂SO₄ 质量浓度 0.6 g/L 和发酵温度 30 ℃。

2.4 2 种粗酶液单独酶解膨胀梗丝条件优化结果分析

果胶酶粗酶液酶解膨胀梗丝中果胶的单因素试验结果如图 5 所示。由图 5 可知,当果胶酶粗酶液添加量由 80 U/g 提高至 240 U/g 时,果胶降解率由(3.3±0.5)%提高至(14.9±0.7)%,继续提高果胶酶粗酶液添加量至 320 U/g 时,基本不增加果胶的降解率。果胶降解率随酶解时间的延长呈先增加后趋于平缓的趋势,由 2.5 h 时的(7.3±0.3)%提高至 4.0 h 时的(23.3±0.6)%。当液质比为 1:2 时,果胶降解率最高,为(25.2±0.8)%。当酶解

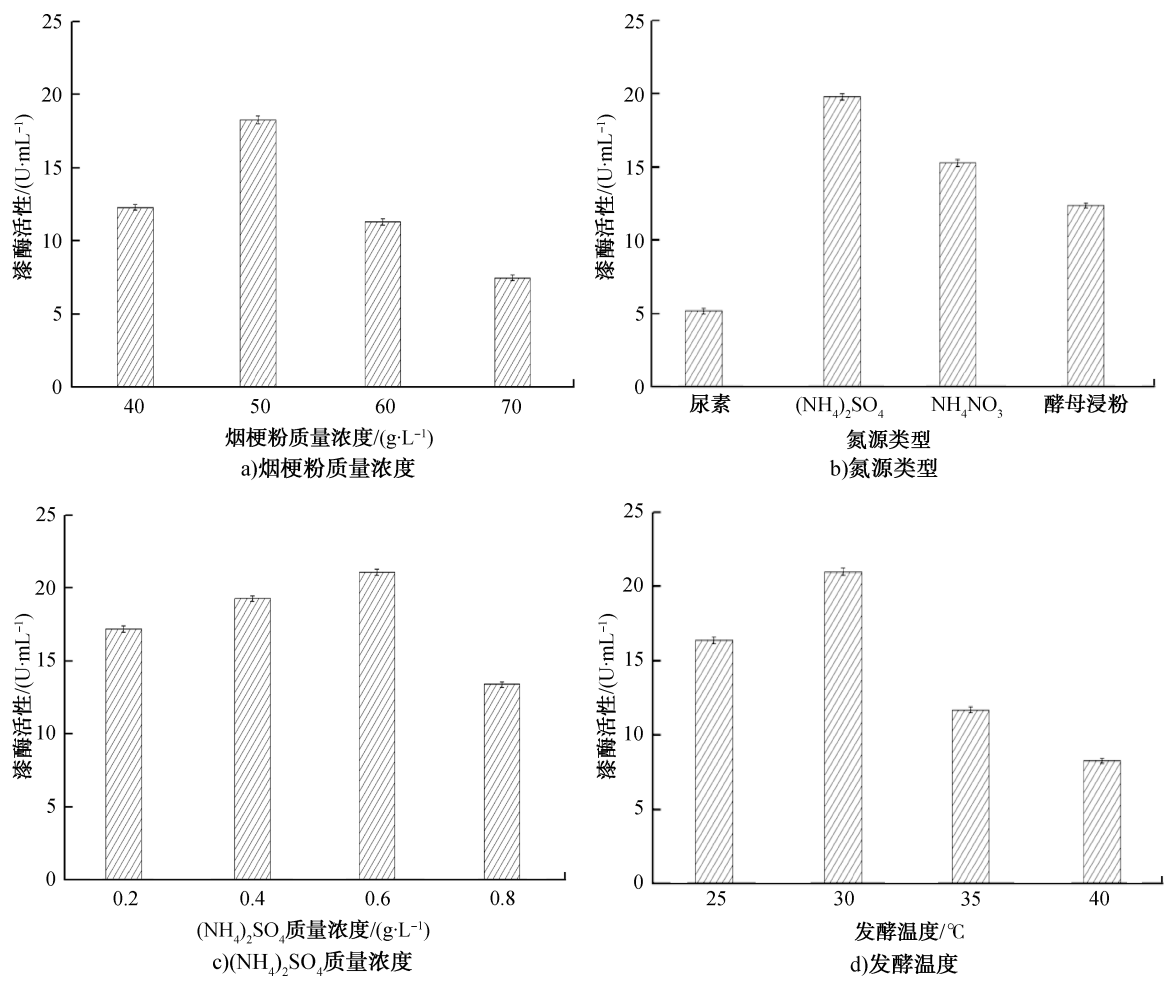


图 4 菌株 TS-2 发酵烟梗粉产漆酶的单因素试验结果
Fig. 4 Single-factor optimization results for laccase production by strain TS-2 using tobacco stem powder as substrate

温度为 30 ℃ 和 40 ℃ 时,果胶降解率分别为(25.9±0.5)%和(26.2±0.7)%,高于酶解温度为 20 ℃ 和 50 ℃ 时的果胶降解率。综上可知,果胶酶粗酶液酶解膨胀梗丝中果胶的最优条件为果胶酶粗酶液添加量 240 U/g、酶解时间 4.0 h、液质比 1 : 2 和酶解温度 30 ℃。

