

## 利用酶制剂降解烤烟烟叶中淀粉和蛋白质的研究

谢会雅<sup>1</sup>, 朱列书<sup>1\*</sup>, 牛艳丽<sup>2</sup>, 赵松义<sup>1,3</sup>, 宫长荣<sup>4</sup>

[1.湖南农业大学烟草工程技术中心, 长沙 410128; 2.武汉烟草(集团)有限公司, 武汉 430050; 3.湖南省烟草公司, 长沙 410007; 4.河南农业大学, 国家烟草栽培生理生化基地, 郑州 450002]

**摘要:** 为探索外加酶制剂施于调制后原烟发酵过程的效果, 设计了不同加酶量、作用时间、相对湿度和温度处理的方法来降解烤烟烟叶中的淀粉和蛋白质的试验。结果表明, 单一施用中性蛋白酶对烤烟蛋白质的降解率不理想, 综合使用 $\alpha$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶针对不同的部位均有不同的相对最佳处理组合。在各等级相对最佳条件下施加 $\alpha$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶后再喷施中性蛋白酶发酵烟叶后针对3个等级烟叶的淀粉和蛋白质有所降解, 氨基酸含量均有显著提高, 但还原糖含量、总氮和烟碱含量变化不明显。

**关键词:** 烤烟烟叶; 淀粉; 蛋白质; 酶

中图分类号: S572.01

文献标志码: A

文章编号: 1007-5119 (2008) 06-0023-04

## Using Enzyme to Degrade Hydrolyze Starch and Protein of Flue-cured Tobacco Leaves

XIE Huiya<sup>1</sup>, ZHU Liushu<sup>1\*</sup>, NIU Yanli<sup>2</sup>, ZHAO Songyi<sup>1,3</sup>, GONG Changrong<sup>4</sup>

(1. Tobacco Engineering Center, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Technology Center, Wuhan Cigarettes Factory, Wuhan 430050, China; 3. Hunan Provincial Tobacco Corporation, Changsha 410007, China; 4. National Tobacco Cultivation and Physiological and Biochemical Research Centre, Henan Agriculture University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to explore the effect of added enzyme preparation on fermentation of flue-cured tobacco, an experiment on degradation of starch and protein in tobacco leaves was conducted by using various treatments of added enzyme level, time, RH and temperature. The results showed that single application of neutral protease could not achieve favorable degradation rate of protein in flue-cured tobacco, while the best combinations of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase were found for different stalk position leaves. Under the relatively optimum conditions, three grades tobacco leaves treated by  $\alpha$ -amylase, glucoamylase and neutral protease subsequently exhibited degraded starch and protein, significantly increased amino acid, and no changes of reduced sugar, total nitrogen and nicotine.

**Keywords:** flue-cured tobacco leaf; starch; protein; enzyme

烤后烟叶中残留的淀粉和蛋白质对卷烟吸食品质有不良影响<sup>[1-5]</sup>。因此, 降解烤后烟叶淀粉和蛋白质已被烟草科技人员所关注。研究表明<sup>[6-12]</sup>, 烟叶中淀粉、蛋白质的降解实质上是在一定温度、湿度和烟叶水分含量条件下, 由相关酶的水解来完成的。某些产区的上部叶淀粉和蛋白质含量过高, 单纯依靠烘烤过程中烟叶自身淀粉酶和蛋白酶的作用已经不能满足工业生产对于低淀粉和蛋白质的

原料需求。相关烘烤研究表明<sup>[13]</sup>, 烘烤后期用于水解淀粉和蛋白质的淀粉酶类、蛋白酶、肽酶活性迅速下降, 初烤后烟叶中酶活性基本丧失。如何利用各种酶的个体或综合效应, 改善烟叶品质, 在较短时间内实现从农业原料到工业生产所需原料的转变, 已成为烟草行业普遍关注的问题。为此, 笔者探讨了酶制剂对烤烟烟叶中淀粉和蛋白质含量的影响, 对利用酶制剂改善烟叶品质具有重要意义。

基金项目: 国家烟草专卖局项目“高香气优质烟叶开发”(2001B10)

作者简介: 谢会雅(1981-), 女, 在读硕士, 主要从事烟草生理生化及栽培方面研究。Email: xhyzqs@126.com。\*通讯作者, E-mail: Zls5809@hotmail.com  
收稿日期: 2007-11-19 修回日期: 2008-03-09

## 1 材料与方法

### 1.1 烟叶原料

河南许昌产 B2F、C3F、X2L 等级烤烟烟叶。

### 1.2 主要酶制剂

$\alpha$ -淀粉酶(无锡星达生物工程公司,酶活力 4000 u/g); 葡萄糖淀粉酶(无锡杰能科生物工程公司,酶活力 100 000 u/g); 中性蛋白酶(无锡杰能科生物工程公司,酶活力 5 000 u/g)。

