

烟叶蛋白高效降解菌的筛选鉴定及其作用效果研究

The study on isolation, screening, identification and application effect
of an efficient protein derading bacteria in flue-cured tobacco

杨宗灿¹ 冯颖杰¹ 刘超¹ 王鹏飞¹ 张展¹

YANG Zong-can¹ FENG Ying-jie¹ LIU Chao¹ WANG Peng-fei¹ ZHANG Zhan¹

张耀广² 杨永锋¹ 李家美² 刘向真¹ 王红霞¹

ZHANG Yao-guang² YANG Yong-feng¹ LI Jia-mei² LIU Xiang-zhen¹ WANG Hong-xia¹

(1. 河南中烟工业有限责任公司技术中心, 河南 郑州 450000; 2. 河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州 450000)

(1. Technology Center, China Tobacco Henan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou, Henan 450000, China;

2. College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

摘要:为有效降解烟叶中的蛋白质,改善烟叶的吸食品质,从河南、福建、云南 3 省的复烤烟叶表面筛选出 18 株具有降解蛋白质能力的菌株;通过测定菌株所产蛋白酶活性,筛选蛋白质高效降解菌株并进行 16S rDNA 测序,结合生理生化试验对其进行鉴定;进一步采用正交试验优化菌株在烟叶中的发酵条件,考察处理后烟叶的感官质量改善效果。结果表明:① HN-3 为优选菌株,最大酶活达 3 417 U/mL;② 16S rDNA 和生理生化试验证明,HN-3 为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*);③ 根据正交试验结果,将培养后的 HN-3 菌液按照 3% 的烟叶质量比例施加于抽梗后的烟叶表面,在温度为 37 ℃ 的条件下发酵 84 h 后,烟叶中蛋白质降解率可达 29.66%;④ 评吸结果显示,发酵后的烟叶香气质变好,香气量、烟气浓度有所提高,杂气减少,余味有所改善,烟叶整体感官质量得到明显提升。

关键词:烟叶;蛋白质;短小芽孢杆菌;蛋白酶;发酵

Abstract: In order to degrade protein of tobacco and improve the smoking quality of tobacco, 18 protein degrading bacteria from flue-cured tobacco of Henan, Fujian, Yunnan province were isolated through protein degrading selective medium. The activity of protease was detected, and the strain with highest protease-producing was identified by the 16S rRNA gene sequence and physiological-biochemical tests. Orthogonal experiment was further designed to get the optimal fermentation conditions of protein degrading in the tobacco leaf. And then the sensory quality of tobacco leaves after treatment was

investigated. The results showed that: (1) Strain HN-3 was the preferred strain with the highest activity of protease enzyme producing (3 417 U/mL). (2) Strain HN-3 was identified as *Bacillus pumilus* by the 16S rRNA gene sequence and physiological-biochemical tests. (3) The orthogonal experiment results suggested that, by adding 3% culture medium (with strain HN-3) to the surface of tobacco leaf, the degrading rates of protein could reach 29.66% after 84 hours fermentation under the 37 ℃. (4) The sensory evaluation results showed that after fermentation, the aroma of tobacco leaves was changed well. The amount of aroma and smoke increased, while the gas content decreased, the aftertaste improved, and the overall sensory quality of tobacco was improved obviously.

Keywords: tobacco; protein; *Bacillus pumilus*; protease; fermentation

蛋白质是烟叶中主要的含氮化合物^[1],其含量对烟叶的吸食品质影响较大,对烟气饱满和烟香的丰富性具有重要作用。但是,蛋白质含量过高会导致烟叶在燃吸时产生似燃烧羽毛的臭味,并产生辛辣、苦涩感^[2]。同时,蛋白质还是烟叶中许多有害成分的前体物质^[3-5]。一般来说,优质烤烟的蛋白质含量在 7%~11%^[6],而目前中国国产烤烟蛋白质含量普遍较高,尤其是河南产区的烟叶。因此有效降低烟叶蛋白质,使其维持在合理范围,是提高烟叶品质的重要途径。