漆酶粗酶液酶解膨胀梗丝中木质素的单因素试验结果如图 6 所示。由图 6 可知,当漆酶粗酶液添加量由 0.5 U/g 提高至 1.5 U/g 时,木质素降解率由(4.7±0.2)%提升至(7.2±0.5)%,继续提高漆酶粗酶液添加量至 2.0 U/g 对木质素降解率的提升效果有限。当酶解时间为 3.5 h 时,木质素降解率为(7.8±0.4)%,与酶解时间为 4.0 h 时基本持平,这可能与漆酶易被氧化失活有关。当液质比为 1 : 2 时,木质素降解率最高,为(7.6±0.4)%。当酶解温

度为 30 ℃ 时,木质素降解率最高,是酶解温度为 50 ℃ 时的 6.8 倍。综上可知,漆酶粗酶液酶解膨胀梗丝中木质素的最优条件为漆酶粗酶液添加量 2.0 U/g、酶解时间 3.5 h、液质比 1 : 2 和酶解温度 30 ℃。

基于上述最优条件进一步酶解膨胀梗丝,并与未酶解膨胀梗丝进行对比,其主要化学成分含量见表 1。由表 1 可知,经两种粗酶液酶解处理后,膨胀梗丝中淀粉、纤维素、半纤维素和蛋白质的含量均稍有下降,但其降解效果总体低于果胶和木质素。

2.5 2 种粗酶液复配对膨胀梗丝感官质量的影响

Box-Behnken 试验设计及感官评吸得分见表 2。不同因素对感官评吸得分 (R) 的多元回归方程为:

