

酶制剂预处理对酵母菌发酵烟叶的影响

刘晓敏, 卢婷, 李勇, 王猛, 朱保昆, 张伟*

云南中烟工业有限责任公司技术中心, 昆明 650231

摘要: 为研究不同酶制剂对发酵烟叶的影响,以云南烟叶为试验材料,采用多种酶制剂对烟叶进行酶解处理,并利用葡萄酒果酒酵母菌发酵技术,旨在制备出风味更为丰富饱满的烟叶产品。实验分析了不同酶制剂处理对烟叶常规化学成分、挥发性风味物质及感官品质的影响。结果表明,经过酶解处理,各组烟叶的水分含量和含氮量无较大变化,含氮量大致在0.98%~1.18%,其中100 U·g⁻¹风味蛋白酶处理组烟叶中可溶性总糖和还原糖含量最高,分别为12.11%和5.93%。各组烟叶中挥发性风味物质总量均有所提升,最高为180.029 μg·g⁻¹,而且各组烟叶中主要特征性风味物质含量也得到提升,如新植二烯、苯乙醇、茄酮和巨豆三烯酮等,各组烟叶经酶解处理后感官品质也得到提升。综合分析发现,利用70 U·g⁻¹风味蛋白酶和50 U·g⁻¹α-淀粉酶复配对烟叶进行酶解处理,可以使烟叶的化学成分更协调,香气成分更充足,感官指标也更好。因此,通过酶解发酵的方式可以提升烟叶的品质,为烟叶的进一步商业化应用提供了依据。

关键词: 烟叶;酶制剂;酶解发酵;挥发性物质

DOI:10.19586/j.2095-2341.2024.0093

中图分类号:Q556, S572 文献标志码:A

The Impact of Enzyme Treatment on Yeast Fermentation of Tobacco

LIU Xiaomin, LU Ting, LI Yong, WANG Meng, ZHU Baokun, ZHANG Wei*

Technology Center, China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming 650231, China

Abstract: The research aimed to study the influence of different enzyme preparations on fermentation of tobacco. In this experiment, tobacco produced in Yunnan Province were used as materials. Different enzyme preparations were applied to enzymatically treat tobacco, followed by fermentation using wine yeast. The aim was to prepare tobacco products with richer and fuller flavor. The effects of different enzyme treatments on the conventional chemical composition, volatile flavor substances, and sensory quality of tobacco were analyzed. The results showed that, there was no significant change in moisture content and nitrogen content of tobacco after enzymatic treatment, with nitrogen content ranging from approximately 0.98% to 1.18%. The group treated with 100 U·g⁻¹ flavor protease exhibited the highest content of soluble total sugars (12.11%) and reducing sugars (5.93%). The total amount of volatile flavor substances in all groups of tobacco increased, with the highest being 180.029 μg·g⁻¹. Moreover, the content of characteristic flavor substances in each group of tobacco, such as neophytadiene, phenylethanol, solanone, and megastigmatrienone, also increased. The sensory quality of tobacco improved after enzymatic treatment. Comprehensive analysis revealed that enzymatic treatment using 70 U·g⁻¹ flavor protease and 50 U·g⁻¹ α-amylase resulted in a more balanced chemical composition, abundant aroma components, and better sensory indicators of tobacco. Therefore, enzymatic fermentation can improve the quality of tobacco leaves, providing a basis for further commercial development of tobacco leaves.

Key words: tobacco; enzyme preparations; enzymatic fermentation; volatile substances

我国作为烟草种植和消费大国,卷烟消费约占全球烟草市场的三分之一,同时,烟草税收也是

国家经济收入的重要组成部分。因此,烟草是关系国民经济的重要经济作物之一^[1]。烟叶的品质

收稿日期:2024-04-29; 接受日期:2024-07-05

基金项目:云南省中烟科技项目(JB2022YL01)。

联系方式:刘晓敏 E-mail: 13629474732@126.com; *通信作者 张伟 E-mail: zhangwei200200@126.com

优劣直接影响卷烟行业的发展^[2]。然而,尽管烟叶生产技术不断进步,我国当前生产的烟叶在香味方面仍存在不足,烟叶质量的进一步提升面临挑战^[3]。鉴于此,如何有效增加烟叶中的香气成分,提升其吃味,已成为目前卷烟工业亟需解决的关键问题之一。

目前,烟叶增香的方法主要有物理方法、化学合成方法以及生物方法三大类。近年来,随着生物技术的快速发展,外源酶制剂的添加和微生物发酵技术等生物增香方法在烟叶生产中得到了越来越广泛的应用和青睐^[4]。微生物发酵和酶处理的方式可以提升烟叶的内在品质,还可以缩短烟叶醇化周期,使烟叶香气更浓郁,吃味更柔和^[5-6]。在烟草酶解过程中,酶制剂如蛋白酶可以将蛋白质分解为氨基酸,脂肪酶可以将脂质分解为脂肪酸,淀粉酶、纤维素酶和果胶酶可以将糖类物质水解生成葡萄糖、果糖等还原糖^[7]。发酵烟叶中的微生物如酵母菌等可以通过对蛋白质、糖类等物质进行降解和自身代谢产生芳香物质以及致香味物质的前体和中间物质;而且在其生长发育过程中会生成各种酶类^[8]或其代谢产物,作用于烟草时可诱发或活化烟草内的各种酶系统,使底物完全降解,并转化为较小分子物质的芳香化合物或各种芳香物质前体物及中间物质,改善烟叶的香气,并降解烟叶中的有害物质^[9]。

目前有大量研究证实,酶制剂的添加有助于烟叶香吸味的提升。肖明礼等^[10]发现,烟叶经风味蛋白酶处理后,使得其抽吸品质从多方面得到提升。利用中性蛋白酶和多糖复合酶单独或复配添加到烟叶中可以提高中性香气成分的含量,增加卷烟的香吃味^[11]。据绍焯等^[12]发现,向烟叶中复配添加中性蛋白酶和果胶酶,其综合品质得到显著提升。郑勤安^[13]利用蛋白酶对烟叶进行酶解后发酵处理使得烟叶香气有所增加,改善吸味。肖琳等^[14]发现,脂肪酶酶解结合微生物发酵可以促进黄油的风味改良。但目前尚无对作用于不同底物的酶制剂在产香烟叶生产中的作用的研究报道。