蛋白质属于大分子化合物,在自然陈化条件下降解缓慢,通过生物技术加速降解烟叶蛋白具有重要意义。目前的研究^[7-8]主要集中在酶法降解和微生物发酵降解,前者具有降解时间短、降解效率高的优势,但蛋白酶成本较高,导致其难以在工业中大规模的应用;而后者以成本低廉和工艺简单成为了当前的研究热点。李梅云等^[9]将微球菌属或杆菌属的细菌在浓度为 10⁷ CFU/mL 时处理 K326 片烟,蛋白质降

基金项目:河南中烟科技创新项目(编号:ZW2014035)

作者简介:杨宗灿,男,河南中烟工业有限责任公司工程师,硕士。

通信作者:王红霞(1971—),女,河南中烟工业有限责任公司工程师,本科。E-mail: 654908756@qq.com

收稿日期:2017—08—16

解率最高时为 24.46%；马玲玲^[10]从烟叶表面筛选出一株枯草芽孢杆菌，喷施于烟叶表面，蛋白质降低了 20.00%。但目前为止，利用微生物发酵法降解烟叶蛋白依然存在蛋白酶活性不高，蛋白降解率偏低等问题，难以在工业生产中推广应用。

为获得能够高效降解烟叶蛋白质的菌株，提高烟叶品质，本研究从不同年份、不同等级复烤烟叶表面筛选出一株蛋白酶高产菌株，并对其进行鉴定及应用效果探索，以期为高蛋白含量烟叶在卷烟中的应用提供新的选择。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 烟叶

用于菌株筛选的烟叶：采自河南（许昌和三门峡）、福建（三明和南平）以及云南（楚雄和临沧）6 个产地，3 个年份（2011~2013 年）的复烤烟叶，共计 18 份；

供试烟叶（作用效果考察用）：河南许昌 C3F。

1.1.2 主要试剂

酪素、牛血清白蛋白：分析纯，美国 Fluka 公司；
马铃薯、玉米浆、豆粕：市售；
其他试剂：分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

营养琼脂(NA)培养基：胰蛋白胨 10 g，牛肉膏 3 g，氯化钠 5 g，去离子水定容至 1 000 mL，pH 7.0，固体培养基加 15 g 琼脂粉，121 ℃灭菌 20 min，用于细菌的分离与培养；

YEPD 培养基：酵母膏 10 g，蛋白胨 20 g，葡萄糖 20 g，去离子水定容至 1 000 mL，pH 7.0，固体培养基加入 15 g 琼脂粉，121 ℃灭菌 20 min，用于酵母的分离和培养；

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基：马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂粉 12 g，去离子水定容至 1 000 mL，固体培养基加 15 g 琼脂粉，121 ℃灭菌 20 min，用于烟叶表面真菌的分离与筛选；

初筛培养基：KH₂PO₄ 0.36 g，MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g，ZnCl₂ 0.014 g，Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.07 g，NaCl 0.16 g，CaCl₂ · H₂O 0.002 g，FeSO₄ · 7H₂O 0.002 g，脱脂奶粉 10.0 g，琼脂 15 g，去离子水定容至 1 000 mL，pH 7.0，121 ℃灭菌 20 min；

复筛培养基：玉米浆 15.0 g，豆粕 15 g，蛋白胨 1.0 g，NH₄Cl 5.0 g，KH₂PO₄ 1.0 g，Na₂HPO₄ 5.0 g，MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g，MnSO₄ 0.1 g，pH 7.0，去离子水定容至 1 000 mL，121 ℃灭菌 20 min。

1.1.4 主要仪器

分光光度计：WFJ2100 型，尤尼柯(上海)仪器有限公司；
冷冻离心机：Sigma2-16K 型，德国 Sigma 公司；
PCR 仪：Mastercycler nexus X 型，德国 Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 烟叶中微生物的初步分离 称取 0.5 g 烟叶粉末，加入含有 4.5 mL 无菌水的 10 mL 灭菌试管中，于摇床 200 r/min 水平震荡 15 min，然后竖直静置 5 min。用移液枪吸取上清菌悬液 1 mL 于含有 9 mL 无菌水的灭菌 10 mL 试

