



张志平,张翅,苏怡馨,等.灵芝复合酶液关键酶特性分析及其在烟梗增香提质中的应用[J].轻工学报,2026,41(3):120-131.
ZHANG Z P,ZHANG C,SU Y X,et al.Characteristics of the key laccase in *Ganoderma lucidum* complex Enzyme liquid and its application in aroma enhancement and quality improvement of tobacco stems[J].Journal of Light Industry,2026,41(3):120-131. DOI:10.12187/2026.03.012

灵芝复合酶液关键酶特性分析及其在烟梗增香提质中的应用

张志平¹,张翅¹,苏怡馨¹,张荣亚²,马亚萍²,张悦¹,刘民昌²,文武²

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;
2. 四川中烟工业有限责任公司 技术中心,四川 成都 610066

摘要:【目的】明确灵芝复合酶液的关键生物酶及其酶学特性,以及发酵烟梗的增香提质机制。【方法】通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和酶活力测试确定灵芝复合酶液的关键生物酶,采用酶分离纯化技术和分子结构模拟研究关键酶的酶学特性和结构特征,进一步通过扫描电子显微镜和 GC-MS 分析明确灵芝复合酶液处理烟梗的增香提质效果。【结果】灵芝复合酶液具有多种酶活力,其中漆酶活力最高,达 35 466.67 U/L,并含 3 种漆酶同工酶;关键漆酶 Lac3 为三域结构漆酶,相对分子质量为 58.4 kDa,含 500 个氨基酸,最适温度、pH 值分别为 55 °C 和 3.0,1 mmol/L Cu²⁺ 对其活力具有促进作用,而 Fe³⁺ 的抑制作用最大;经灵芝复合酶液酶解后,烟梗致密结构被破坏,木质素降解率达 22.56%;卷烟加香感官评价得分明显提升,梗丝中醛类、酮类、酚类等共计 17 种香气成分总量提升,实现烟梗增香提质目的。【结论】灵芝复合酶液以漆酶为关键酶,可降解梗丝木质素、提升香气,助力资源化利用。

关键词:灵芝复合酶液;漆酶;结构模拟;烟梗;提质增香

中图分类号:TS49 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2026)03-0120-12

0 引言

加强烟梗资源开发是烟草多用途利用的重要方向。我国烟草行业每年产生烟梗约 3.0×10^5 t,其中卷烟企业和再造烟叶企业可利用约 1.9×10^5 t,利用率不足 65%^[1]。剩余烟梗主要由打叶复烤企业存放或焚烧处理,这不仅造成资源浪费,还带来一定的环境污染。因此,提升烟梗内在品质,将其以

梗丝形式添加至卷烟,是烟梗资源开发和利用率提升的关键。

目前,微生物发酵和酶解技术的发展为烟梗品质提升提供了新思路。例如,利用适宜的微生物和外源酶处理烟梗,能够加速木质素等不利化学成分降解,改善烟梗感官品质^[1-2]。利用短小芽孢杆菌、白腐球菌和乳酸菌均可降低烟梗中纤维素、果胶、木质素和蛋白含量,降低梗丝烟气杂气量,改善梗

收稿日期:2024-06-18;修回日期:2025-07-31;出版日期:2026-06-15

基金项目:河南省重点研发专项项目(241111110400);四川中烟工业有限责任公司科技项目(10202313BA510)

作者简介:张志平(1981—),男,河南省安阳市人,郑州轻工业大学副教授,博士,主要研究方向为生物质资源化利用。E-mail:zzp@zzuli.edu.cn

通信作者:刘民昌(1985—),男,山东省菏泽市人,四川中烟工业有限责任公司高级工程师,主要研究方向为卷烟工艺。E-mail:liumc@sctobacco.com

丝抽吸品质^[3]。四川中烟工业有限责任公司构建了烟梗生物发酵实验平台和生产线,利用灵芝复合酶液处理烟梗,再将其发酵后作为梗丝原料,为生物发酵技术应用于烟梗资源综合利用提供了实践路径^[4]。

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是我国传统的名贵中药材,其生长过程可分泌系列胞外酶,其中,能高效降解木质素的漆酶(EC1.10.3.2)为其主要胞外酶^[5]。漆酶是一种含铜糖蛋白氧化酶,能够催化烟梗中木质素多酚类成分氧化和降解,减轻木质杂气并生成新的香味成分,从而提高烟梗品质^[6-7]。马亚萍等^[4]研究发现,灵芝复合酶液中漆酶的酶活力可达 65 387 U/L,对烟梗木质素的降解率为 38%。H. W. Lou 等^[8]将灵芝分泌的高活性漆酶用于降解玉米中的黄曲霉毒素 B1 (AFB1),降解率可达 92.91%。然而,灵芝复合酶液中的关键酶及其酶学特性尚不清楚,其发酵烟梗的作用机制也缺乏相关研究报道。

鉴于此,本文拟在明确灵芝复合酶液主要胞外酶种类及其活力的基础上,利用酶分离纯化技术和分子结构模拟研究其关键酶的酶学特性和结构特征,结合木质素降解率测定、显微图像分析、感官评价及梗丝香味成分检测,阐释灵芝复合酶液降解烟梗木质素及增香提质的相关机制,为灵芝复合酶液处理烟梗的工艺和品质控制,以及烟梗资源化利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

灵芝复合酶液、烟梗,由四川中烟工业有限责任公司提供;果胶、半乳糖醛酸、可溶性淀粉、苯酚、木聚糖、木糖、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、冰乙酸,上海麦克林生化科技有限公司;3,5-二硝基水杨酸(DNS)、NaOH、Na₂SO₃、(NH₄)₂SO₄、柠檬酸,国药集团化学试剂有限公司;乙酸钠、酒石酸钾钠,天津市科密欧化学试剂有限公司;蛋白质 Marker(10~180 kDa),兰杰柯科技有限公司;非变性聚丙烯酰胺凝胶(Native-PAGE)电泳试剂盒、SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-

PAGE)电泳试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 主要仪器与设备

HHS-21-1 型电热恒温水浴锅,上海博讯实业有限公司;UV-1800 型紫外-可见分光光度计,美谱达仪器有限公司;Regulus 8100 型扫描电子显微镜(SEM),日本日立公司;DGX-9143 型电热恒温鼓风干燥箱,上海福玛实验设备有限公司;EL204 型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Agilent 6890-5973 型气相色谱-质谱联用(GC-MS)仪,美国 Agilent 公司;DYCZ-24DH 型双板垂直电泳仪、DYY-7C 型转印电泳仪,北京六一生物科技有限公司;Biorad ChemiDocXRS⁺ 型凝胶成像仪,美国伯乐公司;AKTATM Pure 25 L 蛋白纯化系统,美国通用电气公司。

1.3 实验方法

1.3.1 灵芝复合酶液胞外酶活力测定 为明确发酵液中功能酶的种类及活力,对灵芝复合酶液中主要酶的活性进行测定,以活性最高的酶为关键酶,以便后续对其进行分离纯化及应用研究。

1)果胶酶活力测定。参考文献[9]方法,建立的半乳糖醛酸标准曲线为 $y = 0.9665x - 0.0533$ ($R^2 = 0.9984$)。0.9 mL 1% (若无特指,百分数均指质量分数)果胶溶液中添加 0.1 mL 灵芝复合酶液,对照组添加 0.1 mL 高温灭活的灵芝复合酶液,40 °C 水浴保温 30 min 后,加入 2 mL DNS,沸水浴 2 min,冷却并用蒸馏水定容至 15 mL,测定 A_{540} 。根据半乳糖醛酸标准曲线,计算果胶酶活力。每分钟水解果胶生成 1 μmol 半乳糖醛酸所需要的果胶酶量为一个酶活单位。

