

# 木质素降解菌的筛选、鉴定、发酵优化及应用

苏日臻<sup>1</sup> 林志平<sup>2</sup> 张汉球<sup>2</sup> 崔振伟<sup>2</sup> 张雯<sup>1</sup>

(1. 福州大学食品营养与健康研究中心, 福建 福州 362251; 2. 福建中烟工业有限责任公司, 福建 厦门 361021)

**摘要:** [目的] 研究木质素降解菌应用于烤烟风味改善的效果。[方法] 通过木质素降解酶活力测定, 并结合感官评析效果对微生物进行筛选。得到功能菌株后对其进行发酵优化, 最后使用 GC-MS 分析菌株处理后的烤烟挥发性风味物质的变化。[结果] 获得产木质素过氧化物酶(Lip)的枯草芽孢杆菌 YY-10, 该菌株的粗酶液对烤烟样品中酸不溶性木质素的降解率达到 31.04%。粗酶液的作用使样品中挥发性风味物质含量显著增加, 香气质量和细腻度也得以提高。[结论] 高产 Lip 的枯草芽孢杆菌 YY-10 对烤烟风味具有改善作用。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 木质素; 烤烟; 降解; 风味物质

## Screening, identification, fermentation optimization, and application of lignin-degrading bacteria

SU Rizhen<sup>1</sup> LIN Zhiping<sup>2</sup> ZHANG Hanqiu<sup>2</sup> CUI Zhenwei<sup>2</sup> ZHANG Wen<sup>1</sup>

(1. Institute of Food Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 362251, China;  
2. China Tobacco Fujian Industrial Co., Ltd., Xiamen, Fujian 361021, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the effect of lignin-degrading bacteria on improving the flavor of flue-cured tobacco. [Methods] Microorganisms were screened based on lignin-degrading enzyme activity and sensory evaluation performance. After obtaining functional strains, fermentation conditions were optimized. Finally, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to analyze changes in volatile flavor compounds in tobacco samples treated with the strain. [Results] A *Bacillus subtilis* strain YY-10 capable of producing lignin peroxidase (LiP) was obtained. The crude enzyme solution from this strain achieved a 31.04% degradation rate of acid-insoluble lignin in the tobacco samples. Treatment with the crude enzyme significantly increased the content of flavor compounds in the samples and improved both aroma quality and smoothness. [Conclusion] The high LiP-producing *B. subtilis* strain YY-10 has a positive effect on enhancing the flavor of flue-cured tobacco.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; lignin; flue-cured tobacco; degradation; flavor substance

木质素是构成植物次生细胞壁的主要成分, 在一般的草本植物中木质素含量为 17%~24%<sup>[1]</sup>。木质素的热解会产生酚类化合物, 如具有花果香气的 4-乙基酚, 具有丁香香气的丁香酚、异丁香酚和 4-乙基愈创木酚, 这些化合物存在于茶叶和烟草中, 可以提高烤烟的风味<sup>[2-3]</sup>。但过高的木质素在加热过程中会产生酚类化合物, 如苯酚和对甲酚, 增加烤烟的刺激性和杂气<sup>[4-5]</sup>。在烘烤和贮藏过程中, 烟叶木质素降解产生的苯甲醛、苯乙醛等芳香小分子

能在一定程度上改善烟叶的香气和整体品质<sup>[6-7]</sup>。因此, 通过合理调控烟草叶中的木质素含量, 可以减少醛类和酚类化合物引起的刺激性和粗糙感, 同时保留木质素燃烧产生的香味物质, 从而丰富烟草的香气质量。

相关研究<sup>[8-9]</sup>表明, 微生物可以影响烤烟的品质。在烟叶发酵过程中烟叶表面的微生物组成对烤烟具有不同影响, 其中贪噬菌属 (*Variovorax*), 鞘氨醇单胞菌属 (*Spingomonas*), 红球菌属 (*Rhodococcus*) 等的相对丰度在

基金项目: 中国烟草总公司重点研发项目 (编号: 110202202022)

通信作者: 张雯 (1980—), 女, 福州大学教授, 博士。E-mail: zhangwen@fzu.edu.cn

崔振伟 (1981—), 男, 福建中烟工业有限责任公司农艺师, 硕士。E-mail: 58190675@qq.com

收稿日期: 2025-03-01 改回日期: 2025-05-30

引用格式: 苏日臻, 林志平, 张汉球, 等. 木质素降解菌的筛选、鉴定、发酵优化及应用[J]. 食品与机械, 2025, 41(6): 17-25.

Citation: SU Rizhen, LIN Zhiping, ZHANG Hanqiu, et al. Screening, identification, fermentation optimization, and application of lignin-degrading bacteria[J]. Food & Machinery, 2025, 41(6): 17-25.

