

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.02.007

烟草中淀粉降解菌的筛选、鉴定及发酵工艺优化

Screening, identification and fermentation process optimization of starch degrading bacteria in tobacco

张晓瑞¹ 刘晓晖² 付博¹ 杨宗灿³ 时向东¹

ZHANG Xiao-rui¹ LIU Xiao-hui² FU Bo¹ YANG Zong-can³ SHI Xiang-dong¹

(1. 河南农业大学烟草学院, 河南 郑州 450000; 2. 深圳烟草工业有限责任公司, 广东 深圳 518000; 3. 河南中烟工业有限责任公司技术中心, 河南 郑州 450000)

(1. College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450000, China;

2. Shenzhen Tobacco Industrial Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong 518000, China;

3. Technology Center, China Tobacco Henan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou, Henan 450000, China)

摘要:从河南初烤烟叶表面分离筛选得到一株淀粉降解菌 HX-6, 并对菌株产酶培养基和烟叶发酵工艺进行优化。结果表明: 淀粉降解菌 HX-6 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 其最佳产酶培养基配方为: 可溶性淀粉与红薯淀粉 ($m_{\text{可溶性淀粉}} : m_{\text{红薯淀粉}} = 1 : 1$) 17.0 g/L, 蛋白胨与酵母粉 ($m_{\text{蛋白胨}} : m_{\text{酵母粉}} = 1 : 1$) 21.89 g/L, KNO_3 2.58 g/L, 菌株经最佳产酶培养基培养后, 其菌株酶活力提高了 71.51%; 烟叶发酵最优工艺为: HX-6 菌株粗酶液添加量 4%、发酵温度 35 °C、发酵时间 27 h, 发酵后淀粉降解率达 31.75%, 总糖和还原糖含量分别增加了 18.8%, 20.2%, 感官品质显著提升 ($P < 0.05$), 香气质变好, 香气量增加。

关键词:烟草; 淀粉降解菌; 筛选; 鉴定; 培养基优化; 发酵工艺

Abstract: A starch degrading bacterium HX-6 was isolated and screened from the surface of Henan flue-cured tobacco leaves, and the enzyme-producing medium and tobacco fermentation process of the strain were optimized. The results showed that starch degrading bacterium HX-6 was identified as *Bacillus subtilis*, and the optimum enzyme-producing medium formula was as follows: 17.0 g/L soluble starch and sweet potato starch ($m_{\text{soluble starch}} : m_{\text{sweet potato starch}} = 1 : 1$), 21.89 g/L peptone and yeast powder ($m_{\text{peptone}} : m_{\text{yeast powder}} = 1 : 1$), 2.58 g/L KNO_3 .

基金项目:河南中烟科技创新项目(编号: CW201930); 国家自然科学基金(编号: 31700270)

作者简介:张晓瑞, 女, 河南农业大学在读硕士研究生。

通信作者:付博(1984—), 男, 河南农业大学讲师, 博士。

E-mail: fubo@henau.edu.cn

杨宗灿(1985—), 男, 河南中烟工业有限责任公司技术中心工程师, 硕士。E-mail: 974866606@qq.com

收稿日期: 2020-10-26

The enzyme activity of HX-6 was increased by 71.51%. The optimum tobacco fermentation process was found to be using 4% crude enzyme solution of HX-6 strain and fermenting at 35 °C for 27 h. After fermentation, the starch degradation rate reached 31.75%, and the total sugar and reducing sugar content increased by 18.8% and 20.2% respectively. The sensory quality was significantly improved ($P < 0.05$), and the aroma quality became better, with the increase of aroma volume.

Keywords: tobacco; starch degrading bacteria; screening and identification; medium optimization; fermentation process

淀粉是烟叶中重要的有机化合物, 其含量过高会产生焦糊气味以及多种有害成分, 对烟草制品的感官质量产生不良影响^[1-3]。相较于国外优质烟叶, 中国烟叶淀粉含量普遍偏高。研究^[4]表明, 一定范围内, 烟叶感官质量随淀粉含量的下降而提升。因此利用适宜的方法降解烟叶淀粉对提升烟叶品质具有重要意义^[5]。

大量研究^[6-7]表明, 微生物法降解烟叶淀粉可显著提升烟叶品质。胥海东^[8]利用枯草芽孢杆菌对烟叶进行发酵, 烟叶淀粉降解率达 11.49%, 烟叶内在品质得到改善; 陈雨峰等^[9]发现, 烟叶经不同浓度芽孢杆菌菌液发酵后, 烟叶淀粉含量显著降低, 糖含量和香气量增加, 烟叶品质显著提升。微生物法在降解烟叶淀粉方面应用广泛, 但仍存在烟叶淀粉降解率偏低, 效果不稳定、烟用微生物工业应用技术缺乏等问题。烟叶发酵过程中, 提高产淀粉菌株的酶活可提高烟叶淀粉的降解率^[10], 而目前研究多集中于利用诱变、转基因以及选育优良菌株等技术提高菌株酶活性以改善烟叶发酵效果, 其操作方式复杂且周期较长^[11-13]。相对而言, 通过产酶培养基优化和发酵工艺优化相结合的方法, 不仅能在较短时间内提

高菌株酶活及烟叶淀粉降解率,而且能够稳定工业应用效果。

文章拟从烟叶表面筛选出本源微生物,通过响应面试验优化菌株产酶条件,利用正交试验优化烟叶发酵工艺,旨在通过微生物发酵定向解决烟叶淀粉问题,为提升烟叶品质及烟用微生物的工业应用提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试烟叶:2019年河南许昌襄县 B2F 初烤烟叶;