2)淀粉酶活力测定。参考文献[10]方法,建立的葡萄糖标准曲线为 $y = 1.1450x - 0.0256$ ($R^2 = 0.9986$)。0.9 mL 1% 可溶性淀粉溶液中添加 0.1 mL 灵芝复合酶液,对照组添加 0.1 mL 高温灭活的灵芝复合酶液,50 °C 水浴 30 min 后,加入 2 mL DNS,沸水浴 2 min,冷却并用蒸馏水定容至 15 mL,测定 A_{540} 。根据葡萄糖标准曲线,计算淀粉酶活力。每分钟水解可溶性淀粉生成 1 μmol 葡萄糖所需要的淀粉酶量为一个酶活单位。

3) 纤维素酶活力测定。参考《饲用纤维素酶活性的测定》(GB/T 23881—2009)^[11]进行测定。每分钟降解纤维素滤纸生成 1 μmol 葡萄糖所需的纤维素酶量为一个酶活单位。

4) 木聚糖酶活力测定。参考文献[12]方法,建立的木糖标准曲线为 $y = 1.145 0x - 0.025 6 (R^2 = 0.997 1)$ 。0.9 mL 1% 木聚糖溶液添加 0.1 mL 灵芝复合酶液,对照组添加 0.1 mL 高温灭活的灵芝复合酶液,40 ℃ 水浴 30 min 后,加入 2 mL DNS,沸水浴 2 min,冷却并用蒸馏水定容至 15 mL,测定 A_{540} ,根据木糖标准曲线,计算木聚糖酶活力。每分钟水解木聚糖生成 1 μmol 木糖所需的木聚糖酶量为一个酶活单位。

5) 漆酶活力测定。2 mL Na_2HPO_3 -柠檬酸缓冲液中加入 0.5 mL 灵芝复合酶液,再加入 0.5 mL 1 mmol/L 的 ABTS 溶液,迅速放入 45 ℃ 恒温水浴锅中反应 5 min,测定 A_{420} 。根据下式计算漆酶活力/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)。

$$\text{漆酶活力} = \frac{10^6 \times V_{\text{总}} \times A_{420}}{\varepsilon \times V_{\text{酶}} \times \Delta t}$$

式中, ε 为 $3.6 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$, $V_{\text{总}}$ 为反应体系总体积/mL, $V_{\text{酶}}$ 为添加漆酶体积/mL, Δt 为反应时间/min。

1.3.2 漆酶分离纯化 1) 最佳硫酸铵盐析饱和度确定。50 mL 灵芝复合酶液在 10 000 r/min、4 ℃ 条件下离心 10 min,上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,备用。滤液中加入硫酸铵粉末至质量分数为 30%~90%,间隔 10%,4 ℃ 条件下静置沉淀 12 h。离心取上清液和沉淀,分别测定不同硫酸铵质量分数下所获得上清液和沉淀中的漆酶活力和蛋白质含量,根据上清液剩余漆酶活力和沉淀比活力的变化确定漆酶沉淀的最佳硫酸铵盐析饱和度。

2) 蛋白质含量测定。根据 Bradford 法^[13]建立的蛋白质标准曲线为 $y = 0.004 6x + 0.017 7 (R^2 = 0.997 4)$,根据标准曲线,将牛血清蛋白标准溶液替换为 0.1 mL 灵芝复合酶液,测定 A_{595} ,计算蛋白质含量。

3) 漆酶同工酶鉴定。利用 Native-PAGE 鉴定灵芝复合酶液中的漆酶同工酶^[14]。5 μL 灵芝复合酶

液与上样缓冲液等体积混合,上样量 10 μL。浓缩胶和分离胶浓度分别为 5% 和 10%,电泳电压分别为 70 V 和 110 V。电泳结束后,用 1 mmol/L ABTS 溶液对凝胶进行染色,并采用成像仪进行扫描,分析漆酶同工酶数量。

4) 关键漆酶 Lac3 分离纯化。1 L 灵芝复合酶液在 4 ℃、4000 r/min 条件下离心 20 min,0.2 μm 滤膜过滤,经硫酸铵沉淀,离心收集沉淀,用 Na_2HPO_3 -柠檬酸缓冲液复溶沉淀至 20 mL,透析过夜,冻干得粗漆酶粉,备用。粗漆酶粉用 Na_2HPO_3 -柠檬酸缓冲液复溶至 5 mL,利用蛋白纯化系统 (AKTATM Pure 25 L) 进行凝胶过滤层析,选用 Sephadex G-200 色谱柱, Na_2HPO_3 -柠檬酸缓冲液为洗脱液,洗脱流速为 2.0 mL/min。每管收集 5 mL 洗脱液,检测蛋白质含量及酶活力,收集具有漆酶活力的洗脱组分。利用 Native-PAGE 切胶回收法进一步纯化漆酶^[15],浓缩胶和电泳条件与同工酶鉴定方法一致。电泳结束后,将 ABTS 显色凝胶回收于缓冲液中,多次重复回收步骤获得纯化酶液。利用 SDS-PAGE 检验纯化效果。浓缩胶和分离胶浓度分别为 5% 和 12%,上样量 10 μL,电泳后凝胶经考马斯亮蓝 R-250 染色、乙醇-冰醋酸过夜脱色后,采用成像仪拍照,计算蛋白质相对分子质量。

1.3.3 酶学特性测定 1) 最适温度。以 ABTS 为底物,设置 5~85 ℃ 温度梯度(间隔 5 ℃),在 pH 值为 3.0 条件下测定粗酶液和 Lac3 活力,定义最高酶活力为 100%,计算各组相对酶活力。

2) 温度稳定性。以 ABTS 为底物,将粗酶液和 Lac3 在 25~75 ℃ 温度梯度(间隔 10 ℃)条件下保温 6 h,每 1 h 取样,在 pH 值为 3.0、最适温度下测定各组剩余漆酶活力,定义初始酶活力为 100%,计算各组剩余相对酶活力。

3) 最适 pH 值。以 ABTS 为底物,设置 pH 值范围 2.5~6.5(间隔 0.5),Lac3 在最适温度条件下,分别测定粗酶液及 Lac3 活力,定义最高酶活力为 100%,计算各组相对酶活力。

4) pH 值稳定性。以 ABTS 为底物,将粗酶液和 Lac3 分别在 3.0~8.0 pH 值梯度(间隔 0.5)条件下孵育 6 h,每 1 h 取样,在最适温度、pH 值条件下测

定剩余漆酶活力,定义初始酶活力为 100%,计算各组剩余相对酶活力。

5) 金属离子对酶活力的影响。以 ABTS 为底物,向各反应体系中分别加入 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} (以 Cl^- 为共有阴离子),使上述金属离子终浓度为 0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 和 5.0 mmol/L,测定粗酶液和 Lac3 的活力,定义未添加金属离子的样品酶活力为 100%,分析各金属离子对酶活力的影响。

6) 阴离子对酶活力的影响。以 ABTS 为底物,向各反应体系中分别加入 Cl^- 、 CO_3^{2-} 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- (以 Na^+ 为共有阳离子),使上述阴离子终浓度为 0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 和 5.0 mmol/L,测定粗酶液和 Lac3 的活力,定义未添加阴离子的样品酶活力为 100%,分析各阴离子对酶活力的影响。

