



冯颖杰,齐文渊,刘文召,等. 烟草糖苷降解菌筛选及糖苷酶挖掘[J]. 轻工学报,2026,41(3):109-119.
FENG Y J, QI W Y, LIU W Z, et al. Screening of tobacco glycoside-degrading bacteria and mining of glycosidases [J]. Journal of Light Industry, 2026, 41(3): 109-119. DOI:10.12187/2026.03.011

烟草糖苷降解菌筛选及糖苷酶挖掘

冯颖杰¹, 齐文渊², 刘文召¹, 张婷婷¹, 杨金初¹, 杨宗灿¹, 朱丽², 黄申²

1. 河南中烟工业有限责任公司 技术中心, 河南 郑州 450000;
2. 郑州轻工业大学 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001

摘要:【目的】开发降解烟草糖苷类化合物并生成香味成分的生物酶。【方法】以3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷为唯一碳源筛选降解烟草糖苷的菌株,对该菌株进行基因组分析,分离纯化降解菌糖苷酶,考查糖苷酶的酶学特性,鉴定并挖掘烟草糖苷酶。【结果】菌株 HZW-15 可降解3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷,其粗酶处理烟草粗糖苷后,3-氧代- α -紫罗兰醇、苯甲醇、苯乙醇等香味成分显著增加;酶液处理再造烟叶浓缩液后甜感突出、余味干净、香气质改善;当酶解温度40℃,转速150 r/min, pH值7,钾离子浓度10 mmol/L时,3-氧代- α -紫罗兰醇含量增加了2.3倍; HZW-15基因组共有5 554 921个碱基,编码76个糖苷水解酶基因。【结论】利用质谱鉴定纯化后的酶组分,推测6-磷酸- β -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖糖苷酶和1,4- α -葡聚糖分支酶为功能酶,可为烟用糖苷酶的开发提供参考。

关键词:烟草糖苷;降解菌;糖苷酶;酶学特性

中图分类号: TS41.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2026)03-0109-11

0 引言

糖苷类化合物普遍存在于调制和陈化后的烟草中,是一类重要的香味前体物^[1],由糖及其衍生物的半缩醛羟基与非糖有机化合物分子中的羟基、巯基或氨基脱水缩合而成^[2],主要有3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷、4-羟基苯乙醇-3-O-葡萄糖苷、芸香糖苷等。该类化合物本身香气较弱或没有香气,大多无色无臭^[3],在烟叶的调制及燃烧过程中发生分解、转化及热解生成多种香味成分^[4-6],这些成分对提高烟叶品质、改善主流和侧流

烟气、增加释香稳定性等具有重要作用^[7-9]。

一般认为糖苷类化合物在卷烟燃吸过程中是充分裂解的,但近年来研究^[10-12]发现,烟气的粗焦油中存在糖苷类化合物,表明该类化合物并未得到完全分解和利用。同时,随着卷烟工业的发展,卷烟结构不断优化,卷烟工业对烟叶品质的要求也越来越高^[13]。充分利用烟草本源的糖苷类化合物,提高烟叶的吸品质,是解决烟草工业发展供需矛盾的有效途径。

目前,如何高效降解烟草糖苷类化合物的研究仍不够深入,利用生物法降解烟草糖苷类化合物的

收稿日期:2024-09-19;修回日期:2025-03-21;出版日期:2026-06-15

基金项目:中国烟草总公司重点科技项目(110202202006);河南中烟工业有限责任公司科技项目(AW2022017)

作者简介:冯颖杰(1990—),男,安徽省萧县人,河南中烟工业有限责任公司高级工程师,主要研究方向为烟草生物技术。
E-mail: fyjwin123@163.com

通信作者:黄申(1981—),男,河南省周口市人,郑州轻工业大学副教授,博士,主要研究方向为烟草生物技术和生物化工。
E-mail: huangshen@zzuli.edu.cn

研究鲜有报道^[14-15]。近年来,应用生物技术改善烟叶的感官品质成为烟草行业的研究热点^[16-17]。如 B. He 等^[18]用果胶酶处理烟梗后,烟梗中的还原糖含量增加;周瑾等^[19]用纤维素酶处理烟叶后,烟叶中的还原糖含量增加,同时卷烟的感官品质提升。糖苷酶可通过水解各种含糖化合物中的糖苷键,生成单糖、寡糖和糖配体^[1],有助于提升烟叶品质。

本文拟筛选高效降解烟草糖苷类化合物的菌株,分离纯化降解粗糖苷,利用生物质谱和基因组分析鉴定糖苷酶,以增加烟草的香味成分,提升卷烟的吸食品质,为烟用糖苷酶的开发提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 主要材料、试剂和培养基

土壤样品,采自河南省襄城县烟田;初烤烟叶样品,品种等级分别为翠碧 1 号(B2F)、云烟 87(B2F 和 C2F),由福建武夷山烟叶有限公司提供;粗糖苷,由本课题组从烟草中提取;3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷(纯度 $\geq 95\%$),郑州轻工业大学烟草生物技术实验室分离纯化所得;二氯甲烷(色谱纯)、无水乙醇(分析纯),山东禹王和天下新材料有限公司;无水 Na_2SO_4 、酵母粉、胰蛋白胨、NaCl,均为分析纯,烟台市双双化工有限公司;TS 0002 型再造烟叶浓缩液,由河南卷烟工业烟草薄片有限公司提供。

破碎液:20 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液,pH 值为 7.0。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,NaCl 10 g/L;再加入琼脂粉 20 g/L,即为 LB 固体培养基。

糖苷培养基:3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷溶液 1 g/L,无机盐配方。

粗糖苷培养基:粗糖苷 2 g/L,无机盐配方。

无机盐配方^[20]: K_2HPO_4 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L,NaCl 0.5 g/L, KH_2PO_4 0.65 g/L, MnSO_4 0.001 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L。

1.2 主要仪器与设备

LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申

安医疗器械厂;J6-MI 型冷冻离心机,美国 Beekman 公司;SW-CJ-1F 型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;6890a/5975 型气相色谱-质谱联用(GC-MS)仪,美国安捷伦公司;TH2-C 型恒温摇床,太仓市科教器材厂;DEAE 型层析预装柱(20 mL)、Resources Q 型层析预装柱(5 mL),美国 GE Healthcare 公司;JY92-II DN 型超声细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;F3 型凝胶成像仪,英国 Syngene 公司;Q Exactive HF-X 型 MS 仪,美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 糖苷降解菌筛选与鉴定 1) 菌株富集与初筛。分别称取 15 g 土壤样品和初烤后烟叶样品置于装有 300 mL 无菌生理盐水的三角瓶中,放入 30 $^\circ\text{C}$ 、150 r/min 的摇床中振荡 2~4 h。取上清液,按 1%(体积分数,下同)接种量转接至 LB 培养基中,在 30 $^\circ\text{C}$ 、150 r/min 的摇床中培养至浑浊。再按 1%的接种量接入糖苷培养基中,在 30 $^\circ\text{C}$ 、150 r/min 的摇床中培养 24 h。挑选出有明显香味变化的发酵液,即含能降解糖苷类化合物并能产生香味物质的初筛菌株。