上等烟、中等烟中占比更多<sup>[10]</sup>。刘文莉等<sup>[11]</sup>筛选得到了一株胶红酵母 YG14,通过混菌发酵提高梗丝品质。关于木质素降解菌的研究<sup>[12]</sup>表明,地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌等芽孢杆菌能够降解木质素或参与木质素的降解。Zhu 等<sup>[13]</sup>从南海沉积物中分离得到一株 *Bacillus ligniniphilus* L1,将菌株置于以木质素为唯一碳源培养基中培养 7 d,木质素的降解率约为 38.9%,主要产生了香草酸、苯甲酸、香草醛等 15 种低分子化合物。Sur 等<sup>[14]</sup>对洞穴沉积物细菌的研究表明,缺陷短波单胞菌、苏云金芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌是有效的木质素降解微生物。

研究拟构建以感官评析为导向的木质素降解功能菌株筛选体系,从烟梗表面分离筛选出一株能改善烟叶香气品质的木质素降解菌株,并系统优化其发酵条件和产酶特性,开发一种具有实际应用潜力的微生物风味改善方法。通过 GC-MS 全面解析微生物酶作用下烤烟中挥发性风味物质的变化,旨在为卷烟工业利用微生物调控烟叶风味的工艺设计提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 试剂与样品

硝酸钠、磷酸二氢钾、氯化钠、七水硫酸镁、无水氯化钙、D(+)-无水葡萄糖、麦芽糖、纤维二糖、木糖、蔗糖、硫酸铵、酵母粉、硫酸铜、硫酸亚铁、氯化锌、琼脂粉等:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

L-酒石酸、酒石酸钠、藜芦醇、愈创木酚:分析纯,上海源叶生物科技有限公司;

玉米秸秆:连云港苏锐秸秆加工厂;

烟梗、后浆、粗解纤:福建中烟工业有限责任公司技术中心;

烟叶样品:云烟 87、南平 B03,福建中烟有限责任公司。

#### 1.1.2 仪 器

气相色谱—质谱联用仪:8890B-5977B 型,美国 Agilent 公司;

紫外分光光度计:Lambda 35 型,珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司;

#### 1.1.3 培 养 基

碱木素固体平板:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 6.2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH<sub>4</sub>Cl 1.0 g/L, 碱性木素 2.0 g/L, 琼脂 18.0 g/L, pH 7.0;

苯胺蓝平板:胰蛋白胨 10.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, 酵母提取粉 5.0 g/L, 琼脂 18.0 g/L, pH 7.0, 灭菌后待培养基温度降到 60~70 °C 时加入苯胺蓝 0.1 g/L;

发酵培养基:烟梗 30.0 g/L, NaNO<sub>3</sub> 2.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.0 g/L, NaCl 0.5 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.1 g/L, pH 7.0。

### 1.2 方 法

1.2.1 功能菌株的初筛 将云烟 87 和 CB-1 两种烤烟的烟梗和烟叶剪成小段分别均匀撒在碱木素固体平板上, 30 °C 培养 3~5 d。观察平板上单菌落的菌落形态,挑选菌落形态特征存在差异的菌株进行纯化。纯化后的菌株使用苯胺蓝平板。记录水解圈直径和菌落直径计算 HC 值(水解圈直径/菌落直径),HC 值越大,说明菌株降解能力越强<sup>[15]</sup>。

1.2.2 粗酶液制备 使用发酵培养基在 30 °C、180 r/min 培养 48 h 后取发酵液,10 000 r/min 离心 10 min,得上清液为粗酶液。

#### 1.2.3 酶活检测

(1) 木质素过氧化物酶(Lip):以 pH 3.0,37 °C 条件下,每分钟氧化 1 μmol 藜芦醇所需的酶量为一个酶活力单位(U)。反应体系包括 600 μL 浓度为 10 mmol/L 的藜芦醇,1.2 mL 浓度为 200 mmol/L 的酒石酸—酒石酸钠缓冲液(pH 3.0),1.2 mL 稀释 5 倍的粗酶液,加入 60 μL 浓度为 20 mmol/L 的过氧化氢启动反应,37 °C 反应 2 min。测定反应在最初 2 min 于 310 nm 处吸光度值增加的速率<sup>[16]</sup>。

(2) 锰过氧化物酶(Mnp):以 pH 4.5,37 °C 条件下,每分钟氧化 1 μmol Mn<sup>2+</sup> 所需的酶量为一个酶活力单位(U)。反应体系包括 3.4 mL 浓度为 250 mmol/L 的酒石酸—酒石酸钠缓冲液(pH 4.5),100 μL 浓度为 1.6 mmol/L 的 MnSO<sub>4</sub>,400 μL 粗酶液,加入 100 μL 浓度为 1.6 mmol/L 的过氧化氢启动反应,37 °C 反应 2 min。测定反应在最初 2 min 于 238 nm 处吸光度值增加的速率<sup>[17]</sup>。

1.2.4 菌株鉴定 使用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,按照要求提取微生物基因组总 DNA,送至生物工程(上海)股份有限公司进行 16S rDNA 测序,使用 blast 与已鉴定的物种进行比较,运用 MEGA6 软件,Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

#### 1.2.5 菌株发酵条件优化

(1) 发酵底物:将产酶发酵培养基中 30.0 g/L 的烟梗替换为 30.0 g/L 的后浆(再造烟叶生产原料)、粗解纤(再造烟叶生产原料)和过 60 目筛的玉米秸秆。在 30 °C、180 r/min 培养 24 h,测定上清液的酶活力。以发酵底物为烟梗的培养基测定的酶活为 100%,计算相对酶活。

(2) 碳源:在发酵底物优化的基础上,以未额外添加碳源的培养基为对照组,分别添加 3.0 g/L 的葡萄糖、麦芽糖、纤维二糖、木糖、蔗糖。在 30 °C、180 r/min 培养 24 h,测定上清液的酶活力。以对照组测定的酶活为 100%,计算相对酶活。