淀粉培养基:蛋白胨 10.0 g、牛肉膏 5.0 g、NaCl 5.0 g、可溶性淀粉 20.0 g、琼脂粉 15.0 g、水 1 000 mL, pH 7.0;

LB 培养基:酵母粉 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 10.0 g、水 1 000 mL, pH 7.0;

LB 固体培养基:酵母粉 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 10.0 g、琼脂粉 15 g、水 1 000 mL, pH 7.0;

发酵培养基:可溶性淀粉 10.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 3.0 g、水 1 000 mL, pH 7.0。

1.2 试验方法

1.2.1 产淀粉酶菌株的筛选

(1) 初筛:参照桑筱筱等^[14]的方法并修改,将 10 g 烟叶置于 150 mL 灭菌蒸馏水中,35 ℃、160 r/min 培养 24 h,按 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 倍稀释涂布于 LB 固体培养基,35 ℃ 培养 24 h。挑取单菌落至淀粉培养基,培养 24 h,滴加碘液,观察透明圈产生情况,测定各菌株的透明圈直径/菌落直径(D/d 值)。

(2) 复筛:将 D/d 值较大的菌株接种至 LB 液体培养基,35 ℃、160 r/min 培养 24 h,将种子液按 1% 接种量接种于发酵培养基,摇瓶培养,4 ℃、4 000 r/min 离心 20 min。用 pH 7.0 的 KH_2PO_4 —NaOH 缓冲液洗涤菌体沉淀(1 000 mL 发酵液菌体中加入 100 mL 缓冲液),超声波破碎 40 min(20 W, 间隔 4 s, 超声 2 s),4 ℃、8 000 r/min 离心 20 min,测定上清液(粗酶液)^[15]的淀粉酶活力。

(3) 淀粉酶活力测定:以 45 ℃、pH 5 条件下,1.0 mL 菌株粗酶液每分钟催化分解淀粉生成 1 mg 麦芽糖所需酶量定义为 1 个酶活力单位。

1.2.2 菌株形态观察及分子鉴定

(1) 形态观察:将 HX-6 菌株接种至 LB 固体培养基,35 ℃ 培养 24 h,观察菌落形态特征并对菌株进行革兰氏染色。

(2) 分子生物学鉴定:依据细菌基因组 DNA 试剂盒提取 HX-6 菌株基因组 DNA。以菌株 HX-6 的基因组 DNA 为模板,利用引物 $\text{gyrA-F}(5'-\text{CAGTGTGTTGATC-CTGGCT-3}')$ 和 $\text{gyrA-R}(5'-\text{AGGAGCTGATCCAGCCG-}$

$\text{CA-3}')$ 扩增 gyrA 序列。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,将 gyrA 阳性克隆条带的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测定结果利用 BLAST 比对分析,并用 MEGA6.0 软件邻接法构建系统发育树,明确菌株 HX-6 的分类地位。

1.2.3 HX-6 菌株产酶培养基优化

(1) 碳源种类及质量浓度对菌株淀粉酶活力的影响:发酵培养基中分别以 10 g/L 的可溶性淀粉、红薯淀粉、葡萄糖、可溶性淀粉与红薯淀粉混合粉($m_{\text{可溶性淀粉}}:m_{\text{红薯淀粉}}$ 为 1:1)作为碳源,其他条件不变,测定淀粉酶活力,确定最适碳源。调整最适碳源质量浓度为 5, 10, 15, 20, 25 g/L,考察碳源最适质量浓度对菌株淀粉酶活力的影响。

(2) 氮源种类及质量浓度对菌株淀粉酶活力的影响:以质量浓度为 10 g/L 的蛋白胨、 NH_4NO_3 、酵母粉、蛋白胨与酵母粉混合粉($m_{\text{蛋白胨}}:m_{\text{酵母粉}}$ 为 1:1)作为氮源,其他条件不变,测定淀粉酶活力,确定最适氮源。调整最适氮源质量浓度分别为 5, 10, 15, 20, 25 g/L,考察最适氮源质量浓度对菌株淀粉酶活力的影响。

(3) 无机盐种类及质量浓度对菌株淀粉酶活力影响:分别添加质量浓度为 3 g/L 的 NaCl、 CaCl_2 、 KNO_3 、 MgSO_4 作为无机盐,其他条件不变,测定淀粉酶活力,确定最适无机盐。调整最适无机盐的质量浓度分别为 1, 3, 5, 7, 9 g/L,考察最适无机盐的质量浓度对菌株淀粉酶活力的影响。

(4) 响应面优化:依据单因素试验结果,以最适碳源、氮源、无机盐为自变量,采用 Design Expert 11 软件对培养基成分进行 Box-Behnken 响应面试验优化。

1.2.4 烟叶发酵工艺优化 参照谷月^[16]的方法并修改,烟叶经回潮、切丝后制得试验用长度均匀的烟丝。将产酶优化后菌株 HX-6 的粗酶液均匀喷施于烟丝表面,以烟丝表面喷施同等比例 KH_2PO_4 —NaOH 缓冲液为对照,无菌水调整烟叶含水率至 18%,于恒温恒湿箱中进行发酵。发酵后烟丝于 80 ℃ 烘箱中干燥 5 min,对菌株粗酶液进行灭活。

(1) 发酵时间对烟叶淀粉质量分数的影响:将粗酶液按烟丝重量 3% 的比例均匀喷施于烟丝表面,33 ℃ 分别发酵 8, 16, 24, 32, 40, 48 h 后测定烟叶淀粉质量分数。

(2) 粗酶液添加量对烟叶淀粉质量分数的影响:将粗酶液分别按烟丝重量 1%, 3%, 5%, 7% 的比例均匀喷施于烟丝表面,33 ℃ 发酵 24 h 后测定烟叶淀粉质量分数。