2) 菌株复筛与鉴定。将初筛菌株接种至粗糖苷培养基中,于 30 $^\circ\text{C}$ 、150 r/min 条件下培养 24 h。利用 GC-MS 仪分析糖苷降解菌发酵前后粗糖苷中香味成分的变化,在 NTST17. L 库中进行检索定性分析,同时进行半定量分析。

将糖苷降解菌培养 24 h 后进行离心、破碎,制得粗酶液,在 30 $^\circ\text{C}$ 、150 r/min 条件下处理 2 g/L 的粗糖苷 6 h,利用 GC-MS 仪分析粗酶液处理前后粗糖苷中香味成分的变化,在 NTST17. L 库中进行检索定性分析,同时进行半定量分析。

将粗酶液加入体积分数为 10%的再造烟叶浓缩液中进行催化,于 30 $^\circ\text{C}$ 、150 r/min 条件下处理 6 h。催化完成后,加入等体积乙醇,于 -20 $^\circ\text{C}$ 冰箱中静置 24 h。取 20 μL 上清液涂抹于空白烟支表面,平衡 48 h 后,由 9 名具有烟草行业感官评吸资格的人员进行感官评吸。

1.3.2 糖苷粗酶处理及酶解条件优化 1) 菌种活化及菌体收集。将解冻后菌种按 1%的接种量接入

15 mL LB 培养基中,于 30 ℃、150 r/min 条件下培养过夜。菌液进行梯度稀释涂布后,挑选单菌落,接种至 LB 培养基中培养过夜,制成种子液。将种子液按 1%接种量接入 LB 培养基中进行培养(培养条件同上),发酵完成后,将发酵液于 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 10 min,弃上清液,沉淀即为所需菌株。

2)粗酶液制备。将收集的菌株与破碎液按照 $m(\text{菌株}/\text{g}) : V(\text{破碎液}/\text{mL}) = 1 : 10$ 混合,利用超声波细胞粉碎机破碎细胞 20 min,每次 10 min,期间持续破碎 5 s 并间隔 5 s。破碎后在 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 10 min,收集上清液,即为粗酶液。

3)酶解条件优化。将糖苷培养基中的无机盐组分换成 20 mmol/L、pH 值为 7 的磷酸盐缓冲液,即为底物,每个试管中加入 10 mL 底物和 0.2 mL 粗酶液。设置加入 0.2 mL 磷酸盐缓冲液而不加粗酶液为空白组。初始条件为酶解温度 37 ℃、转速 100 r/min、pH 值 7。控制单一变量,选择不同的酶解温度(25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃)和转速(100 r/min、150 r/min、200 r/min、250 r/min、300 r/min);用 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4 分别配制 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液、pH 值为 5、6、7、8;加入 1 mL 不同类型的金属离子(K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+}),使反应体系中金属离子的终浓度为 10 mmol/L。酶降解时间均为 6 h,每组实验设 3 个重复。

1.3.3 烟叶及糖苷香味成分检测 烟叶糖苷检测方法参考文献[21],烟叶香味成分检测方法参考文献[22]。

1.3.4 基因组测序 糖苷降解菌培养 48 h 后,在 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 10 min,弃去上清液,收集菌株细胞,在液氮中浸泡 15 min 后,放入-80 ℃冰箱保存。基因组测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

采用全基因组鸟枪法(Whole Genome Shotgun, WGS)策略,构建不同插入片段的文库,利用第二代测序技术(Next-Generation Sequencing, NGS),基于 Illumina NovaSeq 测序平台,采用 A5-MiSeq^[23] 和 SPAdes^[24] 软件对去除接头序列的测序数据进行从头拼装,构建 contig 和 scaffold。对得到的拼装结果进行评估和比较,并使用 Pilon^[25] 软件进行碱基校正。

1.3.5 基因预测及功能注释 采用 GeneMarkS 软件预测细菌基因组的蛋白质编码基因,采用 Hmmscan 软件预测 CAZy 酶类基因,结果选取标准为:ORF 序列长度 > 80 个氨基酸时, E-value < $1e^{-5}$; ORF 序列长度 < 80 个氨基酸时, E-value < $1e^{-3}$,且氨基酸序列比对长度大于数据库中对应序列的 30%。最后使用 DIAMOND 软件在 KEGG、Swiss-Prot、GO 数据库中对蛋白编码基因进行序列比对,比对临界值设为 E-value < $1e^{-6}$ 。

1.3.6 糖苷酶分离纯化及鉴定 1)糖苷酶分离纯化。按照硫酸铵饱和度 20%~40%、40%~60%和 60%~80%对粗酶进行盐析,以 3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷为底物追踪糖苷酶,将粗酶于 4 ℃条件下搅拌,透析 4 次,每 2.5 h 换 1 次透析液;将透析后粗酶上样至 DEAE 型层析预装柱,利用不同浓度(200 mmol/L、400 mmol/L、600 mmol/L、1000 mmol/L)的 NaCl 洗脱液洗脱;将功能酶组分上样至 Resource Q 型层析预装柱,利用不同浓度的 NaCl 洗脱液洗脱,并进行功能酶组分鉴定。

2)糖苷酶鉴定。将粗酶和糖苷酶利用 SDS-PAGE 进行蛋白检测,5%浓缩胶 4 mL,15%分离胶 15 mL,在 20 mA、200 V 条件下跑浓缩胶,在 25 mA、200 V 条件下跑分离胶。结束后将胶片进行染色和脱色,最后用凝胶成像仪拍照。将经过 Resource Q 型层析预装柱纯化的糖苷酶送至元莘生物公司进行蛋白质质谱鉴定。

1.4 数据处理

采用软件 Minitab 22 进行数据分析,利用软件 Origin 2024 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 糖苷降解菌筛选结果分析

2.1.1 初筛结果 通过初筛,共分离获得 18 株以 3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷为唯一碳源的菌株,分别以 HZW-1 至 HZW-18 命名。通过对发酵液进行嗅辨,初步挑选出 9 株香味变化明显的菌株,利用上述菌株发酵粗糖苷,其香味成分含量变化见表 1。由表 1 可知,经 9 株菌发酵后,苯甲醇、苯乙醇、巨豆三烯酮 b、二氢- β -紫罗兰酮、4-羟

