

复合酶条件优化对烟梗品质提升研究

杨乾栩¹, 和智君¹, 杨 蕾², 张天栋¹, 曾晓鹰¹, 王保兴¹, 杨 清^{*1}

(1. 云南中烟工业有限责任公司 技术中心, 云南 昆明 650231; 2. 昆明理工大学 环境科学与工程学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 为提升烟梗品质,降低烟梗中大分子蛋白质、果胶和纤维素含量,发展了烟梗的酸性蛋白酶-果胶酶-纤维素酶的复合酶水解方法,并采用全局搜索方法对复合酶的水解条件进行了优化和验证。结果表明:不同酶对不同参数的响应不同,3个酶对pH均很敏感,尤以酸性蛋白酶最为敏感,作用区间较窄,果胶酶和纤维素酶对温度较为敏感,酸性蛋白酶受温度影响较小。整体上,3个酶在限定范围内达到最优水解率时的作用参数均不相同;参数优化后的复合酶对烟梗中的大分子物质具有较好的水解效果,总水解效率达28.34%,且感官品质较好;复合酶处理后的烟梗,其品质提升较为明显;结合工业生产特点,感官品质需求,及烟梗中蛋白、果胶和纤维素含量特点,可以有目的的在限定条件下优化烟梗水解效率及方向。

关键词: 复合酶;参数优化;烟梗;水解率

中图分类号:TS 4 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2016)11—1206—06

Optimization of Mixed Enzymes to Improve the Quality of Tobacco Stems

YANG Qianxu¹, HE Zhijun¹, YANG Lei², ZHANG Tiandong¹,
ZENG Xiaoying¹, WANG Baoxing¹, YANG Qing^{*1}

(1. R&D Center, China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming 650231, China; 2. College of Environmental Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: The study aimed to optimize the hydrolysis parameters for mixed enzymes to improve the quality of tobacco stems and reduce the contents of macromolecules protein, pectin and cellulose. Results showed that acid protease was more sensitive to pH than pectinase and cellulase but much less affected by temperature. The optimized parameters resulted in the better degradation of macromolecules with a total hydrolysis efficiency of 28.34% and significantly improved the sensory quality of tobacco stems. These indicated that hydrolysis rate and direction of tobacco stems could be changed according to industrial manufacturing, the requirement of sensory quality and the contents of macromolecules.

Keywords: mixed-enzyme, parameter optimization, tobacco stems, hydrolysis rate

收稿日期: 2015-01-02

基金项目: 云南中烟工业有限责任公司科技项目(20146CP03, 2013GY02)。

作者简介: 杨乾栩(1987—),男,内蒙古呼伦贝尔人,理学博士,工程师,主要从事烟草化学、香精香料研究。E-mail:18314300710@126.com

*通信作者: 杨 清(1973—),男,云南红河人,理学硕士,高级工程师,主要从事卷烟产品开发研究。E-mail:hkx1@tom.com

烟梗是卷烟生产中重要的副产物,约占烟叶的20%~25%。由于添加烟梗的卷烟其本质气严重、灼热感较强、刺激性较大,极大限制了烟梗的使用,使得烟梗的利用率一直较低,造成了资源的浪费。

从化学成分的角度来看,烟梗具有与烟叶基本一致的化学信息,但不同成分含量差异显著。其中,烟梗中含量明显高于烟叶且对感官品质不利的主要成分有木质素、纤维素、蛋白、果胶等大分子含量显著高于烟叶(图1)。因此发展可降低烟梗中主要大分子含量的方法,对转化烟梗化学成分向烟叶趋近,提升烟梗品质有重要作用。由于酶的选择专一性,因此烟梗的酶前处理研究也是烟梗前处理的研究热点^[1-5]。

通过已有研究不难发现,单一酶由于可以最大

条件调节其作用参数,因而对其目标降解物具有较强水解效果。复合酶在作用时,虽然每个酶不能达到各自最大的水解效果,但由于不同酶的共同作用,其整体水解后烟梗或梗丝品质往往具有较大提升,在生产中应用往往应用更大。然而从目前的烟梗酶水解参数选择研究来看,均是通过有限次数的水解参数试验选定较优的参数组合,未考虑到不同参数间的交互作用。针对目前研究尚存在的不足,作者发展了基于酶水解数学模型的复合酶的参数优化方法,并根据不同的条件优化了复合酶作用的水解参数。研究表明,数学模型可以从一定范围内对单酶和复合酶水解效果有较好的拟合效果。根据模型,并结合实际情况,可以在限定条件下考察复合酶的最佳水解条件,达到最佳水解效率。