(3) 发酵温度对烟叶淀粉质量分数的影响:将粗酶液按烟丝重量 3% 的比例均匀喷施于烟丝表面,分别于 23, 28, 33, 38, 43 ℃ 发酵 24 h 后测定烟叶淀粉质量分数。

(4) 正交优化:在单因素试验基础上,以烟叶淀粉质量分数为指标,考察发酵时间、粗酶液添加量、发酵温度

对烟叶淀粉的降解效果,设计三因素三水平正交试验,优化发酵工艺。

1.2.5 常规化学成分的测定

(1) 水溶性总糖及还原糖:按 YC/T 159—2002 执行。

(2) 总植物碱:按 YC/T 160—2002 执行。

(3) 总氮:按 YC/T 161—2002 执行。

(4) 淀粉:按 YC/T 216—2013 执行。

1.2.6 感官评价 发酵烟丝卷制成卷烟,于(22±1)℃、相对湿度(60±2)%下平衡水分 48 h。由河南中烟工业有限责任公司技术中心组织呼吸专家从卷制样品的香气质(A)、香气量(B)、浓度(C)、柔细度(D)、余味(E)、杂气(F)及刺激性(G)7个方面进行感官质量评价。感官评价总分=(A+B)×2.3+C×1.5+D+E+F+G。

1.2.7 数据处理 各试验指标均重复 3 次,采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,Origin 2019 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 烟叶中产淀粉酶菌株的分离与筛选

经初步筛选产生透明圈的菌株共有 53 株,其中 D/d 值>1.5 的菌株 10 株(见图 1)。由表 1 可知,菌株 HX-6 的 D/d 值最大,初步判断 HX-6 菌株淀粉酶活力最高。

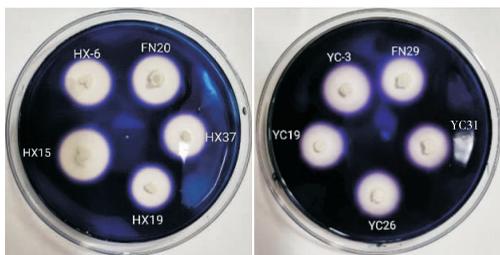


图 1 产淀粉酶菌株的透明圈及生长情况
Figure 1 Transparent circle and growth of amylase producing strain

表 1 10 株淀粉酶产生菌菌株的透明圈直径与菌落直径
Table 1 Transparent circle diameter and colony diameter of 10 amylase-producing strains

菌株编号	透明圈直径 D/mm	菌落直径 d/mm	D/d 值
HX-6	14.00±0.15	4.00±0.04	3.50±0.08
HX15	19.00±0.21	8.00±0.09	2.30±0.05
HX19	12.00±0.13	5.00±0.05	2.40±0.05
HX37	10.00±0.11	5.00±0.05	2.00±0.04
FN20	15.00±0.16	8.00±0.09	1.90±0.04
FN29	12.00±0.13	6.00±0.06	2.00±0.04
YC-3	14.00±0.15	8.00±0.09	1.80±0.04
YC19	12.00±0.13	8.00±0.09	1.50±0.03
YC26	10.00±0.11	6.00±0.06	2.00±0.04
YC31	12.00±0.13	6.00±0.06	2.00±0.04

由图 2 可知,菌株 HX-6 的淀粉酶酶活最大,为 38.96 U/mL,因此选择 HX-6 为试验菌株。赵淑琴等^[17]从富含淀粉的土壤中筛选出初始酶活为 32.5 U/mL 高产淀粉酶菌株;聂晶晶等^[18]从烟叶表面筛选出一株高效降淀粉的解淀粉芽孢杆菌,其酶活为 25.2 U/mL,均低于菌株 HX-6 的酶活。

2.2 菌株 HX-6 的形态与分子学鉴定

由图 3 可知,HX-6 菌落呈乳白色,不透明,边缘不规则,直径约 4 mm,经革兰氏染色为阳性菌,细胞形态呈杆状。

GyrA 序列分析结果表明,菌株 HX-6 与枯草芽孢杆菌的同源性达 99%;采用邻接法构建菌株 HX-6 及其相似菌株的系统发育树,结果表明 HX-6 菌株与枯草芽孢杆菌 SRCM101393 亲缘关系最近(图 4)。综合形态特征和 gyrA 序列分析结果,菌株 HX-6 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.3 HX-6 菌株产酶培养基优化

2.3.1 单一碳源、氮源、无机盐对酶活的影响 由图 5(a)可知,碳源种类对菌株产淀粉酶影响显著(P<0.05),相较于单一碳源,可溶性淀粉与红薯淀粉(m 可溶性淀粉 : m 红薯淀粉 为 1 : 1)混合作为碳源时,HX-6 菌株淀粉酶活性最高,可能是由于混合培养基中淀粉含量较高,菌株产生的淀粉酶将淀粉水解为葡萄糖,菌体能利用产生的葡萄糖进行增殖,且红薯淀粉中含有多种矿质元素和维生素,

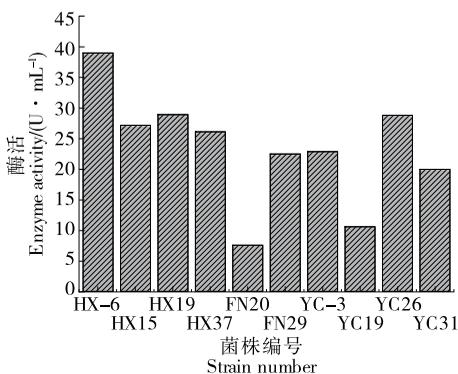
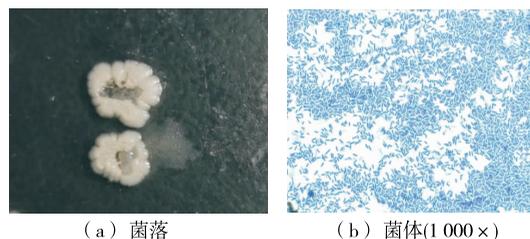