因此,本研究以云南烟叶为材料,采用来源较为广泛且作用底物不同的3种酶制剂对烟叶进行酶解处理后再利用葡萄酒果酒酵母菌进行发酵,分析了处理后烟丝的常规化学成分、挥发性物质含量和感官品质,旨在为制备出香气更醇厚的烟叶提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

3号烟丝为云南中烟有限责任公司产品;葡萄酒果酒酵母SY(*Saccharomyces*)为安琪酵母股份有限公司产品;脂肪酶(假丝酵母)(20 U·mg⁻¹)、风味蛋白酶(米曲霉)(20 U·mg⁻¹)、 α -淀粉酶(猪胰腺)(12 U·mg⁻¹)均购自上海源叶生物科技有限公司。QP2020NX气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司);K9840自动凯氏定氮仪(济南海能仪器股份有限公司)。YPD固体培养基:1 g酵母粉,2 g胰蛋白胨,2 g葡萄糖,2 g琼脂粉,去离子水100 mL,115 °C条件下灭菌20 min,用于酵母菌的分离;烟叶固体培养基:烟叶粉末2 g,琼脂粉2 g,去离子水定容至100 mL,115 °C条件下灭菌20 min,用于驯化酵母菌,使菌株适应烟叶基质的生长环境。

1.2 试验设计

烟丝于恒温恒湿(22±1 °C, RH=60%±2%)条件下平衡48 h,取5 g烟丝平铺于托盘上,根据前期预实验结果确定了不同酶制剂用量,将不同酶制剂按表1中试验设计比例混合并溶于水,用喷头喷雾器均匀喷洒在烟丝表面,对照组(CT)喷洒等量去离子水,密封置于50 °C的恒温恒湿箱中,保持相对湿度为60%,酶解4 h后,80 °C烘干处理30 min结束酶解反应。

取葡萄酒果酒酵母粉,用温水活化后,用接种环挑取一环于YPD固体培养基上划线培养,30 °C培养箱中培养48 h。挑取单菌落于YPD液体培养基,30 °C摇床中200 r·min⁻¹培养24 h,再用接种

表1 试验设计

Table 1 Experimental design

处理组	酶制剂用量/(U·g ⁻¹)		
	脂肪酶	风味蛋白酶	α -淀粉酶
CT	—	—	—
D1	100	—	—
D2	—	100	—
D3	—	—	100
H1	100	—	50
H2	100	70	—
H3	—	70	50

环挑取一环于烟叶固体培养基上置于 30 °C 培养箱中培养 72 h, 如此驯化 3 代。挑取驯化后的单菌落于 YPD 液体培养基中 30 °C 震荡培养 24 h, 得到酵母菌种子液, 然后离心 (4 °C、10 000 r·min⁻¹、10 min) 去除上清液, 用无菌水重悬两次得到菌密度为 10⁸ CFU·mL⁻¹ 的发酵剂。然后在上步酶处理后的烟叶表面以 1% (质量分数) 的接种量均匀喷洒发酵剂, 30 °C 发酵 36 h。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 化学成分指标的测定 根据 YC/T 31—1996^[15]、蒽酮比色法^[16]、3,5-二硝基水杨酸法^[17]、凯氏定氮法^[18]分别对烟丝的水分含量、可溶性总糖、还原糖、氮含量进行测定。

1.3.2 烟丝中香气成分的定量测定 采用顶空固相微萃取/气相色谱——质谱联用 (solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometer, SPME-GC-MS) 方法^[19]进行测定。称取发酵后的 0.1 g 烟丝样品至顶空瓶中, 加入 1 μL 浓度为 118.2 mg·L⁻¹ 的 2-甲基-3-庚酮作为内标, 迅速密封, 将固相微萃取纤维头暴露于顶空瓶内上空, 不接触到样品。萃取条件是 70 °C, 30 min。萃取结束后将纤维头收回转移至气相色谱进样口, 解吸 7 min。最终通过比对各挥发性物质与内标的峰面积, 可以得出各挥发性物质的含量。

气相色谱条件: 色谱柱为 DB-WAX 毛细管柱, 规格: 30 mm×0.25 mm×0.25 m (安捷伦科技有限公司); 载气 (He) 流量为 0.8 mL·min⁻¹; 进样口 (不分流) 温度 250 °C; 柱温升温程序为 40 °C, 3 min, 然后以 5 °C·min⁻¹ 速度升温到 90 °C, 再以 10 °C·min⁻¹ 升温到 250 °C。

质谱条件: 电子轰击 (EI) 模式, 离子能为 70 eV, 检测器电压为 350 V, 扫描范围为 33~450 m·z⁻¹, 频率为 3.00 scans·s⁻¹。

1.3.3 感官评价 根据据绍焯等^[12]的方法, 对各实验组酶解后发酵处理的烟丝进行感官评价。以未经过任何处理的烟丝样品作为空白对照, 把其余处理组烟丝装入密封袋中, 60 °C 烘干 30 min, 分别制成卷烟。由 6 位专业人员对卷烟香气量、香气质、余味、杂气、甜润感、刺激性、燃烧性 7 种指标进行感官质量评价, 感官评价评分表见表 2, 各项指标满分为 9 分。

