

漆酶降解梗丝中木质素工艺条件的优化

李 晓¹, 王 宇¹, 姚二民¹, 丁美宙², 晋照普³, 李全胜², 刘 强², 顾小燕¹

(1. 郑州轻工业大学 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 河南中烟工业有限责任公司 技术中心, 河南 郑州 450000; 3. 上海烟草集团 北京卷烟厂, 北京 101121)

摘要: 采用 3 因素 5 水平的正交实验方法研究了不同酶解时间、酶解温度和漆酶用量对梗丝中木质素降解率的影响, 同时对漆酶处理前后梗丝的化学成分和填充值进行测量, 结果表明: 不同酶解时间、酶解温度和漆酶用量极显著影响着木质素的降解率。使用漆酶降解梗丝中木质素的最佳参数是: 酶解时间 4 h, 酶解温度 50 ℃, 漆酶用量 10.0 μL/g。在该参数条件下, 梗丝中的木质素降解效果最好, 降解率高达 47.3%。使用漆酶处理梗丝后, 除了木质素之外, 梗丝的其他化学成分含量基本不发生变化, 填充值也基本没有影响。在最优的参数条件下, 使用漆酶能在不降低梗丝原有品质的前提下有效的降解梗丝中的木质素, 提高梗丝的品质和可用性。

关键词: 梗丝; 漆酶; 木质素; 填充值; 化学成分

中图分类号: TS 452.2 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.01.023

Optimization of the Process Conditions for the Degradation of the Lignin in the Cut Stem By Laccase

LI Xiao¹, WANG Yu¹, YAO Ermin¹, DING Meizhou²,
JIN Puzhao³, LI Quansheng², LIU Qiang², GU Xiaoyan¹

(1. School of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China; 2. Technology Center, China Tobacco Henan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China; 3. Beijing Cigarette Factory, Shanghai Tobacco Group, Beijing 101121, China)

Abstract: The experiment uses three factors five levels of orthogonal experimental method to study the different digestion times, enzymolysis temperatures and dosage of laccase influence on cut stem in lignin degradation rate. the change of chemical composition and filling values in cut stem before and after processing also have been measured. The result showed that: (1) Digestion time, enzyme solution temperature, dosage of laccase in cut stem have significantly effected on the degradation of lignin. The best parameter of the enzymatic hydrolysis is time 4 h, enzymolysis temperature 50 ℃, the dosage of laccase 10.0 μL/g. Under this parameter, the lignin degradation effect is best and the degradation rate is as high as 47.3%. (2) The chemical composition of cut stem don't change after the treatment of laccase except lignin and the same situation appeared on the filling values. Under the

收稿日期: 2016-10-11

基金项目: 河南中烟工业有限公司科技项目(ZW2014034)。

作者简介: 李 晓(1967—), 女, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事烟草工艺研究。E-mail: Lixiao6712@126.com

引用本文: 李晓, 王宇, 姚二民, 等. 漆酶降解梗丝中木质素工艺条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(01): 156-159.

condition of optimal parameters, the use of laccase can effectively degrade lignin, raising the quality and availability of cut stem, and don't lower the quality of cut stem.

Keywords: cut stem, laccase, lignin, filling value, chemical composition

烟梗占烟叶总质重量的 25% 左右, 是其主要的组成部分之一。使用梗丝可以提高烟支的整体填充能力, 还能够增加烟支的燃烧性^[1-2], 但梗丝也存在不同程度的质量缺陷, 如在吸食过程中会感到杂气重、木质气重和灼喉感等不适^[3-6]。对梗丝中木质素进行降解处理不仅有利于改善梗丝的吸食品质, 而且对于疏松梗丝纤维结构, 改善梗丝物理结构也具有重要作用^[7-8]。目前, 使用生物方法来提高梗丝的质量, 在国内外已经有了大量的研究, 但其在梗丝的具体应用及参数优化方面却很少涉及, 且生物法具有使用方便、污染小、降解效果明显, 使用后不需特殊工艺处理等生态优势^[9-13]。因此, 作者主要关注在不同酶解时间、漆酶用量和酶解温度下的木质素降解率, 同时测定酶解前后梗丝化学成分和填充值的变化情况, 最终确定酶解的最优条件, 以期提高烟梗原料的综合利用率, 并使梗丝在中高档卷烟中得到有效利用。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