### 1.3 添加酶制剂发酵烟叶方法

1.3.1 烟叶预处理 选取B2F、C3F、X2L等级烟叶,将烟叶抽去烟梗撕扯为片状,用小型喷雾器回潮烟叶使水分达16%~18%。同一种叶片称取相同重量(约200 g)并平均分成3份备用。抽样测定3个等级烟叶的淀粉、蛋白质含量及其它成分作为对照。

1.3.2 单施酶试验 主要探讨中性蛋白酶加酶量、作用温度、湿度和作用时间对各等级烟叶中淀粉、蛋白质降解的影响。采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计(表1), 3次重复。

表1 单施酶试验因素水平表

Table 1 Design of single enzyme experiment

处理	加酶量	温度/℃	相对湿度/%	作用时间
D1	2×	25	50	30h
D2	6×	35	60	60h
D3	12×	45	70	90h
D4	18×	55	80	120h

注:表中加酶量“×”为酶量单位系数,作用时间“h”为时间单位系数。

1.3.3 混合酶试验 主要探讨 $\alpha$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶混合使用的比例、加酶量、作用温度、湿度和作用时间对各等级烟叶中淀粉降解的影响。采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计(表2), 3次重复。

表2 混合酶试验因素水平表

Table 2 Design of mixed enzyme experiment

组合处理	比例	加酶量	温度/℃	相对湿度/%	作用时间
H1	1: 0.5	1×	25	50	30×
H2	1: 1	2×	35	60	60×
H3	1: 5	4×	45	70	90×
H4	1: 10	8×	55	80	120×

注:表中加酶量“×”为酶量单位系数;作用时间“×”为时间单位系数。

1.3.4 酶制剂的施加方法 称取规定质量的酶制品,冰浴研磨后配制成均匀的酶溶液,量取相同体积的酶溶液用喉头喷雾器均匀喷洒于约50 g烟叶表

面,放入恒温恒湿培养箱中,按要求调节温度、湿度和作用时间,使酶制剂作用于烟叶;用喷洒清水作为对照。

### 1.4 取样与测定

发酵结束后,将烟片(丝)置于105℃烘箱中烘5 min使酶失活,再于70℃下烘30 min,粉碎,过40目筛。采用蒽酮比色法测定烟叶的淀粉含量,蛋白质、氨基酸及其它指标均按常规方法测定。

以淀粉降解率(%)((对照的淀粉含量-酶处理的淀粉含量)/对照的淀粉含量),蛋白质降低率(%)((对照的蛋白质含量-酶处理的蛋白质含量)/对照的蛋白质含量)作为试验指标。

## 3 结果

### 3.1 中性蛋白酶对蛋白质降解的影响

由表3可知,中性蛋白酶对B2F、C3F、X2L中残留的蛋白质的总体降解效果均不理想,其中对X2L的效果稍好。

由表4看出,对于上部叶,加酶量、温度两因素的影响达到了极显著水平,湿度因素也有显著影响,时间因素不显著;对于中部叶,以时间和温度因素影响最大,达到了极显著,其次是湿度的影响显著,加酶量对蛋白质降解率影响不显著;对于下部叶,加酶量对降解结果的影响最大,达到了极显著水平,酶作用的湿度、温度分别也有极显著和显著的影响,时间因素的影响仍不显著。

表3 中性蛋白酶发酵试验结果及蛋白质降解率

Table 3 Test result of neutral protease fermentation and protein degradation rate

编号	加酶量	温度/℃	相对湿度/%	作用时间	蛋白质降解率/%		
					B2F	C3F	X2L
1	2×	25	50	30×	3.21	7.27	17.54
2	2×	35	60	60×	1.69	2.25	3.57
3	2×	45	70	90×	2.20	6.82	8.65
4	2×	55	80	120×	7.04	1.74	6.83
5	6×	25	70	120×	7.33	7.69	6.67
6	6×	35	80	90×	7.99	0.87	7.62
7	6×	45	50	60×	4.03	4.93	0.79
8	6×	55	60	30×	4.84	4.79	8.89
9	12×	25	80	60×	4.55	16.32	10.00
10	12×	35	70	30×	10.78	2.1	2.54
11	12×	45	60	120×	0.15	0.94	2.06
12	12×	55	50	90×	0.51	1.23	6.83
13	18×	25	60	90×	10.41	0.15	6.75
14	18×	35	50	120×	9.53	9.43	30.32
15	18×	45	80	30×	0.73	0.73	11.27
16	18×	55	70	60×	8.14	8.12	18.1

注:表中加酶量“×”为酶量单位系数;作用时间“×”为时间单位系数。

表4 中性蛋白酶作用时发酵条件方差分析  
Table 4 Analysis of variance for fermentation condition of neutral protease