基- β -二氢大马酮、3-氧代- α -紫罗兰醇等香味成分含量均有不同程度的增加。其中 HZW-15 发酵液中含有的香味成分种类最多,有 9 种。香味成分总含量由高到低的前 4 株菌依次为:HZW-15、HZW-1、HZW-4、HZW-16。

2.1.2 复筛结果 将上述 4 株菌进行破碎,获得粗酶液后用于处理粗糖苷,其香味成分含量变化见表 2。由表 2 可知, HZW-15 的粗酶液降解糖苷的效果最好,处理后的 3-氧代- α -紫罗兰醇含量可达 33.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时,与表 1 所示结果对比,粗酶液处理比菌株发酵产生的香味成分种类更少,多为 3-氧代- α -紫罗兰醇。

再造烟叶浓缩液为烟叶水提物浓缩液,化学成分与烟叶相近,且含有烟草香味成分及糖苷类化合物。为筛选实用性较好的烟草糖苷降解菌,用 4 株菌的粗酶液处理再造烟叶浓缩液,并将提取的香气成分涂抹于空白烟支进行感官评吸,结果见表 3。

由表 3 可知,经 HZW-1、HZW-4、HZW-15、HZW-16 处理后的再造烟叶浓缩液均可提升卷烟吸品质,其中 HZW-15 效果最好,表现为烟气柔和,甜感突出,香气质改善,刺激较小,余味干净,与 GC-MS 分析结果和浓缩液处理结果表现一致。因此,选择 HZW-15 作为优选菌株进行后续研究。

2.2 酶解条件优化结果分析

2.2.1 酶解温度 不同酶解温度下粗酶液酶解产物的含量见图 1,其中不同小写字母表示在 0.05 水平下差异显著,下同。由图 1 可知,当酶解温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 时,粗酶液降解糖苷的效果最好。随着酶解温度的升高,酶解速率快速下降,这可能是因为高温条件会导致酶蛋白变性,影响了酶活力;而较低温度也会抑制酶的活性,降低酶解效率。因此,最适酶解温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.2 转速 不同转速下粗酶液酶解产物的含量见图 2。由图 2 可知,当转速为 150 r/min 时,粗酶

表 1 粗糖苷发酵前后香味成分含量变化

Table 1 Changes in the content of aroma components pre- and post-fermentation of crude glycosides

化合物	香味成分含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$									
	空白	HZW-1	HZW-2	HZW-4	HZW-9	HZW-11	HZW-12	HZW-14	HZW-15	HZW-16
苯乙烯	4.02±0.06	5.08±0.12	11.46±0.05	—	—	—	4.70±0.04	5.01±0.06	6.14±0.06	—
苯甲醇	—	1.82±0.05	—	3.22±0.11	3.98±0.06	2.09±0.07	2.12±0.08	4.33±0.08	3.40±0.05	3.91±0.07
壬醛	0.55±0.07	0.75±0.05	1.78±0.06	1.54±0.06	—	—	1.13±0.17	—	1.01±0.07	1.17±0.08
苯乙醇	—	24.58±0.13	—	39.83±0.15	39.13±0.10	15.02±0.16	26.82±0.13	46.85±0.14	37.33±0.19	45.93±0.11
2,4-二叔丁基苯酚	55.09±0.23	51.64±0.35	83.06±0.26	—	61.18±0.15	61.72±0.27	61.26±0.33	60.63±0.14	57.27±0.25	67.89±0.17
巨豆三烯酮 b	1.21±0.07	1.17±0.05	1.19±0.06	—	1.76±0.07	1.85±0.03	1.23±0.05	—	1.27±0.07	—
4-羟基- β -二氢大马酮	7.75±0.09	9.53±0.11	17.07±0.08	26.61±0.19	10.61±0.08	10.82±0.09	10.80±0.06	24.04±0.18	11.47±0.13	13.18±0.05
二氢- β -紫罗兰酮	—	3.45±0.05	7.11±0.06	—	4.80±0.07	—	—	—	5.37±0.04	—
巨豆三烯酮 d	0.98±0.04	—	1.40±0.03	—	1.29±0.03	0.99±0.05	1.07±0.05	—	1.28±0.06	—
3-氧代- α -紫罗兰醇	1.93±0.02	140.97±0.04	4.89±0.05	131.76±0.23	9.75±0.09	12.79±0.12	37.71±0.19	—	138.29±0.34	32.56±0.13
总计	71.53±0.78	238.99±0.95	127.96±0.65	202.96±0.74	132.5±0.65	105.28±0.79	146.84±1.10	140.86±0.60	262.83±1.26	164.64±0.61
增长率/%		234.11	78.89	183.74	85.24	47.18	99.13	91.02	256.43	123.27

注:—表示未检测出,下同。

表 2 粗酶液处理前后粗糖苷香味成分含量变化

Table 2 Changes in the content of aroma components in crude glycosides pre- and post-treatment with crude enzyme solution

化合物	香味成分含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$				
	空白	HZW-1	HZW-4	HZW-15	HZW-16
苯甲醇	—	6.76±0.04	4.75±0.05	11.10±0.03	6.94±0.04
苯乙醇	—	20.78±0.17	11.19±0.09	18.08±0.12	9.42±0.09
3-氧代- α -紫罗兰醇	4.23±0.04	15.10±0.07	21.19±0.13	33.34±0.21	22.34±0.17
3-氧代- β -紫罗兰酮	10.13±0.01	10.06±0.05	8.38±0.06	9.12±0.04	8.08±0.06
3-氧代-7,8-二氢- α -紫罗兰醇	—	3.79±0.02	7.92±0.04	7.96±0.04	4.81±0.07
总计	14.36±0.15	56.497±0.35	53.43±0.37	79.6±0.44	61.59±0.43
增长率/%		293.43	272.08	454.32	328.90

液降解糖苷的效果最佳。当转速为 300 r/min 时,转速过大形成的剪切力可能使酶蛋白的空间结构受损,使酶解效果降低;当转速为 100 r/min 时,酶蛋白与底物接触不够充分,导致降解效率不高。因此,最适转速为 150 r/min。

2.2.3 pH 值 不同 pH 值下粗酶液酶解产物的含量见图 3。由图 3 可知;当在 pH 值为 7 时,粗酶液

表 3 卷烟感官品质评价结果

Table 3 Sensory quality evaluation results of cigarettes

组别	感官品质
空白	烟气自然,香气量少,刺激性较大,余味不舒适
HZW-1	烟气柔顺,香气足,刺激性稍强,余味尚可
HZW-4	烟气柔顺,甜感较好,有杂气,刺激性稍显,余味尚可
HZW-15	烟气柔和,甜感突出,香气质改善,刺激性较小,余味干净
HZW-16	烟气柔顺,杂气稍显,刺激性较小,余味干净

