

生物技术及美拉德反应改良烟梗提取液的性质

骆莉¹, 卓浩廉², 周榕², 孔浩辉², 程志颖², 杨博^{1,*}

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006;

2. 广东中烟工业有限责任公司技术中心, 广东广州 510145)

摘要: 利用酶、微生物以及美拉德反应对烟梗提取液处理以改善烟梗提取液性质, 并传统的三级逆流提取工艺进行对比。烟梗提取液经一系列酶处理后, 后续经两种工艺处理, 工艺一: 美拉德反应后微生物发酵; 工艺二: 微生物发酵后美拉德反应。对比三级逆流提取工艺, 工艺一所得最终提取液, 还原糖减少了 3.0%, 氨基态氮增加了 41%, 挥发性物质增加了 165.3%; 工艺二所得提取液还原糖增加了 3.9%, 氨基态氮增加了 54%, 挥发性物质增加了 239.6%。确定工艺二为较合理的改善烟梗提取液性质的工艺路线。

关键词: 烟梗提取液, 酶, 微生物, 美拉德反应

Improvement of the nature of tobacco stem extracts by biotechnology and Maillard reaction

LUO Li¹, ZHUO Hao-lian², ZHOU Rong², KONG Hao-hui², CHENG Zhi-ying², YANG Bo^{1,*}

(1. College of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China;

2. Technology Center, China Tobacco Guangdong Industrial Corporation, Guangzhou 510145, China)

Abstract: In order to raise the use value of tobacco stems, tobacco stem extract was treated by applying enzymes, microbes and Maillard reaction for improving the nature of tobacco stems, which was compared with traditional three-stage countercurrent extraction technology. After being treated by a series of enzymes, tobacco stem extract was handled with other two processes; the first process, maillard reaction following microbial fermentation; the second process, microbial fermentation following Maillard reaction. Comparing with traditional three-stage countercurrent extraction technology, in the final extraction obtained by the first process, the content of reducing sugar decreased 3.0%, the content of amino nitrogen increased 41% and the content of volatile matters increased 165.3%. While the content of reducing sugar, amino nitrogen and volatile matters in the final extraction through the second process increased 3.9%, 54% and 239.6%, respectively. So the second process was determined as the more reasonable route to improve the tobacco stem extract.

Key words: tobacco stem extract; enzyme; microorganism; Maillard reaction

中图分类号: TS41⁺4

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)06-0189-04

烟梗即是烟叶之粗硬叶脉, 约占烟叶重的 25%~30%, 是烟草工业的主要副产物^[1]。作为烟草生产大国, 我国每年约有数十万吨烟梗废弃物没有得到合理的处理而被弃置。既对环境造成了污染, 同时也是对自然资源的浪费^[2]。烟梗是再造烟叶的主要原料成分, 制造烟草薄片是烟梗高值化利用主要的方式。造纸法烟草薄片的生产过程中, 原料的萃取分离是确保产品产率、品质和成本的一个重要工艺步骤^[3]。采用传统工艺所得到的烟梗提取液主要为

多糖、蛋白质等大分子, 糖分会影响燃烧速度和燃烧完全性, 燃烧过程中产生的焦油量^[4], 蛋白质燃烧时会产生一种如同燃烧羽毛的臭味, 并且是烟气有害物质的前体, 包括喹啉、HCN 和其他含氮化合物^[5-6]。导致烟草薄片存在吃味品质较差、杂气重等吸味缺陷, 影响了薄片在卷烟工业产品中的使用效果和添加量。国内外研究表明^[7-9], 通过微生物发酵, 能明显消除烟叶的青杂气, 减轻刺激性, 并且对烟叶香气质量的改善有一定的促进作用。酶制剂可以明显降解烟叶中的蛋白质^[10-12]、淀粉^[13-16]、细胞壁物质和果胶质^[17], 增加香气^[18]。美拉德反应三种技术结合是形成烟草特征香味的重要反应, 在烟用香料合成方面的应用十分广泛^[19]。目前, 三种技术已

收稿日期: 2011-06-07 * 通讯联系人

作者简介: 骆莉(1988-), 女, 硕士, 主要从事烟草生物科学、烟草化学方面的研究。

较成熟地应用于烟叶的处理,但要么以单一的形式,或其中两种形式结合,几乎还没有将三种技术结合的报道。本文拟采用酶、微生物发酵技术和美拉德反应对烟梗进行处理,研究复合酶、混合菌发酵并结合美拉德反应处理后提取液中还原糖、氨基态氮和挥发性香气成分的变化,与传统的三级逆流提取工艺进行对比,提出合理的改善烟梗提取液品质的工艺路线,为提高烟梗的利用价值和生产高品质的烟草薄片奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