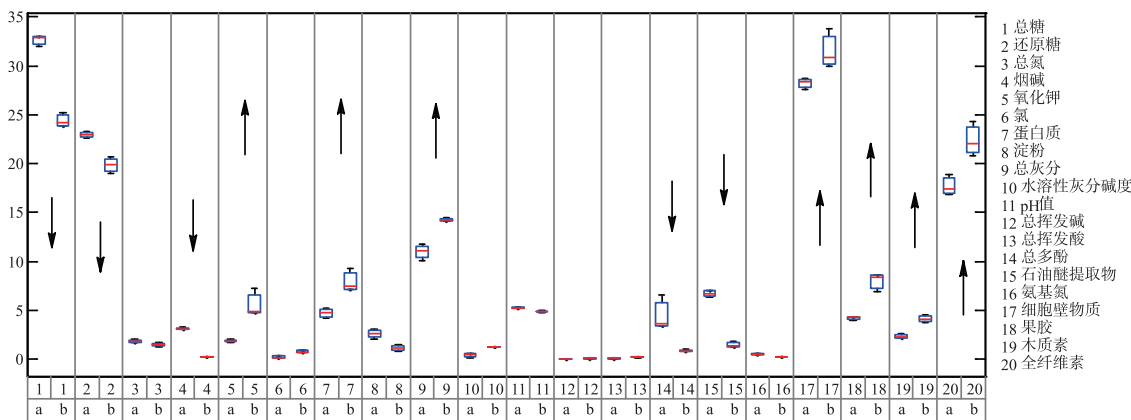


图1 烟梗(a)与烟叶(b)化学成分整体比较

Fig.1 Overall comparison of chemical constituents between tobacco stems and leaves

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

2008年红大GBBX烟梗:红河卷烟厂产品;酸性蛋白酶,果胶酶,纤维素酶:和氏璧生物试剂公司产品。

Milli-Q超纯水系统:美国Millipore公司产品;XP404S型电子天平(感量:0.1 mg):瑞士Mettler Toledo公司产品。

1.2 方法

1.2.1 实验酶选择 根据和氏璧生物试剂公司官网提供的酶最优参数范围(表1),以pH和温度为主要参考因素,结合最终复合酶所需的参数一致性原则,选择果胶酶(pH 3.2~5.0, 10~50℃),纤维素酶(pH 4.0~5.5, 30~60℃),酸性蛋白酶(pH 2.5~

6.0, 10~55℃)为最终的试验酶。

表1 试验酶选择

Table 1 Selection of enzymes for the experiments

试验酶	pH	最优 pH 值	温度/℃	最优温度/℃
果胶酶	3.2~5.0	3.5	10~50	50
纤维素酶	4.0~5.5	4.8	30~60	50
中性蛋白酶	6.0~8.0	7.5	10~60	45
酸性蛋白酶	2.5~6.0	3.5	10~55	50
碱性蛋白酶	7.0~8.5	8.5	10~60	45

1.2.2 蛋白质、果胶、纤维素检测方法 蛋白质的测定参照《烟草及烟草制品 蛋白质的测定 连续流动法》YC/T 249-2008进行;果胶的测定参照文献^[4-5]的相关方法进行;样品中的纤维素的测定参照《烟草及烟草制品中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维、酸洗木质素的测定 洗涤剂法》YC/T 347-2010进行。

1.2.3 缓冲溶液配置 精确称量柠檬酸 19.21 g, 柠檬酸钠 29.41 g, 分别加入 1 L 纯净水, 即配置为 0.1 mol/L 缓冲溶液。量取 0.7、3.2、4.6、5.7、6.6、8.0、9.3 和 10.0 mL 的柠檬酸, 并分别加入 9.3、6.8、5.4、4.3、3.4、2.0、0.7 和 0.0 mL 的柠檬酸钠中, 即配置得 pH 分别为 6.6、5.4、4.8、4.4、4.0、3.4、3.0、2.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液。