管中，依次稀释为 10⁻² 和 10⁻³ 的菌悬液；分别吸取 10⁻²、10⁻³ 稀释度的菌悬液 100 μL，涂布于 NA 和 PDA 培养基平板，分别于 37，28 ℃培养过夜。

观察菌落大小、形态特征，对不同菌落进行编号，记录菌落特征及长势。

1.2.2 产蛋白质降解菌筛选 将上述分离获得的细菌、真菌依次接种到蛋白质降解菌选择培养基上，细菌在 37 ℃培养，真菌在 30 ℃培养。观察并计算透明圈直径与菌落直径的比值和透明圈明显程度，通过统计学分析选择出酶活较高的菌株。

将能够在蛋白质降解菌选择培养基上产生透明圈的菌株，按菌株种类的不同接种到 NA 或 YEPD 培养基，37 ℃或 30 ℃下 150 r/min 震荡培养 12 h，按照 2% 的接种量接入 50 mL 产蛋白酶发酵培养基的锥形瓶中，37 ℃下 150 r/min 发酵 48 h。取发酵液于 3 500 r/min 离心 10 min 后取上清液，测酶活。

1.2.3 蛋白质降解菌的蛋白酶活性测定 采用福林酚法^[11]，以 2% 的酪蛋白溶液为底物。

1.2.4 烟叶蛋白含量的测定 采用 Brad-Ford 法^[12]，以牛血清白蛋白为标准。

1.2.5 蛋白质降解菌的 16S rDNA 分析 菌株总 DNA 的提取，采用改良的 SDS 方法进行提取。PCR 扩增采用通用引物，得到的 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测合格后送至上海铂尚生物技术有限公司进行测序，测序结果在 NCBI 数据库中利用 BLAST 进行序列分析。

下载同源性较高菌株的 16S rDNA 序列，与测得序列通过 DNAMAN 软件进行序列比对分析。

1.2.6 烟叶中蛋白质降解菌的形态学与理化鉴定 在 NA 固体培养基上，37 ℃培养 48 h 后，观察菌落外部形态特征；使用显微镜油镜观察细菌形态^[13]。

参照文献^[14]对蛋白酶产生菌 HN-3 进行革兰氏染色、接触酶反应、V-P 反应、酪素水解反应等试验。

1.2.7 菌株降解烟叶蛋白质的应用 将保藏的 HN-3 菌株转接到 NA 培养基内，于 37 ℃、150 r/min 震荡培养 24 h，至菌悬液 OD 值为 2.0 时，3 600 r/min 离心 10 min，弃上清，加入等体积的无菌生理盐水，得到种子液。

取 100 g 许昌复烤烟叶，选择发酵时间、施加菌液量、发酵温度为影响因素，通过单因素试验确定了各因素的水平范围，并设计三因素三水平正交试验，优化菌株有效降解烟叶蛋白质的适宜条件^[15]。正交试验因素和水平见表 1。

将烟叶切丝，制成烟支规格(20+64) mm×24.5 mm 的

表 1 菌株降解烟叶蛋白的正交试验因素和水平 L₉(3³)

Table 1 Factors and levels of strain degrading tobacco protein orthogonal text L ₉ (3 ³)			
水平	A 发酵时间/h	B 施加菌液量/%	C 发酵温度/℃
1	60	1	35
2	72	3	37
3	84	5	40

烟支样品,在 22 ℃、相对湿度 60%的恒温恒湿箱中平衡 48 h 后待评。由 11 名专业评吸员按 9 分制打分,汇总结果去除最高分和最低分后取平均值。

2 结果与分析

2.1 蛋白质降解菌的初筛

从不同类型复烤烟叶样品中,经菌落大小、颜色、形态分析,共分离获得细菌 123 株,真菌 9 株。这些细菌、真菌经蛋白质降解菌选择培养基筛选,获得能够产生透明圈的菌株 18 株。