α -淀粉酶、糖化酶 GA II、复合植物水解酶(液体)、纤维素酶(固体颗粒) 诺维信(中国)生物技术有限公司;烟梗 广东中烟工业有限责任公司;生香酵母、植物乳杆菌 由本实验室提供;柠檬酸、柠檬酸钠、二氯甲烷、无水硫酸钠 均为分析纯。

CP2245 型电子天平 感量 0.0001g,德国 Sartorius 公司;DSHZ-300A 型恒温水浴摇床 太仓市实验设备公司;QZ-18(B7)型电磁炉 广州市九阳电器有限公司;FZ102 型粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司;漩涡振荡器 广州正一科技公司;Agilent7890-5975 型气相色谱质谱联用仪,ZHWY-200D 型恒温气浴摇床,Centrifuge 5804R 型离心机,731 型紫外-可见分光光度计(UV-2100),TiraLab TIM840 型自动滴定仪,50mL 圆底烧瓶、容量瓶等玻璃仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 传统三级逆流提取工艺 将烟梗切割成小于 20mm 的短梗,加入 4 倍体积水,65℃,摇床振荡萃取 20min,5000r/min,离心 10min,按表 1 进行三个轮次的三级逆流萃取,按生产实际情况,从短梗 3 开始步入稳定生产状态,新鲜水均在第三次萃取时加入,依次参加其后三次萃取,只有第一次萃取液进入浓缩工序。因此,此处取短梗 3 的第一轮次萃取液 G 进行相关检测。

表 1 三级逆流萃取工艺过程
Table 1 The process of three-stage countercurrent extraction technology

萃取过程	萃取轮次	萃取液编号
短梗 1 + 新鲜水	第一次	A
+ 新鲜水	第二次	B
+ 新鲜水	第三次	C
短梗 2 + B	第一次	D
+ C	第二次	E
+ 新鲜水	第三次	F
短梗 3 + E	第一次	G
+ F	第二次	H
+ 新鲜水	第三次	I

1.2.2 烟梗处理工艺一(E→E+M→E+M+W)

1.2.2.1 烟梗的前处理方法 将原料烟梗在 40℃ 烘箱烘 5h 后,用粉碎机粉碎成粉末,放置于密封袋中存放备用。

1.2.2.2 烟梗的酶处理方法(E) 取 20g 梗粉,分别加 α -淀粉酶(0.4g,2%)、糖化酶 GA II(0.4g,2%)、

诺维信纤维素酶(0.4g,2%),加入 200mL pH 5.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,密封,在 180r/min、50℃ 下水浴摇床 4h,再加入风味蛋白酶(0.6g,3%),密封,在 180r/min、50℃ 下水浴摇床 4h,然后在 100℃ 水浴时灭活 8min,12000r/min 离心 10min,取上清液,得到烟梗提取液 a。取适量的提取液,测定还原糖和氨基态氮的含量。

1.2.2.3 美拉德反应方法(E→E+M) 取 70g 提取液加入到上接球形冷凝管的 500mL 圆底烧瓶中,调节 pH 为 6.5~8,在 100℃ 下蒸馏 5h,先停止加热再关水,停止反应即得美拉德反应物,即烟梗提取液 b。取适量的提取液,测定还原糖和氨基态氮的含量。

1.2.2.4 微生物发酵处理方法(E+M→E+M+W)

取 50g 的提取液 b 灭菌,按照 1% 的接种量接入安琪生香活性干酵母和植物乳杆菌 LP,在 33℃、180r/min 下摇瓶发酵 4h,反应结束后 100℃ 水浴灭活 8min。12000r/min 离心 10min,取上清液,即为烟梗提取液 c。取适量的提取液,测定还原糖和氨基态氮的含量。

1.2.3 烟梗处理工艺二(E→E+W→E+W+M)

具体的处理过程同 1.2.2 各步骤,不同在于:第一步酶处理完以后,先进行菌种发酵,发酵完以后再进行美拉德反应。

1.2.4 还原糖测定方法^[20] 分别移取烟梗提取液样品 1.0mL,加入容量为 50mL 的比色管中,加水至比色管内液体总体积为 2.5mL,再精密加入 3.0mL DNS 试剂,混匀,于沸水中煮沸 5min,取出后立即冷却,加水至刻度,摇匀,经一定倍数稀释,于 489nm 处测定吸光度值,其中以 2.5mL 蒸馏水替代标准液作试剂空白。