图 2 10 株淀粉酶产生菌的淀粉酶活力
Figure 2 Amylase activity of 10 amylase-producing bacteria



(a) 菌落 (b) 菌体(1 000×)
图 3 菌落形态特点
Figure 3 Characteristics of colony morphology

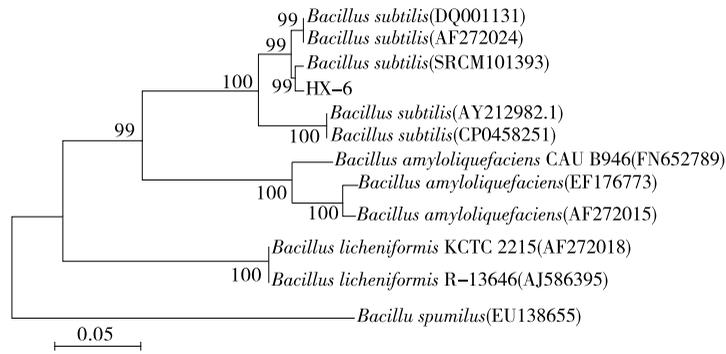


图4 HX-6菌株系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain HX-6

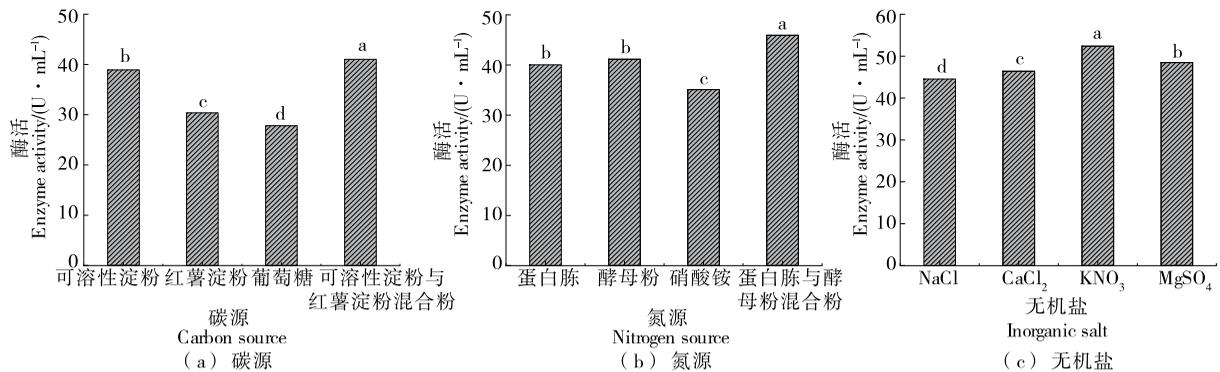
字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图5 各因素对淀粉酶酶活的影响

Figure 5 Effect of various factor on enzyme activity of strain

这些营养物质促使菌体量不断增加,提高了淀粉酶产量^[19],与代阳等^[20]的结果一致。

由图5(b)可知,无机氮——硝酸铵作为氮源时,菌株HX-6酶活性最低;而有机氮源作为氮源时的产酶效果明显优于无机氮源,这是因为有机氮源含有丰富的氨基酸、维生素及生长因子等营养物质,其中氨基酸可直接参与微生物体内的转氨或脱氨作用,维生素可作为一些酶的辅因子参与胞内生命活动,提高菌株产酶效果^[21]。相较于单一有机氮源,蛋白胨与酵母粉($m_{\text{蛋白胨}} : m_{\text{酵母粉}}$ 为1:1)混合作为氮源时,HX-6菌株酶活力最高,这是由于酵母粉分子比蛋白胨分子小,更易被菌体吸收,促进菌体生长,蛋白胨则利于菌体稳定期的延长,促进菌体代谢及产酶,共同使用时增强了菌株的产酶作用^[22-24]。

由图5(c)可知,以KNO₃作为无机盐时,HX-6菌株淀粉酶活力显著高于其他处理,其次是MgSO₄、CaCl₂、NaCl,表明KNO₃能显著提高枯草芽孢杆菌HX-6的酶活,这是由于K⁺能提高酶的结构稳定性,提高酶活性^[25],与丁翠珍等^[26]的结果一致。

2.3.2 碳源、氮源、无机盐质量浓度对酶活的影响 由图6可知,随着碳源($m_{\text{可溶性淀粉}} : m_{\text{红薯淀粉}}$ 为1:1)质量浓