上述所有实验均设 3 组重复。

1.3.4 Lac3 蛋白测序及结构模型预测与评估 委托生工生物工程(上海)股份有限公司对关键漆酶蛋白进行测序。关键漆酶的二级结构使用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html) 进行预测,结构域使用在线工具 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 进行预测,三级结构使用 Alpha Fold 3 进行预测。预测模型上传至 SAVES (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) 进行模型评估。

1.3.5 灵芝复合酶液处理烟梗效果及其形态和产物测定 1) 灵芝复合酶液处理烟梗。烟梗切丝后,过筛(筛孔直径 0.15 mm),灭菌,备用。10 mL 降解体系中,含梗丝 1 g,加漆酶量 10 U/g,介体 ABTS 终浓度为 0.5 mmol/L。对照组使用高温灭活的灵芝复合酶液。在 pH 值为 3.0、55 °C 条件下反应 6 h 后,使用三素测定法^[16]测定梗丝中木质素的降解率。

2) 烟梗发酵前后结构表征。将酶解前后的烟梗样品涂布于导电胶上,经喷金处理后进行 SEM 观察,放大倍数为 1×10^4 倍。

3) GC-MS 分析条件。Agilent DB-5 MS 毛细管柱(30 m×250 μ m×0.25 μ m),载气为氦气,流速为 1 mL/min,不分流;进样口温度为 200 °C,传输线温度为 280 °C,进样量为 1 μ L;升温程序:初始温度

45 °C,保持 5 min,以 10 °C/min 升温至 200 °C,保持 5 min,以 10 °C/min 升温至 240 °C,保持 5 min,实验结束。离子源温度为 230 °C,四极杆温度为 150 °C,电离方式为电子轰击(EI),电子能量为 70 eV;溶剂延迟时间为 8 min,质量扫描范围为 35~550 amu,扫描方式为全扫描。

4) 定性定量分析。利用 Agilent 质谱工作站 MSD Chemstation Data Analysis 处理 GC-MS 总离子流图后,进行 NIST 20 谱库检索,选取匹配度大于 85%的质谱离子峰进行定性分析。同时参考本实验室保存的标准品(如苜蓿亭、糖醛、5-甲基呋喃醛、苯乙醛、5-羟甲基糖醛、香草醛、甲基环戊烯醇酮、愈创木酚、4-乙炔基-2 甲氧基苯酚、麦芽醇、雪松醇、4-羟基-苯乙炔吡啶、烟碱等)确定 GC-MS 保留时间。以乙酸苯乙酯为内标进行定量分析。

1.3.6 卷烟加香感官评价 将未处理烟梗、无菌水处理 8 h 对照组及灵芝复合酶液处理 2 h、4 h、6 h 和 8 h 烟梗,在 55 °C 条件下进行发酵后制成梗丝。每只烟筒加 0.7 g 梗丝,卷制后进行感官评价,明确不同处理方式对卷烟加香感官效果的影响。

感官评价小组由 10 位评吸人员组成,按照卷烟第 4 部分:感官技术要求(GB 5606.4—2005)^[17]对 6 组卷烟样品进行感官评价,评价指标为木质气、燃烧性、刺激感、甜感、香气量和杂味。每项得分均为 0~5 分,得分越高,加香效果越好。

2 结果与分析

2.1 灵芝复合酶液胞外酶活力分析

灵芝复合酶液胞外酶活力见表 1。由表 1 可知,漆酶活力达 35 466.67 U/L,显著高于其他酶。漆酶在木质素的生物降解中发挥着重要作用,该灵

表 1 灵芝复合酶液胞外酶活力
Table 1 Extracellular enzyme activities in *G. lucidum* complex enzyme liquid

胞外酶种类	酶活力/(U·L ⁻¹)
果胶酶	281.90 ± 12.62
淀粉酶	1 642.98 ± 49.29
纤维素酶	21.02 ± 0.46
木聚糖酶	336.50 ± 10.11
漆酶	35 466.67 ± 864.05

芝复合酶液较高的漆酶活性是其具备分解木质纤维素能力的重要基础之一。

2.2 漆酶分离纯化结果分析

2.2.1 最佳硫酸铵盐析饱和度 不同硫酸铵饱和度下蛋白质沉淀中比活力及上清液剩余酶活力如图 1 所示。由图 1 可知,当硫酸铵饱和度达到 60% 和 70% 时,蛋白质沉淀比活力分别达到 144.24 U/mg 和 72.77 U/mg,表明大部分漆酶在此饱和度范围内沉淀分离。上清液剩余酶活力在硫酸铵饱和度 ≤50% 及 ≥80% 时均较低。因此,选用 50%~80% 的硫酸铵饱和度为硫酸铵沉淀漆酶的最佳范围。

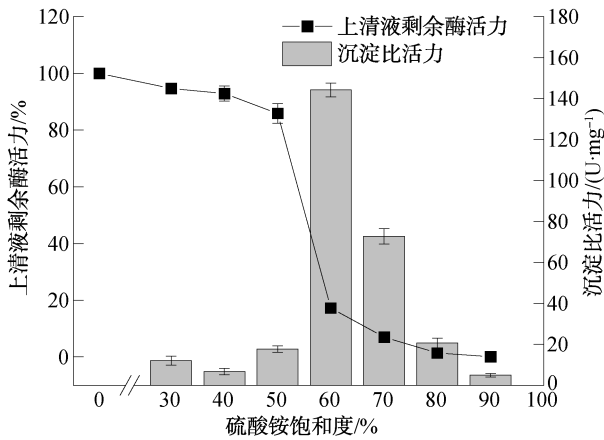


图 1 不同硫酸铵饱和度下蛋白质沉淀比活力及上清液剩余酶活力

Fig. 1 specific activity of the protein precipitate and residual enzyme activity in the supernatant at different ammonium

2.2.2 漆酶同工酶鉴定及分离纯化 漆酶同工酶鉴定及分离纯化结果如图 2 所示。由图 2a)可知,经 ABTS 染色后,凝胶显示出 3 条明显的条带,表明在灵芝复合酶液中含有 3 种漆酶同工酶,分别标记为 Lac1、Lac2 和 Lac3,其中 Lac3 蛋白含量和活性均最高,故选定为关键漆酶。相关研究^[18]已证实,多种白腐菌、高卢菌等真菌中均存在多个漆酶基因,并可表达产生多种漆酶同工酶,本研究得出的灵芝中存在多种漆酶同工酶的结论与之较一致。

由图 2b)可知,在洗脱体积为 70~105 mL 范围内,出现 2 个具有漆酶活力的洗脱峰 P2 和 P3,其中漆酶活性的峰形与蛋白质含量的峰形重合度较高,表明两峰均为目标漆酶,但尚未完全分离。合并 P2 和 P3 峰的样品,采用 Native-PAGE 切胶回收法进一步分离纯化,回收得到高纯度的漆酶 Lac3。由图 2c)可知,在 58.4 kDa 处有一清晰条带,表明漆酶 Lac3 的纯化度已达到电泳纯。

2.3 粗漆酶和漆酶 Lac3 的酶学特性分析

2.3.1 最适温度、pH 值及其稳定性 粗漆酶和漆酶 Lac3 的最适温度、pH 值及其稳定性如图 3 所示。由图 3a)和 b)可知,漆酶 Lac3 的最适温度为 55 °C,最适温度范围为 45~65 °C,该酶在此温度区间内能够维持 90% 以上的相对酶活力,表明其具有较宽的温度作用范围。粗漆酶的相对酶活力随温度变化的趋势与漆酶 Lac3 相似。这表明粗漆酶和 Lac3 均具有较好的工艺温度调控优势。由图 3c)和 d)可