1.2.4 单一酶作用参数考察 称量果胶酶、酸性蛋白酶、纤维素酶各 960 mg, 分别溶解于 60 mL 缓冲溶液中为母液, 其中果胶酶和酸性蛋白酶分别溶于 pH 3.4 的缓冲溶液, 纤维素酶溶于 pH 4.8 的缓冲溶液; 将各母液依次二倍稀释为 16、8、4、2、0.4 mg/mL。取 30 mL 酶液, 喷洒于 120 g 烟梗上, 此时每个烟梗中酶质量分数为 0.4%、0.2%、0.1%、0.05%、0.01%; 将处理后的烟梗装密封袋, 于 48 °C 下, 保存 6~24 h。

1.2.5 单一酶水解模型建立 通过单一酶作用参数试验, 确定每个酶作用的最佳浓度和时间后, 固定每个酶作用时间为所有酶中最优作用时间最长者为准, 作弄浓度为每个酶各自的最优浓度, 考察不同 pH 和温度条件下, 每个酶的水解率。

水解率=(对照样品被检测物质质量分数-被检测物质质量分数)/对照样品被检测物质质量分数

试验所选 3 种酶的 pH 和温度范围分别为 2.5~6.0、10~60 °C, 最优 pH 值和温度分别是 3.5~4.8、50 °C, 因此试验参数围绕此范围设定如下均匀试验(见表 2)。

表 2 单一酶水解参数设置

Table 2 Hydrolysis parameters for single enzymes

试验号	温度/°C	pH
1	65	4.8
2	40	4.4
3	35	5.4
4	45	2.0
5	50	6.6
6	60	3.0
7	25	3.4
8	55	4.0

1.2.6 水解模型建立及参数估计 采用 Levenberg-Marquardt 算法, 以均方根(RMSE)和 R^2 (R-Square) 为目标函数, 选择适合每个酶的关于 pH 和水解温度的最佳数学模型。

1.2.7 复合酶解参数优化 采用全局搜索算法(GlobalSearch), 以水解率倒数为目标函数, 对复合酶水解方程在限定条件下进行最大值求解。

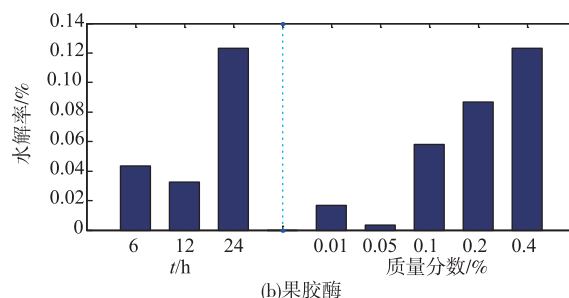
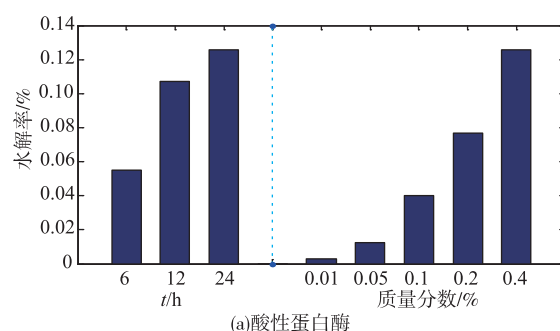
1.2.8 感官评价 参照《卷烟 第四部分: 感官技术要求》(GB5606.4-2005) 对烟梗样品进行感官评价分析。

2 结果与分析

2.1 酶作用时间及浓度考察

图 2 反映了不同酶随作用时间及作用浓度的水解效率变化。从图中来看, 不同参数对不同酶的影响不尽相同。酸性蛋白酶水解效率从 6~24 h 逐渐增加, 但增长率有所减少。但在酶质量分数 0.01% 至 0.4% 范围内稳步增加, 且增长率亦逐步增加; 对于果胶酶, 其在低质量分数和作用时间较低时的水解效率均较低且误差较大, 在较长作用时间和较大质量分数时, 可达到 12% 左右的水解率; 纤维素酶水解效率与水解时间的关系同酸性蛋白酶较为相似, 但从酶质量分数来看, 其水解效率则随酶使用质量分数先增加后减小, 但整体差异并不明显。

从上面的分析来看, 3 个酶的作用时间均在 24 h 时, 具有较好的水解效率。酸性蛋白酶和果胶酶作用质量分数为 0.4% 时, 纤维素酶的作用质量分数为 0.05% 时, 具有较好的水解效率。通过作用参数的单因素分析, 确定了下一步每个酶作用的时间及质量分数。