1.4 数据处理与分析

采用 Microsoft Excel 2016 对试验数据进行处

表 2 烟叶感官评价标准

Table 2 Sensory evaluation criteria for tobacco

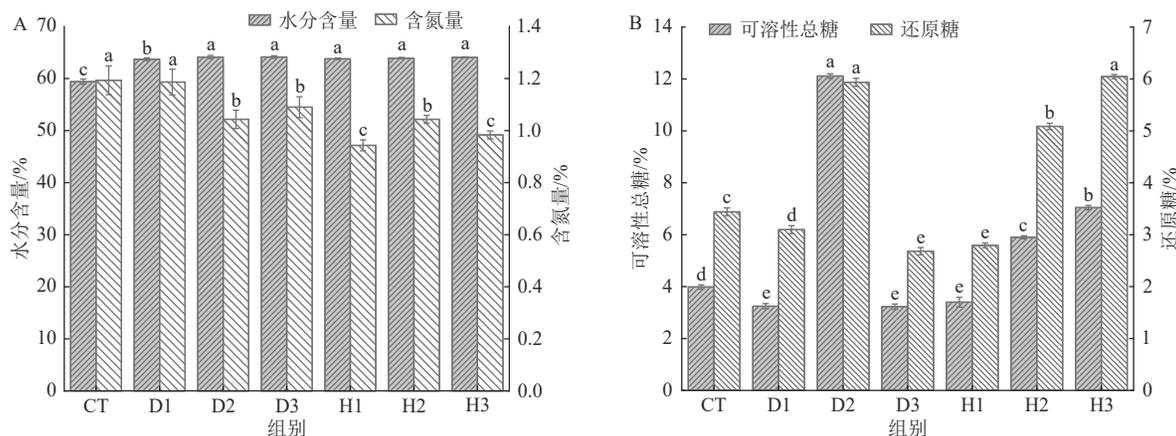
指标	特征描述	分值	指标	特征描述	分值
香气质	好	7~9	香气量	充足	7~9
	较好	4~6		尚充足	4~6
	差	1~3		较少	1~3
余味	舒适	7~9	杂气	小	7~9
	较舒适	4~6		较小	4~6
	差	1~3		大	1~3
甜润感	显著	7~9	刺激性	小	7~9
	稍显著	4~6		较小	4~6
	不显著	1~3		大	1~3
燃烧性	好	7~9			
	中	4~6			
	差	1~3			

理, 用 IBM SPSS Statistics 27 进行显著性分析, 用 Origin 2024 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 酶处理对烟叶常规化学成分的影响

由图 1A 可知, 经酶处理的各组烟叶中的水分含量相较于仅 CT 组烟叶有了显著提升, 而不同酶处理之间则差异性不大。在含氮量方面, 除添加脂肪酶组外, 其余各组酶处理后的烟叶含氮量为 0.98%~1.18%, 均显著低于对照组, 且与市面上一般烟叶的含氮量 (1.5%~3.5%) 相比较低^[20]。特别值得注意的是, 当脂肪酶和 α-淀粉酶复配添加到烟叶中, 烟叶的含氮量降至最低, 这一结果表明, 这两种酶复配使用对烟叶中含氮物质的降解效果尤为显著。这与樊文举等^[21]的研究结论相契合, 即纤维素酶的添加同样能有效降低烟叶的含氮量。从图 1B 中可以看出, 不同酶制剂对烟叶进行处理后, 其可溶性总糖和还原糖含量呈现出增加或降低的趋势。具体而言, 100 U·g⁻¹ 风味蛋白酶处理组烟叶中的可溶性总糖和还原糖含量分别达到了最高的 12.11% 和 5.93%。然而, 烟叶糖含量过高会影响化学成分之间的协调性, 因此, 需将糖含量控制在适宜的范围内。进一步研究发现, 无论是利用风味蛋白酶单独酶解, 还是将风味蛋白酶分别与脂肪酶、α-淀粉酶进行复配酶解, 均可以使烟叶中的糖含量增加。这一现象可能归因于风味蛋白酶的特殊性质, 它同时包含内切蛋白酶



A:水分含量和含氮量;B:可溶性总糖和还原糖含量。不同小写字母表示不同酶处理组各指标间存在显著性差异。

图1 酶处理对烟叶常规化学成分的影响

Fig. 1 The effect of enzyme treatment on the conventional chemical composition of tobacco

和外切蛋白酶两种活性,可以更充分降解蛋白质,从而改变体系中的碳氮比。这种变化进而影响了酵母菌的生长发育,最终导致了烟叶中糖含量的变化。

2.2 酶处理对烟叶香气成分的影响

2.2.1 总体挥发性物质的种类和含量 利用SPME-GC-MS方法共检测出100余种挥发性香气物质成分,根据其化学结构,可分为醇类、酯类、醛类、酮类、酸类、含氮杂环化合物、烃类等物质。由图2可以看出烟叶经不同酶处理后,各组烟叶中的总体挥发性物质的含量均有所上升,但H2组除外,推测是添加酶制剂能更好地降解烟叶中的大分子物质,从而提高烟叶中的香气成分含量。 α -淀粉酶单独酶解处理组烟叶的总挥发性物质含量最高,为 $180.029 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,相较于仅发酵组的 $136.377 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

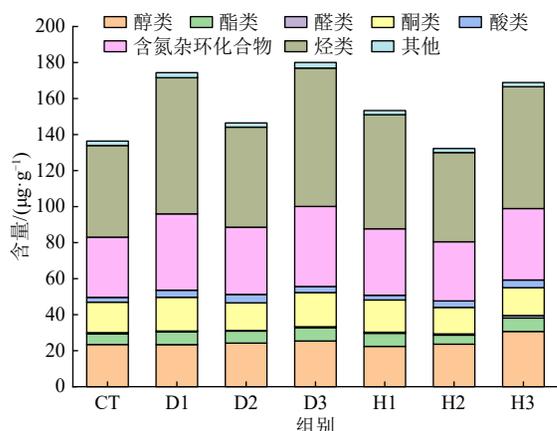


图2 酶处理对烟叶中总体挥发性物质的影响

Fig. 2 The influence of enzyme treatment on the overall volatile compounds in tobacco

提升了32%。其中不同酶处理组烟叶中烃类物质香气含量最高,平均含量为 $62.776 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,占总体含量的40%左右,不同酶制剂均有助于提升烟叶中烃类物质的含量,与樊文举等^[21]的结论相似。含氮杂环化合物含量在各处理组也较高,大概占总体含量的24%,这些含氮杂环类化合物如吡啶、呋喃等物质的产生,能够赋予卷烟烘烤香、花香、果香等香气,对烟草的香味具有较好的修饰作用,丰满烟香^[22]。其次含量相对较高的成分为醇类和酮类化合物,分别大约占总含量的15%和10%。酮类物质是烟叶中细腻、清香味特征的主要来源^[23]。酯类、酸类、醛类物质在各组烟叶中含量不高,分别占香气成分物质总量的4%、2%和0.4%,这些物质含量相对较少,对烟叶香气的提升有促进作用,主要起到增加烟气香甜气味和浓度的作用,使吃味更加醇和顺口^[21,23]。