(3) 氮源:在发酵碳源优化的基础上,以 2.5 g/L 的硝酸钠作为对照,分别用 2.5 g/L 硫酸铵、牛肉膏、大豆蛋白胨、酵母粉取代硝酸钠以及不额外添加任何氮源的发酵培养基。在 30 °C、180 r/min 培养 24 h,测定上清液的酶活力。以对照组测定的酶活为 100%,计算相对酶活。

(4) 金属离子:在发酵氮源优化的基础上,以未添加金属离子的培养基为对照组,在对照培养基中分别只添加 0.5 g/L 的  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 。在 30 °C、180 r/min 培养 24 h,测定上清液的酶活力。以对照组测定的酶活为 100%,计算相对酶活。

1.2.6 烟丝发酵 吸取 2.5 mL 粗酶液用便携式喷枪均匀喷洒在 50 g 烤烟烟丝表面,37 °C 发酵 4 h;发酵完成后取出烟丝平铺在托盘上以便受热均匀,135 °C 烘烤 70 s 进行灭酶处理。

1.2.7 感官质量评价 将烤烟烟丝使用打烟器制成烟支,由福建中烟工业有限责任公司技术中心的 8 位评分专家参照 GB 5606.4—2005 进行感官评定,取平均值。

#### 1.2.8 烤烟中木质素含量测定

(1) 酸不溶木质素含量:按 YC/T 347—2010 执行。

(2) 酸溶木质素含量:采用酶解—温和酸解法从烟草中分离出的木质素作为标准物质,配制酸溶木质素标准溶液<sup>[18]</sup>,绘制标准曲线。参考楚文娟等<sup>[19]</sup>的方法测定酸溶木质素含量。

1.2.9 烤烟挥发性成分分析 采用气相色谱—质谱联用仪(GC-MS)进行分析,称取 0.5 g 烤烟烟丝装入到进样瓶中,再加入 3  $\mu$ L 的 2 mg/mL 乙酸苯乙酯溶液作为内标。HP-5ms 色谱柱(60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25  $\mu$ m),氦气作为载气,流量 1 mL/min;不分流进样;进样口温度 250 °C;升温程序:起始温度 50 °C,保持 2 min,以 2 °C/min 升至 180 °C,再以 5 °C/min 升至 280 °C,保持 10 min;后运行温度 280 °C,后运行时间 5 min。溶剂延迟 5.5 min。四极杆温度 150 °C;EI 电离源,电子能量 70 eV,离子源温度 230 °C,质量扫描范围  $m/z$  33~400。所得图谱经计算机谱库

(NIST14)检索定性,并用内标法计算烤烟中挥发性风味物质的相对含量。

1.2.10 数据分析 所有样本至少进行 3 次重复,采用 GraphPad Prism 8.0 绘制柱状图,使用 Cytoscape3.9 绘制网络图,使用 Simca 14.1 绘制 PCA 图,使用 SPSS 25.0 的 Duncan 检验对数据进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟叶中木质素降解菌初步筛选

使用碱木素平板对云-87 烟叶表面微生物进行初步筛选,得到 40 株形态差异较大的菌株。将纯化后的菌株接种到苯胺蓝平板,进一步筛选能够降解木质素的菌株。大部分菌株在苯胺蓝平板上产生了明显的褪色圈(见表 1),试验挑选了 20 株使苯胺蓝平板褪色明显的菌株(HC 值 $>$ 3.24)进行后续研究。

### 2.2 烟丝感官评析

20 株菌株的 Mnp、Lip 酶活力见图 1。其中 WYY-10、YC-11 为高产 Mnp 的菌株,YY-1、YY-5、YY-10 为高产 Lip 酶菌株。将酶活力较高菌株 WYY-10、YC-11、YY-1、YY-5、YY-10 的粗酶液,应用于烟丝处理,最后卷制成成品香烟,由专业感官评析人员进行感官评价(见图 2)。处理后烤烟的风味产生了不同的影响,其中 YY-10 菌株粗酶液处理过后的烟叶对比水处理组,在香气质、甜感、香型、余味、浓度、细腻度全面提高,同时对抽吸感官负面影响的刺激性、劲头、杂气也均显著提高,是 5 株菌中对烟草的质量提升效果最好的。同时对比灭活粗酶液组的烟丝感官评析,处理后烟丝风味无明显改善(见图 3)。综合酶活力以及感官结果,选择 YY-10 为试验菌株。