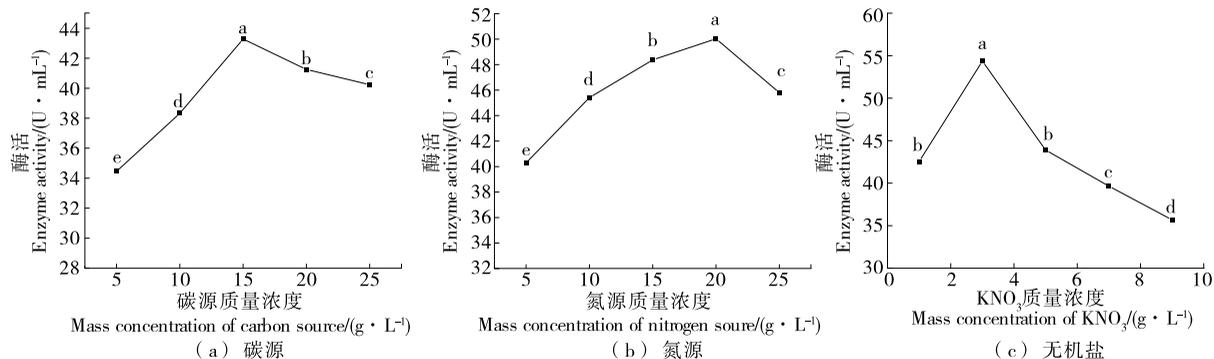
度的增加,酶活先升高后降低,当碳源质量浓度为15 g/L时,酶活最高。当氮源($m_{\text{蛋白胨}} : m_{\text{酵母粉}}$ 为1:1)质量浓度为20 g/L时,酶活最高;随着氮源质量浓度的增加,酶活显著降低,可能是混合氮源浓度过高使培养基渗透压增加,细胞脱水或死亡,抑制了酶的表达。当KNO₃质量浓度为3 g/L时,酶活最高。

2.3.3 Box-Behnken设计与结果 在单因素试验基础上,以碳源($m_{\text{可溶性淀粉}} : m_{\text{红薯淀粉}}$ 为1:1)质量浓度、氮源($m_{\text{蛋白胨}} : m_{\text{酵母粉}}$ 为1:1)质量浓度、KNO₃质量浓度为自变量,根据Box-Behnken中心组合原理设计三因素三水平响应面优化产酶培养基。试验因素水平表见表2,试验设计与结果见表3。

由软件可得各因素对菌株产淀粉酶酶活(Y)的多元回归方程为:

$$Y = 66.18 + 3.00A + 4.83B - 0.4450C - 1.36AB + 1.8AC + 1.53BC - 9.34A^2 - 2.32B^2 - 3.32C^2. \quad (1)$$

由表4可知,模型 $P = 0.0008 < 0.01$,表明该数学模型选择恰当;失拟项 $P = 0.0568 > 0.05$,说明试验无失拟项因素存在,进一步说明模型拟合度良好。决定系数 $R^2 = 0.9511$,表明有95.11%的试验数据可用此模型进行



字母不同表示差异显著(P<0.05)

图 6 各因素质量浓度对菌株酶活的影响

Figure 6 Effects of various factors on enzyme activity

表 2 Box-Behnken 试验设计因素水平

Table 2 Level of Box-Behnken experimental design factors

g/L			
水平	A 碳源质量浓度	B 氮源质量浓度	C KNO ₃ 质量浓度
-1	10	15	2.0
0	15	20	3.0
1	20	25	4.0

表 3 响应面试验设计与结果

Table 3 Response surface test design and results

试验号	A	B	C	酶活/(U·mL ⁻¹)
1	1	-1	0	54.14
2	0	0	0	63.82
3	0	1	1	64.16
4	1	1	0	63.21
5	1	0	1	57.97
6	0	0	0	66.81
7	-1	1	0	57.63
8	-1	-1	0	43.12
9	0	0	0	66.73
10	1	0	-1	52.79
11	0	0	0	66.77
12	0	-1	1	53.58
13	0	-1	-1	60.01
14	0	1	-1	64.45
15	0	0	0	66.79
16	-1	0	1	50.66
17	-1	0	-1	52.68

解释,真实值与预测值之间具有较好的拟合度和可靠度,该方案可行。由 F 值判断,各因素对淀粉酶活的影响顺序为 B>A>C;A、B、A²对菌株酶活影响极显著(P<0.01),C²对菌株酶活影响显著(P<0.05)。

表 4 回归模型方差分析[†]

Table 4 Analysis of variance of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	757.08	9	84.12	15.14	0.000 8**
A	72.12	1	72.12	12.98	0.008 7**
B	186.25	1	186.25	33.53	0.000 7**
C	1.58	1	1.58	0.29	0.609 9
AB	7.40	1	7.40	1.33	0.286 3
AC	12.96	1	12.96	2.33	0.170 5
BC	9.42	1	9.42	1.70	0.233 9
A ²	367.47	1	367.47	66.15	<0.000 1**
B ²	22.60	1	22.60	4.07	0.083 5
C ²	46.33	1	46.33	8.34	0.023 4*
残差	38.88	7	5.55		
失拟项	31.90	3	10.63	6.08	0.056 8
纯误差	6.99	4	1.75		
总变异	795.96	16			

[†] **表示差异极显著(P<0.01),*表示差异显著(P<0.05)。

2.3.4 响应曲面分析 由图 7 可知,碳源质量浓度与氮源质量浓度、碳源质量浓度与 KNO₃质量浓度之间的交互作用影响显著,氮源质量浓度与 KNO₃质量浓度之间的交互作用影响较小。同时影响酶活最显著的因素是氮源质量浓度,表现为其响应面弧度变化最大,其次是碳源质量浓度和 KNO₃质量浓度。

2.3.5 发酵最佳培养基确定及验证 应用 Design-Expert 软件得到产酶培养基的最佳配方为碳源(m_{可溶性淀粉}:m_{红薯淀粉}为 1:1)质量浓度 17.0 g/L,氮源(m_{蛋白胨}:m_{酵母粉}为 1:1)质量浓度 21.89 g/L,KNO₃质量浓度 2.58 g/L,预测酶活为 66.23 U/mL。经 3 次实验验证,得到酶活平均值为(66.82±0.65) U/mL,与理论值基本吻合,说明该

