

生物酶法降解烟梗末中果胶的研究

许春平¹, 刘远上¹, 郝辉², 王文领³, 孙斯文¹, 马宇平^{*2}

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450002;2. 河南中烟工业有限责任公司技术中心,河南 郑州 450016;3. 河南卷烟工业烟草薄片有限公司,河南 许昌 461100)

摘要: 通过青霉产果胶酶降低烟梗末中的果胶的含量,从而提高梗末作为原料薄片工艺中的使用性能。首先通过正交实验确定了酶解的最佳条件为加酶质量分数 6%,料液比 1 g:3 mL,酶解温度 50 ℃,酶解时间 2 h,果胶酶的最大降解率为 38.92%。然后经热重分析表明,梗末经果胶酶降解后,最后的残重从 24.46%下降至 9.84%,说明酶解后的梗末的燃烧性得到提升。最后,利用热裂解-气相色谱/质谱联用分析酶解前后梗末的热裂解产物,发现酶解后裂解产中的乙酸含量降低,香味物质吡咯含量升高,这将有助于改善烟草薄片的吸食口感,本研究中为提高造纸法烟草薄片品质提供了一个新的方法。

关键词: 果胶降解;生物酶法;烟草薄片;果胶酶

中图分类号: S 572;Q 539+.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)02-0194-06

Enzymatic Degradation of Pectin in Tobacco Stem End

XU Chunping¹, LIU Yuanshang¹, HAO Hui², WANG Wenling³, SUN Siwen¹, MA Yuping^{*2}

(1. College of Food and Biology Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China; 2. Technical Center of China Tobacco Henan Industrial Co. Ltd, Zhengzhou 450016, China; 3. Henan Cigarette Industry Tobacco Sheet Co. Ltd, Xuchang 461100, China)

Abstract: This study aimed to degrade the pectin in the tobacco stem end by pectinase from *Penicillium* and improve its usability as raw material for the reconstituted tobacco. Optimal degradation parameters obtained by the orthogonal method were enzyme dosage 0.6 g, solid/liquid ratio 1:3, reaction temperature 50 ℃ and time 2 h, which resulted in a maximum degradation rate of 38.51%. Thermogravimetric analysis showed that the residual weight of tobacco stem end was decreased from 24.46% to 9.84% after enzymolysis, indicating that its burning capacity was improved. Pyrolysis-GC/MS analysis found that the content of acetic acid in the smoke was decreased and pyrrole was increased, which would benefit the smoke taste. This study provided a new method to improve the quality of reconstituted tobacco.

Keyword: pectin degradation, biological enzyme method, reconstituted tobacco, pectinase

收稿日期: 2015-04-22

基金项目: 河南中烟科技有限责任公司科研项目。

作者简介: 许春平(1977—),男,河南焦作人,工学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事生物催化与烟草工程研究。

E-mail: xuchunping05@163.com

* 通信作者: 马宇平(1965—),男,河南许昌人,工学硕士,研究员,主要从事烟草产品开发和烟草化学的研究。E-mail: mayp@mail.dihao.cn

引用本文: 许春平,刘远上,郝辉,等. 生物酶法降解烟梗末中果胶的研究[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(02):194-199.

烟草薄片是以废弃的烟梗、烟末、烟片等烟草原料,通过物理和化学方法经重组制成烟叶的薄片。造纸法烟草薄片以其密度小、填充值高、柔韧性和耐加工性好、焦油释放量低、可塑性强的特点,因此,造纸法成为目前国内外生产烟草薄片的主要方法^[1]。有研究表明,在卷烟中添加烟草薄片能够减少卷烟的焦油含量^[2],所以在卷烟中添加薄片丝成为卷烟降焦减害的一项重要手段。造纸法烟草薄片生产主要分为三个过程:萃取浓缩、制浆抄造、涂布干燥^[3],在这个过程中能够实现人为地调控烟草薄片的物理化学性质。