表 1 菌株 HC 值表<sup>†</sup>

Table 1 Table of HC ratio of strains

| 菌株编号   | 菌落直径/mm | 水解圈直径/mm | HC 值 | 菌株编号  | 菌落直径/mm | 水解圈直径/mm | HC 值 | 菌株编号  | 菌落直径/mm | 水解圈直径/mm | HC 值 |
|--------|---------|----------|------|-------|---------|----------|------|-------|---------|----------|------|
| WYY-10 | 5.50    | 33.00    | 6.00 | YC-4  | 15.50   | 54.00    | 3.48 | BC-18 | 18.00   | 49.00    | 2.72 |
| WYC-1  | 5.00    | 28.50    | 5.70 | YY-7  | 15.00   | 52.00    | 3.47 | YC-1  | 12.00   | 30.00    | 2.50 |
| WYY-14 | 4.50    | 25.00    | 5.56 | YC-3  | 14.00   | 48.00    | 3.43 | BC-12 | 10.00   | 24.00    | 2.40 |
| YY-10  | 5.00    | 25.00    | 5.00 | YC-5  | 12.50   | 42.00    | 3.36 | BY-10 | 18.00   | 43.00    | 2.39 |
| YY-5   | 10.00   | 47.00    | 4.70 | YC-2  | 7.00    | 23.50    | 3.36 | WYY-1 | 9.00    | 18.00    | 2.00 |
| WYC-2  | 4.00    | 18.00    | 4.50 | BY-9  | 16.50   | 53.50    | 3.24 | BC-1  | 18.50   | 22.00    | 1.19 |
| YY-13  | 10.50   | 45.00    | 4.29 | BC-13 | 13.00   | 42.00    | 3.23 | BC-4  | 5.00    | —        | —    |
| YY-12  | 15.00   | 61.50    | 4.10 | YC-10 | 19.00   | 61.00    | 3.21 | BC-9  | 8.00    | —        | —    |
| YC-9   | 11.50   | 46.50    | 4.04 | BY-5  | 11.00   | 35.00    | 3.18 | BC-7  | 9.00    | —        | —    |
| YC-8   | 10.50   | 41.00    | 3.90 | WYY-5 | 9.50    | 30.00    | 3.16 | BC-11 | 11.50   | —        | —    |
| BY-2   | 15.00   | 57.50    | 3.83 | YC-6  | 11.50   | 36.00    | 3.13 | BC-14 | 14.00   | —        | —    |
| YC-7   | 6.00    | 22.00    | 3.67 | YY-14 | 14.00   | 40.50    | 2.89 | BY-12 | 16.50   | —        | —    |
| YY-1   | 14.50   | 53.00    | 3.66 | BC-5  | 17.00   | 47.50    | 2.79 |       |         |          |      |
| YC-11  | 8.00    | 28.00    | 3.50 | BC-10 | 15.50   | 43.00    | 2.77 |       |         |          |      |

<sup>†</sup> “—”表示没有水解圈。

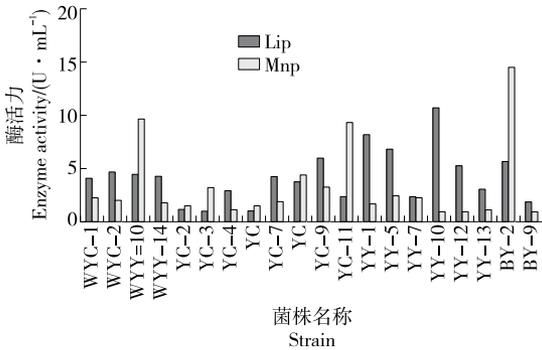


图 1 20 株菌的 Lip 和 Mnp 酶活

Figure 1 Lip and Mnp enzyme activities of 20 strains

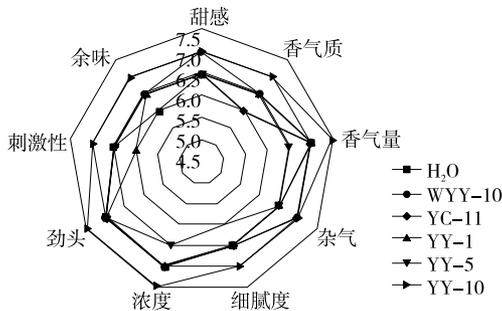


图 2 不同菌株的发酵粗酶液感官评定雷达图

Figure 2 Sensory evaluation radar map of crude fermentation enzyme solution of different strains

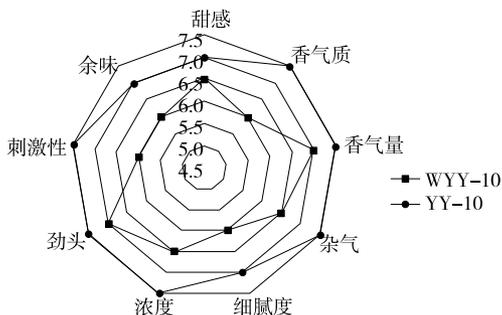


图 3 YY-10 发酵粗酶液处理组及其灭酶处理组感官评定雷达图

Figure 3 Radar map of sensory evaluation of YY-10 fermentation crude enzyme solution treatment group and its enzyme deactivation treatment group

### 2.3 菌株 YY-10 的分子学鉴定

对 YY-10 菌株的 16S DNA 基因区序列进行 blast 分析,结果显示其与 *Bacillus subtilis* 关系更近。采用邻接法构建菌株 YY-10 及其相似菌株的系统发育树,结果表明 YY-10 菌株与枯草芽孢杆菌 PP325758 亲缘关系最近(见图 4)。综合形态 blast 分析和菌株系统发育树分析结果,菌株 YY-10 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

### 2.4 YY-10 发酵培养基优化

由图 5~图 8 可知,不同发酵营养源对 YY-10 产 Lip 酶

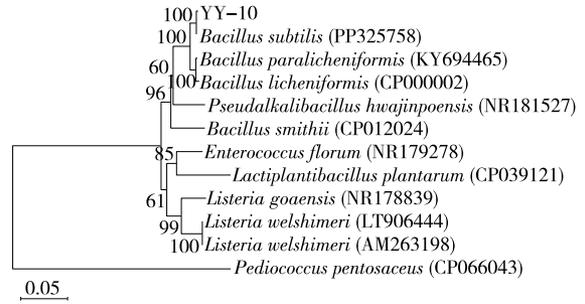


图 4 YY-10 菌株系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain YY-10

活力具有不同影响。在发酵底物优化中,YY-10 使用不同底物进行发酵时,酶活力无显著差异;在发酵碳源优化中,葡萄糖和蔗糖对 Lip 酶活力的提高最显著,与未添加碳源的对照组相比,酶活力分别提高了 3.25 倍和 3.12 倍。此外,当使用大豆蛋白胨作为氮源时,与未添加氮源的对照组相比,Lip 酶活力提高了 1.67 倍。在金属离子优化中, $K^+$  的加入对酶活性的影响最为显著,与未添加金属离子的对照组相比,添加  $K^+$  进行发酵使 YY-10 酶活性提高了 2.61 倍。