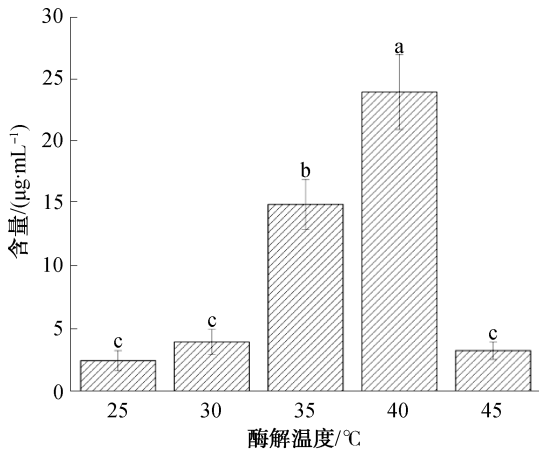


图 1 不同酶解温度下粗酶液酶解产物的含量

Fig. 1 Content of enzymatic hydrolysis products of crude enzyme solution at different enzymatic hydrolysis temperatures

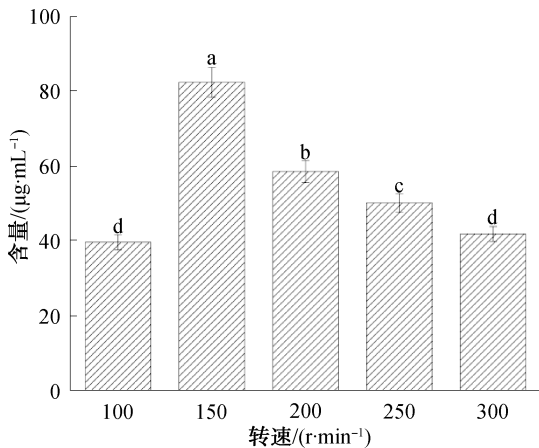


图 2 不同转速下粗酶液酶解产物的含量

Fig. 2 Content of enzymatic hydrolysis products of crude enzyme solution at different shaking speeds

的酶解效果最优;当 pH 值为 8 时,酶促反应几乎停滞,基本检测不到 3-氧代- α -紫罗兰醇,这可能是由于碱性环境导致蛋白酶的空间结构发生变化,酶活性急剧降低。随着 pH 值下降,酶活性被明显抑制。因此,最适 pH 值为 7。

2.2.4 金属离子 添加不同金属离子的粗酶液酶解产物的含量见图 4。由图 4 可知,与空白组相比,粗酶液在 K^+ 存在时分解糖苷的效果明显提高, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 存在时酶解效果变化不显著,而 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 对粗酶液酶解糖苷有明显的抑制效果。通常烟叶中 K^+ 含量较高,可在一定程度上促进烟叶燃烧^[26]。因此,最适金属离子为 K^+ 。

2.2.5 粗酶液处理效果验证 在酶解温度 40 °C、转速 150 r/min、pH 值为 7 的条件下,加入 10 mmol/L

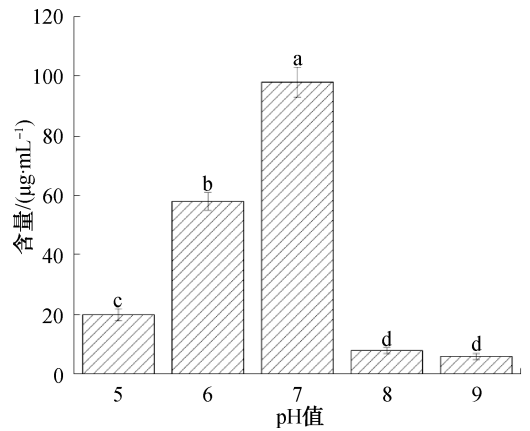


图 3 不同 pH 值下粗酶液酶解产物的含量

Fig. 3 Content of enzymatic hydrolysis products of crude enzyme solution at different pH values

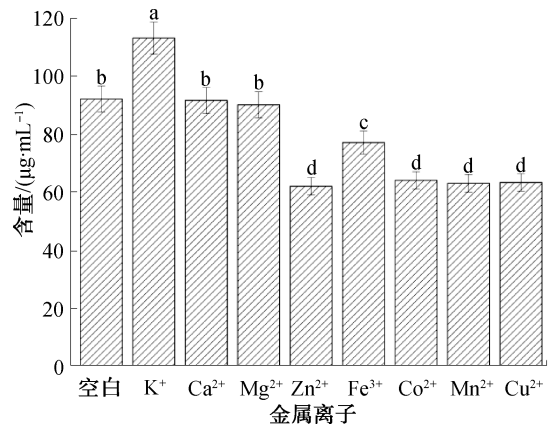


图 4 添加不同金属离子的粗酶液酶解产物的含量

Fig. 4 Content of enzymatic hydrolysis products of crude enzyme solution with different metal ions added

K⁺,利用粗酶液处理粗糖苷,可使主要香味成分 3-氧代- α -紫罗兰醇的含量大幅提升,由优化前的 33.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高到 111.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$,增加了 2.3 倍,优化效果明显。

2.3 糖苷降解菌基因组分析

通过基因组测序,菌株基因序列长度为 5 554 921 bp,GC 含量为 57.15%,开放阅读框数量为 5268。

2.3.1 蛋白编码基因的 KEGG 注释 通过 KEGG 数据库对比获得分子网络的相关信息后进行跨物种注释,发现 HZW-15 基因编码蛋白主要有遗传信息处理、新陈代谢、信号传导和细胞过程 4 种代谢功能,其注释结果见图 5。由图 5 可知,在 HZW-15 中共注释到蛋白编码基因 3169 个,在二级分类中,与

碳水化合物代谢相关基因最多(567 个),其次为与氨基酸代谢相关基因(351 个)、膜传输相关基因(343 个)、辅助因子和维生素代谢相关基因(221 个)、能量代谢相关基因(206 个),此外还有与萜类和酮类代谢相关基因(43 个)。因此, HZW-15 可降解糖苷、纤维素、淀粉等碳水化合物,还可能对萜类物质具有降解作用。

2.3.2 碳水化合物活性酶 (Carbohydrate-active Enzymes, CAZy) 分析 采用 Hmmscan 软件预测 HZW-15 基因组序列中存在的 CAZy 酶类基因,绘制的 CAZy 功能分类图见图 6。由图 6 可知, HZW-15 的 CAZy 酶类基因共有 162 个,其中糖苷水解酶 (Glycoside Hydrolases, GHs) 相关编码蛋白基因 76 个,糖基转移酶 (Glycosyl Transferases, GTs) 相关基因