梗丝: 郑州卷烟厂提供; 漆酶 (酶活 10 000 u/mL); 北京夏盛实业有限公司产品。

ST-07B 多功能粉碎机: 上海树立仪器仪表有限公司产品; SXT-06 索氏提取仪器: 上海本昂科学仪器有限公司产品; AA3 连续流动分析仪: 英国 Seal Analytical 公司产品; YDZ430A 型烟丝填充值测定仪: 北京中西化玻仪器有限公司产品; KBF 240 恒温恒湿箱: 德国 Binder 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 漆酶对梗丝木质素降解率的影响测定 试验使用 Klason 法对梗丝中的木质素质量分数进行测定。首先测定云南地区梗丝中的木质素质量分数做为对照, 之后进行 3 因素 5 水平的正交实验。将一定量的梗丝放在硫酸 (质量分数 72%) 中酸解, 然后稀释硫酸并加热使糖类化合物溶解, 最后将剩余的固体过滤、洗涤、干燥和称量, 即可计算出剩余的木质素质量分数。

酸不溶木质素的质量分数 X 的计算公式为:

$$X(\%) = \frac{(m_3 - m_4) - (m_1 - m_2)}{m_0} \times 100\%$$

式中, m_1 为烘干后滤纸+称量瓶的质量, g; m_2 为空称量瓶的质量, g; m_3 为烘干后称量瓶+滤纸+滤渣的质量, g; m_4 为空称量瓶的质量, g; m_0 为烟梗的干物质质量, g。

1.2.2 漆酶对梗丝化学成分的影响测定 对未处理及在最高木质素降解率条件处理后的云南地区梗丝, 按照国家标准采用 AA2 型连续流动分析仪, 测定感官标准样品中烟碱、总糖、还原糖、氯、钾、总氮、蛋白质。

1.2.3 漆酶对梗丝填充值的影响测定 对未处理及在最高木质素降解率条件下处理后的云南地区梗丝按照行标 YC/T 152—2001 测定其填充值。

综合梗丝木质素降解率、化学成分和填充值测定结果, 最终确定漆酶降解梗丝中木质素的最佳参数组合。

2 结果

2.1 漆酶对梗丝木质素降解率的影响

与对照样相比, 漆酶处理后梗丝的木质素含量显著降低, 具体结果如表 1 所示。

对正交实验数据进行 SPSS 处理, 不同酶解时间、酶解温度和漆酶用量对梗丝中木质素的降解率影响结果如下。由表 2 中可以看出, 不同时间、温度和漆酶用量对木质素降解率的影响显著性 p 值均小于 0.05, 也就是说时间、温度、漆酶用量都对实验结果有极显著的影响。

2.1.1 酶解时间对梗丝木质素降解率的影响结果 进行不同时间的酶解试验时, 梗丝中木质素会有不同的降解效果, 从均值估计可得在酶解时间为 4、5 h 时, 平均降解率较高, 为 43.3% 和 43.8%。由表 3 可以看出, 不同的酶解时间下, 梗丝中木质素的降解率有显著差异, 其在 4 h 时与 1、2、3 h 的酶解时间的显著性差异 p 值均小于 0.05, 但与酶解 5 h 无显著差异。

表 1 正交实验及对照样试验结果

Table 1 Result of orthogonal experiment and the control

酶解时间/h	酶解温度/℃	漆酶用量/($\mu\text{L/g}$)	木质素剩余质量分数/%
1	46.00	2.50	4.30
1	48.00	5.00	4.20
1	50.00	7.50	3.60
1	52.00	10.00	3.14
1	54.00	12.50	3.09
2	46.00	5.00	4.00
2	48.00	7.50	3.80
2	50.00	10.00	3.10
2	52.00	12.50	3.12
2	54.00	2.50	3.90
3	46.00	7.50	3.80
3	48.00	10.00	3.20
3	50.00	12.50	2.83
3	52.00	2.50	3.79
3	54.00	5.00	3.40
4	46.00	10.00	3.16
4	48.00	12.50	3.04
4	50.00	2.50	3.31
4	52.00	5.00	3.24
4	54.00	7.50	3.11
5	46.00	12.50	3.13
5	48.00	2.50	3.65
5	50.00	5.00	3.01
5	52.00	7.50	3.05
5	54.00	10.00	2.91
未处理梗丝木质素平均含量(对照样)			5.60