方差来源	F 值		
	B2F	C3F	X2L
加酶量	6.84**	0.10	15.18**
温度	14.05**	5.08**	3.34*
湿度	4.06*	3.94*	7.02**
时间	0.86	6.53**	1.91
误差			
总和			

注：\*表示差异显著，\*\*表示差异极显著。

对中性蛋白酶降解蛋白质结果进行极差分析知，针对 B2F 的较优条件为：加酶量 18×，在温度 35℃、湿度 70% 下作用 120 h；针对 C3F 的较优条件为：加酶量为 12×，25℃ 湿度 70% 下作用时间 60 h；针对 X2L 的较优条件为加酶量 18×，在温度 35℃、湿度 50% 下作用 120 h。

### 3.2 混合使用 $\alpha$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶

由表 5 可以看出，淀粉酶和糖化酶的混合酶液对 3 个等级中烟叶淀粉的总体降解效果差别不大，以 X2L 最为显著。对于 B2F，温度因素影响最大，其次是加酶量和湿度、淀粉酶与糖化酶的比例，时间的影响仍最小，最佳处理条件为：淀粉酶和糖化酶比例 1: 1，加酶量为 4×，在 45℃ 和相对湿度 70% 的条件下作用 30 h；与 B2F 相似，C3F 影响最大的因素是温度，其次是加酶量、湿度和时间，淀粉酶与糖化酶的比例的影响最小，最佳条件为：淀粉酶和糖化酶比例 1: 5，加酶量 8×，在 55℃ 和 60% 相对湿度的条件下作用 30 h；对于 X2L，加酶量影响

最大，其次是作用时间和湿度，淀粉酶与糖化酶的比例和温度的影响最小，最佳条件为：淀粉酶和糖化酶比例 1: 5，加酶量 8×，在 35℃ 和 60% 相对湿度的条件下作用 30 h。

### 3.3 综合使用 $\alpha$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、中性蛋白酶

考虑了中性蛋白酶会影响其它酶的作用，所以先按照 3.2 试验结果在各等级相对最佳条件下施加  $\alpha$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶，作用一段时间后在喷施中性蛋白酶，在 1.3.3 试验得到的相对较优条件下分别发酵各等级烟叶，结束后测定化学成分，结果表明（表 6），3 种酶分别添加在发酵过程后，其淀粉和蛋白质有所降解，B2F、C3F、X2L 的淀粉降解率分别为 26.77%、29.54% 和 35.00%，蛋白质降解率分别为 13.36%、3.10% 和 11.79%。由表 6 还看出，B2F、C3F、X2L 3 个等级烟叶的氨基酸含量均有显著提高，其增加率分别为 7.11%、11.45% 和 9.52%。3 个等级烟叶的还原糖、总氮和烟碱含量变化不明显。

## 4 结 论

(1) 正交试验表明，中性蛋白酶对 B2F、C3F、X2L 3 个等级烟叶中蛋白质的平均降解率分别为 5.20%、4.71% 和 9.28%。本试验确定出 3 个等级烟叶的相对最佳酶作用条件为：B2F 为加酶量 18×，在温度 35℃，湿度 70% 下作用 120 h；C3F 为加酶量为 12×，25℃ 湿度 70% 下作用时间 60 h；对于

表5 外加淀粉酶和糖化酶对烟叶中淀粉的降解作用  
Table5 Degradation effect of added amylase and glucoamylase on starch in tobacco leaves

实验编号	加酶量	温度/℃	比例 <sup>①</sup>	相对湿度/%	作用时间	淀粉降低率/%		
						B2F	C3F	X2L
1	1×	25	1: 0.5	50	30×	7.78	12.21	39.89
2	1×	35	1: 1	60	60×	40.86	36.88	35.32
3	1×	45	1: 5	70	90×	36.04	37.24	39.44
4	1×	55	1: 10	80	120×	29.36	29.15	36.27
5	2×	25	1: 1	70	120×	12.83	4.42	11.18
6	2×	35	1: 0.5	80	90×	12.64	14.04	22.32
7	2×	45	1: 10	50	60×	16.96	7.30	17.53
8	2×	55	1: 5	60	30×	15.81	44.15	36.28
9	4×	25	1: 5	80	60×	17.33	7.96	37.08
10	4×	35	1: 10	70	30×	46.81	28.78	43.28
11	4×	45	1: 0.5	60	120×	38.05	40.43	28.15
12	4×	55	1: 1	50	90×	20.98	41.35	44.41
13	8×	25	1: 10	60	90×	22.07	31.28	48.21
14	8×	35	1: 5	50	120×	19.80	43.80	45.78
15	8×	45	1: 1	80	30×	55.75	38.80	45.76
16	8×	55	1: 0.5	70	60×	24.87	31.25	21.03