果胶是烟草及其他植物细胞壁的组成成分之一,是一类比较复杂的多糖,主要由 D-半乳糖醛酸和 D-半乳糖醛酸甲酯以 α -1,4 苷键连成的直链^[4]。果胶在烟草制品中的含量为 5%~13%^[5]。闫克玉等^[6]研究表明,果胶含量随着烟叶部位的升高、颜色的加深、成熟度的提高、厚度的增加而增加,随等级的降低而降低。果胶质是亲水胶体,对烟叶的吸湿性和弹性起一定作用,但果胶质对烟草品质不利,分解会产生甲醇^[4]。另外,果胶在烟叶醇化过程中产生多达 1.2%~1.5% 的乙酸,会产生呛咳、辛辣灼烧等刺激性气味,对吸食健康不利^[7]。去除烟草制品中的果胶逐渐受到行业研究人员的重视。曹茜等^[8]用超声波辅助法以草酸铵为浸提液去除烟梗中的果胶,去除率达到 13.7%。而利用生物产酶法降解果胶的方法比较少。由于梗末呈粉末状便于利用生物酶法处理,所以本实验中以青霉菌产果胶酶来降解造纸法薄片生产线上的二号挤干机出口梗末中的果胶,然后对其清除果胶效果进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

二号挤干机出口的梗末,由河南中烟工业有限责任公司提供。

无水乙醇,天津市风船化学试剂有限公司产品;浓硫酸,盐酸,2 mol/L NaOH,开封市芳晶化学试剂有限公司产品;果胶粉,上海华兴化工有限公司产品;D-半乳糖醛酸标准品(97%),Sigma-Aldrich 公司产品;0.15% 吡唑溶液,天津市光复精细化工研究所提供等。

BS200S 型电子分析天平,北京赛多利斯天平有

限公司产品;UV-17001C 型紫外分光光度计,上海凤凰光学仪器有限公司产品;HH-4 型电热数字恒温水浴锅,常州国华电器有限公司产品;DSX-280A 型不锈钢手提式灭菌锅,上海申安医疗器械厂产品;热重分析仪,美国 TA 公司产品;CDS PYROPROBE 2000 型裂解仪,上海光谱仪器有限公司产品等。

1.2 试验方法

1.2.1 果胶酶的获得 果胶酶来自作者所在实验室优化出的微紫青霉(*Penicillium janthinellum*)sw09 产出的果胶酶,即深层液体发酵培养 3 d,离心去除菌丝体,发酵液再经过超滤浓缩,冷冻干燥成酶粉,酶活力经测定约为 20 000 U/g,4 ℃ 储存备用。液体深层发酵培养基:葡萄糖 50 g/L,酵母浸粉 3 g/L, KH_2PO_4 1 g/L,果胶粉 2 g/L;pH 5。

1.2.2 梗末中果胶含量的检测 根据杨海健^[9]优化的吡唑比色法作为测定梗末果胶含量的方法。其原理是果胶降解生成半乳糖醛酸,半乳糖醛酸与吡唑产生显色反应,其含量在一定范围内与其吸光度呈线性关系,绘制半乳糖醛酸标准曲线得到方程: $y=0.0088x+0.0098$, $R^2=0.9991$ 。根据与标准曲线对比测定出梗末酶解前后的果胶含量。

1.2.3 单因素实验考查各因素对果胶酶降解果胶效果的影响 将梗末烘干,粉碎,取 10 g 梗末,加水设置不同的料液比(1 g:1 mL、1 g:3 mL、1 g:5 mL、1 g:7 mL、1 g:9 mL),加入果胶酶 0.5 g,40 ℃ 下酶解 2 h,按下式(1)计算测定果胶降解率,根据结果确定最适料液比。然后根据得出的最适料液比,设置不同的果胶酶加入量(质量分数 1%、2%、3%、4%、5%、6%),40 ℃ 下酶解 2 h,得出最适的酶液加入量。由得出的最适料液比和果胶酶加入量,设置不同的酶解温度(30、35、40、45、50、55 ℃),酶解 2 h,得出最适的酶解温度,相同方法得出最适的酶解时间。

$$R=(W_1-W_2)/W_1 \times 100\% \quad (1)$$

(1)式中 R 为果胶降解率; W_1 为酶解前烟梗末中果胶质量; W_2 为酶解后烟梗末中果胶质量。

1.2.4 正交实验优化果胶酶降解梗末果胶的条件 根据单因素实验得出的条件设置不同的水平,以果胶降解率为评价标准,选用 $L_9(3^4)$ 正交表对果胶酶降解梗末果胶的实验条件进行优化。因素水平见表 1。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 Table of the orthogonal factor levels

水平	A 加酶 质量分数/%	B 料液 质量体积比/(g/mL)	C 酶解 温度/℃	D 酶解 时间/h
1	4	1:1	40	2.0
2	5	1:3	45	2.5
3	6	1:5	50	3.0