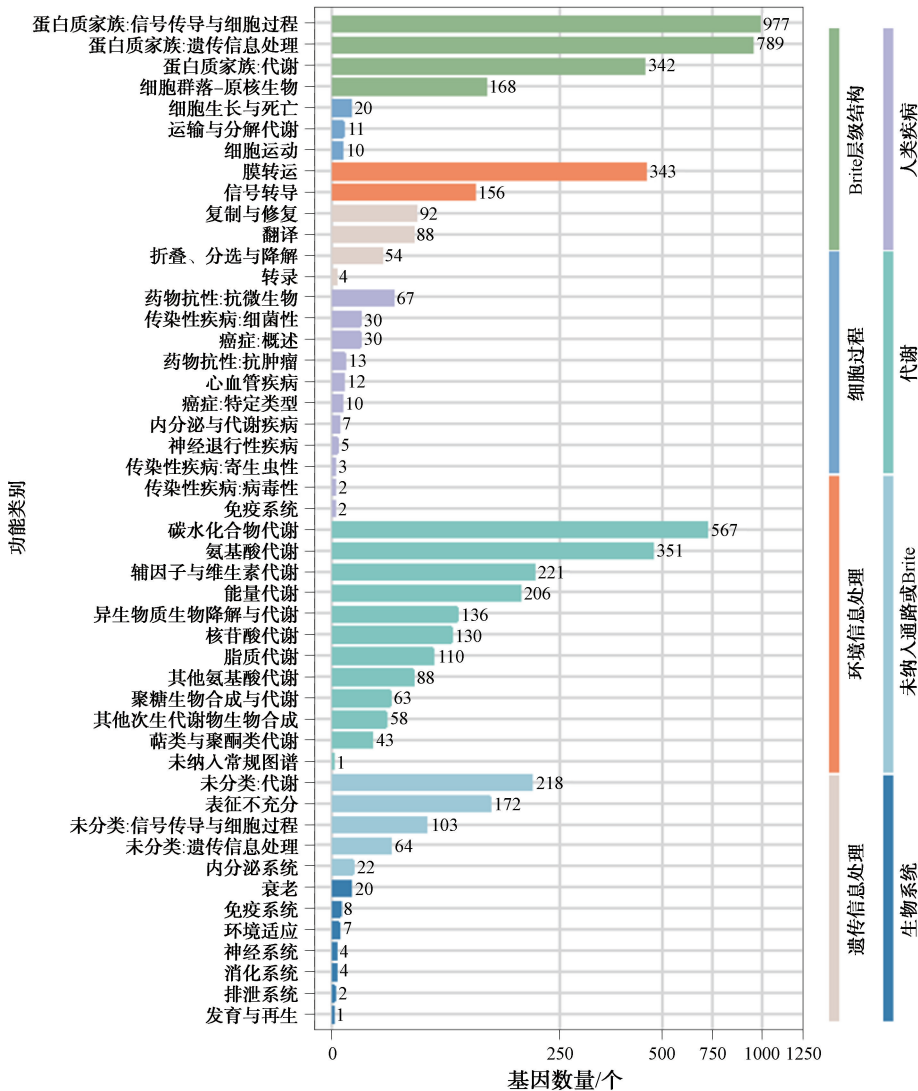


图 5 蛋白编码基因的 KEGG 注释图

Fig. 5 KEGG annotation map of protein-coding genes

39个,糖脂酶(Carbohydrate Esterases, CEs)相关基因24个,辅助功能的酶(Auxiliary Activities, AAs)相关基因12个,糖基聚集模块(Carbohydrate-Binding Modules, CBMs)相关基因6个,多糖裂合酶(Polysaccharide Lyases, PLs)相关基因5个。由于CAZy对糖苷键具有降解作用,糖苷、低聚糖、多糖等含有糖苷键的物质可被CAZy降解。因此, HZW-15能降解相应的糖苷酶,比如降解3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-葡萄糖苷生成3-氧代- α -紫罗兰醇。

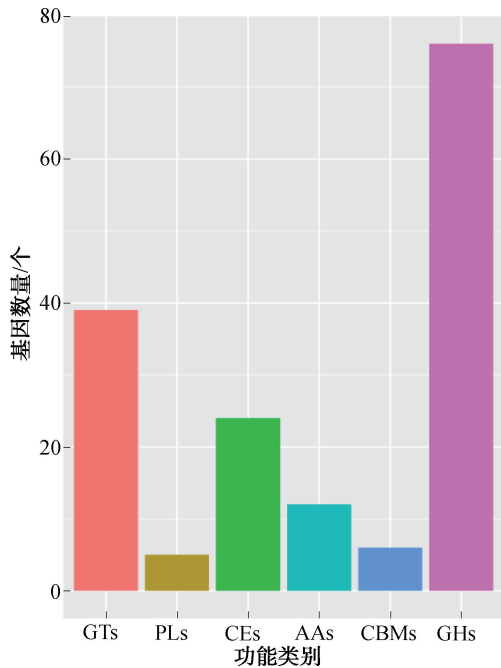


图6 HZW-15的CAZy功能分类图

Fig. 6 CAZy functional Classification map of HZW-15

对 HZW-15 的 CAZy 酶类基因进行基因簇注释,结果见表4。由表4可知,编码 β -葡萄糖苷酶的基因为GH1家族的8个基因和GH3家族的2个基因;编码 α -葡萄糖苷酶的基因为GH31家族的2个基因和GH13的3个亚族;编码6-磷酸- β -葡萄糖苷酶的基因主要为GH1家族和GH4家族。上述3类酶都可降解O-糖苷键,催化烟草中糖苷化合物释放出糖和相应苷元。

2.4 糖苷酶分离纯化及鉴定结果分析

2.4.1 糖苷酶分离纯化

通过酶活追踪实验发现,粗酶中的目标酶活性主要集中在硫酸铵饱和度20%~40%和40%~60%时析出的沉淀蛋白中,因此,后续采用硫酸铵饱和度20%~60%的条件对目标酶进行沉淀分离。盐析、透析后的酶液经DEAE型层析预装柱层析后得到的4个主要组分见图7。通过酶活检测20 mmol/L NaCl洗脱组分为目标酶组分,因此选择该酶组分用Resource Q型层析预装柱进一步纯化,获得的2个主要酶组分见图8。功能酶追踪后发现,10 mmol/L NaCl洗脱下的第1个紫外吸收峰收获的酶液为有效酶组分。

将粗酶及柱层析后糖苷酶组分进行SDS-PAGE电泳检测,结果见图9,其中,M表示标准蛋白;1表示粗酶液;2表示流穿峰;3表示DEAE柱层析洗脱组分;4表示Q柱层析洗脱组分。由图9可知,DEAE柱纯化后酶组分(第3泳道)及Resource Q型层析预装柱纯化后酶组分(第4泳道)较纯化前条带明显变少,且明显变粗,表明富集作用明显;第4