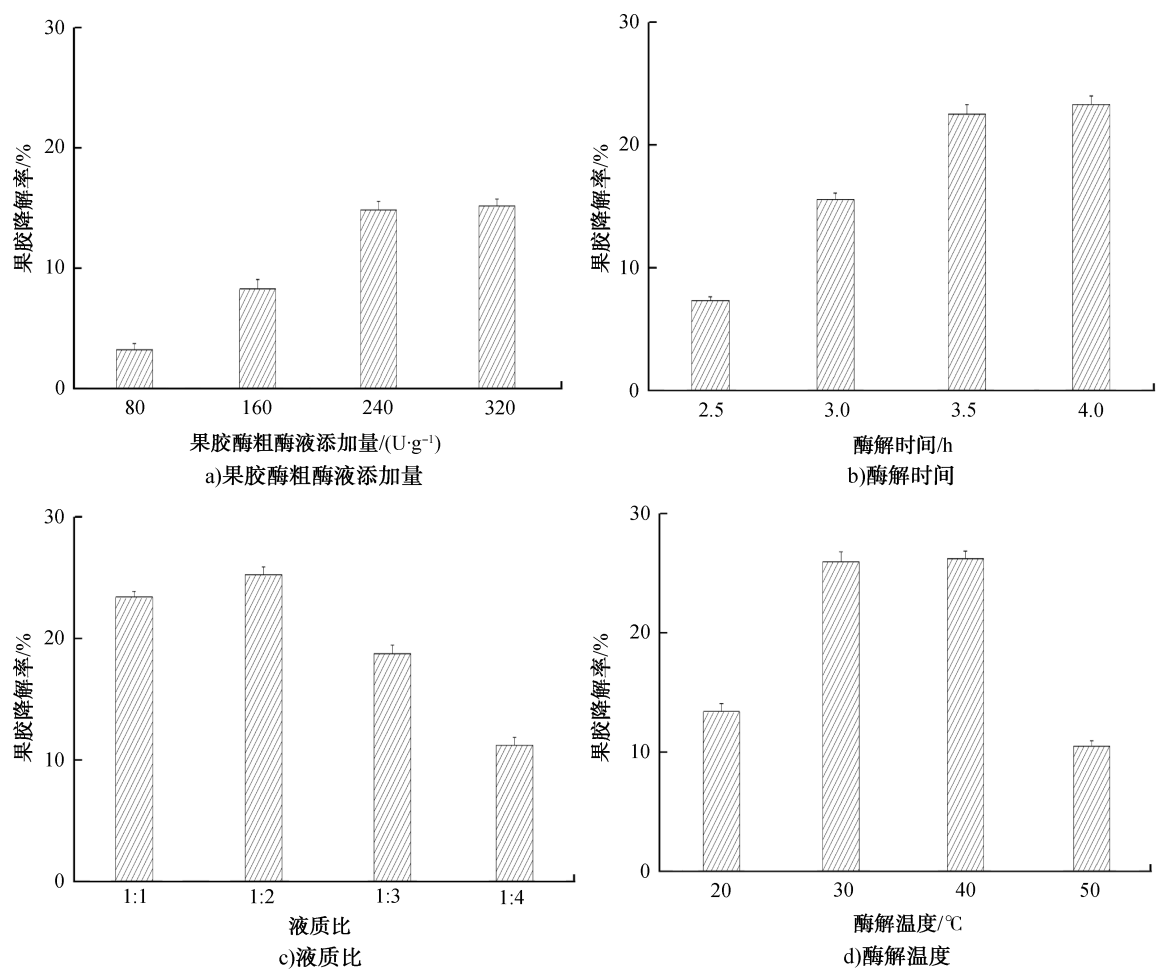


图 5 果胶酶粗酶液酶解膨胀梗丝中果胶的单因素试验结果
Fig. 5 Single-factor optimization results for enzymatic hydrolysis of pectin in expanded tobacco cut stems using crude pectinase

$$R = 69.420\ 0 + 0.025\ 0A + 0.100\ 0B - 0.175\ 0C + 0.225\ 0AB - 0.025\ 0AC + 0.275\ 0BC - 1.200\ 0A^2 - 0.422\ 5B^2 - 1.870\ 0C^2$$

方差分析及显著性检验结果见表 3。由表 3 可知,回归模型 P 值 <0.05 ,失拟项 P 值 >0.05 ,决定系数 R^2 为 0.976,表明该模型回归显著、可靠,可在 97.6%程度上解释感官评吸得分与 3 个变量之间的关系。由 F 值判断,各因素对评吸得分的影响顺序为酶解时间(C)>漆酶粗酶液添加量(B)>果胶酶粗酶液添加量(A)。

不同因素交互作用对感官评吸得分的影响如图 7 所示。由图 7 可知,漆酶粗酶液添加量与果胶酶粗酶液添加量、果胶酶粗酶液添加量与酶解时间、漆酶粗酶液添加量与酶解时间之间的交互作用对感官评吸得分均有影响。酶解时间的响应面弧