注：①混合酶中淀粉酶与糖化酶的质量比例。表中加酶量“×”为酶量单位系数；作用时间“×”为时间单位系数。

表6 综合使用 $\alpha$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、中性蛋白酶后的烟叶化学成分分析  
Table6 Chemical components of tobacco leaves treated by enzymes

等级	处理	淀粉/%	还原糖/%	总氮/%	烟碱/%	氨基酸/mg.g <sup>-1</sup> DW	蛋白质/%
B2F	对照	6.65	15.86	2.67	2.84	13.08	8.61
	发酵后	4.87	15.97	2.59	2.56	14.01	7.46
C3F	对照	7.21	17.11	1.98	2.46	13.89	7.75
	发酵后	5.08	17.57	2.03	2.09	15.48	7.51
X2L	对照	5.80	17.00	1.83	2.07	11.98	5.77
	发酵后	3.77	17.02	1.76	1.88	13.12	5.09

X2L, 加酶量 18 $\times$ , 在温度 35 $^{\circ}$ C, 湿度 50%下作用 120 h。但在试验设定的条件下, 中性蛋白酶对烟叶蛋白质的降解效果不明显。

(2) 通过正交试验得到, 2 种淀粉酶对 B2F、C3F、X2L 3 个等级烟叶的相对最佳的酶作用条件为: B2F 为淀粉酶和糖化酶比例 1: 1, 加酶量 4 $\times$ , 45 $^{\circ}$ C 和相对湿度 70%下作用 30 h; 对于 C3F 淀粉酶和糖化酶比例 1:5, 加酶量 8 $\times$ , 50 $^{\circ}$ C 和 60%相对湿度下作用 30 h; 对于 X2L, 淀粉酶和糖化酶比例 1: 5, 加酶量 8 $\times$ , 35 $^{\circ}$ C 和 60%相对湿度下作用 30 h。3 个等级烟叶的淀粉平均降解率分别为 26.12%、28.04%和 34.50%。

(3) 综合施加生物酶制剂结果表明, 3 种酶分别添加在发酵过程后, 其淀粉和蛋白质有所降解, B2F、C3F、X2L 的淀粉降解率分别为 26.77%、29.54%和 35.00%, 蛋白质降解率分别为 13.36%、3.10%和 11.79%。B2F、C3F、X2L 3 个等级烟叶中所测得的氨基酸含量均有显著提高, 其增加率分别为 7.11%、11.45%和 9.52%。3 个等级烟叶的还原糖含量、总氮和烟碱含量变化则不明显。

烤烟的陈化从酶促反应机理来看是烤烟本身所含的酶和微生物酶共同作用的结果。所以引用外援酶用于烟叶发酵, 增加烟叶香气不失为一种理想的方法。下一步将针对不同烟叶的具体情况, 在完成了酶种类的筛选精制的基础上, 寻找配制一种烟草特制发酵液, 应用于烘烤前的鲜样烟叶及原烟样品, 从而提高烟叶淀粉和蛋白质的降解幅度。

## 参考文献

- [1] 闫克玉. 烟草化学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2002: 50-56.
- [2] 左天觉. 烟草的生产、生理和生物化学[M]. 上海: 远东出版社, 1993: 16-24.
- [3] 肖协忠等. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1997: 47-66.
- [4] 金闻博, 戴亚. 烟草化学[M]. 北京: 清华大学出版社, 1994: 17-19.
- [5] 朱尊权. 烟叶的可用性与卷烟的安全性[J]. 烟草科技, 2000 (8): 3-6.
- [6] 许洪庆, 吕永芬. 提高烟叶醇化发酵效果的途径[J]. 贵州烟草, 2001 (4): 43-45.
- [7] 朱大恒, 陈再根, 陈锐, 等. 烤烟自然醇化与人工发酵过程中微生物变化及其与酶活性关系的研究[J]. 中国烟草学报, 2001 (2): 26-30.
- [8] 卢红, 王晶晶. 陈化过程烤烟主要水解酶活性跟踪分析[J]. 烟草科学研究, 2000 (4): 47-49.
- [9] 姚光明. 降低烟叶中蛋白质含量的研究[J]. 烟草科技, 2000 (9): 6-8.
- [10] 李晓, 刘凤珠, 姚光明, 等. 淀粉类酶在烟叶中降解条件的研究[J]. 生物技术, 2001, 11 (2): 44-46.
- [11] 李晓, 刘凤珠, 姚光明, 等. 酶解法改善烟叶吸味品质的试验[J]. 烟草科技, 2002 (3): 14-17.
- [12] 陈洪, 钱强. 酶对烟叶中淀粉和蛋白质的降解作用[J]. 烟草科学研究, 2002 (1): 38-39.
- [13] 宫长荣. 烟草调制学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.

(责任编辑 徐秋萍)