18 株菌株在蛋白质降解菌选择培养基上生长 48、72 h 之后产生的透明圈分别见图 1、2。

进一步测定 18 株菌株在蛋白质降解菌选择培养基上生长 48、72 h 之后透明圈/菌落直径比值的平均值,并通过均值方差分析法分析差异显著性,结果见表 2。

方差分析结果表明,48 h 和 72 h 的透明圈菌落直径比



图 1 蛋白降解选择培养基 48 h 透明圈

Figure 1 Transparent circle of protein degrading selective medium(48 h)

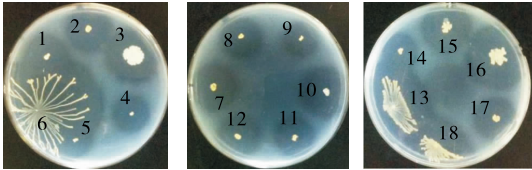


图 2 蛋白降解选择培养基 72 h 透明圈

Figure 2 Transparent circle of protein degrading selective medium(72 h)

表 2 蛋白质降解选择培养基上 48、72 h 透明圈/菌落直径比值[†]

Table 2 Rate of transparent circle to strain colony diameter of protein degrading selective medium(48 h and 72 h)

菌株	标记序号	48 h				72 h			
		平行 1	平行 2	均值	分组	平行 1	平行 2	均值	分组
HN-3	10	15.4	15.0	15.2	A	15.3	15.5	15.4	A
YN-6	7	11.1	11.8	11.4	B	11.8	12.1	12.0	B
YN-10	8	10.9	11.3	11.1	B	9.3	9.7	9.5	C
HN-4	12	10.6	9.9	10.2	B C	10.1	10.8	10.5	C
FJ-12	2	9.0	9.3	9.2	C D	6.3	6.5	6.4	D E F
HN-8	5	9.0	8.7	8.9	C D E	6.8	7.0	6.9	D E F
HN-9	11	8.8	8.8	8.8	D E F	7.1	7.2	7.2	D E F
YN-11	9	8.7	8.3	8.5	D E F G	7.0	6.7	6.9	D E F
FJ-5	17	8.0	7.7	7.9	D E F G H	7.0	7.7	7.3	D E
FJ-7	16	7.4	7.7	7.6	E F G H	6.3	6.0	6.2	E F G
YN-17	15	7.7	7.1	7.4	F G H	6.1	5.8	6.0	F G
FJ-14	14	7.3	6.9	7.1	G H I	6.6	6.7	6.7	D E F
FJ-2	1	6.6	6.9	6.8	H I	7.7	7.2	7.5	D
HN-1	5	6.0	5.8	5.9	I	7.7	7.3	7.5	D
HN-15	3	4.6	4.2	4.4	J	5.0	5.2	5.1	G
YN-16	6	3.4	3.7	3.6	J	3.3	3.0	3.2	H
YN-13	13	*	*	*		*	*	*	
FJ-18	18	*	*	*		*	*	*	

[†] 99% 整体置信区间,分组中不共享字母的均值之间具有显著差异;* 表示由于该菌落形态极不规则,无法计算直径,或长度无法计算,或透明圈与菌落直径比值无法计算。

中,HN-3、YN-6 和 YN-10 的比值较大,差异性分组均不共享字母,差异性显著。HN-4 的 48 h 比值差异不显著,考虑到 72 h 的结果差异显著以及透明圈较大,列为待考察菌株。YN-13 和 FJ-18 菌落形态不规则,但实际观察中透明圈较大,因此同样列为待考察菌株。

2.2 烟叶中蛋白质降解菌的复筛

将 6 个菌株接种于产蛋白酶培养基上,30 ℃下 150 r/min

振荡培养 48 h 后,经测定 OD_{600} 并计算,结果见图 3。其中,HN-3 具有最高的蛋白酶活力(3 417 U/mL),因此选择为试验菌株,应用于烟叶蛋白的降解。