1.2.5 氨基氮测定方法 按照 ZBX 66038-87 测定氨基态氮。

1.2.6 挥发性成分测定方法 称取 15g 提取液,以二倍体积的二氯甲烷超声提取 20min,分液漏斗过滤,水相再以二倍体积二氯甲烷超声提取 20min,反复三次,收集二氯甲烷相,45℃ 常压旋转蒸馏二氯甲烷萃取液至 1mL 浓缩液,加入无水硫酸钠去除水分,进行气质分析。

采用 GC/MS 对 1.2.6 制取的样品进行分析。GC 条件如下:色谱柱:DB-FFAP(30m × 0.25mm i.d × 0.25 μ m);载气:He,流量 1.0mL/min;分流比 30:1;进样量为 1 μ L;进样口温度:250℃;程序升温:60℃,维持 2min,5℃/min 升至 250℃,维持 10min。MS 条件如下:传输线温度:260℃;离子源温度:230℃;四级杆温度:150℃;电离电压:70eV;质量数范围:50~550amu;MS 谱库:Wiley05 + Nist08 串联检索;采用丙酸苯乙酯内标法定量。

2 结果与讨论

2.1 不同处理工艺对烟梗还原糖量的影响

从表 2 中可看出,与三级逆流提取工艺(还原糖含量,131.8mg/g)对比,烟梗经过外源活性酶处理后还原糖量提高了 12.5%,烟梗中多糖大分子在酶的作用下得到一定程度的降解,使烟梗提取液还原糖含量升高。然而将得到的烟梗提取液 a,无论是经微

表2 还原糖含量的变化(mg/g)

Table 2 The changes of the content of reducing sugar(mg/g)

工艺	工艺一			工艺二		
	E	E + M	E + M + W	E	E + W	E + W + M
还原糖含量	148.310	143.593	127.869	148.310	137.697	136.910

注:单位为还原糖量/烟梗重量。

表3 氨基态氮含量的变化(mg/g)

Table 3 The changes of the content of amino nitrogen(mg/g)

工艺	工艺一			工艺二		
	E	E + M	E + M + W	E	E + W	E + W + M
氨基态氮含量	1.9301	1.6405	2.1308	1.9301	2.5302	2.3203

注:单位为氨基氮量/烟梗重量。

生物发酵还是美拉德高温热反应处理,还原糖含量均降低,这主要由于还原糖作为碳源供微生物生长发酵所需,作为美拉德反应的反应物,与氨基态氮发生反应,从表2中的数据可以得出,还原糖含量分别降低了14.8%和7.7%,但与传统工艺相比,处理工艺一的还原糖减少了3.0%,处理工艺二的还原糖增加了3.9%。有研究表明^[21],还原糖与香气、吃味、杂气、劲头、灰色呈极显著正相关,由此可以看出,工艺二对烟梗提取液改善有一定的促进作用。

2.2 不同处理工艺对烟梗氨基态氮含量的影响

从表3可以看出,烟梗经过外源活性蛋白酶处理,氨基态氮量与传统工艺(1.5109mg/g)处理相比提高了27.8%。工艺一:酶处理后的烟梗提取液,经高温热反应后,氨基态氮减少了15%,反应液再经微生物发酵后,氨基态氮升高了30%;而工艺二:酶处理后烟梗提取液,经微生物发酵,氨基态氮升高了31%,发酵液再进行高温热反应后,氨基态氮降低了8%。外源蛋白酶能有效地降解蛋白质、多肽大分子为小分子氨基态氮,在高温热的作用下,还原糖和氨基态氮发生了美拉德反应,使得氨基态氮含量下降,

表4 不同工艺处理后烟梗提取液主要香气成分的变化(μg/g)

Table 4 The changes of major aroma compositions of the tobacco stem extract through different processes(μg/g)