表4 HZW-15的CAZy酶类基因簇注释结果

Table 4 CAZy gene cluster annotation results of HZW-15

酶	家族	基因编号
β -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21)	GH1	scaffold11_3918, scaffold12_4079, scaffold1_173, scaffold3_1461, scaffold3_1478, scaffold3_1640, scaffold3_1726, scaffold7_2831
	GH3	scaffold10_3815, scaffold1_180
	GH13_11	scaffold5_2210
	GH13_21	scaffold2_1282
α -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.20)	GH13_29	scaffold9_3577
	GH31	scaffold11_3913, scaffold5_2441
	GH4	scaffold17_4699, scaffold1_251, scaffold4_1858, scaffold4_1935, scaffold5_2439, scaffold9_3439, scaffold9_3575, scaffold13_4180, scaffold14_4408
6-磷酸- β -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.86)	GH1	scaffold11_3918, scaffold12_4079, scaffold1_173, scaffold3_1461, scaffold3_1478, scaffold3_1640, scaffold3_1726, scaffold7_2831
	GH4	scaffold13_4180, scaffold14_4408, scaffold17_4699, scaffold1_251, scaffold4_1858, scaffold4_1935, scaffold5_2439, scaffold9_3439, scaffold9_3575

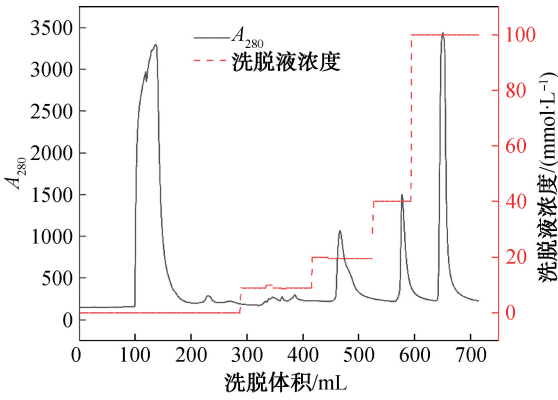


图7 DEAE柱层析分离色谱图

Fig. 7 DEAE column chromatography process diagram

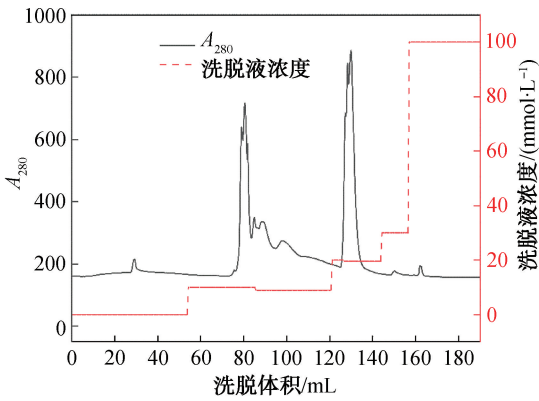


图8 Resource Q柱层析过程图

Fig. 8 Resource Q column chromatography process diagram

泳道较第3泳道蛋白质数量明显减少,主要条带9条,表明目标酶在9条之内。

2.4.2 糖苷酶鉴定 对 Resource Q 型层析预装柱纯化后糖苷酶组分进行质谱分析,将得到的数据分别在 Maxquant、Mascot 和 Sequest 这3个数据库中进行定量定性分析,共鉴定到肽段 5520 条,匹配到蛋白质 654 个,其中可信度低 ($P > 0.05$) 的蛋白质 18 个。3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷中的糖苷键为 O-糖苷键,从质谱数据中共分析获得 4 个具有水解 O-糖苷键的水解酶(见表 5),包括 2 个 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶、1 个 1,4- α -葡聚糖分支酶和 1 个 β -葡萄糖糖苷酶。后期可对上述酶基因进行克隆和体外重组,利用枯草芽孢杆菌、毕赤酵母等生物安全性表达菌株进行异源表达,大量制备后进行生产应用。

分析菌株基因组后发现, HZW-15 为克雷伯菌属 (*Klebsiella*) 菌株。该属菌株是一种常见革兰氏阴

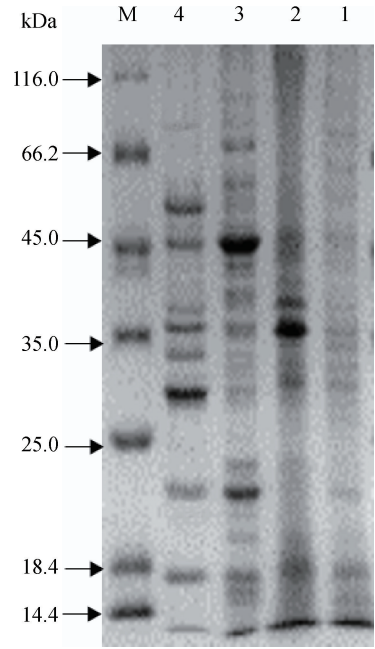


图9 糖苷酶 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 9 SDS-PAGE electrophoresis map of glycosidases

表5 功能酶组分蛋白鉴定表

Table 5 Protein identification results of functional enzyme components

蛋白序列号	名称	分子功能描述
A0A0H3GSS3	6-磷酸- β -葡萄糖苷酶	水解 O-糖苷键
A0A0H3GUC2	6-磷酸- β -葡萄糖苷酶	水解 O-糖苷键
A0A0H3GWW6	1,4- α -葡聚糖分支酶	水解 O-糖苷键
A0A5R9LN38	β -葡萄糖糖苷酶	水解 O-糖苷键

性菌,广泛存在于自然环境、水体、土壤及人和动物肠道内,其中肺炎克雷伯杆菌可引起人和动物患病,变栖克雷伯菌具有固氮、解磷、解钾作用,在农业生产中应用广泛^[27]。此外,多种克雷伯菌还具有降解有害物^[28]、改善土壤污染^[29]、催化香味前体物等能力^[30],具有一定的研究价值。

利用该属菌株的重要途径是挖掘功能酶基因,然后进行异源表达,制备重组酶后进行应用。例如,王婉莹等^[31]将来自克雷伯杆菌的烯还原酶基因在大肠杆菌中异源表达,用以还原香芹酮生成天然香料二氢香芹酮。韩增叶^[32]将来自克雷伯氏杆菌肺炎亚种的吡咯喹啉醌基因簇在大肠杆菌中进行异源表达合成吡咯喹啉醌。李宗显等^[33]将来自克雷伯杆菌的 β -半乳糖苷酶基因进行异源表达后,用以制备低聚半乳糖。温亮亮等^[34]将来自产酸克雷伯氏菌的普鲁兰酶基因进行异源表达,用以特异性