2.2.2 主要挥发性物质的含量 不同酶制剂处理发酵烟叶中主要挥发性物质的含量见表3。可以看出,新植二烯是烟叶中含量最高的挥发性物质,大约占香气成分总量的40%。新植二烯是叶绿素的降解产物,作为烟叶香气的主要成分之一,其可以增加烟叶的吃味和香气,且进入烟气时具有减少刺激和醇和香气的作用,燃烧时可以携带其他香气物质进入烟气,是烟叶的重要增香剂^[24-25]。相较于CT组的 $48.761 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,各酶处理组新植二烯含量均有所提升,其中 α -淀粉酶和脂肪酶单独酶解组含量最高,分别提升了1.50和1.52倍,可能是由于这两种酶对烟叶中大分子物质如多糖、脂质等的降解能力更强,再通过酵母菌发酵后,产生更

表3 酶处理发酵后烟叶中主要挥发性物质的含量

Table 3 The content of major volatile compounds in tobacco after enzyme treatment and fermentation (单位: $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

中文名称	CT	D1	D2	D3	H1	H2	H3
3-甲基-1-丁醇	0.240±0.013g	0.564±0.006e	0.617±0.001d	0.670±0.016c	0.479±0.001f	0.810±0.006b	0.885±0.007a
芳樟醇	0.146±0.008b	0.215±0.007a	0.126±0.006c	0.148±0.004b	0.146±0.001b	0.158±0.011b	0.215±0.007a
植物醇	0.123±0.004a	0.092±0.000b	0.000±0.000c	0.093±0.004b	0.000±0.000c	0.000±0.000c	0.000±0.000c
香叶醇	0.102±0.003a	0.084±0.006bc	0.066±0.001d	0.092±0.003ab	0.063±0.004d	0.072±0.014cd	0.085±0.001bc
苯乙醇	17.718±0.308d	19.014±0.348bc	18.692±0.235c	20.386±0.317a	19.424±0.034b	18.758±0.147c	20.348±0.252a
3-氧代- α -紫罗兰醇	0.570±0.014f	1.009±0.006a	0.966±0.001b	0.932±0.014c	0.718±0.011d	0.688±0.006e	0.000±0.000g
苯乙酸乙酯	0.843±0.003b	0.736±0.000d	0.751±0.010cd	0.830±0.007b	0.770±0.013c	0.640±0.016e	0.876±0.001a
β -丁酸苯乙酯	1.857±0.010f	1.991±0.001d	1.974±0.006e	2.396±0.008a	2.086±0.000c	1.653±0.004g	2.354±0.006b
十六烷酸甲酯	0.349±0.001g	0.801±0.006a	0.701±0.001b	0.678±0.011c	0.660±0.000d	0.540±0.014f	0.611±0.003e
十六烷酸乙酯	0.440±0.008g	1.134±0.001b	0.939±0.010e	1.154±0.004a	0.978±0.001d	0.533±0.004f	1.060±0.000c
(E)-9-十八碳烯酸乙酯	0.000±0.000c	0.035±0.007ab	0.038±0.004a	0.029±0.013ab	0.034±0.006ab	0.023±0.001ab	0.037±0.003ab
亚油酸甲酯	0.031±0.006d	0.068±0.008a	0.053±0.001b	0.056±0.008ab	0.050±0.001bc	0.038±0.006cd	0.052±0.003b
丙酮	4.118±0.150a	3.183±0.046c	3.232±0.020b	3.121±0.030c	3.759±0.270b	2.969±0.141c	3.837±0.055ab
2-壬酮	0.022±0.000c	0.030±0.003bc	0.032±0.006bc	0.058±0.011a	0.035±0.007bc	0.038±0.003b	0.053±0.004a
茄酮	3.873±0.004bc	4.784±0.263a	3.549±0.041c	4.816±0.250a	4.180±0.113b	3.585±0.062c	4.831±0.216a
2-哌啶酮	0.243±0.004e	0.326±0.001a	0.315±0.007b	0.324±0.006a	0.268±0.003d	0.244±0.001e	0.297±0.003c
巨豆三烯酮	3.911±0.074c	5.021±0.049a	3.852±0.107cd	5.091±0.168a	4.361±0.148b	3.673±0.004d	4.901±0.058a
3-羟基- β -大马士革酮	0.077±0.010b	0.152±0.003a	0.090±0.014b	0.142±0.001a	0.088±0.000b	0.077±0.004b	0.092±0.003b
壬醛	0.072±0.000c	0.031±0.001e	0.043±0.004d	0.081±0.003b	0.040±0.007d	0.131±0.001a	0.038±0.004de
苯乙醛	0.408±0.011a	0.272±0.003c	0.229±0.008e	0.189±0.001g	0.359±0.004b	0.204±0.006f	0.246±0.001d
己酸	0.000±0.000d	1.195±0.007a	1.098±0.049b	0.000±0.000d	0.887±0.010c	0.000±0.000d	1.070±0.001b
3-甲基戊酸	0.982±0.020d	1.812±0.017c	1.674±0.148b	1.233±0.028c	0.931±0.024d	1.909±0.013a	1.901±0.074a
异巴豆酸	0.162±0.003a	0.140±0.014b	0.094±0.001c	0.141±0.013b	0.133±0.005b	0.111±0.000c	0.112±0.011c
烟碱	33.080±0.163e	41.893±0.858b	37.203±0.434d	43.935±0.550a	36.456±0.198d	32.556±0.126f	39.178±0.049c
二烯烟碱	0.974±0.006c	1.094±0.001b	0.964±0.006c	1.260±0.014a	0.000±0.000d	0.000±0.000d	0.000±0.000d
新植二烯	48.761±1.121e	72.900±0.375a	54.087±0.553d	73.923±0.502a	60.884±1.075c	47.359±0.014e	66.289±0.151b
2-甲氧基-4-烯基苯酚	0.449±0.001g	0.727±0.002b	0.644±0.006d	0.812±0.003a	0.669±0.003c	0.519±0.005f	0.632±0.003e

注:不同小写字母表示不同酶处理组各指标间存在显著性差异。

多的酶和小分子物质能够促进新植二烯的形成。其次,烟碱在各组烟叶中含量也较高,烟碱是烟叶中重要的植物碱,其含量决定了烟叶的劲头,也是烟叶中的主要有害物质之一^[26]。通过不同酶制剂处理,各组烟叶中烟碱的相对含量差异不显著,大致含量为23.2%~25.4%,说明不同酶制剂处理对烟叶中的烟碱含量的影响不大。