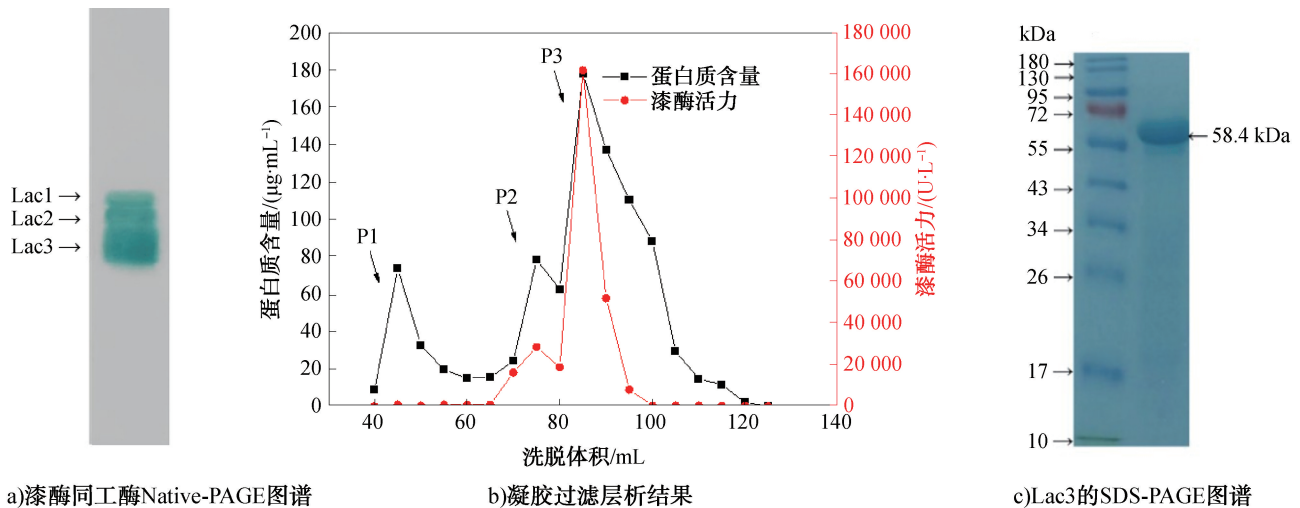


图 2 漆酶同工酶鉴定及分离纯化结果

Fig. 2 Identification and purification of laccase isoenzymes

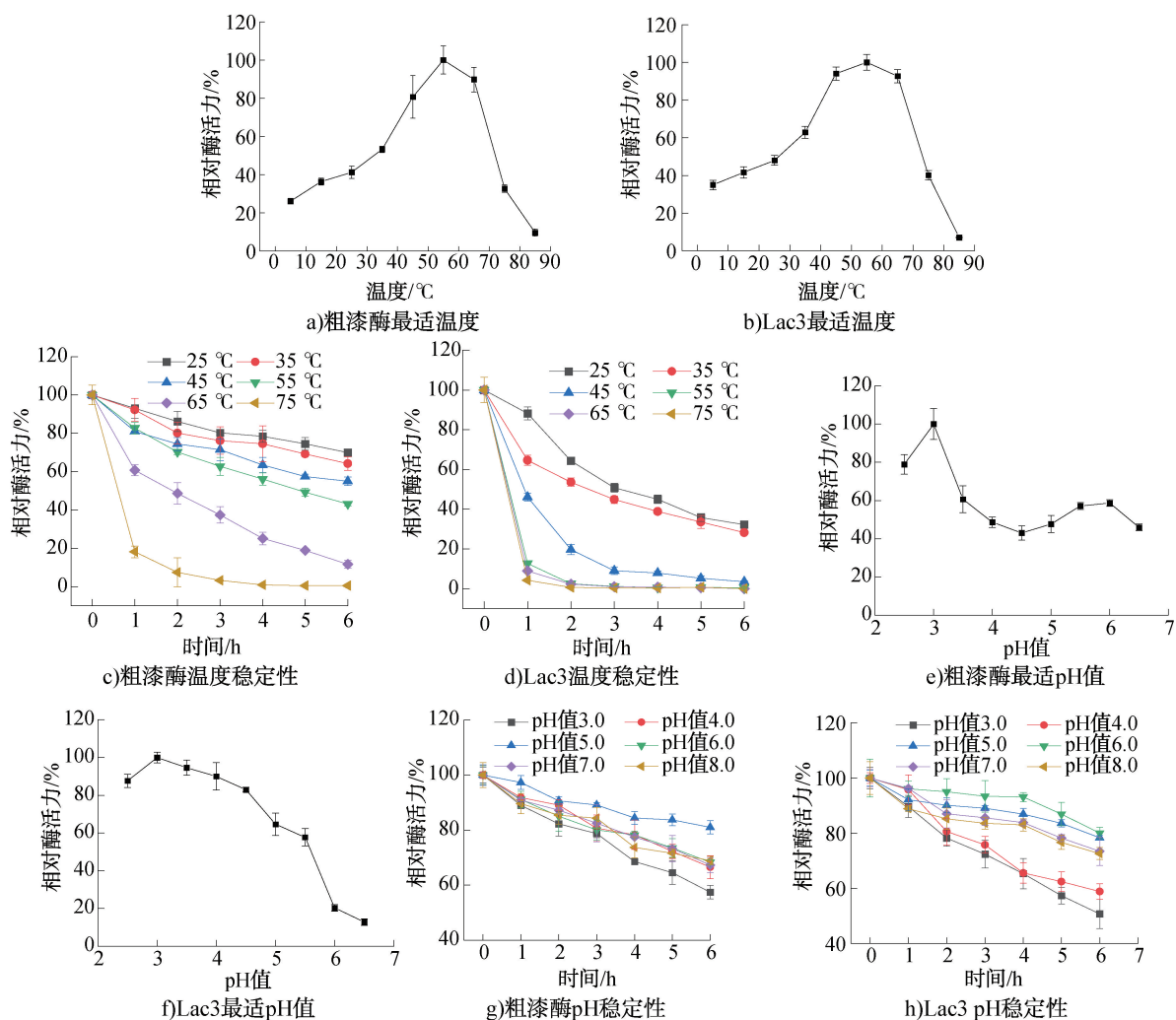


图3 粗漆酶和漆酶 Lac3 的最适温度、pH 值及其稳定性

Fig. 3 Optimal temperature, pH, and stability of crude laccase and purified laccase Lac3

知,漆酶 Lac3 在 55 °C、65 °C 和 75 °C 条件下保温 2 h 后,几乎全部失活。在 25 °C 条件下,漆酶 Lac3 的酶活力半衰期($t_{1/2}$)约为 3 h,高于 M. A. Alshiekheid 等^[19]在 20 °C 条件下测定的重伞灵芝(*Ganoderma multipileum*)漆酶 $t_{1/2}$ (1 h)。粗漆酶在 25 °C 条件下保温 6 h,其相对酶活力仍能够保持在 69.91%,其 $t_{1/2}$ 约为 11.5 h,温度稳定性明显优于漆酶 Lac3。由图 3e)和 f)可知,漆酶 Lac3 在 pH 值为 3.0 时达到最大相对酶活力,随着 pH 值升高,其相对酶活力呈下降趋势。粗漆酶最适 pH 值与漆酶 Lac3 一致,在 pH 值为 6.5 时达到第二个相对酶活力峰值(47.40%)。由图 3g)和 h)可知,粗漆酶在 pH 值为 5.0 时稳定性最好,保温 6 h 后,其相对酶活力保持在 80.98%的水平。漆酶 Lac3 在 pH 值为 6.0 时稳