度变化较大,其对感官评吸得分影响最显著,其次是漆酶粗酶液添加量和果胶酶粗酶液添加量。利用 Design-Expert 13 期望函数优化程序,以优化感官评吸得分为目标,得到 2 种粗酶液复配酶解膨胀梗丝的最佳工艺参数为漆酶粗酶液添加量 1.51 U/g、果胶酶粗酶液添加量为 168.93 U/g、酶解时间 2.96 h。考虑到实验操作的可行性,选取漆酶粗酶液添加量、果胶酶粗酶液添加量和酶解时间分别为 1.5 U/g、170 U/g 和 3.0 h。经实验验证,得到 2 种粗酶液复配酶解膨胀梗丝的平均感官评吸得分为 71.2 分,比未经粗酶液复配酶解膨胀梗丝的感官评吸得分提高了 8.2 分,符合实验预期。

2.6 膨胀梗丝酶解前后致香成分分析

膨胀梗丝酶解前后致香成分定量结果见表 4。由表 4 可知,由于膨胀梗丝在酶解前经过水洗、提取

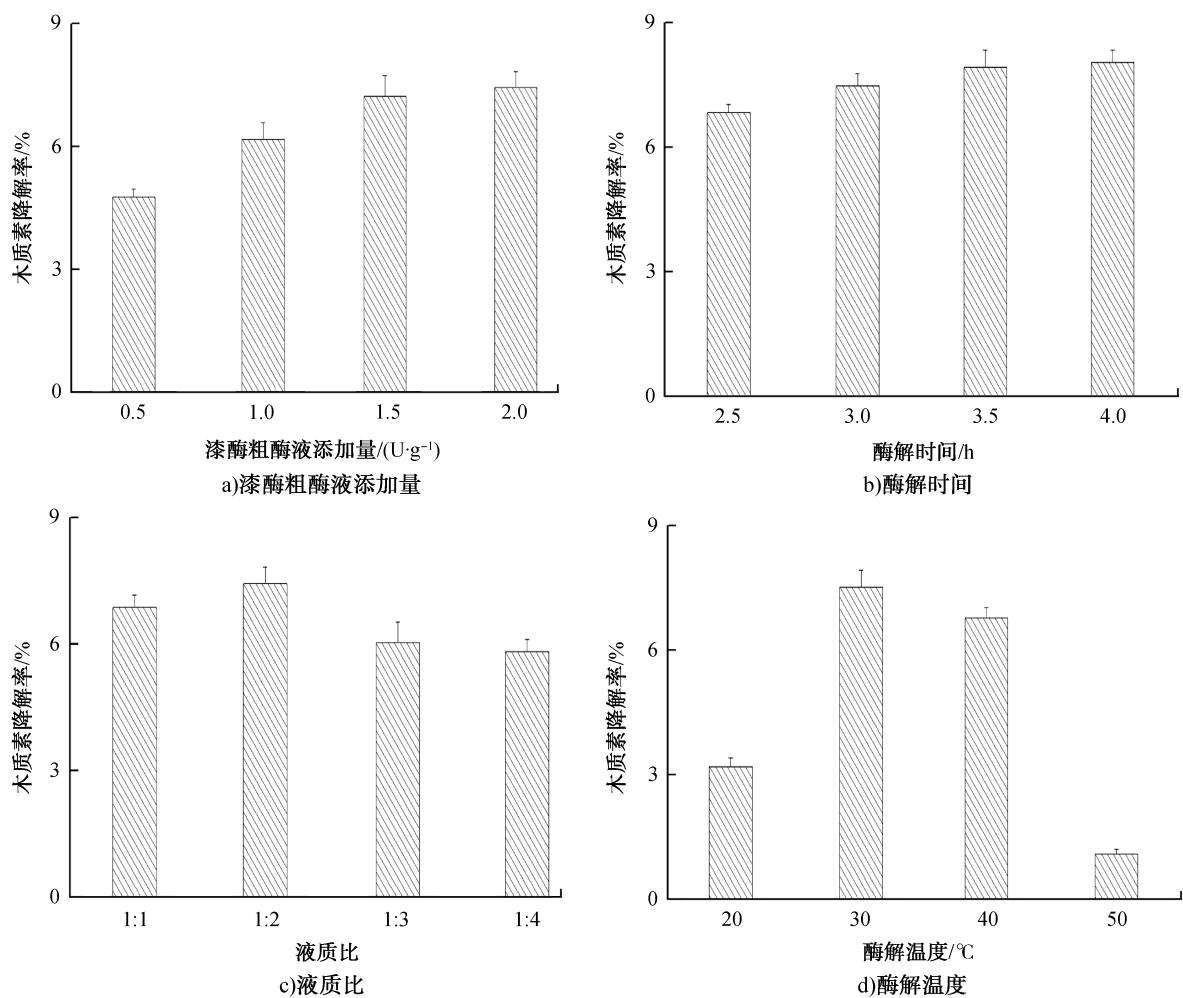


图 6 漆酶粗酶液酶解膨胀梗丝中木质素的单因素试验结果

Fig. 6 Single-factor optimization results for enzymatic hydrolysis of lignin in expanded tobacco cut stems using crude laccase

表 1 膨胀梗丝中主要化学成分含量

Table 1 Contents of major chemical components in expanded tobacco cut stems %

组别	淀粉含量	纤维素含量	半纤维素含量	蛋白质含量
未酶解	0.43±0.08	17.7±0.75	3.2±0.23	3.4±0.23
果胶酶粗酶液酶解	0.41±0.10	16.9±0.83	3.0±0.18	3.2±0.22
漆酶粗酶液酶解	0.42±0.07	16.6±1.08	3.1±0.12	3.3±0.17

表 2 Box-Benhnken 试验设计及感官评吸得分

Table 2 Box-Benhnken experimental design and sensory evaluation scores

序号	A/(U·g ⁻¹)	B/(U·g ⁻¹)	C/h	R/分	序号	A/(U·g ⁻¹)	B/(U·g ⁻¹)	C/h	R/分
1	160	1.5	3.0	69.1	10	160	1.0	4.0	66.3