2.3 菌株的 16S rDNA 序列测定

采用 16S rDNA 基因片段通用引物 FP/RP,对 HN-3 进行 PCR 扩增以及克隆测序,获得一条 1 422 bp 的片段,将测序结果与 NCBI 数据库中的基因序列进行比对,发现 HN-3

与短小芽孢杆菌的同源性高达 100%，确定 HN-3 是短小芽孢杆菌。使用 DNAMAN 软件,选取同源性较高的 7 种模式细菌菌株,进行系统进化分析,显示 HN-3 与短小芽孢杆菌的亲缘关系最近(图 4)。

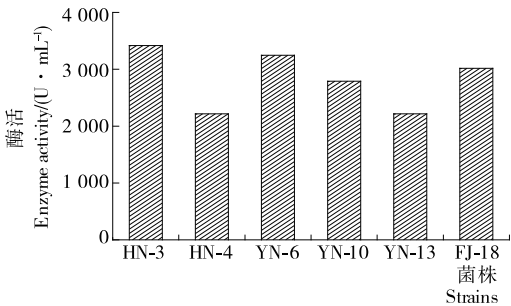


图 3 复筛菌株蛋白酶活性

Table 3 Protease activity of rescreening strains

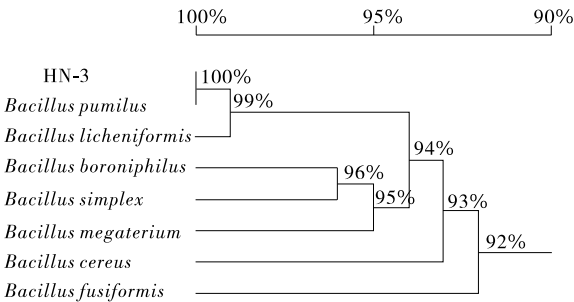


图 4 HN-3 的系统发育进化树

Figure 4 The phylogenetic tree of strain HN-3

2.4 HN-3 的形态学观察

在 37 ℃ 培养 48 h 后,HN-3 菌落呈白色至淡黄色,表面无光泽,不透明,表面不平整,凸起,菌落近圆形或不规则,菌落边缘不规则,在蛋白质降解菌选择培养基上生长速度较快。菌株个体 0.6~0.7 μm×2.0~3.0 μm,呈杆状(图 5),很少呈链状,芽孢椭圆形。

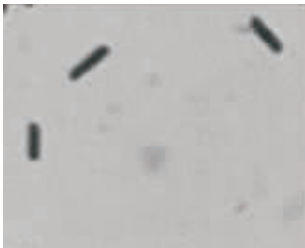


图 5 HN-3 菌体形态图

Figure 5 The morphological character of strain HN-3(1 600×)

2.5 HN-3 的理化鉴定

HN-3 经试验分析,发现该菌革兰氏染色呈阳性,甲基红反应呈阴性,接触酶反应呈阳性,V-P 测验呈阳性,产酸反应呈阳性,在 7% NaCl 中不能生长,酪素水解反应呈阳性,淀粉水解反应呈阳性,硝酸盐还原试验呈阴性,最低生长温度 10 ℃,最高生长温度 50 ℃(表 3)。参考《伯杰细菌鉴定手册》^[16],确定 HN-3 为短小芽孢杆菌。

表 3 HN-3 的部分生理生化特性

Table 3 Physiological biochemical characters of strain 3

试验项目	试验结果	试验项目	试验结果
革兰氏染色反应	+	柠檬酸盐反应	+
甲基红反应	—	产酸	+
V-P 测定	+	硝酸盐还原	—
接触酶反应	+	生长温度 5 ℃	—
酪素水解	+	生长温度 10 ℃	+
淀粉水解	+	生长温度 50 ℃	+
7% NaCl	—	生长温度 55 ℃	—