定性最优,pH 值为 3.0 时稳定性最差。

2.3.2 金属离子和阴离子对粗漆酶和漆酶 Lac3 活力的影响 金属离子和阴离子对粗漆酶和漆酶 Lac3 活力的影响如图 4 所示。由图 4a)和 b)可知,金属离子对粗漆酶和漆酶 Lac3 活力的影响类似,除 1.0 mmol/L 的 Cu^{2+} 以外,其他金属离子均对漆酶活力表现出抑制作用,且该抑制作用随着金属离子浓度的升高而增强。其中, Fe^{3+} 对酶活力抑制作用最大,低浓度(0.5 mmol/L)即可使漆酶 Lac3 完全失活,这可能是因为 Fe^{3+} 能渗透进入漆酶分子内部,与漆酶活性中心的 Cu^{2+} 抢夺底物的结合位点,从而干扰或置换关键 Cu^{2+} 位点,扰乱酶内部的电子传递系统,阻碍正常的酶促反应流程,最终导致漆酶活力降低^[20]。此外, Fe^{3+} 对漆酶的强烈抑制作用还可能

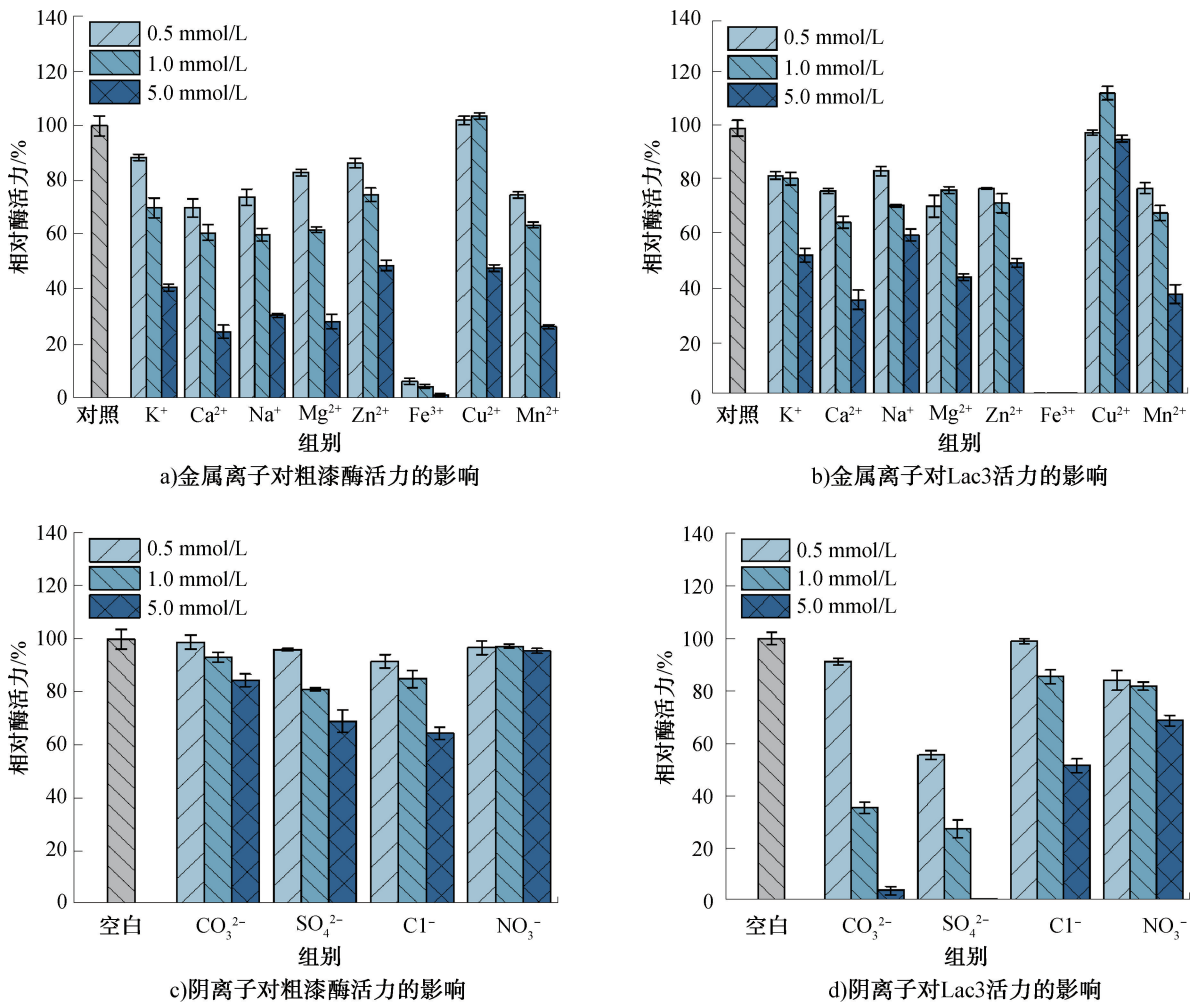


图4 金属离子和阴离子对粗漆酶和漆酶 Lac3 活力的影响

Fig. 4 Effects of metal ions and anions on the activity of crude laccase and Lac3

与其高离子价态有关。在水溶液中,漆酶表面呈负电性,高价态金属阳离子可通过增强静电相互作用,提高与漆酶的结合能力,进而导致其活力下降^[21]。较低浓度(1.0 mmol/L) Cu²⁺可对酶活力产生促进作用,粗漆酶和漆酶 Lac3 的相对酶活力分别为 103.47% 和 113.07%。而高浓度(5.0 mmol/L) Cu²⁺对粗漆酶的抑制作用较为明显,表明粗漆酶中可能存在对高浓度 Cu²⁺耐受性较差的同工酶。Cu²⁺通常对漆酶表现为激活作用,低浓度的 Cu²⁺通过稳定漆酶结构或补偿活性中心的 Cu²⁺损失来增强其活力,当 Cu²⁺浓度超过一定程度时,Cu²⁺与酶蛋白结合而改变其构象,进而产生抑制作用^[22]。

由图 4c) 和 d) 可知,粗漆酶对不同浓度阴离子的耐受性均较好。随着阴离子浓度的升高,对漆酶

Lac3 活力的抑制作用加强。低浓度(0.5 mmol/L)条件下,SO₄²⁻对漆酶活力抑制作用较为明显,相对酶活力仅为初始相对酶活力的 55.44%。中浓度(1.0 mmol/L)条件下,CO₃²⁻和 SO₄²⁻对漆酶活力抑制较明显,相对酶活力分别为初始相对酶活力的 35.42% 和 27.33%。在高浓度(5.0 mmol/L)条件下,CO₃²⁻和 SO₄²⁻几乎完全抑制漆酶活性,相对酶活力分别剩余 51.35% 和 68.67%,其次是 Cl⁻ 和 NO₃⁻。C. X. Zhou 等^[23] 研究发现,CO₃²⁻、NO₃⁻、Cl⁻ 对变色栓菌(*Trametes versicolor*)漆酶均有较好的抑制作用,这可能是因为漆酶的活性中心是由 3 种结构的 Cu²⁺ 组成,其中的 II 型 Cu²⁺ 处于配位不饱和状态,阴离子可能以底物形式与该位点结合,并通过与底物竞争结合位点抑制漆酶活力。