中文名称	英文名称	传统工艺	E	工艺一		工艺二	
				E→E + M	E + M + W	E→E + W	E + W + M
苯乙醛	Acetaldehyde, phenyl-	0.1158	0.2696	0.7734	0.8035	0.3696	1.1258
苯乙酮	Ethanone, 1-phenyl-		0.2402	0.3058	0.3411	0.2928	0.3886
糠醛	Furfural	2.8300	3.2823	4.0851	4.3521	4.8233	5.3327
β-大马烯酮	β-Damascenone			0.6346	0.5372		0.6346
苯甲酸	Benzenecarboxylic acid		0.9325	0.9028	0.9327	0.8694	0.7704
大马酮	damascene						0.5657
麦芽酚	Larixic acid		0.0232	0.1015	0.1873	0.5033	0.1939
3-氧代-α-紫罗兰醇	3-Oxo-α-ionol			0.9245	0.9482		0.8233
新植二烯	Neophytadiene	3.7181	6.7551	7.0553	6.9531	6.2702	7.2301
3-羟基β-大马酮	3-Hydroxy-β-damascenone			0.5052	0.4932		0.5051
苈烯	Norbornene		0.1070			0.0995	0.1607
邻苯二甲酸二异丁酯	Phthalic acid, diisobutyl ester	0.1792	0.1648	0.3198	0.7572	0.5107	0.3275
环异长叶烯	Cycloisolongifolene		0.1742			0.4867	0.2185
苯乙烯	Styrene	0.3965	0.7713	0.6949	0.6751	0.9093	1.7982
杜法三烯二醇	4,8,13-Duvatriene-1,3-Diol		2.1942	1.1523	1.0613	2.9080	1.5520
呋喃醇	Furfuryl alcohol			0.2301	0.4413	0.1235	0.4329
5-羟甲基糠醛	5-Hydroxymethylfurfural	0.2761	0.6278	1.0251	1.2958	0.6211	0.8233
山梨酸	Sorbic Acid		0.7542	0.7852	0.6937	1.2656	3.2040
β-大马酮	β-Damascenone						0.5338
苯甲醇	Benzenemethanol		0.2232	0.2873	0.3372	0.3006	0.2260
香豆满	Coumaran		0.0158			0.1773	
香草醛	Vanillic aldehyde					0.2674	
5-(1-哌啶)-2-糠醛	5-(1-Piperidinyl)-2-furaldehyde		0.2049	0.4619	0.3908	0.6553	0.2390
γ-羟基丁酸内酯	γ-Butyrolactone					0.3528	
巨豆三烯酮A	Megastigmatrienone	0.2722	0.2305	0.2508	0.1930	0.1676	0.2675
巨豆三烯酮B	Megastigmatrienone	0.0513	0.0628	0.0665	0.0401	0.0342	0.0653
巨豆三烯酮C	Megastigmatrienone	0.3561	0.3807	0.4033	0.3039	0.1623	0.4122
总计		8.1953	17.4143	20.9654	21.7378	22.1660	27.8311

微生物发酵过程中,氨基态氮会有一定程度的升高,尤其是当菌体细胞自溶后。与传统工艺相比,处理工艺一氨基态氮增加了41%,处理工艺二氨基态氮增加了54%。蛋白质对吃味影响显著,含量越高,抽吸刺激性越大,酶解后氨基态氮含量高,其中蛋白质降解程度大,会降低抽吸时的杂气与刺激性。

2.3 不同处理工艺对提取物挥发性化学组分的影响

为了比较不同处理工艺烟梗提取液中主要香气成分的变化情况,采用GC-MS对不同处理的烟梗提取液的挥发性组分进行了分析。

结果如表4所示,对比传统萃取工艺,酶处理使一些大分子物质降解,并生成一些风味成分的前体物质,挥发性物质增加了112.5%;处理工艺一,在美拉德反应作用下,羰基化合物与氨基化合物发生美拉德反应,增加了烟梗提取液中的风味物质,改善烟梗提取液品质,挥发性物质含量比酶处理后增加了20.4%;微生物发酵过程产生一些醇、醛、酮、酸、酯等成分,增加烟梗提取液的致香成分,挥发性物质含量比美拉德反应后增加了3.7%。对比传统工艺,该处理过程中所得提取液中挥发性物质含量增加了165.3%。处理工艺二,微生物发酵后挥发性物质含量比酶处理后增加了27.3%;美拉德反应作用下,挥发性物质含量增加了25.6%。对比传统工艺,该处理过程所得提取液挥发性物质含量增加了239.6%。

微生物及美拉德反应后,在提取液中均检测到在烟梗直接提取液中未检出的 β -大马烯酮、3-羟基- β -大马酮、3-氧代- α -紫罗兰醇等重要的烟草致香成分。挥发性成分及其含量是影响烟支抽吸效果的重要因素,其中一些挥发性成分与评吸效果密切相关,随着其含量的增加,吸味越佳。

3 结论

本文采用酶、微生物发酵和热反应三种技术结合对烟梗进行了处理,以还原糖、氨基态氮和主要挥发性成分为指标初步研究了两种不同工艺处理对烟梗提取液的影响,并与传统的三级逆流萃取工艺进行了比较,提出了合理的改善烟梗提取液品质工艺路线,为生产高品质烟草薄片工艺提供依据。