2	80	1.0	3.0	67.8	11	160	2.0	2.0	66.4
3	80	1.5	4.0	66.5	12	80	1.5	2.0	67.7
4	160	1.5	3.0	69.4	13	240	1.0	3.0	67.7
5	240	1.5	4.0	67.1	14	160	1.5	3.0	69.2
6	240	2.0	3.0	68.2	15	240	1.5	2.0	67.2
7	160	1.0	2.0	66.3	16	160	1.5	3.0	69.9
8	160	2.0	4.0	66.3	17	80	2.0	3.0	67.4
9	160	1.5	3.0	69.5					

等工艺,其致香成分总量较低,仅为 210.85 $\mu\text{g/g}$,酶解后总量提升至 258.23 $\mu\text{g/g}$,增幅为 22.5%。

表3 方差分析及显著性检验结果

Table 3 Analysis of variance results and significance tests					
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	24.465 8	9	2.718 4	31.042 0	0.000 1
A	0.005 0	1	0.005 0	0.057 1	0.818 0
B	0.080 0	1	0.080 0	0.913 5	0.371 0
C	0.245 0	1	0.245 0	2.797 7	0.138 3
AB	0.202 5	1	0.202 5	2.312 4	0.172 2
AC	0.002 5	1	0.002 5	0.028 6	0.870 6
BC	0.302 5	1	0.302 5	3.454 3	0.105 4
A ²	6.292 7	1	6.292 7	71.857 0	0.000 1
B ²	0.751 6	1	0.751 6	8.582 8	0.022 0
C ²	14.763 2	1	14.763 0	168.580 0	0.000 0
残差	0.613 0	7	0.087 6		
失拟项	0.225 0	3	0.075 0	0.773 2	0.566 5
纯误差	0.388 0	4	0.097 0		
合计	25.078 8	16			
R ²	0.976				