2.4 利用 SOPMA 预测漆酶 Lac3 蛋白序列及结构模型分析

LC-MS/MS 对 Lac3 蛋白质全长测序结果如下,共有 500 个氨基酸,其氨基酸序列为:

AGIGPSTDLTISNADISPDGFTRAAVVVVNGVFPGLITGNMGDRFQLNVVDQMTNHSMLKTTSIHWHGF-FQKGTNWADGPAFVNQCPIASGNSFLYDFQVPDQSG-TYWYHSHLSTQYCDGLRGPVVYDPNDPLKSLYDV-DDDSTVITLADWYHVAARLGRPFPLGSDSTLINGLGR-SPATPTADLAVISVTQ GKRYRFRLVLSLCPNYVFSID-DHDLSVIEADGIETQPVSVNAIQIFAAQRYSFILNANQ-TIDNYWIRANPNFGNVGFTDAINSAILRYDTADPVEP-VTTQQTQNLKETDLHPLIARATPGSPIQGGVDKAINMAFSFNGSNFFINGATFVPPTVPVLLQLSGAQAAQ-DLLPSGSVYELPINSSIEITFPATTGAPGAPHPFHLHG-HAFVAVRSAGSTVYNYDNPVWRDVVSTGTPAAGDN-VTIRFQTDNPGPWFLHCHIDFHL DAGFAVVF AEDSP-DTSVANPVPQAWSDLCPPTYNALSPDDL

Lac3 结构模型预测如图 5 所示,其中蓝色表示 α -螺旋,紫色表示 β -折叠,黄色表示无规则卷曲,该漆酶的二级元件主要由 α -螺旋(5.6%)、 β -折叠

(29.8%)和无规则卷曲(64.6%)组成。利用 InterPro 预测结构域发现,漆酶 Lac3 含有 Cu-oxidase-3、Cu-oxidase、Cu-oxidase-2 这 3 个结构域,位点分别为(11-131)、(114-284)和(346-472),属于多铜氧化酶家族。上述结构域通常由 2 个 β -折叠中的 7 条链组成,排列成希腊钥匙 β -桶状结构^[22],表明该漆酶为典型的三域结构漆酶。

使用 Alpha Fold 3 模拟漆酶的三级结构(见图 5b)),并通过 SAVES 服务器对该模型进行验证,发现该模型质量符合标准。由图 5c)可知,位于不允许区域的氨基酸残基占比均为 0.2%,表明该模型的空间构象符合立体化学规则。

2.5 灵芝复合酶液处理烟梗结果分析

2.5.1 对烟梗木质素降解率及形态的影响

以灵芝复合酶液中漆酶主导的多酶系统为酶源,对烟梗进行发酵后,其木质素含量由 7.76% 降低至 6.01%,降解率达 22.56%。酶解前后烟梗的 SEM 图如图 6 所示。由图 6 可知,酶解前烟梗的表面光滑且结构致密,而酶解后烟梗的表面出现明显裂纹,纤维结构变得松散、易断,碎片增多。表明灵芝复合酶系破坏了烟梗的表面结构,这种变化可显著

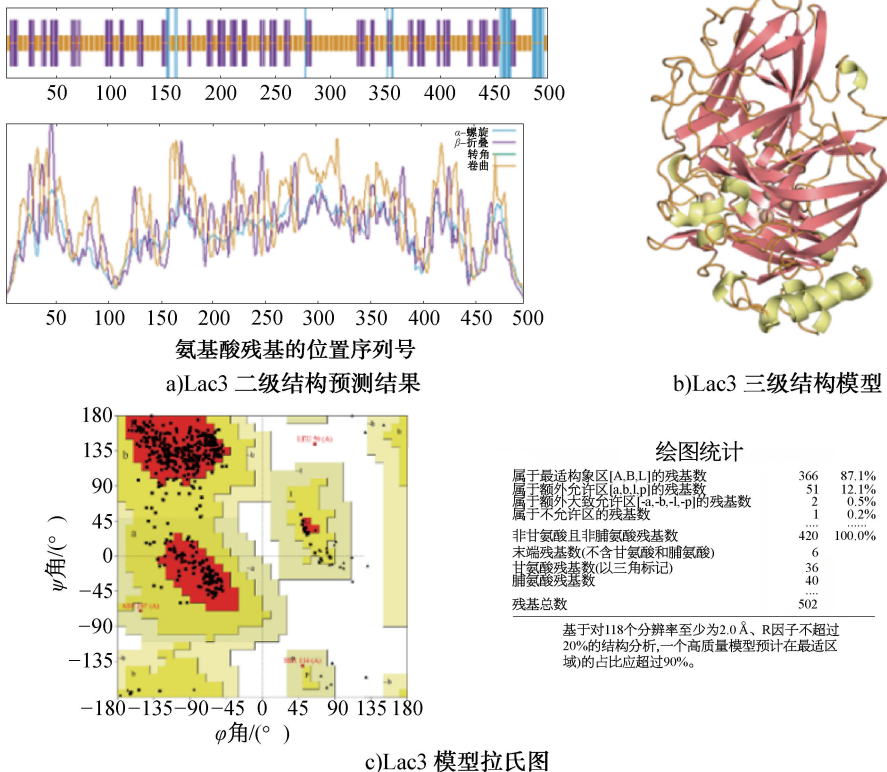
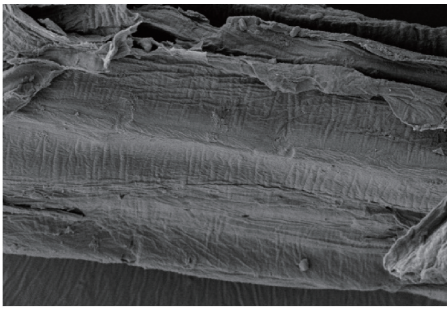
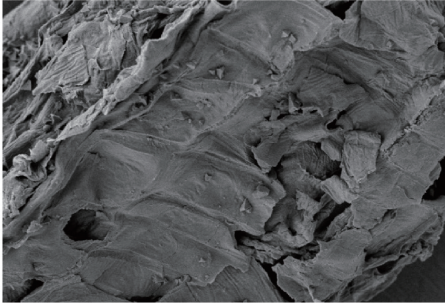


图 5 Lac3 结构模型预测

Fig. 5 Structural prediction of Lac3



a)酶解前烟梗形态



b)酶解后烟梗形态

图6 酶解前后烟梗的SEM图

Fig. 6 The SEM images of tobacco stems before and after enzymatic hydrolysis

提升木质素的可及性,从而加速其降解。

2.5.2 产物香气成分分析 产物主要香气成分GC-MS结果见表2。由表2可知,经酶解后,共鉴定到醛类10种、酯类3种、酸类5种、醇类4种、酚类6种、烃类6种、含氮化合物类4种和酮类7种。醛类的生成可能与木质素侧链氧化断裂相关,其中5-甲基呋喃醛含量最高(15.83 μg/mL),而糠醛和5-甲基呋喃醛的检出表明木聚糖酶对半纤维素具备降解作用。此外,经酶解后,样品的油酸、亚油酸等脂肪酸含量增加,在卷烟燃烧时能够赋予烟气奶油脂肪味,增加醇和感^[25]。甜香(2,4-二羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃-3-酮、2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-吡喃-4-酮、甲基环戊烯醇酮、麦芽醇),花香(香草醛、异香兰素、雪松醇),坚果香(苯甲醛、苯乙醛、2,4,5-三甲氧基苯甲醛),焦糖香(糠醛、5-甲基呋喃醛、5-羟甲基糠醛)等香气特征成分增加明显,表明烟梗香气品质明显改善。灵芝复合酶液中含有改善烟梗品质成分的多种酶系,其中果