水解淀粉中的 α -1,6-糖苷键,进而提高淀粉的利用率。

3 结论

以3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷为底物,从土壤和烟叶样本中筛选到一株降解糖苷菌 HZW-15。利用该菌破碎后提取的粗酶液对糖苷进行处理,在酶解温度 40 °C、转速 150 r/min、pH 值为 7 的条件下加入 10 mmol/L 的 K^+ ,酶解处理 6 h 后,酶解效率最高,3-氧代- α -紫罗兰醇含量可达 111.26 μ g/mL。HZW-15 基因组共有 5 554 921 个碱基,编码 5268 个基因,与烟草糖苷降解相关的酶有 β -葡萄糖苷酶(10个)、 α -葡萄糖苷酶(14个)和6-磷酸- β -葡萄糖苷酶(17个)。

对菌株 HZW-15 的粗酶液进行盐析、DEAE 柱层析、Resource Q 柱层析分离纯化后,获得可催化水解3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷的功能酶组分;通过质谱对该功能酶组分进行鉴定,从中筛选出糖苷水解酶类蛋白,具体包括6-磷酸- β -葡萄糖苷酶(A0A0H3GSS3、A0A0H3GUC2)、1,4- α -葡聚糖分支酶(A0A0H3GWW6)和 β -葡萄糖糖苷酶(A0A5R9LN38)。本研究结果不仅为烟用生物酶的开发提供了新思路,还为烟用糖苷酶的后续研发奠定了基础。

参考文献:

[1] 王燕,刘志华,刘春波,等.烟草中两种紫罗兰醇葡萄糖苷衍生物的分离鉴定及热分析研究[J].分析测试学报,2012,31(1):22-28.
WANG Y, LIU Z H, LIU C B, et al. Isolation, identification and thermal decomposition behavior of two ionol glucopyranosides in tobacco [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2012, 31(1): 22-28.

[2] 原野,胡彦波,周义发.糖苷水解酶:生物转化制备活性糖苷与苷元的有效工具[J].微生物学报,2017,57(8):1219-1234.
YUAN Y, HU Y B, ZHOU Y F. Glycosidase: An effective tool for the preparation of active glycosides and aglycone [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(8): 1219-1234.

[3] 钱晓波.烤烟中西柏三烯醇、糖苷类物质的检测及其与烟叶油润性的关系[D].合肥:中国科学技术大

学,2014.

QIAN X B. Determination of cembratriene diols and glycosides in flue-cured tobacco and their relationship with tobacco leaf oiliness [D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2014.

- [4] BLAŽEVIĆ I, MASTELIĆ J. Glucosinolate degradation products and other bound and free volatiles in the leaves and roots of radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 96-102.
- [5] 李锋,朴永革,李宝志,等.延边烟叶糖苷类香味成分分析研究[J].农业与技术,2018,38(17):20-22.
LI F, PIAO Y G, LI B Z, et al. Analysis of glycosides flavor components in Yanbian tobacco leaves [J]. Agriculture and Technology, 2018, 38(17): 20-22.
- [6] LI X F, BIN J, YAN X F, et al. Application of chromatographic technology to determine aromatic substances in tobacco during natural fermentation: A review [J]. Separations, 2022, 9(8): 187.
- [7] 解万翠,刘艺,阎威,等.糖苷类香料前体的卷烟加香和缓释效果[J].烟草科技,2006,39(7):40-42.
XIE W C, LIU Y, GE W, et al. Application of geranyl glycoside in cigarette flavoring [J]. Tobacco Science & Technology, 2006, 39(7): 40-42.
- [8] 刘百战,徐玉田,孙哲建,等.加料前后烟草中游离及糖苷结合态香味成分的分析研究[J].中国烟草学报,1998,4(1):1-8.
LIU B Z, XU Y T, SUN Z J, et al. Studies on the free and glycosidically bound aroma components of tobacco during casing process [J]. Acta Tabacaria Sinica, 1998, 4(1): 1-8.
- [9] 尚善斋,雷萍,刘春波,等.一种源自烟草的糖苷类化合物及其热裂解分析[J].香料香精化妆品,2015(5):17-22.
SHANG S Z, LEI P, LIU C B, et al. A glycoside compound from K326 tobacco leaf in Yunnan Yuxi and analysis of its pyrolysis behavior [J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2015(5): 17-22.
- [10] 王林,朱金峰,许自成,等.烟草中糖苷类物质研究进展[J].中国农业科技导报,2015,17(1):65-70.
WANG L, ZHU J F, XU Z C, et al. Research progress on tobacco glycoside substances [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2015, 17(1): 65-70.
- [11] KAPFER G F, NITZ S, DRAWERT F. Bound aroma compounds in tobacco smoke condensate [J]. Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 1989, 188(6): 512-516.
- [12] WANG C, LIU W, WEI Y, et al. Dynamic changes of the total content of glycoside aroma components in tobacco leaves in different producing areas during the late growth period [J]. Science Publishing Group, 2018(5): 164-172.
- [13] 荀廷军,李光正,高勇,等.凉山州去除不适用烟叶技术示