对比传统工艺,烟梗经外源活性酶处理后,还原糖量提高了12.5%,氨基态氮量提高了27.8%;通过比较两种不同处理工艺处理酶解后的烟梗提取液,最终所得烟梗提取液中,处理过程一还原糖减少了3.0%,氨基态氮增加了41%,挥发性物质增加了165.3%。处理过程二还原糖增加了3.9%,氨基态氮增加了54%,挥发性物质增加了239.6%。并且处理后所得烟梗提取液检测到在传统三级逆流提取工艺中未检出的 β -大马烯酮、3-羟基- β -大马酮、3-氧代- α -紫罗兰醇等重要的烟草致香成分。对比两种工艺,工艺二所得提取液的还原糖含量、氨基态氮含量和挥发性组分含量均高于工艺一,确定了工艺二为较合理的改善烟梗提取液的工艺路线。

酶处理技术有助于降解烟梗多糖、蛋白质等大分子物质,降低燃烧过程中的杂气与刺激性,同时酶解产生小分子的挥发性成分,提高小分子成分及风

味前体物质的含量,弥补了烟梗本身香气不足的缺点,微生物发酵和高温热反应技术,能增加烟梗提取液风味物质含量和致香组分,改善烟梗提取液品质,提高烟草薄片的品质。该技术有很好的应用前景,可以应用于工业上大规模生产烟草薄片,不仅能够实现废物利用,还能产生巨大的经济效益。

参考文献

- [1] D Layten Davis, Mark T, Nielsen. 烟草-生产,化学和技术[M]. 李天飞译. 北京: 化学工业出版社, 2003: 1-16.
- [2] 彭靖里, 马敏象, 吴绍情, 等. 论烟草废弃物的综合利用技术及其发展前景[J]. 中国资源综合利用, 2001(8): 18-20.
- [3] 孙霞, 舒文强. 造纸法烟草薄片研究现状及应用展望[J]. 涂布纸与特种纸, 2010, 41(8): 34-39.
- [4] 厉昌坤, 周显升, 王允白, 等. 烤烟烟叶焦油释放量与部分化学成分的关系[J]. 中国烟草科学, 2004, 25(2): 25-27.
- [5] 闫克玉. 烟草化学[M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2002: 1-54.
- [6] David H Slaymaker. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in hypersensitive defense response[J]. PNAS, 2002, 99: 1145-1160.
- [7] Tamayo A I, Cancho F G. Microbiology of the fermentation of Spanish tobaccos [J]. International Congress of Microbiology, 1953, 6: 48-50.
- [8] English C F, Bell E J, Berter A J. Isolation of thermopiles from roadleaf tobacco and effect of pure culture inoculation on cigar aroma and mildness[J]. Appl Microbio, 1967, 15: 117-119.
- [9] 马林. 利用生物技术改变烟叶化学组分提高其吸食品质和安全性的研究[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(3): 40-42.
- [10] Izquierdo Tsmayo A. Bacteria in tobacco fermentation[J]. TA. 1958(2): 2146.
- [11] 姚光明. 降低烟叶中蛋白质含量的研究[J]. 烟草科技, 2000, 148(9): 6-8.
- [12] 王革, 邓斌, 王笛, 等. 蛋白酶处理降低烟叶蛋白质研究[J]. 烟草科学研究, 2000(3): 54-57.
- [13] 李晓, 刘凤珠. 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.
- [14] 闫克玉, 赵磊, 朱国成, 等. 混合酶制剂改善上部烟叶品质研究[J]. 郑州轻工业学院学报, 2004, 19(1): 52-55.
- [15] 牛燕丽, 张鹏, 宋朝鹏. 酶法降解河南烤烟烟叶 B2F、C3F 和 X2L 淀粉的初步实验[J]. 烟草科技, 2005(3): 26-28, 32.
- [16] 李晓, 刘凤珠. 酶解法改善烟叶吸味品质的实验[J]. 烟草科技, 2002(3): 14-17.
- [17] 邓国兵, 李雪梅, 李成斌. 降果胶菌改善烟叶品质研究[J]. 烟草科技, 2003(11): 17-18, 20.
- [18] 任军林, 李小斌, 杜红梅. 加酶烟叶挥发性致香物质与感官质量变化的研究[C]. 中国烟草学会工业专业委员会烟草化学学术研讨会论文集. 海南: 中国烟草学会, 2005: 307-310.
- [19] 刘珊, 刘洋. 水解程度对小麦水解蛋白美拉德反应产物的影响及在烟用香料中的应用[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 127-130.
- [20] 舒馨, 刘雄民, 梁秋霞. 3,5-二硝基水杨酸吸光光度法测定八角残渣中总糖、还原糖含量[J]. 食品工业科技, 2010, 31(6): 341-343.
- [21] 王允白, 王宝华, 郭承芳, 等. 影响烤烟品吸质量的主要化学成分研究[J]. 中国农业科学, 1998, 31(1).