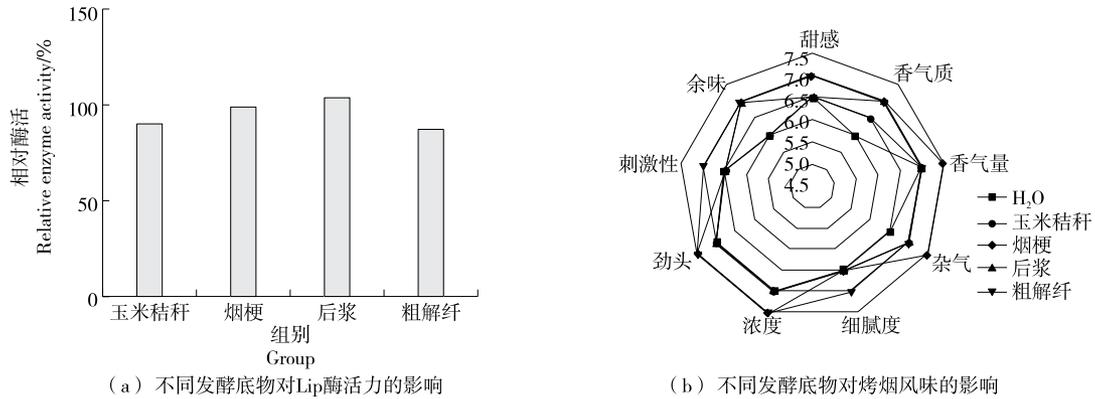
对不同营养源发酵的粗酶液处理后的烤烟烟叶进行感官评析,由图 5~图 8 可知,使用葡萄糖作为碳源的发酵粗酶液可改善烟叶细度。相反,使用麦芽糖、木糖、蔗糖和纤维素二糖作为碳源时会导致刺激,增加颗粒度、粗糙度、残留;在不同氮源的粗酶液中,硫酸铵组相比水对照组,香气质量降低,烟气细腻度下降。而其余不同组,相比水对照组烤烟感官品质均有不同程度的提升。其中大豆蛋白胨的改善效果最佳,增强了烤烟香气,减少了刺激;在添加不同金属离子发酵的粗酶液中,4 种离子均能提高烟草品质。其中  $K^+$  的效果最为显著,处理后的烤烟香气量、香气质提高,并且可以减少刺激性和杂气。

### 2.5 不同营养源的发酵粗酶液与烤烟风味的关联

将不同营养源与烤烟正面风味作关联分析。由图 9 可知,以烟梗和粗解纤作为 YY-10 发酵底物时,二者发酵粗酶液的酶活力相当。然而,相较于粗解纤,烟梗作为发酵底物的发酵粗酶液可显著改善多种风味指标。

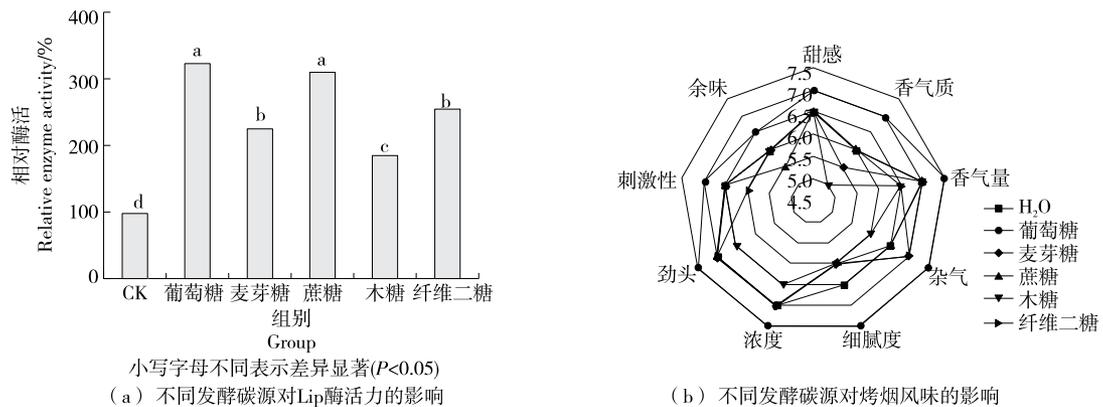
在碳源方面,葡萄糖和蔗糖的粗酶液酶活相近。但葡萄糖与风味指标呈正相关,蔗糖则与整体风味呈负相关。这是因为蔗糖会被水解为葡萄糖和果糖。研究<sup>[20]</sup>发现,果糖代谢产生的长链脂肪酸会带来脂肪味和脂肪蜡味,对烤烟风味产生负面影响。

在氮源中,大豆蛋白胨表现优异,与甜感、香气质、香气量和细腻度均呈正相关,既能显著提高酶活性,又能显著增强风味。有文献<sup>[21]</sup>报道,当烤烟中总氮含量为 2.0%~2.5% 时,烤烟风味最佳。考虑到不同氮源的利用程度各异,粗酶溶液中高氮含量可能导致后续加工步骤中烟叶的氮含量升高,进而致使风味变差<sup>[22]</sup>。