- 范效果研究[J]. 现代农业科技, 2023(13):46-48, 53.
- XUN T J, LI G Z, GAO Y, et al. Study on the demonstration effect of removing unusable tobacco leaves in Liangshan Prefecture[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2023(13):46-48, 53.
- [14] 吴琼, 汪阳忠, 安彤, 等. 利用特征中性丢失和非靶向液相色谱-质谱联用技术鉴定烟草中的糖苷成分[J]. 分析测试学报, 2023, 42(1):68-74.
- WU Q, WANG Y Z, AN T, et al. Identification of glycosides in tobacco by characteristic neutral loss and untargeted liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2023, 42(1):68-74.
- [15] CHOI J M, HAN S S, KIM H S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects[J]. Biotechnology Advances, 2015, 33(7):1443-1454.
- [16] 武士杰, 付秋娟, 信琪, 等. 白酒大曲中产香微生物筛选及提升再造烟叶品质研究[J]. 轻工学报, 2024, 39(4):89-96, 117.
- WU S J, FU Q J, XIN Q, et al. Screening of an aroma-producing microorganism in Baijiu Daqu and its application on improving the quality of reconstituted tobacco extract[J]. Journal of Light Industry, 2024, 39(4):89-96, 117.
- [17] 黄申, 芦尧, 刘强, 等. 生物酶在烟草工业中的应用研究进展[J]. 轻工学报, 2023, 38(5):112-118.
- HUANG S, LU Y, LIU Q, et al. Review on application of biological enzymes in tobacco industry[J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(5):112-118.
- [18] HE B, SHEN X, CHEN X, et al. Study on improving the internal quality of tobacco stems by using pectinase[J]. Agricultural Science & Technology, 2013, 14(9):1299-1321.
- [19] 周瑾, 李成斌, 邓国斌, 等. 烤烟叶面微生物产生的纤维素酶对上部烟叶品质改善作用的研究[J]. 烟草科学研究, 2004(1):62-64.
- ZHOU J, LI C B, DENG G B, et al. Study on quality improvement effect of cellulase produced by foliar microorganisms of flue-cured tobacco on upper leaves[J]. Tobacco Science Research, 2004(1):62-64.
- [20] 黄申, 夏璠, 魏涛, 等. 烟叶中西柏三烯-4, 6-二醇降解产香菌的分离与鉴定[J]. 轻工学报, 2017, 32(6):73-80.
- HUANG S, XIA F, WEI T, et al. Isolation and identification of a cembratriene-4, 6-diol degradation and aroma producing strain from tobacco leaf[J]. Journal of Light Industry, 2017, 32(6):73-80.
- [21] 李石头, 毕一鸣, 帖金鑫, 等. 基于UHPLC法的巨豆三烯酮前体物同分异构体的定量分析及其在不同产地烟叶中的分布情况[J]. 2023, 38(5):83-87.
- LI S T, BI Y M, TIE J X, et al. Quantitative analysis of isomers of the precursor of gianotrienone based on UHPLC method and its distribution in tobacco leaves from different producing areas[J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(5):83-87.
- [22] 黄申, 刘丹阳, 张增辉, 等. 肠杆菌和不动杆菌混菌发酵提升山东烟叶品质机制研究[J]. 轻工学报, 2023, 38(1):45-53.
- HUANG S, LIU D Y, ZHANG Z H, et al. Study on improving tobacco quality mechanism of Shandong province by Enterobacter and Acinetobacter mixed fermentation[J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(1):45-53.
- [23] DELCHER A L, HARMON D, KASIF S, et al. Improved microbial gene identification with GLIMMER[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(23):4636-4641.
- [24] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. Journal of Computational Biology, 2012, 19(5):455-477.
- [25] WALKER B J, ABEEL T, SHEA T, et al. Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. PLoS One, 2014, 9(11):e112963.
- [26] 刘春奎, 贾琳. 烟叶分级[M]. 北京: 中国纺织出版社, 2024.
- LIU C K, JIA L. Tobacco Grading[M]. Beijing: China Textile Press, 2024.
- [27] 刘智慧, 赵佳男, 王雪, 等. 高效氮氮降解克雷伯菌筛选鉴定和适宜条件研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(15):64-71, 136.
- LIU Z H, ZHAO J N, WANG X, et al. Screening and identification of *Klebsiella* with high-efficiency ammonia nitrogen degradation and study on suitable conditions[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2023(15):64-71, 136.
- [28] CHEN Y H, SHEU S C, MAU J L, et al. Isolation and characterization of a strain of *Klebsiella pneumoniae* with citrinin-degrading activity[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(3):487-493.
- [29] NWAGUMA I V, CHIKERE C B, OKPOKWASILI G C. Isolation, characterization, and application of biosurfactant by *Klebsiella pneumoniae* strain IVN51 isolated from hydrocarbon-polluted soil in Ogoniland, Nigeria[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2016, 3(1):40.
- [30] ZHANG L L, FAN G, LI X, et al. Identification of functional genes-associated with the biotransformation of limonene to trans dihydrocarvone in *Klebsiella* sp. O852[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(8):3297-3307.
- [31] 王婉莹, 李志建, 李泽浩, 等. 克雷伯杆菌烯还原酶基因的异源表达和性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(14):65-73.
- WANG W Y, LI Z J, LI Z H, et al. Heterologous expression and characterization of *Klebsiella* SP.

- eneductase gene[J]. Food and Fermentation Industries, 2025,51(14):65-73.
- [32] 韩增叶. 吡咯喹啉醌及其酶蛋白葡萄糖脱氢酶基因的克隆与原核表达[D]. 北京:北京化工大学,2011.
HAN Z Y. Cloning and prokaryotic expression of pyrroloquinoline quinone and its ouinoprotein glucose dehydrogenase[D]. Beijing:Beijing University of Chemical Technology,2011.
- [33] 李宗显,许丽亚,朱运平,等. 克雷伯氏菌产 β -半乳糖苷酶的异源表达及低聚半乳糖合成工艺优化[J]. 中国食品学报,2021,21(8):245-251.
- LI Z X, XU L Y, ZHU Y P, et al. Optimization of synthesis technology of galacto-oligosaccharides by heterologous expression of β -galactosidase from *Klebsiella* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,2021,21(8):245-251.
- [34] 温亮亮,郭佳,关锋. 产酸克雷伯氏菌 M5al 普鲁兰酶的异源表达及酶学性质研究[J]. 工业微生物,2015,45(1):36-42.
WEN L L, GUO J, GUAN F. Heterologous expression and enzymatic properties of pullulanase from *Klebsiella oxytoca* M5al[J]. Industrial Microbiology,2015,45(1):36-42.

Screening of tobacco glycoside-degrading bacteria and mining of glycosidases

FENG Yingjie¹, QI Wenyuan², LIU Wenzhao¹, ZHANG Tingting¹, YANG Jinchu¹,
YANG Zongcan¹, ZHU Li², HUANG Shen²

1. Technology Center, China Tobacco He'nan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China

2. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

Abstract: [Objective] To develop enzymes that degrade tobacco glycosides and generate aroma components. **[Methods]** A strain capable of degrading 3-oxo- α -ionol- β -D-glucopyranoside was screened using 3-oxo- α -ionol- β -D-glucopyranoside as the sole carbon source. The genome of this strain was analyzed, and the glycosidase from it was isolated and purified. The enzymatic properties of the glycosidase were investigated, and tobacco glycosidases were identified and mined. **[Results]** Strain HZW-15 was capable of degrading 3-oxo- α -ionol- β -D-glucopyranoside. After treating crude tobacco glycosides with its crude enzyme, the contents of aroma components such as 3-oxo- α -ionol, benzyl alcohol, and phenylethanol increased significantly. Treatment of reconstituted tobacco leaf concentrate with the enzyme solution resulted in prominent sweetness, a clean aftertaste, and improved aroma quality. Under the conditions of enzymatic hydrolysis temperature 40 °C, shaking speed 150 r/min, pH value 7.0, and K⁺ concentration 10 mmol/L, the content of 3-oxo- α -ionol increased by 2.3 times. The genome of HZW-15 consists of 5 554 921 bp, encoding 76 glycoside hydrolase genes. **[Conclusion]** We identified the purified enzyme components by mass spectrometry, which indicated that 6-phospho- β -glucosidase, β -glucosidase, and 1,4- α -glucan branching enzyme are functional enzymes, providing a reference for the development of tobacco-used glycosidases.

Key words: tobacco glycoside; glycoside-degrading bacteria; glycosidase; enzymatic property

[责任编辑:王晓波 刘春奎]