表2 产物主要香气成分GC-MS结果

Table 2 The GC-MS results of major aroma components in the product

类别	化合物名称	含量/(μg·mL ⁻¹)		类别	化合物名称	含量/(μg·mL ⁻¹)	
		空白	酶处理			空白	酶处理
酯类	(6-甲基吡啶-3-基)乙酸酯	5.32	9.85	酸类	亚油酸	13.00	122.66
	萜荭亭	0.24	0.70		α-亚麻酸	—	224.27
	乙酸东萜荭素酯	1.49	—	酚类	苯酚	2.35	2.51
醛类	糠醛	—	5.24		邻甲酚	3.14	5.68
	苯甲醛	—	2.44		愈创木酚	2.34	3.66
	5-甲基呋喃醛	11.20	15.83		对甲酚	0.89	3.05
	苯乙醛	—	15.24		间甲酚	—	1.75
	5-羟甲基糠醛	9.02	12.70		4-乙炔基-2-甲氧基苯酚	7.85	9.64
	反式-2-癸烯醛	—	0.38	醇类	麦芽醇	—	3.51
	3-羟基-4-甲氧基苯甲醛	5.24	8.26		雪松醇	—	0.47
香草醛	—	2.50	反式-3-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-2-丙烯-1-醇		6.34	10.82	
异香兰素	5.24	8.26	1-二十二醇		—	1.26	
酮类	2,4,5-三甲氧基苯甲醛	—	1.03	1-甲基环庚烯	—	2.99	
	甲基环戊烯醇酮	7.26	9.14	烃类	2,5-二甲基-2,4-己二烯	5.03	3.35
	2,4-二羟基-2,5-二甲基-3(2H)-呋喃-3-酮	4.25	4.59		4-羟基苯乙烯	0.73	1.65
	2-羟基-2,4-二甲基戊-3-酮	0.94	—		新植二烯	9.24	10.31
	乙基环戊烯醇酮	4.18	5.89		十八烷	5.38	—
	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-吡喃-4-酮	61.37	66.15	二十烷	4.02	8.16	
	4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮	2.59	3.85	含氮化合物类	吡啶	—	3.38
茄尼酮	—	0.43	2-甲氧基-3-甲基吡嗪		—	3.39	
酸类	棕榈油酸	—	0.96		烟碱	696.46	717.36
	十七酸	—	2.71		芥酸酰胺	25.68	30.88
	油酸	0.56	1.36	总计	901.35	1348.26	

注:—表示未检出。

胶酶、木聚糖酶、纤维素酶、漆酶构成木质纤维素降解酶体系^[26],它们的协同作用能够更好地破除木质纤维素的交联网络,实现对烟梗中木质素的高效降解。此外,灵芝复合酶液在有效降解烟梗木质纤维素的同时,还通过提升系列香气特征成分的含量,改善烟梗香气品质。

2.5.3 卷烟加香感官评价结果分析 卷烟加香感官评价雷达图如图7所示。由图7可知,对照组烟香气木质气、刺激性明显,甜感尚可,香气量较弱,有杂味。酶解后烟香气木质气有较大改善,杂味、刺激感降低,香气量增加。

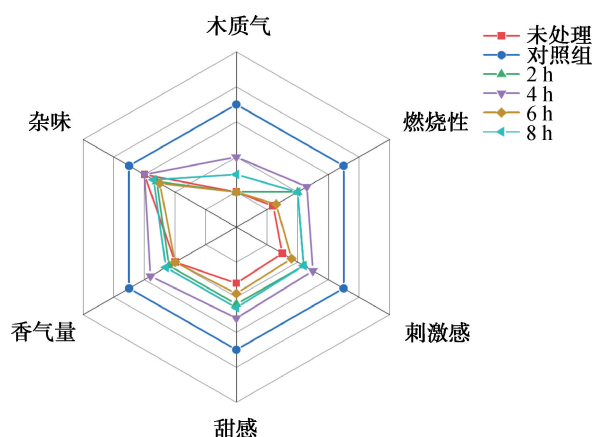


图7 卷烟加香感官评价雷达图

Fig.7 Radar chart for sensory evaluation of flavored cigarettes

3 结论

本研究采用酶分离纯化、酶学特性分析及发酵产物检测等技术,对灵芝复合酶液功能酶种类、漆酶及其酶学特性、发酵处理烟梗效果进行了研究,得到如下结论:灵芝复合酶液中含有降解烟梗品质成分的多种酶系,其中漆酶为关键酶,酶活力达35 466.67 U/L,并含有3种漆酶同工酶。关键漆酶Lac3为典型的三域结构漆酶,相对分子质量为58.4 kDa,含500个氨基酸,最适温度、pH值分别为55℃和3.0。金属离子对粗漆酶和漆酶同工酶Lac3的影响类似,低浓度的 Cu^{2+} 为漆酶的激活剂, Fe^{3+} 对漆酶活力抑制作用最大,阴离子对漆酶活力均有不同程度的抑制作用。以灵芝复合酶液处理烟梗,其致密结构被破坏,木质素降解率达22.56%。梗丝经灵芝复合酶液处理后,香气成分总量提高,醛

类和酮类总量增加,甜香、花香、坚果香、焦糖香等香气特征成分明显增加。卷烟加香感官评价表明,经灵芝复合液处理后,感官得分明显提升,烟梗木质素等感官负面效应物质有效降解,烟梗品质提升,可用性明显增强。本研究阐明了灵芝复合酶液处理烟梗的核心酶学机制与提质效果,为该技术的推广应用奠定了理论与技术基础。

参考文献:

- [1] 李建军,董振山,吕阳波,等.生物酶联合作用改善烟梗梗丝品质的实验研究[J].湖北大学学报(自然科学版),2025,47(5):776-784.
LI J J, DONG Z S, LV Y B, et al. Experimental study on the combined action of biological enzymes to improve the aroma quality of tobacco stem [J]. Journal of Hubei University (Natural Science), 2025, 47(5): 776-784.
- [2] 杨晓倩,李敏,杨紫刚,等.烟梗处理技术及综合利用研究进展[J].农产品加工,2025(4):58-63.
YANG X Q, LI M, YANG Z G, et al. Research progress on tobacco stem treatment technology and comprehensive utilization [J]. Agricultural Products Processing, 2025 (4): 58-63.
- [3] 宋丽丽,霍姍浩,孙永威,等.复合菌群协同发酵烟梗的降解特性及微生物多样性研究[J].轻工学报,2023,38(1):63-70.
SONG L L, HUO S H, SUN Y W, et al. Study on degradation characteristics and microbial diversity of tobacco stem by synergistic fermentation with microbial community [J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(1): 63-70.
- [4] 马亚萍,文武,暴霆杰,等.灵芝产漆酶工艺优化[J].农产品加工,2023(16):61-66.
MA Y P, WEN W, BAO T J, et al. Optimization of laccase production process by *Ganoderma lucidum* [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2023 (16): 61-66.
- [5] 魏滔,张长生,陈琼华,等.灵芝真菌液体发酵及其产物应用的研究进展[J].微生物学通报,2022,49(1):336-351.
WEI T, ZHANG C S, CHEN Q H, et al. Liquid fermentation of *Ganoderma* and application of its products [J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 336-351.
- [6] YAO R N, LIU Y, OUYANG L, et al. Genome-wide analysis of the laccase gene family in *Arachis hypogaea* and functional characterization of *AhLAC63* involved in lignin biosynthesis and abiotic stress [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 289: 138886.
- [7] DEBNATH R, SAHA T. An insight into the production

- strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 26: 101645.
- [8] LOU H W, YANG C M, GONG Y, et al. Edible fungi efficiently degrade aflatoxin B₁ in cereals and improve their nutritional composition by solid-state fermentation [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 451: 131139.
- [9] REYNOLDS A G, KNOX A, DI PROFIO F. Evaluation of macerating pectinase enzyme activity under various temperature, pH and ethanol regimes [J]. *Beverages*, 2018, 4(1): 10.
- [10] 黄静, 和耀威, 李鹏, 等. 菌丝特性及胞外酶活性对茶树菇继代培养菌丝的相关性分析[J]. *北方园艺*, 2025(2): 50-58.
HUANG J, HE Y W, LI P, et al. Analysis of the correlation between mycelial characteristics and extracellular enzyme activity in subsequent cultivation of *Agrocybe aegerita* [J]. *Northern Horticulture*, 2025(2): 50-58.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料纤维素酶活性的测定 滤纸法: GB/T 23881—2009[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Determination of feed cellulase activity-filter paper assay method: GB/T 23881—2009 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2009.
- [12] 王静, 董梦蝶, 李祥, 等. 黑曲霉固态发酵葡萄皮渣产木聚糖酶的工艺研究[J]. *饲料工业*, 2023, 44(16): 100-106.
WANG J, DONG M D, LI X, et al. Study on the process of producing xylanase with grape pomace fermented by *Aspergillus niger* [J]. *Feed Industry*, 2023, 44(16): 100-106.
- [13] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
WANG J Z, FAN M. *Handbook of Protein Technology* [M]. Beijing: Science Press, 2000.
- [14] VAN LA T, SUNG B H, KIM S. Biocatalytic characterization of *Hericium erinaceus* laccase isoenzymes for the oxidation of lignin derivative substrates [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 241: 124658.
- [15] NAJJARI M, MOOSAVI N, ASGARAN E. Native page as a tool for semi-purification of catalase from kocuria ASB 107 [J]. *Iranian journal of public health*, 2014, 43(2): 61.
- [16] SLUITER A, HAMES B, RUIZ R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass [J]. *Environmental Science*, 2011, 8: 1.
- [17] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 卷烟 第4部分: 感官技术要求: GB/T 5606.4—2005 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Cigarettes-technical requirements for sense evaluation: GB/T 5606.4—2005 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2005.
- [18] GONZÁLEZ-GONZÁLEZ P, GÓMEZ-MANZO S, TOMASINI A, et al. Laccase production from *Agrocybe pediades*: Purification and functional characterization of a consistent laccase isoenzyme in liquid culture [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(3): 568.
- [19] ALSHIEKHEID M A, UMAR A, AMEEN F, et al. Biodegradation of chromium by laccase action of *Ganoderma multipileum* [J]. *Journal of King Saud University-Science*, 2023, 35(10): 102948.
- [20] LU J H, SHI Y Y, JI Y F, et al. Transformation of triclosan by laccase catalyzed oxidation: The influence of humic acid-metal binding process [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 220: 1418-1423.
- [21] 方华, 黄俊, 陈墨, 等. 缓冲体系和金属离子对漆酶催化活性的影响[J]. *武汉理工大学学报*, 2009, 31(5): 27-30.
FANG H, HUANG J, CHEN Z, et al. Effect of buffer solutions and metal ions on the laccase activity [J]. *Journal of Wuhan University of Technology*, 2009, 31(5): 27-30.
- [22] PATEL S K S, KALIA V C, KIM S Y, et al. Immobilization of laccase through inorganic-protein hybrids using various metal ions [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2022, 62(2): 312-316.
- [23] ZHOU C X, DONG A X, WANG Q, et al. Effect of common metal ions and anions on laccase catalysis of guaiacol and lignocellulosic fiber [J]. *BioResources*, 2017, 12(3): 5102-5117.
- [24] ROBERTS S A, WEICHSEL A, GRASS G, et al. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(5): 2766-2771.
- [25] 付秋娟, 郝贤伟, 杜咏梅, 等. 烤烟上部烟叶中非挥发性有机酸及高级脂肪酸与烟叶内在品质的关系[J]. *烟草科技*, 2024, 57(9): 24-32.
FU Q J, HAO X W, DU Y M, et al. Relationship between non-volatile organic acids and higher fatty acids in upper flue-cured tobacco leaves and intrinsic leaf quality [J]. *Tobacco Science & Technology*, 2024, 57(9): 24-32.
- [26] KAISSAR F Z, BENINE M L, ABBOUNI B, et al. Revealing of multifunctional newly isolated *Bacillus* strains from Algerian wastes with high pectinase activity for sustainable biotechnological application [J]. *Biologia*, 2025, 80(4): 1007-1022.

Characteristics of the key laccase in *Ganoderma lucidum* complex Enzyme liquid and its application in aroma enhancement and quality improvement of tobacco stems

ZHANG Zhiping¹, ZHANG Chi¹, SU Yixin¹, ZHANG Rongya², MA Yaping²,
ZHANG Yue¹, LIU Minchang², WEN Wu²

1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Technology Center, China Tobacco Sichuan Industrial Co., Ltd., Chengdu 610066, China

Abstract: **[Objective]** This study aimed to identify the key enzyme in *Ganoderma lucidum* complex enzyme liquid and its enzymatic characteristics, and to elucidate the mechanism of aroma enhancement and quality improvement of tobacco stems by fermentation. **[Methods]** The key enzyme in *Ganoderma lucidum* complex enzyme liquid was identified by native polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE) and enzymatic activity assays. Enzyme separation and purification combined with molecular structure modeling were employed to investigate the enzymatic properties and structural features of the key enzyme. Scanning electron microscopy (SEM) and GC-MS analysis were then used to evaluate the aroma-enhancing and quality-improving effects of the complex enzyme liquid on tobacco stems. **[Results]** The *Ganoderma lucidum* complex enzyme liquid exhibited multiple enzymatic activities, among which laccase activity was the highest at 35 466. 67 U/L, and three laccase isoenzymes were identified. The key laccase, Lac3, was a three-domain laccase with a molecular weight of 58. 4 kDa and 500 amino acids. Its optimal temperature and pH were 55 °C and 3. 0, respectively. Cu²⁺ at 1 mmol/L promoted its activity, while Fe³⁺ exerted the strongest inhibitory effect. After enzymatic treatment with the complex enzyme liquid, the compact structure of tobacco stem shreds was disrupted, and the lignin degradation rate reached 22. 56%. Sensory evaluation scores were significantly improved. Compared with the control, the total content of 17 aroma compounds, including aldehydes, ketones, and phenols, in the stem shreds increased, thus achieving the goal of aroma enhancement and quality improvement of tobacco stems. **[Conclusion]** *Ganoderma lucidum* complex enzyme liquid, with laccase as the key enzyme, can degrade lignin in tobacco stem shreds and enhance aroma, thereby promoting resource utilization.

Key words: *Ganoderma lucidum* complex enzyme liquid; laccase; structural simulation; tobacco stem; quality improvement and aroma enhancement

[责任编辑:王晓波 刘春奎]