1.2.5 梗末的热重分析 用果胶酶降解梗末,用热重分析仪分析烟梗末热重变化,并设置空白对照组。温度从室温以10℃/min的速度上升至900℃。

1.2.6 果胶酶降解梗末果胶对其热裂解产物的影响 利用热裂解模拟烟草梗末在卷烟中燃烧的情况,并对其裂解产物进行分析。根据贺磊^[10]等的研究,烟草薄片在600℃就发生了热分解。另外,周顺^[11]等的研究结果指出果胶在无氧环境下的热解温度为121℃。综合考虑,这次实验的热裂解温度设置为600℃,并进行3次重复实验。

2 结果与讨论

2.1 烟梗末中果胶酶解工艺的优化

2.1.1 单因素优化实验 加酶量、酶解时间、料液比、酶解温度对果胶酶降解梗末中果胶的影响结果见图1。可知,果胶的降解率在一定范围内随加酶量的增加而增大,在加酶质量分数达到4%以后果胶的降解率已经上升不明显,所以,确定最适加酶质量分数为4%。酶解时间越长果胶酶降解越充分,加酶质量分数为4%时,酶解2 h后果胶降解率已不在上升,这可能与酶的活力和用量有关。其他条件一定,料液比在1 g:3 mL时,有最大的降解率,这是因为料液比太小酶无法与之充分混合,料液比太大会使酶的浓度太低,都会影响果胶的降解。酶都会有其最适反应温度,当温度为50℃时,果胶的降解率达到最高,说明此温度下酶的活力最好。

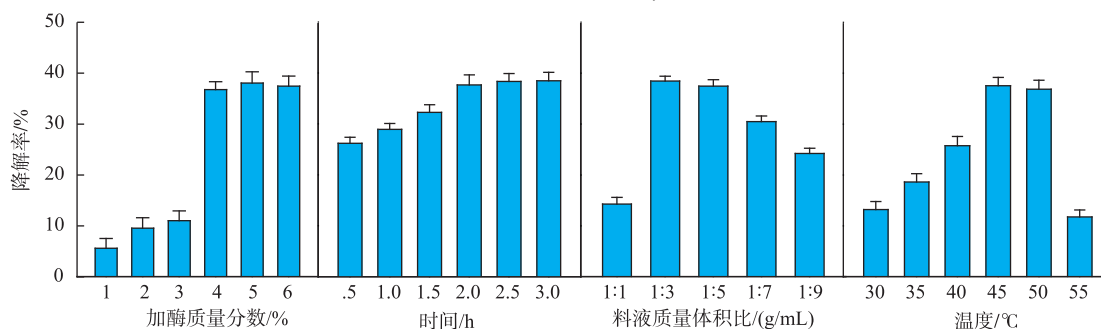


图 1 4种单因素对果胶降解的影响

Fig. 1 Effect of four variables on pectin degradation

2.1.2 正交优化实验 根据单因素时间得出的加酶量、酶解时间、料液比、酶解温度最适条件,设计

水平因素,用 $L_9(3^4)$ 表对果胶酶降解梗末中果胶的条件进行优化,结果见表2。

表 2 青霉产果胶酶降解梗末果胶的正交试验

Table 2 Orthogonal test of tobacco stem end pectin degradation by pectinase from *P. janthinellum*

试验号	A:加酶质量分数/%	B:料液质量体积比/(g/mL)	C:酶解温度/℃	D:酶解时间/h	降解率/%
1	1	1	1	1	20.06±4.24
2	1	2	2	2	15.87±2.68
3	1	3	3	3	25.60±4.83
4	2	1	2	3	13.87±5.66
5	2	2	3	1	34.20±3.08
6	2	3	1	2	24.22±1.89
7	3	1	3	2	38.92±2.88
8	3	2	1	3	38.21±3.42
9	3	3	2	1	32.53±3.28
k_1	20.51	24.29	27.50	28.93	

续表 2

试验号	A:加酶质量分数/%	B:料液质量体积比/(g/mL)	C:酶解温度/℃	D:酶解时间/h	降解率/%
k_2	24.10	29.43	20.76	26.34	
k_3	36.55	27.45	32.91	25.90	
R	16.04	5.14	12.15	2.59	
较优水平	A_3	B_2	C_3	D_1	
主次因素	$A>C>B>D$				