表 2 各因素对降解率的影响

Table 2 Influence of various factors on the degradation rate

因变量	III 型平方和	df	均方	F	P
酶解时间	1.095	4	0.274	22.203	0.000
酶解温度	0.966	4	0.241	19.577	0.000
漆酶用量	2.015	4	0.504	40.862	0.000
误差	0.148	12	0.012		
总计	4.224	25			

表 3 酶解时间 4 h 与其它酶解时间的成对比较

Table 3 Comparison between enzymatic hydrolysis time 4 h and other time

t/h	降解率均值 差值/(%)	标准误差	P
1	0.494 0	0.070 23	0.000
2	0.412 0	0.070 23	0.000
3	0.232 0	0.070 23	0.006
5	0.022 0	0.070 23	0.759

综合均值估计和工业生产中的最少存放时间(4 h)可得:酶解时间为 4 h,梗丝中木质素的降解效果较好。

2.1.2 漆酶用量对梗丝木质素降解率的影响结果

在不同漆酶添加量的情况下,梗丝中木质素的降解效果会有不同,从均值估计可知,当漆酶用量为 10.0 $\mu\text{L/g}$ 时,降解率为 45.61%;当漆酶用量为 12.5 $\mu\text{L/g}$ 时,降解率为 45.68%。

由表 4 可以看出,当漆酶添加量为 12.5 $\mu\text{L/g}$ 时,与 2.5、7.5 $\mu\text{L/g}$ 时相比它的显著性差异 p 值均小于 0.05;但它与 10.0 $\mu\text{L/g}$ 时的降解率相比,显著性差异 $p=0.410>0.05$ 。这表明:在 10.0 $\mu\text{L/g}$ 时,木质素的降解率已经达到较高的水平,之后再增加漆酶用量,木质素降解率变化不明显。

表 4 酶解用量 12.5 $\mu\text{L/g}$ 与其他用量的成对比较Table 4 Comparison between enzyme dosage 12.5 $\mu\text{L/g}$ and other dosages

用量/ ($\mu\text{L/g}$)	降解率均值 差值/($\mu\text{L/g}$)	标准误差	P
2.5	0.748 0	0.070 23	0.000
5.0	0.528 0	0.070 23	0.000
7.5	0.430 0	0.070 23	0.000
10.0	0.060 0	0.070 23	0.410

综合均值估计可得:在漆酶用量为 10.0 $\mu\text{L/g}$ 时,木质素降解效果较好。

2.1.3 酶解温度对梗丝木质素降解率的影响结果
不同温度下漆酶的活性不同,酶的催化作用也受到影响,其对木质素的降解效果也必然不同。由均值估计可知,当酶解温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,木质素的平均降解率最高,降解率达到为 43.4%。

由表 5 可以看出,酶解温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,与 46、48 $^{\circ}\text{C}$ 时相比它的显著性差异 p 值均小于 0.05;但它与 52、54 $^{\circ}\text{C}$ 时的降解率相比,显著性差异 p 值大于 0.05。这表明:在 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,木质素的降解率已经达到较高的水平,降低温度对结果有显著影响,但是适度提高温度对降解率影响不显著。

表 5 酶解温度 50 $^{\circ}\text{C}$ 与其他温度的成对比较Table 5 Comparison between enzymetemperature 50 $^{\circ}\text{C}$ and other temperatures

温度/ $^{\circ}\text{C}$	降解率均值 差值/ $^{\circ}\text{C}$	标准误差	P
46	0.508 0	0.070 23	0.000
48	0.408 0	0.070 23	0.000
52	0.098 0	0.070 23	0.188
54	0.112 0	0.070 23	0.137

综合均值估计可得:在酶解温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,漆酶对梗丝中的木质素降解效果较好。