2.6 HN-3 降解烟叶中蛋白质的效果

测得对照烟叶的蛋白质含量为 112.47 mg/g。由表 4 可知,最优水平组合为 A₃B₁C₂,即时间为 84 h、菌液施加比例为 3%、发酵温度为 37 ℃;菌液施加比例对整个作用条件的影响最大,其次是发酵温度,而发酵时间的影响最小。

表 4 HN-3 降解烟叶蛋白的正交试验分析

Table 4 Orthogonal text result of strain HN-3 degrading tobacco protein

处理	A	B	C	蛋白质含量/(mg · g ⁻¹)
1	1	1	1	102.73
2	1	2	2	106.10
3	1	3	3	83.91
4	2	1	2	81.19
5	2	2	3	107.06
6	2	3	1	101.23
7	3	1	3	90.77
8	3	2	1	101.33
9	3	3	2	93.39
k ₁	97.58	91.56	101.76	
k ₂	96.49	104.83	93.56	
k ₃	95.16	92.84	93.91	
R	2.42	13.27	8.20	

由于最优化组合 A₃B₁C₂并不在 9 组正交处理方案中,因此对优化处理方案进行了验证实验。结果表明,将菌液按照 3%的烟叶质量比例施加于抽梗后的烟叶表面,在温度为 37 ℃的条件下发酵 84 h 后,烟叶中蛋白质降解率可达最高值(29.66%)。

2.7 HN-3 处理烟叶后感官评吸效果

进一步对菌液处理前后的烟叶进行感官质量评价,结果见表 5。

由表 5 可知,烟叶经过菌液处理后,香气质变好,香气量、烟气浓度有所提高,杂气减少,余味有所改善,与对照相比,总得分提高 1.13 分,烟叶整体感官质量得到明显提升。

表 5 菌液处理烟叶后感官质量评价结果[†]

Table 5 Evaluation of sensory quality after treatment of tobacco leaves with bacterial fluid								
样品	香气质 A	香气量 B	浓度 C	柔细度 D	余味 E	杂气 F	刺激性 G	总分 T
发酵后	5.89	5.86	5.89	6.27	5.79	5.77	6.23	59.92
CK	5.78	5.77	5.75	6.16	5.67	5.68	6.09	58.79

[†] $T=(A+B)\times 2.3+C\times 1.5+D+E+F+G$ 。

3 结论

本研究从不同类型复烤烟叶样品中分离出 18 株蛋白质降解菌株,观察其在蛋白质降解菌选择培养基上生长 48 h 和 72 h 降解蛋白质的情况可知,HN-3、HN-4、YN-6、YN-10、YN-13、FJ-18 降解蛋白的能力较强。进一步测定菌株蛋白酶活力表明,6 种菌株的蛋白酶活性分别为 3 417,2 217,3 246,2 789,2 217,3 017 U/mL,蛋白酶活力最高的菌株是在蛋白质降解菌选择培养基上生长快且透明圈与菌落直径比值较大的 HN-3。

通过 16Sr DNA 测序,HN-3 与短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)的同源性高达 100%,亲缘关系最近,结合形态学与理化特性,参考《伯杰细菌鉴定手册》,确定 HN-3 为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。在之前的研究中,黄静文等^[17]从烤烟表面分离到 1 株短小芽孢杆菌 Van35,将其制成菌液施用于卷烟烟丝,22 ℃于 60%恒温恒湿箱发酵 20 d,结果表明,烟叶纤维素含量、总氮均明显降低,短小芽孢杆菌处理后的烟叶,烟香、细腻醇均明显提升,烟叶刺激性、杂气均明显下降,但未报道短小芽孢杆菌 Van35 是否具有降解烟叶中蛋白质的功能。本研究将由 HN-3 制成的菌液喷施于烟叶表面,烟叶中蛋白质降解率可达 29.66%,证明短小芽孢杆菌 HN-3 能有效降解烟叶中的蛋白质,且能显著改善烟叶的整体感官质量。综合之前研究可推测短小芽孢杆菌可有效降解烟叶中蛋白质、纤维素等大分子物质,减少这些大分子物质在烟叶燃吸时产生的刺激气体等,从而有效改善烟叶的吸食品质,相关结果有待进一步验证。