醇类物质是各组烟叶中含量较高的一类化合物。苯乙醇是苯丙氨酸转化产物之一,其具有强

烈的花香,可以显著提高烟叶风味^[27]。通过不同酶制剂处理,发现各组烟叶苯乙醇含量均有所提升,平均含量为19.192 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,其中 α -淀粉酶单独(D3)和与风味蛋白酶复配(H3)对烟叶进行酶解,其含量提升最高,增加了1.15倍,使烟叶的风味更醇厚。还发现通过酶解处理,另一种苯丙氨酸转化产物苯乙醛的含量均有所下降,推测可能是由于酶制剂可以降解大分子物质,产生其他酶,促进苯乙醛脱氢转化为苯乙醇所致。此外,烟叶中

3-甲基-1-丁醇的含量经酶制剂处理后有了较大提升,其中 α -淀粉酶与风味蛋白酶复配处理组烟叶含量最高,为 $0.885 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,相较于仅发酵组的 $0.240 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,提升了3.68倍,赋予烟丝更浓郁的苹果白兰地香气和辛辣味,还可以调节烟气的口感,使其更加柔和。同时还可以发现各处理组中3-氧代- α -紫罗兰醇含量有所提升,但 α -淀粉酶与风味蛋白酶复配处理组烟叶未检测到此物质,其中脂肪酶单独酶解组烟叶中此物质含量最高,提升了1.77倍,此物质含量的增加,赋予烟草甘草样的特征香气,使卷烟具有成熟的烟草气息,有利于卷烟香气的保持、香型的协调等^[28]。

通过不同酶制剂处理,各组烟叶中酯类物质如十六烷酸甲酯、十六烷酸乙酯、十八碳烯酸乙酯、亚油酸甲酯等物质的含量均有所增加,这些高级脂肪酸甲酯或乙酯具有脂肪味、蜡味,使烟气变得醇和香甜^[29]。其中十六烷酸乙酯在各组烟叶中含量最高,除脂肪酶和风味蛋白酶复配处理组外,其余组烟叶中十六烷酸乙酯含量相较于仅发酵组均提升了2倍以上,丰富了烟叶的风味,提高了香吸味。酮类物质中茄酮和巨豆三烯酮的含量最高,通过不同酶制剂酶解处理,这两种物质的含量

有所提升,其中 α -淀粉酶与风味蛋白酶复配处理组烟叶茄酮含量最高,提升了1.25倍;单独 α -淀粉酶处理组烟叶巨豆三烯酮含量最高,提升了1.30倍,可以使烟叶的香气成分更饱满,香吸味更好。茄酮和巨豆三烯酮是烟叶中天然存在的物质,是烟叶香气的重要组成部分,起主要的致香作用,能显著增强烟香,改善吸味,调和烟气,并减少刺激感,增加舒适度^[23]。茄酮及其降解产物均可以赋予烟丝类似胡萝卜的香味、甘草香和茶芳香,还有助于提高烟叶燃吸时的香气质、香气显露程度和扩散力,减少香气的沉闷感^[30];巨豆三烯酮的各同分异构体,也称“烟酮”,是烟草中的一种关键香味化合物,能掩盖杂味,并增加烟叶风味及烟气浓度^[31]。同时还发现通过酶解处理,各组烟叶中的3-甲基戊酸含量有所提升,该物质微带清香气息,是香料烟叶的特征香气成分^[32],其中 α -淀粉酶与风味蛋白酶复配处理组烟叶含量最高,可以更好地调节烟叶的口感,使其更加柔和。

为进一步分析不同酶处理组烟叶的挥发性风味物质,将上表中的主要挥发性风味物质绘制成热图,结果如图3所示,可以直观看出不同酶处理组烟叶中的主要挥发性风味物质存在明显差异。

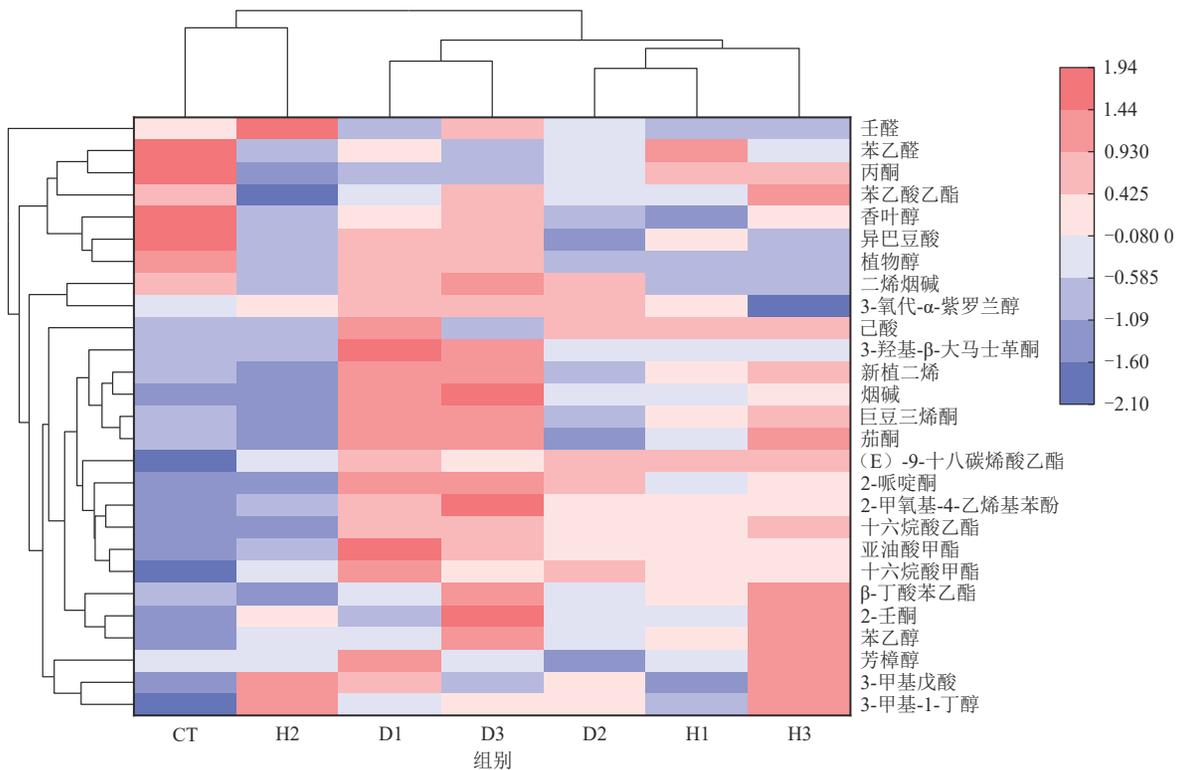


图3 不同酶处理烟叶中挥发性物质的热图和聚类分析图

Fig. 3 Heatmap and cluster analysis of volatile compounds in tobacco treated with different enzymes