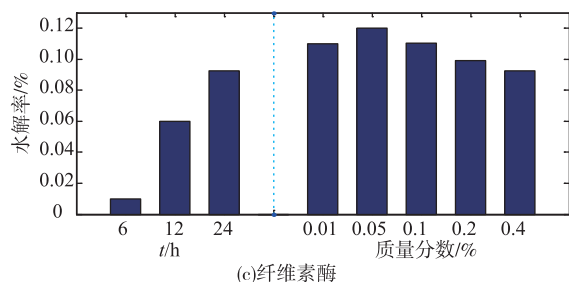


图2 酸性蛋白酶、果胶酶和纤维素酶随作用时间及质量分数的水解率变化

Fig. 2 Dependence of hydrolysis rates on reaction time and concentrations of acid protease,pectase and cellulase

2.2 单一酶水解方程

表3是固定水解时间为24 h,酸性蛋白酶和果胶酶质量分数为0.4%,纤维素酶质量分数为0.05%时,3个酶在不同pH和温度条件下的水解率。

表3 蛋白酶、果胶酶、纤维素酶不同条件下的水解率

Table 3 Hydrolysis rates of macromolecules under different hydrolytic parameters

试验号	温度/ ℃	pH	水解率/%		
			蛋白质	果胶	纤维素
1	65	4.8	0.92	3.8	9
2	40	4.4	6.40	8.7	11
3	35	5.4	1.80	2.3	13
4	45	2.0	4.60	2.5	7
5	50	6.6	0.31	1.0	0
6	60	3.0	2.50	5.9	6
7	25	3.4	7.40	5.8	6
8	55	4.0	9.20	11.0	3

图3反映了3个酶的水解率关于pH和水解温度的三维网状图。从图中来看,酸性蛋白酶的水解率受pH影响极大,其适合pH范围在3.4~4.1间,此区间水解率为9%~12%,当pH为3.7时,达到最大水解率12.1%,温度对酸性蛋白酶水解率影响极小(图3(a));果胶酶的最适pH范围在3.0~4.2之间,最适温度在35~55℃,此区间水解率为9%~10%,其中在水解温度46℃,pH 3.5时,达到最大水解率9.9%(图3(b));纤维素酶的最适pH范围在2.9~3.9之间,最适温度在34~50℃,此区间水解率大于9%,其中在水解温度42.5℃,pH 3.3时,达到最大水解率9.7%(图3(c))。

整体上pH对3个酶的水解率影响较大,尤其对酸性蛋白酶的影响最大,在pH 3.0~4.5范围之外,水解率已小于4%,只有接近1.5个pH跨度的有效区间,而对于果胶酶和纤维素酶,则有接近3~4个跨度的区间;温度对3个酶的水解率影响较少,尤其对酸性蛋白酶几乎没有影响。在试验范围内,温度对果胶酶和纤维素酶的水解率都呈现逐渐递减的效果。

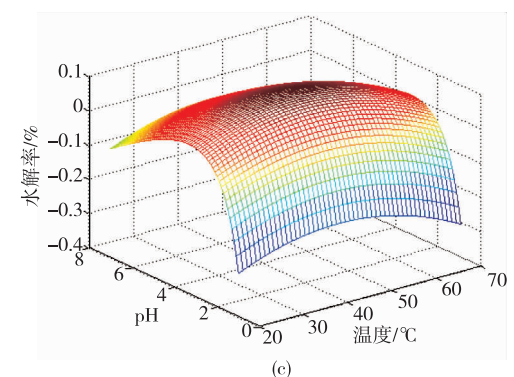
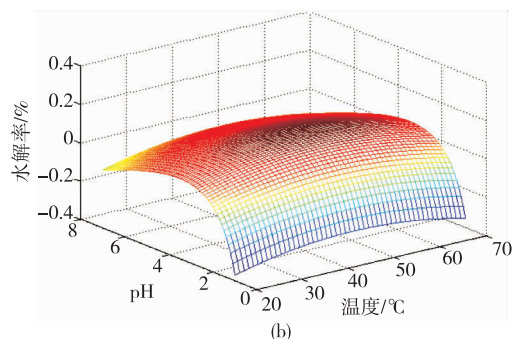
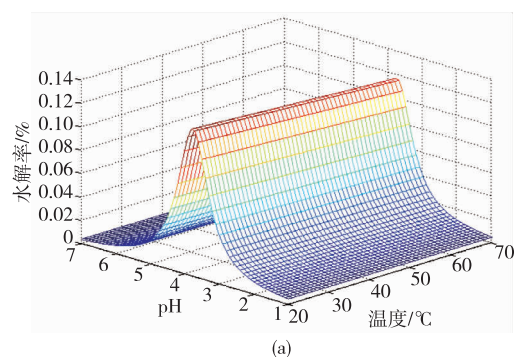