2.2 漆酶处理前后梗丝化学成分的变化

漆酶具有很强的专一性,而且其添加在梗丝中的含量也比较少。由表 6 可以看出,酶处理前后梗丝化学成分无明显变化,添加漆酶基本不会对梗丝化学成分造成影响。

表 6 不同处理条件下测定的梗丝化学成分

Table 6 Chemical constituents of the cut stem under different treatments

编号	质量分数/%						
	总糖	总氮	总碱	还原糖	总氯	总钾	蛋白质
1	13.2	1.46	0.50	12.3	2.85	5.48	8.56
2	13.1	1.46	0.48	11.8	2.86	5.5	8.62

*注:1号代表云南地区梗丝,2号代表最高降解率参数条件处理后的云南地区梗丝

2.3 漆酶处理前后梗丝填充值的变化

由于梗丝的填充性能不单单是靠木质素来支撑,所以降解部分木质素对其填充性能影响很小。

由表 7 中也可以看出,酶处理前后梗丝的填充值变化不明显,使用漆酶降解木质素对填充值基本没有造成影响。

表 7 不同处理条件下测定的梗丝填充值

Table 7 Filling value of the cut stem under different treatments

编号	均值/(cm ³ /g)			均值/(cm ³ /g)
1	5.92	5.89	5.94	5.91
2	5.89	5.88	5.82	5.86

*注:1号代表云南地区梗丝,2号代表最高降解率参数条件处理后的云南地区梗丝

3 结 语

1)酶解时间、酶解温度和漆酶用量都对梗丝中木质素的降解有显著的影响。

2)漆酶仅仅对梗丝中的木质素有显著的降解效果,而对梗丝中原有的化学成分不会造成影响。

参考文献:

- [1] 闫克玉,赵铭钦,褚国海,等.烟草原料科学[M].北京:科学出版社,2008:432-446.
- [2] 于建军.卷烟工艺学[M].北京:中国农业出版社,2003:203-216.
- [3] QIU Zengchang,WANG Haiyi. The application research status and progress of lignin [J]. **South West Pulp And Paper**,2004 (3):29-32.(in Chinese)
- [4] WANG Peng, GU Zhengbiao, CHENG Li. Effect of modification by laccase on property of wood material [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012(9):991-995.(in Chinese)
- [5] TAO Hong, SHEN Guanglin, ZHAO Mouming, et al. A kaline Treatment of tobacco stem [J]. **Tobacco Science & Technology**, 2009(4):37-40.(in Chinese)
- [6] ZHOU Yuanqing, ZHOU Liqing, ZHANG Xin, et al. Preliminary study on enhancing the use value of the cut-stem tobacco through the degradation of lignin by biotechnology[Q]. **Journal of Yuxi Teachers' College**,2006(6):61-63.(in Chinese)
- [7] WANG Jing, LI Yongkuan, Li Kun, et al. Optimization of conditions for reducing pectin in waste tobacco stem with pectinase[J]. **Tobacco Science & Technology**,2013(10):59-62.(in Chinese)
- [8] CHEN Xing, SHEN Xiaofeng, GONG Xiaowei, et al. Improving tobacco cut stem quality with microbial preparation [J]. **Acta Tabacaria Sinica**,2013,19(3):83-86.(in Chinese)
- [9] ZHAO Mingqin, LI Fangfang, LI Xiaoqiang, et al. study on the influence of different biological agent treatment to the content of aroma component of the fermentation fluecured tobacco [J]. **Journal of Yunnan Agricultural University**,2007,22(4):519-524.(in Chinese)
- [10] YU Jianjun, MA Haiyan, YANG Hanwen, et al. Study on using pectinase to degradate pectin in flute-cured tobacco [J]. **Acta Agriculturae Jiangxi**,2009,21(3):136-138.(in Chinese)
- [11] ZHANG Hui. New advance of study on ligninolytic enzymes[J]. **Tianjin Agricultural Sciences**,2006,12(3):8-12.(in Chinese)
- [12] WANG Na, LI Xian, WANG Dingwei. The screening of lign in and metabo lice of a fungus from tobacco and its application on tobacco technology[J]. **Journal of Yunnan Agricultural University**,2008(23):64-67.(in Chinese)
- [13] DUAN Meng, LI Xian, LI Zhengyong, et al. Application of lignin-degrading fungus to paper-making reconstituted tobacco[J]. **Chinese Tobacco Science**,2009,30(3):69-70.(in Chinese)