回归方程能比较真实地反映各因素对菌株酶活的影响,且酶活优于王越^[27]的。

2.4 烟叶发酵工艺优化

2.4.1 发酵条件对烟叶淀粉质量分数的影响 由图8可知,与对照组相比,烟叶经粗酶液发酵后淀粉质量分数显

著下降,发酵32 h时,烟叶淀粉质量分数由最初的4.85%下降至3.53%,降幅达27.21%。当粗酶液添加量为5%时,烟叶淀粉质量分数下降幅度最大,达27.63%,当粗酶液添加量>5%时,淀粉质量分数变化趋势平缓,主要是随着粗酶液添加量的增加,酶与底物反应越彻底完全,当

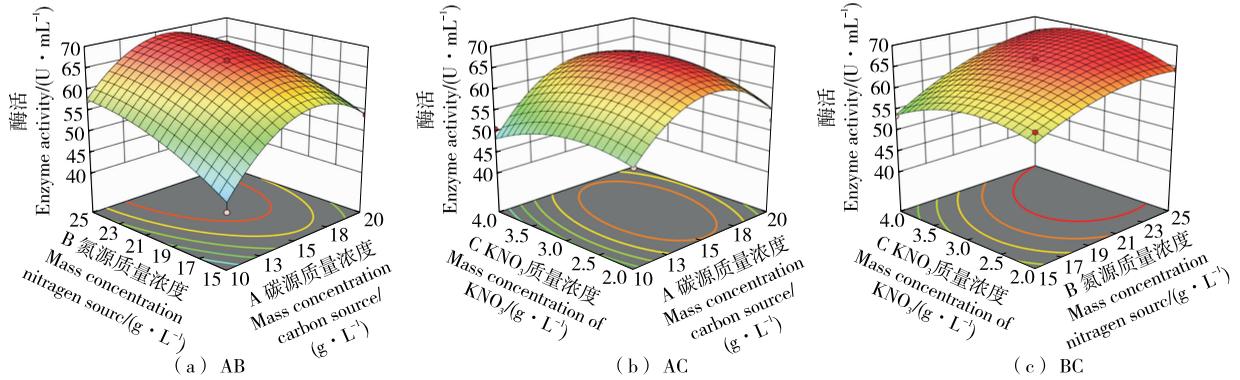
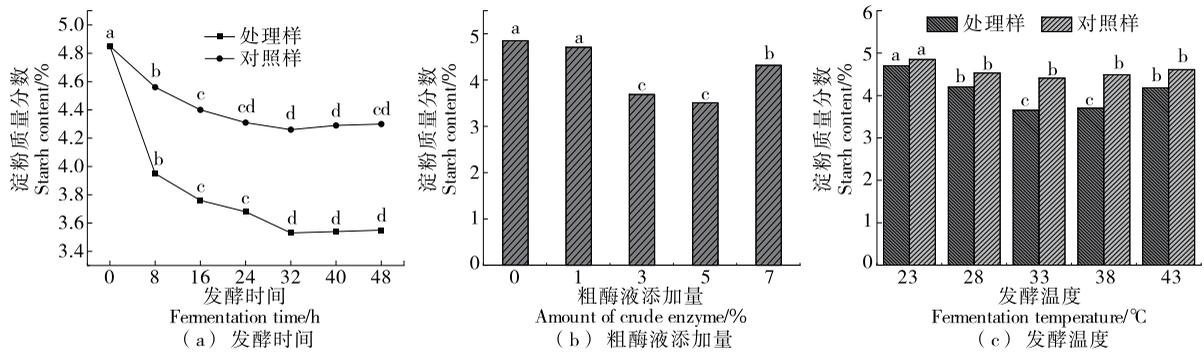


图7 各因素交互作用对酶活的影响

Figure 7 Effect of interaction of various factors on enzyme activity



字母不同表示差异显著(P<0.05)

图8 发酵条件对烟叶淀粉含量的影响

Figure 8 Effects of fermentation conditions on starch content of tobacco leaves

粗酶液添加量达到一定值时,酶分子之间互相竞争加剧,过量的酶分子无法与底物接触,烟叶淀粉降解效果降低。当发酵温度为28~43℃时,烟叶淀粉质量分数显著降低,温度为33℃时烟叶淀粉质量分数最低,此时淀粉降解率为17.01%;当温度超过38℃时,由于发酵温度过高,菌株酶活性下降,烟叶淀粉降解效果降低。

2.4.2 正交试验 以烟叶淀粉质量分数为指标,根据单因素试验结果设计正交试验,试验因素水平表见表5,结果与分析见表6。

表5 正交试验因素水平表

Table 5 Horizontal table of orthogonal experimental factors

水平	A 发酵时间/h	B 粗酶液添加量/%	C 发酵温度/°C
1	27	4	30
2	32	5	33
3	37	6	35

表6 正交试验结果与分析

Table 6 Orthogonal test results and analysis

试验号	A	B	C	淀粉质量分数/%
1	1	1	1	3.74
2	1	2	2	3.66
3	1	3	3	3.71
4	2	1	2	3.87
5	2	2	3	4.03
6	2	3	1	4.27
7	3	1	3	3.65
8	3	2	1	4.10
9	3	3	2	3.90

k ₁	3.70	3.75	4.03	
k ₂	4.06	3.93	3.81	
k ₃	3.88	3.96	3.80	
R	0.36	0.21	0.23	

由表 6 可知,烟叶最佳发酵组合为 A₁B₁C₃,即发酵时间 27 h、菌株粗酶液添加量 4%、发酵温度 35 ℃。对最佳发酵组合进行实验验证(n=3),发酵后烟叶淀粉质量分数为 3.31%,相较于原烟(淀粉质量分数为 4.85%)淀粉降解率达 31.75%,且高于胥海东^[8](11.49%)和冯颖杰等^[28](29.84%)的。