图3 酸性蛋白酶、果胶酶和纤维素酶水解率关于pH和水解温度的理论预测三维图

Fig. 3 Mesh plots of hydrolysis efficiency of acid protease,pectase and cellulase related to pH and hydrolysis temperature

2.3 复合酶水解参数优化

3酶混合后,作用时间设置为24 h,各酶的质量

分数设置为各自的最优质量分数,在不考虑存在的协同效应时,如果定义总水解率为蛋白质水解率、果胶水解率和纤维素水解率之和,则总水解率方程如下:

$$F_{\text{总水解率}}(T, \text{pH}) = f_{\text{蛋白质}}(T, \text{pH}) + f_{\text{果胶}}(T, \text{pH}) + f_{\text{纤维素}}(T, \text{pH})$$

可以看出,由于蛋白质水解率、果胶水解率、纤维素水解率均是关于温度 T 和 pH 的函数,烟梗的总水解率实际上也是关于温度 T 和 pH 的函数。

图 4 是烟梗总水解率关于水解温度和水解 pH 的等高线图。从图中来看烟梗的总水解率,在实验范围内与水解温度和水解 pH 均表现为开口朝上的抛物线关系,说明在实验范围内,烟梗总水解率与水解温度和水解 pH 均表现为先增加后减小的关系,在试验参数范围内,烟梗总水解率有最大值。

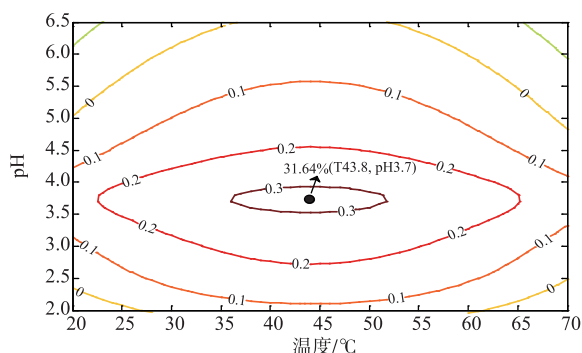


图 4 复合酶水解率随温度和 pH 变化等高线图

Fig. 4 Contour plots of hydrolysis rates with complex enzymes under different temperature and pH values

从影响作用大小上来看,沿 pH 方向的等高线较密,变化较快,反映 pH 对烟梗总水解率影响较大,而相应的水解温度对烟梗总水解率影响较小。

说明整体上, pH 对复合酶的影响较为重要,需要严格控制。

采用全局搜索算法(GlobalSearch)对烟梗总水解率进行最大值求解,参数设置为:初始值[25,3],最低边界[20,1],最高边界[70,7]。经全局算法搜索,当水解温度为 43.8°C ,水解 pH 为 3.7 时,具有最大的水解效率达 31.64%,此时烟梗中蛋白质、果胶和纤维素的水解率分别为 12.09%、9.9%和 9.65%。

2.4 复合酶处理的烟梗化学成分

表 4 是,在温度 43.8°C , pH 3.7 条件下,烟梗经复合酶处理后的果胶、蛋白质和纤维素的理论水解值和实际水解情况比较结果。

表 4 复合酶水解理论值和实际值比较

Table 4 Theoretical and actual hydrolysis values of macromolecules

种类	理论水解率/%	实际水解率/%
蛋白质	12.09	10.25
果胶	9.90	9.13
纤维素	9.65	8.96
总水解率	31.64	28.34

实际检测结果表明,蛋白质、果胶和纤维素的水解率的理论值要略小于实际值,其原因可能是复合酶的构建,使得酶的实际作用浓度小于其理论浓度。从总水解率差异来看,作者构建的复合酶水解模型,可以较好的预测总水解率,具有较强的应用价值。

2.5 复合酶处理梗丝品质

按照优化后的参数,对烟梗进行了复合酶处理,并对处理前后的烟梗制丝后进行了其感官品质分析,其中总分的计算参照下面公式:

感官质量总分=(香气质 $\times 0.3$ +香气量 $\times 0.3$ +杂气 $\times 0.08$ +刺激性 $\times 0.15$ +余味 $\times 0.17$) $\times 11.1$