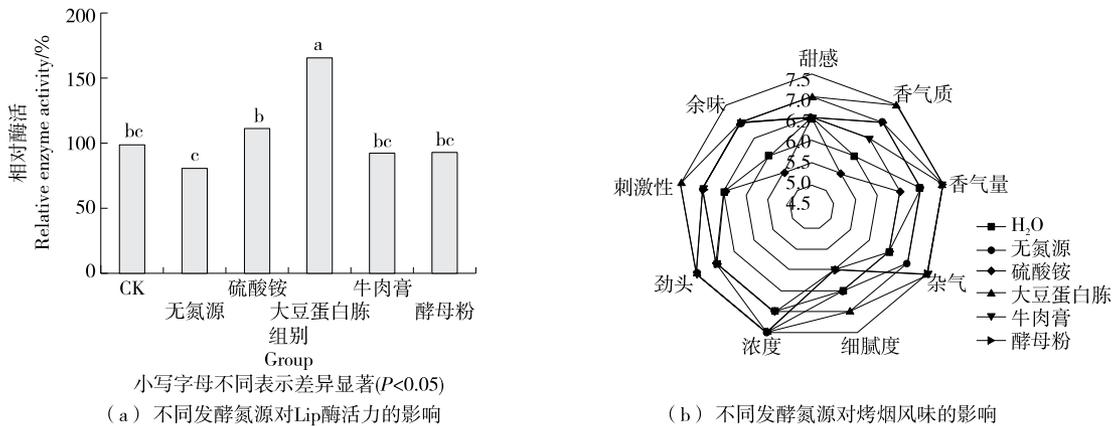
(a) 不同发酵底物对Lip酶活力的影响 (b) 不同发酵底物对烤烟风味的影响  
图5 底物对YY-10酶活力的影响及其粗酶液对烤烟风味的感官评价

Figure 5 Effects of different fermentation substrates on the enzymatic activity of YY-10 and sensory evaluation of flue-cured tobacco treated with its crude enzyme solution



小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ ) (a) 不同发酵碳源对Lip酶活力的影响 (b) 不同发酵碳源对烤烟风味的影响  
图6 碳源对YY-10酶活力的影响及其粗酶液对烤烟风味的感官评价

Figure 6 Effects of different fermentation carbon sources on the enzymatic activity of YY-10 and sensory evaluation of flue-cured tobacco treated with its crude enzyme solution



小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ ) (a) 不同发酵氮源对Lip酶活力的影响 (b) 不同发酵氮源对烤烟风味的影响  
图7 氮源对YY-10酶活力的影响及其粗酶液对烤烟风味的感官评价

Figure 7 Effects of different fermentation nitrogen sources on the enzymatic activity of YY-10 and sensory evaluation of flue-cured tobacco treated with its crude enzyme solution

在金属离子中,  $K^+$ 与香气量和细腻度相关。与其他离子相比,  $K^+$ 展现出最高的酶活性, 且能显著改善风味。提高  $K^+$ 含量提升了烟叶的钾氯比, 适当增加钾氯比, 能够

提升烤烟品质和燃烧性<sup>[23]</sup>。

## 2.6 烤烟木质素含量的变化

使用YY-10粗酶液处理烤烟, 检测处理前后烤烟木

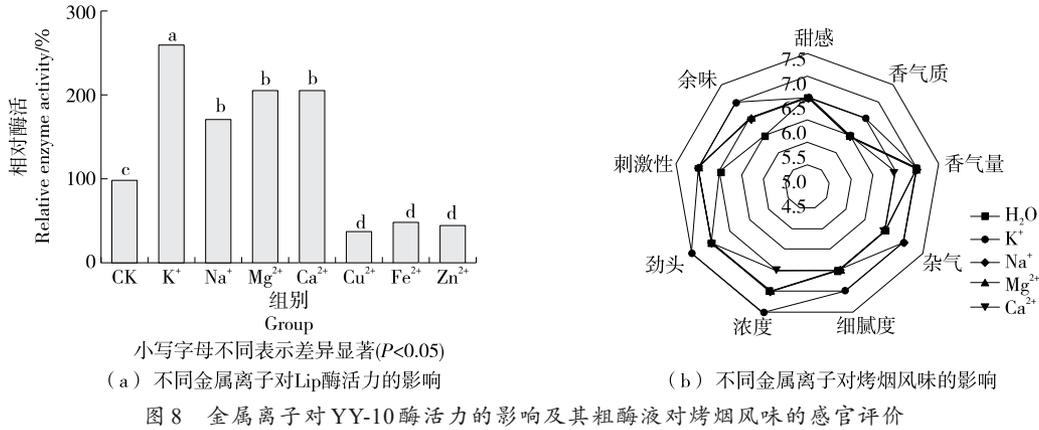


Figure 8 Effects of different metal ions on the enzymatic activity of YY-10 and sensory evaluation of flue-cured tobacco treated with its crude enzyme solution