2.4.3 最佳发酵工艺条件下烟叶常规化学成分及感官质量变化 由表 7 可知,烟叶经粗酶液发酵后,总糖、还原糖质量分数分别增加了 18.8%,20.2%;总氮和烟碱质量

分数显著降低,两糖差显著降低。杜咏梅等^[29]研究表明,提高还原糖相对于总糖的质量分数、减少两糖差值,有利于提高烟叶吃味品质。

由表 8 可知,发酵后烟叶感官质量显著提升,香气量增加、香气质提升、杂气减轻、刺激性降低。这是由于微生物发酵将烟叶淀粉转化为可溶性糖,增加了烟叶中的潜香类物质,减少了烟叶的杂气来源,从而提升了烟叶的工业可用性^[30];且还原糖等烟叶香气前体物质对感官评价影响显著,烟叶香气特性与还原糖呈极显著正相关^[31-32]。

表 7 最佳发酵工艺下烟叶常规化学成分[†]

Table 7 Conventional chemical constituents of tobacco leaves under optimum fermentation conditions

组别	总糖/%	还原糖/%	烟碱/%	总氮/%	糖碱比	糖氮比	两糖差
对照组	13.58±0.15	13.21±0.14	2.32±0.03	2.29±0.02	5.85±0.11	5.93±0.11	0.36±0.01
试验组	16.13±0.17*	15.88±0.17*	2.15±0.02*	2.10±0.02*	7.62±0.09	7.68±0.03	0.25±0.07

† *表示差异显著(P<0.05)。

表 8 最佳发酵工艺下烟叶感官质量[†]

Table 8 Sensory quality of tobacco leaf under optimum fermentation process

组别	香气质	香气量	浓度	柔细度	余味	杂气	刺激性	劲头	总分
对照组	5.50	6.00	6.00	6.00	6.00	5.50	6.00	中	58.95
试验组	5.80*	6.23*	6.20*	6.10	6.00	5.91*	5.90	中	60.88*

† *表示差异显著(P<0.05)。

3 结论

试验筛选的枯草芽孢杆菌 HX-6 具有高效降解烟叶淀粉的功能特性,经最佳产酶培养基优化后菌株 HX-6 淀粉酶活达 66.82 U/mL,较初始培养条件下的酶活提高了 71.51%。烟叶经菌株 HX-6 粗酶液发酵后,淀粉降解率达 31.75%,烟叶的总糖和还原糖含量显著增加。发酵处理后的烟叶感官品质显著提升,香气量增加、香气质提升、杂气减轻,工业可用性增加。后续将重点研究生产线酶制剂施用技术及烟叶发酵控制技术,为工业化应用提供技术支撑。

参考文献

[1] 覃明娟,陈森林,赵强忠,等.植物乳杆菌在改善各产区烟叶品质中的应用[J].食品与机械,2020,36(5):199-204,226.
 [2] 段丽斌,崔国民,赵昶灵,等.烤烟烘烤中烟叶淀粉降解的研究进展[J].中国农学通报,2013,29(18):180-186.
 [3] 罗丹,吴俊,全学军,等.淀粉类酶降解烤烟中淀粉的研究[J].重庆理工大学学报(自然科学),2016,30(7):64-68.
 [4] 王红刚,董维杰,窦玉青,等.烤烟烟叶淀粉含量与其感官质量的相关性研究[J].西南农业学报,2017,30(7):1533-

1537.

[5] 何伟,李菁菁,包可翔,等.高效表达淀粉酶 *Bacillus ko-reensis* 的培养基响应面优化[J].天然产物研究与开发,2019,31(8):1425-1433.
 [6] 贺广生,王勇,张国华,等.一株耐高温解淀粉芽孢杆菌 YTK1 及其在烟叶烘烤中的应用:CN106047747A[P].2016-10-26.
 [7] 李士林,王宜君,汤朝起,等.耐高温菌的分离及在固态发酵上部烟叶中的应用[J].生物加工过程,2015,13(1):35-41.
 [8] 胥海东.枯草芽孢杆菌降解片烟中淀粉和蛋白质的研究[D].武汉:湖北工业大学,2011:42-47.
 [9] 陈雨峰,王佩,王行,等.不同浓度芽孢杆菌液对密集烘烤烟叶淀粉降解和质量的影响[J].中国农学通报,2018,34(5):37-41.
 [10] 王宝强,吴潇,季秀玲,等.陈化烟叶产淀粉酶菌株的复筛及产酶条件优化[J].甘肃农业科技,2016(9):13-18.
 [11] 辛磊,安慧,覃国乐,等.枯草芽孢杆菌 XL05 菌株的紫外诱变及发酵配方优化[J].发酵科技通讯,2020,49(3):142-146.
 [12] 刘和.棘孢木霉内切几丁质酶 42 基因表达调控与工程菌株构建[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2019:22-35
 [13] 胡志忠,姜宇,龙章德,等.利用产香酵母发酵技术改善烟叶品质[J].食品与机械,2018,34(11):200-204.