由图3可知,不同酶处理烟叶可聚为3类,其中脂肪酶和风味蛋白酶复配酶解组和仅发酵组聚为一类,说明它们两者的主要挥发性成分分布没有显著差异,可能是由于这两种酶之间存在某种拮抗作用,不能充分发挥各自作用,降解烟叶中大分子物质的能力较差。而脂肪酶和 α -淀粉酶单独酶解聚为一类,结合表3和图3可以看出,这两组烟叶中挥发性风味物质含量高于其余组,考虑是由于脂肪酶和 α -淀粉酶对烟叶中的大分子物质的降解能力更强,能够增加烟叶中挥发性风味物质的含量。同时,风味蛋白酶和 α -淀粉酶复配酶解组烟叶中的挥发性物质含量与仅发酵组烟叶相比差异较大,可能是风味蛋白酶和 α -淀粉酶能够分别降解烟叶中的蛋白质和多糖类物质,降解为氨基酸和小分子糖类物质,游离氨基酸可作为重要的风味物质和风味前体物质,在酶解过程中经一系列反应生成醛类和醇类化合物^[35],增加烟叶的香气程度,风味改善效果明显。

2.3 酶处理对烟叶感官评价的影响

将不同酶制剂酶解后发酵处理的烟叶制成卷烟进行评吸,感官评价结果如图4所示。可以看出,通过向烟叶添加外源酶制剂进行酶解处理,烟叶的感官评价各项指标得分较高,均高于仅发酵组,说明酶解处理对提升烟叶的感官品质具有积极作用。D1、D3和H3组烟叶的香气质和香气量得分较高,大致得分在6.0分左右,这与上述其风味挥发性物质含量的增加呈正相关关系。值得注意的是,利用风味蛋白酶和 α -淀粉酶复配对烟叶

进行酶解后发酵处理,烟叶的甜润感和余味增加,刺激性和杂气降低,从而提高了烟叶的香吸味,提高了烟叶品质,说明利用这两种酶制剂进行酶解处理并经过酵母菌发酵,能够提升烟叶的感官品质特征,满足消费者喜好。

3 讨论

经过本研究发现,首先,通过不同酶制剂酶解后发酵处理,各组烟叶的常规化学成分方面,如水分含量和含氮量的变化并不显著。然而,可溶性总糖和还原糖含量却存在显著差异。其中 $100\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 风味蛋白酶处理组的烟叶,其可溶性总糖和还原糖含量均达到最高,分别为12.11%和5.93%。这一结果与风味蛋白酶的作用机制密切相关,其可以更充分降解蛋白质,从而改变体系中的碳氮比,影响烟叶中的糖含量。其次,经过不同酶制剂酶解处理后,各组烟叶中的挥发性风味物质总量均有所提升。具体而言, α -淀粉酶单独酶解处理组的烟叶,其总挥发性物质含量最高,为 $180.029\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。这一现象可能与 α -淀粉酶对烟叶中淀粉类物质的水解作用相关。淀粉水解生成的糖类产物(如葡萄糖和低聚糖)为挥发性物质的形成提供了丰富的底物。同时,对于各组烟叶各类挥发性物质的含量,从多到少依次为:烃类、含氮杂环化合物、醇类、酮类、酯类、酸类、醛类。再次,通过酶解处理,可以看出各组烟叶主要特征性风味物质含量均得到提升,包括新植二烯、苯乙醇、3-甲基-1-丁醇、3-氧代- α -紫罗兰醇、十六烷酸乙酯、茄酮和巨豆三烯酮等。尤为突出的是,风味蛋白酶和 α -淀粉酶复配进行酶解处理的烟叶组,其各组香气成分含量较协调,与仅经过发酵处理的烟叶相比,表现出明显差异。这表明,酶解处理不仅通过增加挥发性物质的数量改善了风味,而且复配酶的使用能够通过协同作用产生更均衡的香气成分,有助于提升烟叶的整体风味特征。进一步地,对经过不同酶制剂酶解处理后发酵的烟叶制成的卷烟进行感官质量评价,结果显示,外源酶制剂的添加确实对烟叶的感官品质有提升作用,使得烟叶的香吸味更佳。特别值得注意的是,风味蛋白酶和 α -淀粉酶复配发酵的烟叶,在各项感官指标上得分较高,深受消费者喜爱。酶解处理能够有效提升烟叶的香气、口感及吸味等感官属性,为烟叶的

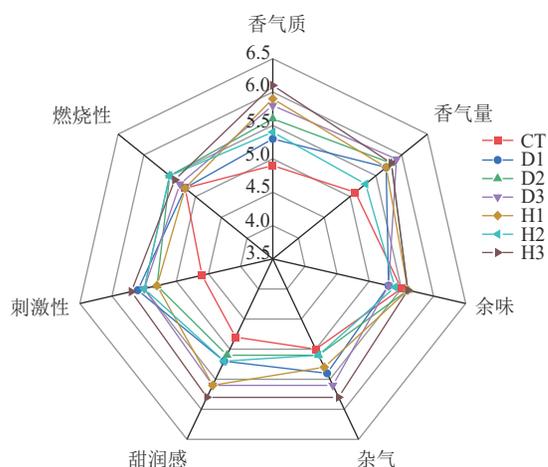


图4 不同酶处理烟叶感官评价得分图

Fig. 4 Sensory evaluation score chart of tobacco treated with different enzymes

品质提升提供了新的技术路径。通过优化酶解条件,尤其是酶制剂的选择和浓度控制,有望在实际生产中进一步提高烟叶的感官质量。因此,综合分析后得出,利用 $70\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ 风味蛋白酶和 $50\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ α -淀粉酶进行复配,对烟叶进行酶解处理,可以使烟叶的化学成分更协调,香气成分更充足,并提升感官指标,从而更好地满足人们的需求。然而,值得注意的是,由于酶活性受到时间、温度、pH等多方面因素的影响,如何在实际应用中充分发挥酶制剂在烟叶处理中的最佳效果,尚需进一步研究。此外,发酵菌株的选择和发酵条件的优化也是需要考