进行极差分析可知,四种因素对果胶酶降解率的影响顺序为:加酶量>酶解温度>料液比>酶解时间。得出的最优条件组合为 $A_3B_2C_3D_1$,即加酶质量分数 6%,料液比 1 g:3 mL,酶解温度 50 ℃,酶解时间 2 h,该条件下果胶的降解率最高达到 38.92%。

2.1.3 热失重实验 将梗末在最优条件下酶处理,抽滤烘干,粉碎,取粉末用热重分析仪分析,空白组用蒸馏水处理,其他条件与加酶实验组一致。结果见图 2。

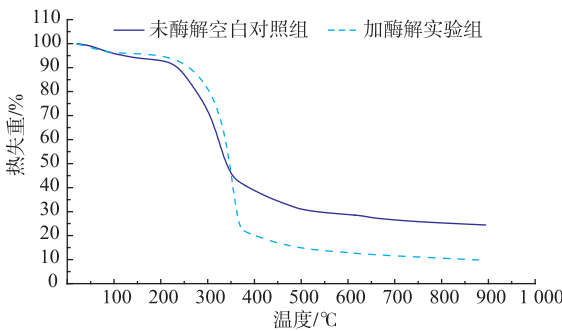


图 2 梗末酶解前后的热重对比分析

Fig. 2 Thermogravimetric comparison of stem end before and after enzymatic hydrolysis

分析可知,加酶组和空白组加热失重趋势基本一致,加酶组和空白组梗末在 347.6 ℃和 325.6 ℃失重速率最大。根据周顺^[11]等的研究,果胶较纤维素和淀粉的燃烧能力较差,而空白组最后的残重为 24.46%,加酶组经降解果胶后的残重为 9.84%,与之

实验结果相符,也就证明了梗末经青霉产酶降解果胶后燃烧性得到了提升。

2.1.4 梗末的热裂解实验 取适量的梗末,在正交实验得出的最优条件下(加酶质量分数 6%,料液比 1 g:3 mL,酶解温度 50 ℃,酶解时间 2 h)处理,抽滤,蒸馏水冲洗两次,烘干,再次粉碎后,制样,上热裂解-气相色谱/质谱联用仪(PY-GC/MS)分析其裂解产物。对照组用等量的蒸馏水处理,其他条件与实验组一致。每组实验设置 3 次平行实验,得出数据取平均值,并对匹配度大于 80%的物质进行分析,结果见表 3。分析可知,酶解前后梗末热裂解产物的种类和含量并无明显差异,有明显差异的主要集中在小分子范围,其中丙醇、乙酸质量分数明显下降,丁烷、羟基丙酮、甲基吡咯质量分数有明显上升。果胶热裂解后会产生乙酸^[7],因此果胶质量分数过多会增加烟草危害,而用青霉所产果胶酶处理后,梗末热裂解产物中乙酸质量分数明显降低,这是果胶酶能加速梗末内果胶降解,果胶质量分数降低所导致的。另外,梗末经酶处理后,酚类物质如苯酚、间甲酚、2-乙基-5-甲基苯酚质量分数酶解后含量有明显提高。而烯烃类物质,如 4-环戊烯-1,3-二酮、2,5-二甲基-2,4-己二烯、苯乙烯、2,4-二甲基苯乙烯、3-甲基吡咯则明显减少。新增加的物质有吡咯、2-乙酰基呋喃、1,3-二甲基-1-环己烯、4-甲基愈创木酚、正癸烯,其中吡咯质量分数较多,而吡咯具有甜果香味,有助于增加卷烟的香味。

表 3 梗末酶解前后热裂解产物对比

Table 3 Pyrolysis products of stem end before and after enzymatic hydrolysis

	保留时间/min	名称	质量分数/%	
			空白对照	酶处理
1	4.93	Butane/丁烷	4.97±0.33 ^a	5.86±0.27 ^b
2	5.42	1-Propanol/丙醇	1.27±0.05 ^a	1.19±0.02 ^b
3	5.91	Acetic acid/乙酸	8.70±0.22 ^a	7.12±0.18 ^b
4	5.54	2,3-Butanedione/2,3-丁二酮	2.83±0.08 ^a	2.86±0.11 ^a
5	6.52	2-Propanone, 1-hydroxy-/羟基丙酮	6.09±0.13 ^a	6.59±0.17 ^b