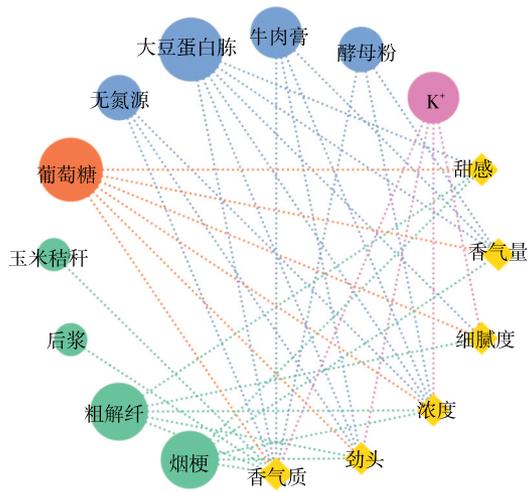


Figure 9 Flavor network diagram of flue-cured tobacco treated with crude enzyme solutions using different fermentation nutrient sources

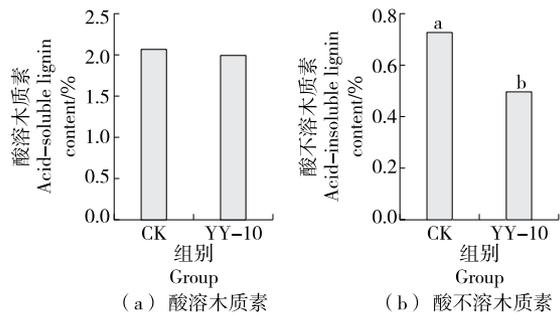


Figure 10 Changes in lignin content in tobacco leaves after treatment with crude enzyme solution from strain YY-10

质素含量的变化。检测处理后卷烟中酸溶性木质素和酸不溶性木质素的含量，酸溶性木质素含量变化不明显。粗酶溶液处理后，与对照组相比，酸不溶性木质素降解率为 31.04% (见图 10)。杨莉等<sup>[24]</sup>对酒糟进行预处理时，利用 *Trametes* sp. SCU31 菌株降解酒糟中的酸不溶性木质素，预处理后的酒糟木质素和半纤维素表面不再完整致密，变得非常粗糙，并且覆盖着大量不同大小的孔隙和碎片。更多的孔隙可以增加烤烟的比表面积，促进烟草的风味物质释放。

2.7 烤烟挥发性物质的变化

采用气相色谱—质谱法对烤烟的挥发性成分进行了分析，探讨了 YY-10 粗酶液处理前后烤烟的风味变化。对风味物质进行 PCA 主成分分析，结果如图 11 所示。通过 GC-MS 分析不同处理后的挥发性风味物质，共鉴定出

54 种挥发性风味物质，包括 5 种醇类、15 种酮类、9 种醛类、4 种酚类、8 种酯类、2 种酸类、4 种碱类、7 种烃类 (见表 2)。YY-10 发酵粗酶液处理组与水对照组以及灭活对照组相比，在 PCA 图上有明显的分离，说明 YY-10 粗酶液

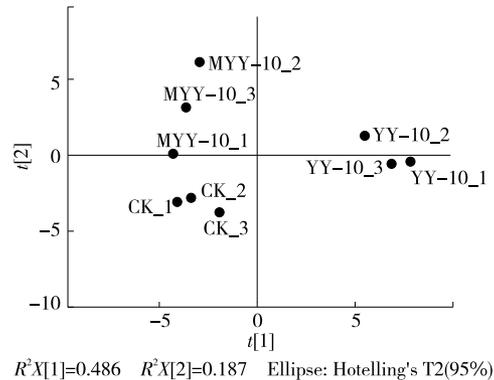


Figure 11 Principal component score plot of volatile flavor compounds in flue-cured tobacco

表2 烤烟挥发性风味成分检测结果<sup>†</sup>  
Table 2 Detection results of volatile flavor compounds in flue-cured tobacco