酶解后膨胀梗丝中含量降低明显的致香成分主要包括棕榈酸、2,4-二叔丁基苯酚和 2,2'-亚甲基双(6-叔丁基-4-甲基苯酚),这可能与粗酶液中酶解此类成分的水解酶和氧化酶有关。含量增加明显的致香成分主要包括苯甲醇、糠醇、肉豆蔻酸异丙酯、东莨菪亭和 9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮,这一方面可能是因为粗酶液中携带这些成分,另一方面,粗酶液酶解膨胀梗丝获得了这些成分。棕榈酸对彰显烟叶蜜甜香风格具有重要贡献,2,4-二叔丁基苯酚赋予烟叶强烈的芳香气味,苯甲醇赋予烟叶柔和稍甜的芳香和弱的花香特征,糠醇赋予烟叶焦糖香的特征,肉豆蔻酸异丙酯可改善烟叶的香气和口感,9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮能提高烟草的甜香特征^[8,22-23]。

另外,仅在酶解后检出的致香成分较多,包括苯乙醇、2-甲基丁酸、呋喃酚、3-环己基苯酚、菖蒲酮、 α -紫罗兰酮、大马士酮、茄酮和 3,5-二羟基-2-

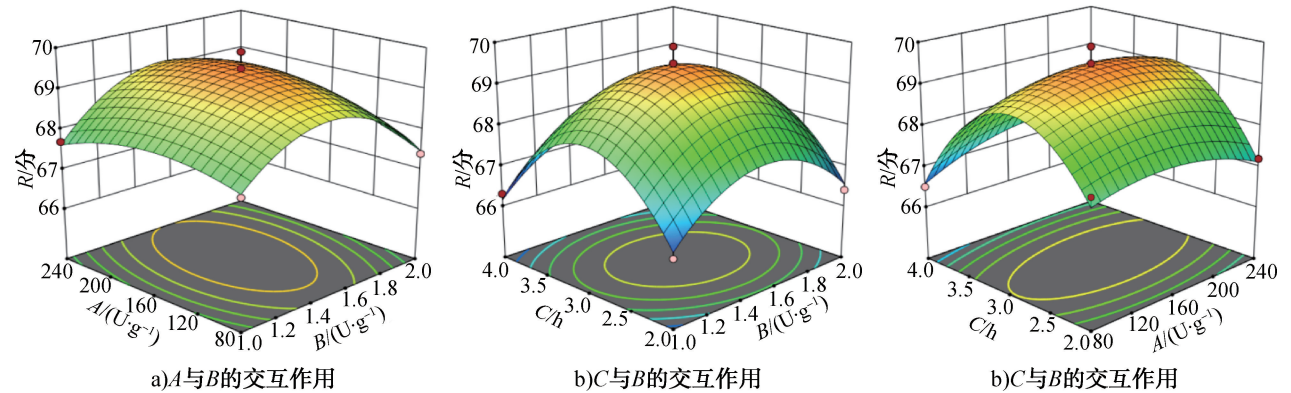


图7 不同因素交互作用对感官评吸得分的影响

Fig. 7 Effects of interactions between factors on sensory evaluation scores

表4 膨胀梗丝酶解前后致香成分定量结果

Table 4 Quantitative results in expanded tobacco cut stem pre-and post-enzymatic hydrolysis						μg/g	
化合物名称		酶解前	酶解后	化合物名称		酶解前	酶解后
苯甲醇		0.23	2.98	呋喃酚		—	1.67
苯乙醇		—	1.32	3-环己基苯酚		—	11.23
芳樟醇		0.21	0.18	菖蒲酮		—	16.24
糠醇		0.27	1.02	α-紫罗兰酮		—	0.12
棕榈酸		36.91	10.56	大马士酮		—	0.56
苯甲酸		0.17	0.15	茄酮		—	0.22
2-甲基丁酸		—	0.24	东莨菪亭		14.22	32.49
肉豆蔻酸异丙酯		98.86	151.35	2,4-二叔丁基苯酚		32.01	15.16
3,5-二羟基-2-甲基-4H-吡喃-4-酮		—	0.13	9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮		0.17	0.56
2,2'-亚甲基双(6-叔丁基-4-甲基苯酚)		27.80	12.05				