续表 3

	保留时间/min	名称	质量分数/%	
			空白对照	酶处理
6	8.01	1H-Pyrrole, 1-methyl-N-/甲基吡咯	0.47±0.03 ^a	0.70±0.07 ^b
7	8.22	Pyridine/吡啶	0.29±0.01 ^a	0.27±0.05 ^a
8	8.43	Pyrrole/吡咯	—	1.09±0.08 ^b
9	8.82	Toluene/甲苯	1.22±0.23 ^a	1.28±0.17 ^a
10	10.73	Furfural/糠醛	2.33±0.11 ^a	2.80±0.06 ^a
11	12.10	Benzene, 1,3-dimethyl-/间二甲苯	0.36±0.07 ^a	0.32±0.12 ^a
12	12.47	4-Cyclopentene-1,3-dione/4-环戊烯-1,3-二酮	0.41±0.02 ^a	—
13	12.91	Styrene/苯乙烯	0.42±0.05 ^a	—
14	13.31	2-Cyclopenten-1-one, 2-methyl-/2-甲基-2-环戊烯-1-酮	0.73±0.12 ^a	0.64±0.08 ^a
15	13.50	Ethanone, 1-(2-furanyl)-/2-乙酰基呋喃	—	0.13±0.03 ^b
16	14.12	2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-/2-羟基-2-环戊烯酮	0.89±0.17 ^a	1.06±0.21 ^a
17	15.48	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-/5-甲基呋喃醛	0.33±0.05 ^a	0.37±0.13 ^a
18	15.61	2-Cyclopenten-1-one, 3-methyl-/3-甲基-2-环戊烯-1-酮	0.64±0.04 ^a	0.60±0.03 ^a
19	15.92	Methyl 2-furoate/2-糠酸甲酯	0.07±0.05 ^a	—
20	16.55	Phenol/苯酚	0.44±0.11 ^a	0.60±0.05 ^b
21	16.68	1,3-Dimethyl-1-cyclohexene/1,3-二甲基-1-环己烯	—	0.22±0.11 ^a
22	17.84	2,4-Hexadiene, 2,5-dimethyl-/2,5-二甲基-2,4-己二烯	0.11±0.08 ^a	—
23	18.09	2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-methyl-甲基环戊烯醇酮	1.60±0.06 ^a	1.45±0.10 ^a
24	18.18	D-Limonene/右旋萜二烯	0.36±0.13 ^a	0.32±0.08 ^a
25	18.42	2-Cyclopenten-1-one, 2,3-dimethyl-/2,3-二甲基-2-环戊烯酮	0.45±0.08 ^a	0.40±0.14 ^a
26	19.35	Phenol, 2-methyl-/邻甲酚	0.38±0.05 ^a	0.33±0.08 ^a
27	19.91	Cyclohexanol, 1-ethenyl-/乙基环己醇	0.11±0.07 ^a	0.10±0.05 ^a
28	19.98	2-Cyclopenten-1-one, 3-ethyl-/3-乙基-2-环戊烯-1-酮	0.17±0.01 ^a	0.16±0.09 ^a
29	20.23	Phenol, 3-methyl-/间甲酚	0.57±0.03 ^a	0.65±0.08 ^b
30	20.47	Phenol, 2-methoxy-/愈创木酚	0.30±0.16 ^a	0.42±0.08 ^a
31	20.60	Benzene,1-methyl-4-(1-methylethenyl)-/2,4-二甲基苯乙烯	0.07±0.05 ^a	—
32	21.43	Maltol/甲基麦芽酚	0.43±0.13 ^a	0.40±0.07 ^a
33	21.62	2-Cyclopenten-1-one, 3-ethyl-2-hydroxy-/乙基环戊烯醇酮	0.37±0.12 ^a	0.40±0.16 ^a
34	22.55	Benzyl nitrile/苯乙腈	0.14±0.05 ^a	0.15±0.03 ^a
35	22.99	Phenol, 2,4-dimethyl-/2,4-二甲基苯酚	0.14±0.02 ^a	0.15±0.08 ^a
36	23.06	Phenol, 2,3-dimethyl-/2,3-二甲基苯酚	0.22±0.10 ^a	0.16±0.16 ^a
37	23.70	Phenol, 4-ethyl-/4-乙基苯酚	0.29±0.06 ^a	0.28±0.05 ^a
38	24.08	1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene/1,6-二甲基庚-1,3,5-三烯	0.07±0.05 ^a	—
39	24.43	Creosol/4-甲基愈创木酚	—	0.60±0.05 ^b
40	26.25	Phenol, 2-ethyl-5-methyl-/2-乙基-5-甲基苯酚	0.03±0.02 ^a	0.15±0.08 ^b
41	27.13	1H-Indene, 1,1-dimethyl-/1,1-二甲基 1H-茚	0.07±0.05 ^a	0.10±0.04 ^a
42	27.69	Benzenethiol, o-isopropyl-/邻异丙基苯硫酚	0.09±0.02 ^a	0.11±0.07 ^a
43	27.86	1-Decene/正癸烯	—	0.08±0.03 ^a
44	27.93	1H-Inden-1-one, 2,3-dihydro-/1-茚酮	0.17±0.02 ^a	0.12±0.07 ^a
45	28.85	2-Methoxy-4-vinylphenol/对乙烯基愈疮木酚	0.25±0.13 ^a	0.32±0.09 ^a
46	30.17	L-Nicotine/烟碱	0.26±0.08 ^a	0.27±0.12 ^a
47	31.28	1-Tetradecene/1-十四烯	0.05±0.02 ^a	0.06±0.04 ^a
48	31.67	1H-Indole, 3-methyl-/3-甲基吲哚	0.04±0.03 ^a	—
49	33.45	Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-/异丁香酚	0.15±0.01 ^a	0.15±0.08 ^a
50	34.75	Pentadecane/十五烷	0.04±0.02 ^a	0.04±0.03 ^a