参考文献

[1] 谢建平. 烟草与烟气化学成分[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 7-8.
[2] 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.
[3] 胥海东, 王永泽, 王金华. 津巴布韦烟叶中淀粉酶和蛋白酶产生菌的分离及鉴定[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(4): 536-539.
[4] 冯志珍, 陈太春, 胡喜怀, 等. 烟叶表面高效降解蛋白质芽孢杆菌的分离筛选及其鉴定[J]. 中国烟草学报, 2012, 18(1): 101-105.
[5] 阮祥稳, 任平陈, 卫锋. 酶对烟叶发酵内在品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(1): 67-68.
[6] 谢会雅, 朱列书, 刘艳丽, 等. 利用酶制剂降解烤烟烟叶中淀粉和蛋白质的研究[J]. 中国烟草科学, 2008, 29(6): 23-26.
[7] 丁冉, 马宇平, 周浩, 等. 烟草中蛋白质研究概述[J]. 广州化工, 2014, 42(5): 5-8, 26.
[8] 陶文沂. 中国食品工业发展及新技术的应用[J]. 食品与机械, 2006, 22(4): 3-9.
[9] 李梅云, 高家合, 王革, 等. 微生物对烟叶蛋白质含量的影响[J]. 生物技术通报, 2006(S1): 376-380.
[10] 马玲玲. 同时高效降解烟叶中淀粉和蛋白质菌株的分离鉴定及其对烟叶理化成分的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
[11] 陈兴, 汪显国, 曾晓鹰, 等. 蛋白降解菌的筛选及其在烟叶中的作用效果研究[J]. 江西农业学报, 2015, 27(6): 90-91.
[12] 卫春会, 黄治国, 黄丹, 等. 高温大曲高产蛋白酶菌株的分离鉴定及其产酶性能研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(4): 24-29.
[13] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 162-163.
[14] 陈瑾, 邵冰洁, 朱晓昊, 等. 糯米炸糕中发酵细菌鉴定与优势菌株筛选[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 33-36, 91.
[15] 朱大恒, 李彩霞. 烟气有害成分与烟叶化学成分的关系[J]. 烟草科技, 1999(4): 25-27.
[16] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 274-442.
[17] 黄静文, 段焰青, 者为, 等. 短小芽孢杆菌改善烟叶品质的研究[J]. 烟草科技, 2010(8): 61-64.

(上接第 22 页)

[11] 姜启兴. 鲮鱼肉热加工特性及其机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2015.
[12] 孙丽, 夏文水. 蒸煮对金枪鱼肉及其蛋白质热变性的影响[J]. 食品与机械, 2010, 26(1): 22-25.
[13] 章建浩, 朱健辉, 王思凡, 等. 金华火腿工艺过程蛋白质水解及其相关性研究[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 173-177.
[14] KONG Fan-bin, TANG Ju-ming, RASCO B, et al. Kinetics of salmon quality changes during thermal processing[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 83(4): 510-520.
[15] 戚巍威, 徐为民, 徐幸莲, 等. 传统风鸭加工过程中非蛋白氮和

游离氨基酸的变化[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(2): 190-193.
[16] 常亚楠. 煮制条件对卤鸡腿蛋白降解影响的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014: 37-42.
[17] 张平, 杨勇, 曹春廷, 等. 食盐用量对四川腊肉加工及贮藏过程中肌肉蛋白质降解的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(23): 67-72.
[18] JIRAPORN Runglerdkriangkrai, KRIANGSAK Balue, NON-GNUCH Raksakulthai. Quality of fish ball from surimi as affected by starch and sterilizing conditions[J]. Kasetsart University Fisheries Research Bulletin, 2008, 32(1): 39-47.
[19] TORNERBERG E. Effects of heat on meat proteins-Implications on structure and quality of meat products[J]. Meat Science, 2005, 70(3): 493.