参 考 文 献

- [1] 郝捷,李选文,张宝,等.纤维素酶在烟草中的应用进展[J].生物技术进展,2023,13(2):166-173.
HAO J, LI X W, ZHANG B, *et al.*. Application progress of cellulase in tobacco[J]. Curr. Biotechnol., 2023, 13(2): 166-173.
- [2] 褚继登,顾毓敏,蔡宪杰等.文山初烤烟叶主要理化指标与感官呼吸质量的关系分析[J].东北农业科学,2022,47(2):150-155.
CHU J, GU Y M, CAI X J, *et al.*. Analysis on the relationship between main physical and chemical indexes and sensory smoking quality of primary flue-cured tobacco in wenshan[J]. J. Northeast Agric. Sci., 2022, 47(2): 50-155.
- [3] 蔡宪杰,刘茂林,谢德平,等.提高上部烟叶工业可用性技术研究[J].烟草科技,2010,43(6):10-17.
CAI X J, LIU M L, XIE D P, *et al.*. Study on improving usability of upper flue-cured tobacco leaves[J]. Tob. Sci. Technol., 2010, 43(6): 10-17.
- [4] 孙福艳,杨雪鹏,杨成,等.烟草增香生物技术研究进展[J].云南化工,2023,50(2):9-14.
SUN F Y, YANG X P, YANG C, *et al.*. Research progress of tobacco aroma enhancing biotechnology[J]. Yunnan Chem. Technol., 2023, 50(2): 9-14.
- [5] 赵铭钦,李芳芳.微生物和酶学技术在烟草发酵中的应用及展望[J].中国农学通报,2007,23(1):314-318.
ZHAO M Q, LI F F. The application and prospect of the technology of microbe and enzyme during tobacco leaf fermentation[J]. Chin. Agric. Sci. Bull., 2007, 23(1): 314-318.
- [6] 帅瑶,陶茜,田运霞,等.复合菌种发酵烟叶产酶及挥发性风味物质变化[J].河南农业科学,2020,49(10):162-175.
SHUAI Y, TAO H, TIAN Y X, *et al.*. Changes of enzyme production and volatile flavor compounds in tobacco leaves fermented by mixed starter[J]. J. Henan Agric. Sci., 2020, 49(10): 162-175.
- [7] 郝捷,季婧,李力群,等.生物酶和微生物技术改善烟叶香气的研究进展[J].生物技术进展,2022,12(6):817-824.
HAO J, JI Q, LI L Q, *et al.*. Research progress on improving aroma of tobacco leaf with bio-enzymes and microorganism technology[J]. Curr. Biotechnol., 2022, 12(6): 817-824.
- [8] 蔡文,吴鑫颖,张倩颖等.高斯芽孢杆菌产中性蛋白酶条件优化及其对烟叶发酵的影响[J].食品与发酵科技,2022,58(3):92-98,118.
CAI W, WU X Y, ZHANG Q Y, *et al.*. Optimization of neutral protease production by *Bacillus kochii* and its effect on fermentation of tobacco leaf[J]. Food Ferment. Sci. Technol., 2022, 58(3): 92-98, 118.
- [9] 刘方玉,高强,付沙,等.雪茄烟叶发酵工艺及其微生物技术研究进展[J].安徽农业科学,2023,51(14):18-21,24.
LIU F Y, GAO Q, FU S, *et al.*. Research progress on fermentation technology and microbial technology of cigar tobacco leaves[J]. J. Anhui Agric. Sci., 2023, 51(14): 18-21, 24.
- [10] 肖明礼,杨庆,林锐峰,等.风味蛋白酶提升烟叶抽吸品质的研究[J].浙江农业学报,2014,26(1):181-185.
XIAO M L, YANG Q, LIN R F, *et al.*. Research on flavour protease to enhance smoking quality of tobacco[J]. Acta Agri. Zhejiangensis, 2014, 26(1): 181-185.
- [11] 孙伟峰,周志磊,殷春燕,等.酶解细胞壁对低等级烟叶品质的改良作用[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(7):70-76.
SUN W F, ZHOU Z L, YIN C Y, *et al.*. Enzymatic degradation of cell wall substances to improve quality of low-grade tobacco[J]. J. Northwest A F Univ. Nat. Sci. Ed., 2014, 42(7): 70-76.
- [12] 琚绍焰,时向东,王骏,等.外源复合酶制剂对发酵后茄芯烟叶品质的影响[J].山东农业科学,2023,55(6):69-76.
JU S X, SHI X D, WANG J, *et al.*. Effect of exogenous complex enzyme preparation on quality of filler tobacco leaves after fermentation[J]. Shandong Agric. Sci., 2023, 55(6): 69-76.
- [13] 郑勤安.造纸法再造烟叶生产过程中微生物增质剂的应用研究[J].浙江工业大学学报,2004,32(4):442-446+458.
ZHENG Q A. Study of the application of microorganism quality-Enhancer in manufacturing tobacco slice by papermaking process[J]. J. Zhejiang Univ. Technol., 2004, 32(4): 442-446+458.
- [14] 肖琳,苟中军,邹滢,等.酶解与发酵工艺改善黄油风味的研究[J].食品与发酵科技,2023,59(5):71-75+103.
XIAO L, GOU Z J, ZOU Y, *et al.*. Study on the application of enzymatic hydrolysis and fermentation technology in improving the flavor of butter[J]. Food Ferment. Sci. Technol., 2023, 59(5): 71-75+103.
- [15] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品试样的制备和水分测定烘箱法:YC/T 31—1996[S].北京:中国标准出版社,1996.
- [16] 王瑞新.烟草化学品质分析法[M].郑州:河南科学技术出版社,1990.
- [17] 王瑞新.烟草化学[M].北京:中国农业出版社,2003.
- [18] 朱春晖,索卫国,黄卫东,等.烟草及烟草制品中总氮测定方法研究进展[J].农业与技术,2020,40(2):16-18.
ZHU C H, SUO W G, HUANG W D, *et al.*. Research progress on determination methods of total nitrogen in tobacco and tobacco products[J]. Agric. Technol., 2020, 40(2): 16-18.
- [19] 倪伟,陈开波,徐志强等.使用GC/MS和GC-O鉴定皖南烟叶主要呈香组分[J].食品与生物技术学报,2019,38(6):137-143.
NI W, CHEN K B, XU Z Q, *et al.*. Identification of main aroma compounds in tobacco leaves from southern anhui using GC/MS and GC-O[J]. J. Food Sci. Biotechnol., 2019, 38(6): 137-143.
- [20] 包勤,张艳玲,王爱国,等.2002—2013年间我国烤烟主要化