注:ab表示方差分析(n=2),相同字母表示95%置信水平无显著差异。

3 结 语

本课题试验中用青霉产果胶酶降解梗末中的果胶,通过单因素和正交实验优化了果胶酶酶解的最佳条件,使得梗末中的果胶降解率达到 38.92%。此外,实验中还进行了热重和热裂解实验,证明了梗末经青霉产酶果胶酶酶解果胶后,燃烧性能得到

提升,而且酶解后梗末在燃烧后,产物中乙酸的含量下降,吡咯等香味植物增加,这有利用提高烟草薄片的吸食口感。综上所述,利用青霉产果胶酶降解梗末果胶,方法简单,操作简单,而且能够有效降低梗末中的果胶,提高烟草薄片的品质,有很好的工业化应用前景。

参考文献:

- [1] MIAO Yingju, LIU Weijuan, LIU Gang, et al. Present status of preparation technology of reconstituted tobacco[J]. **China Pulp & Paper**, 2009(7): 55-60. (in Chinese)
- [2] WANG Huawen. Analysis on application effect of papermaking reconstituted tobacco in cigarettes[J]. **Tobacco Science & Technology**, 2009(7): 55-60. (in Chinese)
- [3] CHANG Jiheng, NIU Congyang, ZHANG Caiyun, et al. Preliminary Experiments on extraction technology in paper-process reconstituted tobacco production[J]. **Tobacco Science & Technology**, 2002(1): 14-17. (in Chinese)
- [4] 闫克玉. 烟草化学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2002.
- [5] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [6] YAN Keyu, YAN Hongyang, LI Xingbo, et al. Comparative analysis of cell wall substances in flue-cured tobacco leaf[J]. **Tobacco Science & Technology**, 2005, 10: 6-11. (in Chinese)
- [7] WANG Zhiyong, SHAO Yan, ZHOU Qingming, et al. The pectin and its influence on tobacco physiology and quality[J]. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 2013, 15(1): 130-135. (in Chinese)
- [8] CAO Xi, LI Xinsheng, ZHANG Jun, et al. Study on the removal method of the pectin in tobacco stem used in sheet with ultrasound-assisted technique[J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, 2010, 26: 14312-14314. (in Chinese)
- [9] YANG Haijian, DING Hongying, YU Jiandong, et al. Study on pectin content in paper-making reconstituted tobacco with carbazole spectrophotometric determination method[J]. **Chinese Journal of Analysis Laboratory**, 2012(6): 100-102. (in Chinese)
- [10] HE Lei, OUYANG Chun, LIU Pan, et al. Thermal analysis comparison of domestic and imported reconstituted tobacco[J]. **China Pulp & Paper**, 2012(2): 28-30. (in Chinese)
- [11] ZHOU Shun, XU Yingbo, WANG Chenghui, et al. A comparative study of the combustion behavior and mechanism of cellulose, pectin and starch[J]. **Acta Tabacaria Sinica**, 2011(5): 1-9. (in Chinese)