表 5 烟梗复合酶处理前后感官质量变化

Table 5 Sensory quality of tobacco stems before and after treated by mix-enzymes

类别	香气质	香气量	杂气	浓度	劲头	刺激性	余味	总分
处理前	4.50	4.00	4.25	4.25	6.50	5.00	5.00	49.84
处理后	4.25	4.00	4.50	4.25	6.25	6.25	5.25	51.78

从表 5 可见,经复合酶处理后烟梗的感官质量总分上提升约 2 分,其中在杂气改善、刺激性降低和余味上提升明显,具有较好的应用前景。

3 结语

作者研究了复合酶限定条件下的水解参数优

化方法,在较少的试验次数下,即可实现对复合酶最大水解效率时水解参数的准确估计,避免了单因素参数试验的结果不准确性。结果表明:酸性蛋白酶、果胶酶和纤维素酶对 pH 均比较敏感,对温度则只要在 70 ℃下,效果均较好。整体上,3 个酶在限定范围内达到最优水解率时的作用参数均不相同;经

水解参数优化后,复合酶的总水解效率达 28.34%,且感官品质较好;经复合酶处理后的烟梗,其感官品质提升较为明显,可用性提升较大;如果结合工业生产特点,感官品质需求,及烟梗中蛋白、果胶和纤维素含量特点,设定最合理的目标函数,可以有目的的在限定条件下优化烟梗水解效率及方向。

参考文献:

- [1] 林凯. 酶法对烟梗丝降解效果的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(11): 6500-6501.
LIN Kai. Research on degradation effect of tobacco stem-silk by enzyme treatment[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(11): 6500-6501. (in Chinese)
- [2] 周榕, 陶红, 沈光林, 等. 碱氧与酶处理改善梗丝性质的研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 463-465.
ZHOU Rong, TAO Hong, SHEN Guanglin, et al. Using alkaline-hydrogen peroxide and enzymic treatment to improve the quality of cut stem[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2010, 26(5): 463-465. (in Chinese)
- [3] 戴丽君, 施建在, 郑彬, 等. 应用复合酶工艺技术提高烟梗浸膏品质的研究[J]. 江西农业学报, 2012, 24(6): 135-138.
DAI Lijun, SHI Jianzai, ZHENG Bin, et al. Study on applying complex enzyme technology to improve quality of tobacco stem concentrated solution[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2012, 24(6): 135-138. (in Chinese)
- [4] 徐志强, 陈开波, 蔡兵, 等. 酶解 - 流动分析法测定烟草中的果胶含量[J]. 烟草科技, 2005(9): 26-28.
XU Zhiqiang, CHEN Kaibo, CAI Bin, et al. Determination of pectin in tobacco with enzymolysis-autoanalyzer [J]. *Tobacco Science & Technology*, 2005(9): 26-28. (in Chinese)
- [5] 孔浩辉, 程志颖, 郭璇华, 等. 烟草中果胶含量连续流动测定方法的改进[J]. 烟草科技, 2014(2): 57-60.
SUN Haohui, CHENG Zhiying, GUO Xuanhua, et al. Improvement of continuous flow method for determining pectin in tobacco [J]. *Tobacco Science & Technology*, 2014(2): 57-60. (in Chinese)

科 技 信 息

韩国天然氨基酸制造技术取得成功

2016 年 10 月 9 日首尔韩联社报道, 韩国食品研究院功能性食品研究总部金钟泰博士研究组的天然肉类蛋白质“氨基 20”(amino 20)生产技术取得成功。

本次新开发的天然肉类蛋白质“氨基 20”采用高压酶加水分解技术, 将日常生活中不太受人们欢迎的猪牛后腿肉、鸡胸脯肉等保证其不氧化、不腐烂的环境下迅速合成蛋白质。这种天然蛋白质含有人类身体必需的 9 种 氨基酸和非必需的 11 种氨基酸。另外, 和原有的氨基酸相比, 天然氨基酸更容易被人体吸收, 对消化不良患者及老弱病残有着很好的治疗效果。

该项研究将申请国际专利 2 项, 并在韩国国内注册专利完毕后进行产业技术转让, 预计 2017 年开始正式投入商业化生产。据预测, 2018 年蛋白质销售市场将实现 40 兆韩币的市场价值。

[信息来源]食品伙伴网. 韩国天然氨基酸制造技术取得成功 [EB/OL]. (2016-10-11). <http://news.foodmate.net/2016/10/399028.html>