- [14] 桑筱筱, 操燕明, 杨艾玲, 等. 高产淀粉酶菌株诱变筛选及其发酵工艺的研究[J]. 生物化工, 2018, 4(6): 14-17, 22.
- [15] 陈蕊, 别小妹, 吕凤霞, 等. 枯草芽孢杆菌 PNG27 生产凝乳酶的发酵工艺优化及分离纯化研究[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(1): 110-117.
- [16] 谷月. 发酵法制备口用型烟草制品烟丝及其品质变化研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016: 17-19.
- [17] 赵淑琴, 杨孝朴. 一株产 α -淀粉酶菌株的分离筛选、鉴定及酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(2): 60-65.
- [18] 聂晶晶, 叶建斌, 马科, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Y11 产淀粉酶的条件优化[J]. 农产品加工, 2019(10): 34-39.
- [19] 胡红伟, 段明房, 闫凌鹏, 等. 一株枯草芽孢杆菌的鉴定及液体发酵工艺优化[J]. 中国饲料, 2017(5): 13-19.
- [20] 代阳, 魏利, 王继华, 等. 枯草芽孢杆菌发酵条件优化及其破乳效能[J]. 微生物学通报, 2010, 37(4): 580-585.
- [21] 杜红丽, 郝亚男, 陈宁, 等. 有机氮源及其在微生物发酵中的应用[J]. 发酵科技通讯, 2019, 48(1): 1-4.
- [22] 王超明, 何菊华, 刘玥, 等. 有机氮源对腺苷发酵的影响[J]. 发酵科技通讯, 2014, 43(4): 7-10.
- [23] 韩唱, 宿玲恰, 吴敬. *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 麦芽寡糖基海藻糖合成酶在 *Bacillus subtilis* 中的重组表达和发酵优化[J]. 生物技术通报, 2017, 33(7): 162-168.
- [24] 杨贞妮, 郭旋, 钟近艺, 等. 重组枯草芽孢杆菌分泌表达缺陷假单胞菌磷酸三酯酶及其发酵优化[J]. 中国科学(生命科学), 2019, 49(5): 625-636.
- [25] 余茜, 张国丽, 敖晓琳. 金属离子对微生物蛋白酶活性的影响及机理[J]. 中国食品学报, 2019, 19(4): 287-294.
- [26] 丁翠珍, 裘季燕, 刘伟成, 等. 枯草芽孢杆菌 B02 产生拮抗物质培养基及发酵条件优化[J]. 中国生物防治, 2008(2): 159-163.
- [27] 王越. 长野芽孢杆菌普鲁兰酶基因在枯草芽孢杆菌中的整合表达[D]. 无锡: 江南大学, 2019: 10-31.
- [28] 冯颖杰, 王鹏飞, 陈芝飞, 等. 烟叶中 1 株可高效降解淀粉的菌株筛选与作用效果研究[J]. 河南农业科学, 2018, 47(1): 150-154.
- [29] 杜咏梅, 郭承芳, 张怀宝, 等. 水溶性糖、烟碱、总氮含量与烤烟吃味品质的关系研究[J]. 中国烟草科学, 2000(1): 9-12.
- [30] 程传玲, 杨艳勤, 刘仕民, 等. 美拉德反应产物在烟草工业中的应用[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版), 2014, 29(1): 59-62.
- [31] 陈颐, 杨虹琦, 杨佳玫, 等. 不同香型烤烟香气前体物特征及其对感官评吸的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2016, 31(3): 489-497.
- [32] 沈晗, 杨凯, 任伟, 等. 影响上部烟叶感官质量的主要化学成分分析[J]. 中国烟草学报, 2019, 25(6): 18-26.

(上接第 13 页)

- [19] 丁珊珊, 贾春利, 张峦, 等. γ -聚谷氨酸提高冷冻甜面团面包质构和感官特性研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(16): 308-311.
- [20] KIM Y S, HUANG Wei-ning, DU Guo-cheng, et al. Effects of trehalose, transglutaminase, and gum on rheological, fermentation, and baking properties of frozen dough[J]. Food Research International, 2008, 41(9): 903-908.
- [21] JIA Chun-li, HUANG Wei-ning, TANG Xiao-juan, et al. Antifreeze activity of γ -poly glutamic acid and its impact on freezing resistance of yeast and frozen sweet dough[J]. Cereal Chemistry, 2016, 93(3): 306-313.
- [22] XU Hua-neng, HUANG Wei-ning, JIA Chun-li, et al. Evaluation of water holding capacity and breadmaking properties for frozen dough containing ice structuring proteins from winter wheat[J]. Journal of Cereal Ence, 2009, 49(2): 250-253.
- [23] 谢新华, 范逸超, 徐超, 等. γ -聚谷氨酸对小麦淀粉凝胶冻融稳定性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(14): 97-101.
- [24] SHYU Yung-shin, HWANG Jean-yu, HSU Cheng-kuang. Improving the rheological and thermal properties of wheat dough by the addition of γ -polyglutamic acid[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(6): 982-987.
- [25] OMEDI J O, HUANG Wei-ning. Advances in present-day frozen dough technology and its improver and novel biotech ingredients development trends: A review[J]. Cereal Chemistry, 2018, 96: 34-56.
- [26] SHYU Yung-shin, SUNG Wen-chieh. Improving the emulsion stability of sponge cake by the addition of gamma-polyglutamic acid [J]. Journal of Marine Ence & Technology, 2010, 18(6): 895-900.
- [27] 王家宝, 陈诚, 王凤, 等. 含丙二醇酯低脂蛋糕的流变学、气泡微结构和烘焙特性研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 1-7.
- [28] CHAKRABARTI-BELL S, WANG Shuo, SIDDIQUE K H M. Flour quality and disproportionation of bubbles in bread doughs [J]. Food Research International, 2014, 64: 587-597.
- [29] 姜培彦, 马晓军, 余斌, 等. 乳化剂与直链淀粉相互作用及其对蛋糕品质影响的研究[J]. 食品工业科技, 2008(2): 247-250.
- [30] 王家宝, 黄美凤, 杨笛, 等. 脂肪酶替代双乙酰酒石酸单双甘油酯对压面面团流变学和面包烘焙特性的影响[J]. 食品与机械, 2020, 36(9): 38-42.
- [31] 姬晓月, 王双燕, 耿鹏, 等. γ -聚谷氨酸对速冻水饺品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 180-187.