注:—表示未检出。

甲基-4H-吡喃-4-酮。这些致香成分可增加膨胀梗丝清甜香、玫瑰花香、坚果香、甘草香等香气,并醇和烟气、减轻刺激等。因此,经复配粗酶液酶解的膨胀梗丝其感官品质明显提升。

3 结论

本研究基于形态学观察和分子生物学理论将从烟田土壤和腐朽烟梗中筛选获得的产果胶酶菌株 TS-1 和产漆酶菌株 TS-2 鉴定为黑曲霉和黄孢原毛平革菌。通过单因素试验获得菌株 TS-1 和 TS-2 以烟梗粉为主要底物发酵产果胶酶和漆酶的最优条件,二者最高酶活性分别为(787.9±12.1) U/mL 和(21.1±0.2) U/mL。膨胀梗丝中果胶和木质素的酶解与果胶酶/漆酶粗酶液添加量、酶解时间、液质比和酶解温度有关,二者最高降解率分别可达(25.9±0.5)%和(7.8±0.4)%。酶解膨胀梗丝的最优粗酶液复配条件为果胶酶粗酶液添加量 170 U/g、漆酶粗酶液添加量 1.5 U/g、酶解时间 3.0 h,酶解后其感官评吸得分较未酶解膨胀梗丝提高了 8.2 分,致香成分含量增加明显。本研究为利用微生物动态发酵烟梗废弃物,并将获得的粗酶液复配用于改善烟梗感官品质提供了参考。

参考文献:

[1] FAN X,ZI W H,AO J C,et al. Analysis and application evaluation of the flavour-precursor and volatile-aroma-component differences between waste tobacco stems[J]. Heliyon,2022,8(9):e10658.

[2] 南哲洙,仝智强,姚思愚,等. 超声洗梗工艺对烟梗理化特性及卷烟感官质量的影响[J]. 烟草科技,2024,57(4):78-84,90.

[3] 孔浩辉,李秀丽,黄翼飞,等. 氢氧化钠/尿素法和硫酸法测定烟草木质素的对比分析[J]. 烟草科技,2015,48(1):66-71.

[4] 陈志浩,丁丽,李栋,等. 溶剂热法降低烟梗中木质素含量及提高发烟剂负载量的初步研究[J]. 中国烟草学报,2022,28(2):27-32.

[5] 余其昌,黄菲,易聪华,等. 甘油碱法脱除烟梗中的木质素[J]. 中国烟草学报,2018,24(4):1-6.

[6] 李强,吴晓青,张新建. 微生物降解秸秆木质素的研究进展[J]. 微生物学报,2023,63(11):4118-4132.

[7] 苏玉龙. 高效降解烟秆菌株筛选及其特性研究[D]. 北京:中国农业科学院,2016.

[8] 王文婷,宋凯,杨晨,等. 基于宏基因组学的霍氏肠杆菌发酵解析及其烟叶品质提升机制研究[J]. 轻工学报,2023,38(1):79-89.

[9] 李林玮,毛亚浩,余君,等. 巨大芽孢杆菌对雪茄烟叶品质及细菌群落结构的影响[J]. 湖南农业科学,2023(11):70-78.

[10] 吴新惠,杜金杰,刘晓纯,等. 六堡茶真菌固态发酵优势单菌的筛选[J]. 食品科学,2024,45(6):64-71.

[11] 全铭沁,董惠忠,沙云菲,等. 黑曲霉发酵液改善上部烟叶风味品质的研究[J]. 中国酿造,2019,38(3):170-176.

[12] 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.

[13] ZHAO J G,OUYANG S F,QI H R,et al. Metabolomics and transcriptomics uncover the pectin hydrolysis during tobacco stem fermentation by *Aspergillus niger*[J]. Journal of Cleaner Production,2024,442:141005.