- 学成分变化趋势及原因分析[J]. 烟草科技, 2015, 48(7): 14-19.
BAO Q, ZHANG Y L, WANG A G, *et al.*. Variation of main chemical components in flue-cured tobacco leaves in China during 2002-2013 and causal analysis[J]. *Tob. Sci. Technol.*, 2015, 48(7): 14-19.
- [21] 樊文举, 高娟娟, 张建新. 外源酶制剂对烤烟烟叶化学品质的影响[J]. 福建农业学报, 2017, 32(6): 652-659.
FAN W J, GAO J J, ZHANG J X. Effect of enzyme treatment on chemical quality of flue-cured tobacco leaves[J]. *Fujian J. Agric. Sci.*, 2017, 32(6): 652-659.
- [22] 许春平, 杨琛琛, 王铮等. 复合生物酶液处理低次烟叶制备烟用香料[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版), 2014, 29(2): 23-26.
XU C P, YANG C C, WANG Z, *et al.*. The preparation of tobacco flavor from discarded tobacco leaf by multi-bioenzyme[J]. *J. Zhengzhou Univ. Light Ind. Nat. Sci. Edit.*, 2014, 29(2): 23-26.
- [23] 黄贺敏, 吴丽香, 邓梅忠, 等. 不同品质烟叶微生物群落与其挥发性成分的关联研究[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(12): 85-95.
HUANG H M, WU L X, DENG M Z, *et al.*. Study on the correlation between microbial communities and volatile aroma compounds in tobacco leaves of different qualities[J]. *J. Food Sci. Biotechnol.*, 2022, 41(12): 85-95.
- [24] 胡婉蓉, 蔡文, 郑召君, 等. 发酵介质和发酵过程对雪茄烟叶品质的影响[J]. 烟草科技, 2023, 56(2): 41-52.
HU W R, CAI W, ZHENG Z J, *et al.*. Effects of fermentation media and processes on cigar tobacco quality[J]. *Tob. Sci. Technol.*, 2023, 56(2): 41-52.
- [25] 张锐新, 苏谦, 杨昌鹤, 等. 堆积发酵时间对五指山茄衣烟叶品质的影响[J]. 山东农业科学, 2020, 52(4): 57-61.
ZHANG R X, SU Q, YANG C H, *et al.*. Effect of stacking fermentation time on quality of Wuzhishan cigar wrapper tobacco leaves[J]. *Shandong Agric. Sci.*, 2020, 52(4): 57-61.
- [26] 陈德鑫, 许家来, 马志远, 等. 一株新的具有高效降低烟碱含量的短小芽孢杆菌 MK21 的分离筛选及作用研究[J]. 中国烟草学报, 2013, 19(1): 60-64.
CHEN D X, XU J L, MA Z Y, *et al.*. Isolation and screening of a new *Brevibacillus brevis* strain MK21 with high nicotine degradation effect[J]. *Acta Tabac. Sin.*, 2013, 19(1): 60-64.
- [27] 时向东, 王旭锋, 林开创, 等. 雪茄外包皮烟堆积发酵中主要中性香气物质的变化[J]. 西北农业学报, 2013, 22(7): 114-119.
SHI X D, WANG X F, LIN K C, *et al.*. Changes of aroma substances in cigar wrapper tobacco leaves during the stacking fermentation[J]. *Acta Agric. Boreali Occidentalis Sin.*, 2013, 22(7): 114-119.
- [28] 方嵩, 韩磊, 马刚. 3-氧代- α -紫罗兰醇的合成研究[J]. 广州化工, 2013, 41(10): 115-117.
FANG S, HAN L, MA G. Study of 3-oxo- α -ionol synthesis[J]. *Guangzhou Chem. Ind.*, 2013, 41(10): 115-117.
- [29] 张希, 邓宝安, 张凤侠, 等. 不同产区烤烟烟叶中性致香物质的对比分析[J]. 轻工科技, 2023, 39(4): 31-34, 41.
ZHANG X, DENG B A, ZHANG F X, *et al.*. Comparative analysis of neutral volatile compounds in flue-cured tobacco leaves from different regions of production[J]. *Light Ind. Sci. Technol.*, 2023, 39(4), 31-34, 41.
- [30] 李佳颖, 马君红, 李志鹏, 等. 烤烟茄酮含量与化学成分和感官质量的关系[J]. 河南农业科学, 2016, 45(12): 34-39.
LI J Y, MA J H, LI Z P, *et al.*. Relationship between solanone content and chemical constituent, sensory quality of flue-cured tobacco[J]. *J. Henan Agric. Sci.*, 2016, 45(12): 34-39.
- [31] SLAGHENAUFI D, M-CPERELLO, MARCHAND S, *et al.*. Quantification of megastigmatrienone, a potential contributor to tobacco aroma in spirits[J]. *Food Chem.*, 2016, 203: 41-48.
- [32] 李红涛, 赵志伟, 王勇, 等. 烟用香精 3-甲基戊酸薄荷酯的合成及分析[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(28): 11509-11511.
LI H T, ZHAO Z W, WANG Y, *et al.*. Synthesis and analysis of cigarette pennyroyal essence menthyl (3-methyl) pentanoate[J]. *J. Anhui Agric. Sci.*, 2013, 41(28): 11509-11511.