[14] 陈建军,刘梁涛,曹香林. 高效木质素降解菌的筛选及产漆酶条件的研究[J]. 甘肃农业大学学报,2018,53(4):130-136.

[15] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、酸洗木质素的测定 洗涤剂法:YC/T 347—2010[S].

[16] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 淀粉的测定 连续流动法:YC/T 216—2013 [S].

[17] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 蛋白质的测定 连续流动法:YC/T 249—2008[S].

[18] 国家烟草专卖局. 烤烟 烟叶质量风格特色感官评价方法:YC/T 530—2015[S].

[19] 罗雯,徐珂盼,王怡,等. 果胶酶生产菌株的筛选、发酵优化及其酶学性质研究[J]. 食品科技,2022,47(4):6-13.

[20] 陈勇强. 黑曲霉液态发酵橘子皮产果胶酶工艺条件优化[J]. 现代农业科技,2021(24):194-196,204.

[21] 郑耀通,李文燕. 黄孢原毛平革菌抗营养阻遏产漆酶同工酶动态分析[J]. 微生物学杂志,2020,40(6):13-20.

[22] 张晓瑞,刘晓晖,付博,等. 烟草中淀粉降解菌的筛选、鉴定及发酵工艺优化[J]. 食品与机械,2021,37(2):34-41.

[23] ZHU B B,AN H Y,LI L,et al. Characterization of flavor profiles of cigar tobacco leaves grown in China via head-space-gas chromatography-ion mobility spectrometry coupled with multivariate analysis and sensory evaluation [J]. ACS Omega,2024,9(14):15996-16005.

Optimization of enzymatic hydrolysis process for expanded tobacco cut stem using combined crude enzymes of pectinase and laccase

QI Hanru¹, OUYANG Shaofeng¹, LI Yu², YANG Xuepeng¹, ZHAO Jianguo¹

1. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. Henan Collaborative Innovation Center of Environmental Pollution Control and Ecological Restoration, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Pectinase-producing strain TS-1 and laccase-producing strain TS-2 were isolated from tobacco field soil and decayed tobacco stems. Morphological observation and molecular biological identification confirmed their taxonomic status as *Aspergillus niger* and *Phanerodontia chrysosporium*, respectively. Enzyme production conditions were optimized via single-factor experiments: for TS-1 pectinase production, the optimal parameters were tobacco stem powder concentration 50 g/L, fermentation temperature 30 ℃, and pH value 6.0; for TS-2 laccase production, the optimal conditions were tobacco stem powder concentration 50 g/L, (NH₄)₂SO₄ concentration 0.6 g/L, and fermentation temperature 30 ℃. The hydrolysis conditions for pectin in expanded tobacco cut stems were optimized as crude pectinase dosage 240 U/g, hydrolysis time 4.0 h, liquid-to-solid ratio 1 : 2, at 30 ℃; for lignin hydrolysis, the optimal conditions were crude laccase dosage 2.0 U/g, hydrolysis time 3.5 h, liquid-to-solid ratio 1 : 2, at 30 ℃. The co-application of crude enzymes achieved optimal hydrolysis at pectinase dosage 170 U/g, laccase dosage 1.5 U/g, and hydrolysis time 3.0 h. Post-hydrolysis, the sensory evaluation score of expanded cut stems increased by 8.2 points compared to untreated samples, accompanied by a significant elevation in aroma constituent content.

Key words: tobacco stem; pectinase; laccase; enzymatic hydrolysis process; expanded tobacco cut stem; sensory quality; aroma constituent

[责任编辑:杨晓娟 刘春奎]

本刊数字网络传播声明

本刊已许可中国知网,万方数据资源系统,维普网,国家科技学术期刊开放平台,博视网,超星,中国科技论文在线,中教数据库,长江文库,CABI,CA, AJ. VINITI, EBSCOhost, Ulrichs, FSTA 等在其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。其相关著作权使用费与本刊稿酬一并支付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我刊上述声明。