| 类别  | 编号  | 香味物质                            | 含量/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |       |       | 类别  | 编号          | 香味物质              | 含量/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |         |         |        |
|-----|-----|---------------------------------|--|-------|-------|-----|-------------|-------------------|--|---------|---------|--------|
|     |     |                                 | H <sub>2</sub> O                       | 粗酶液   | 灭活粗酶液 |     |             |                   | H <sub>2</sub> O                       | 粗酶液     | 灭活粗酶液   |        |
| 醇类  | H1  | 2,3-丁二醇                         | 0.879                                  | 0.727 | 0.685 | 酮类  | H28         | 9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮 | 0.787                                  | 1.317   | 0.833   |        |
|     | H2  | 糠醇                              | 0.032                                  | 0.344 | 0.163 |     | H29         | 植酮                | 0.104                                  | —       | 0.118   |        |
|     | H3  | 苯甲醇                             | 1.160                                  | 2.826 | 3.270 |     | 酚类          | H30               | 苯酚                                     | —       | 0.131   | —      |
|     | H4  | 苯乙醇                             | 0.986                                  | 3.140 | 2.765 |     |             | H31               | 间甲酚                                    | —       | 0.008   | —      |
|     | H5  | 芳樟醇                             | —                                      | —     | 0.039 |     |             | H32               | 愈创木酚                                   | —       | 0.037   | 0.054  |
| 醛类  | H6  | 糠醛                              | 0.267                                  | 0.790 | 0.142 | H33 | 2,4-二特丁基苯酚  | 0.052             | —                                      | 0.009   |         |        |
|     | H7  | 3-糠醛                            | —                                      | —     | 0.366 | 酯类  | H34         | $\gamma$ -丁内酯     | 0.055                                  | —       | 0.310   |        |
|     | H8  | 5-甲基呋喃醛                         | 0.011                                  | 0.058 | 0.050 |     | H35         | 乙酸苯甲酯             | 0.082                                  | 0.306   | 0.220   |        |
|     | H9  | 苯甲醛                             | 0.133                                  | 0.506 | 0.374 |     | H36         | 三乙酸甘油酯            | —                                      | —       | 0.150   |        |
|     | H10 | 2-吡咯甲醛                          | 0.033                                  | 0.040 | 0.063 |     | H37         | 二氢猕猴桃内酯           | 0.925                                  | 1.462   | 0.869   |        |
|     | H11 | 反式-2,4-庚二烯醛                     | 0.030                                  | —     | —     |     | H38         | 棕榈酸甲酯             | 0.724                                  | 2.257   | 1.445   |        |
|     | H12 | 苯乙醛                             | 0.325                                  | 0.500 | 0.528 | H39 | 亚油酸甲酯       | 0.097             | 0.269                                  | 0.126   |         |        |
|     | H13 | N-甲基-2-吡咯甲醛                     | 0.055                                  | 0.245 | 0.119 | H40 | 亚麻酸甲酯       | 0.175             | 0.519                                  | 0.328   |         |        |
|     | H14 | 藏红花醛                            | 0.050                                  | 0.115 | 0.059 | H41 | 硬脂酸甲酯       | 0.012             | 0.032                                  | 0.025   |         |        |
|     | 酮类  | H15                             | 2-环戊烯-1,4-二酮                           | 0.025 | 0.071 | —   | 碱类          | H42               | 尼古丁                                    | 102.024 | 114.882 | 82.822 |
| H16 |     | 甲基庚烯酮                           | 0.119                                  | 0.302 | 0.316 | H43 |             | $\alpha$ -尼古丁     | 0.074                                  | 0.068   | 0.026   |        |
| H17 |     | 3-甲基环戊烷-1,2-二酮                  | 0.055                                  | —     | 0.106 | H44 |             | 麦斯明               | 0.123                                  | 0.142   | 0.107   |        |
| H18 |     | 2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮 | 1.005                                  | 1.365 | 1.512 | H45 |             | 二烯烟碱              | 1.234                                  | 2.211   | —       |        |
| H19 |     | 3-乙基-4-甲基吡咯-2,5-二酮              | 0.245                                  | 0.413 | 0.365 | 烃类  | H46         | 十四烷               | 0.040                                  | 0.063   | —       |        |
| H20 |     | $\beta$ -大马酮                    | 0.357                                  | 0.475 | 0.497 |     | H47         | 四十四烷              | 0.021                                  | —       | —       |        |
| H21 |     | $\alpha$ -大马酮                   | 0.198                                  | 0.346 | 0.244 |     | H48         | 二十五烷              | 0.028                                  | 0.028   | —       |        |
| H22 |     | 香叶基丙酮                           | 1.066                                  | 2.109 | 1.229 | H49 | 正三十一烷       | 0.023             | —                                      | —       |         |        |
| H23 |     | 巨豆三烯酮A                          | 0.803                                  | 0.831 | 0.376 | H50 | 萜品烯         | 0.994             | 2.507                                  | 1.383   |         |        |
| H24 |     | 4-羟基-二氢大马酮                      | 0.570                                  | 0.773 | 0.463 | H51 | 1,5,8-对薄荷三烯 | —                 | 0.098                                  | —       |         |        |
| H25 |     | 巨豆三烯酮B                          | 1.224                                  | 3.413 | 1.983 | H52 | 新植二烯        | 29.007            | 49.399                                 | 30.372  |         |        |
| H26 |     | 巨豆三烯酮C                          | 0.083                                  | 0.474 | 0.280 | 酸类  | H53         | 苯甲酸               | 0.028                                  | —       | —       |        |
| H27 |     | 巨豆三烯酮D                          | 1.737                                  | 3.195 | 1.677 |     | H54         | 苯乙酸               | —                                      | —       | 0.238   |        |

† “—”表示未检出。

处理过后的烟叶挥发性风味物质与水处理以及灭活对照组有较大差异。

进一步使用PLS-DA分析计算烤烟挥发性风味物质VIP值, VIP值>1物质共有19种,其中10种物质在经YY-10粗酶液作用后含量增加,包括了3-乙基-4-甲基吡咯-2,5-二酮、藏红花醛、尼古丁、4-羟基-二氢大马酮、巨豆三烯酮A、二烯烟碱、二氢猕猴桃内酯、9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮、苯甲醛和巨豆三烯酮D,结果见图12。

这些增加的物质中,3-乙基-4-甲基吡咯-2,5-二酮具有木质的风味<sup>[25]</sup>;藏红花醛具有草本味<sup>[26]</sup>;巨豆三烯酮有甜润而又持久的烟草样香气和干果香气,是烟草中重要的香味成分<sup>[27]</sup>;二氢猕猴桃内酯具有花香、果香味的香

味<sup>[27]</sup>;这些化合物带来甜味、花香和干草般的香气,改善了香气质和香气量,增强了烤烟整体感官风味。

同时,使用粗酶液处理过的烤烟显著增加了愈创木酚、苯甲醛和苯乙醛的含量。愈创木酚具有木香、烟熏味,可增强木香<sup>[28]</sup>。苯甲醛具有苦杏仁、樱桃和坚果味<sup>[29]</sup>,苯乙醛具有蜂蜜、玫瑰和巧克力味<sup>[30]</sup>。这些都是木质素裂解产生的物质<sup>[31-32]</sup>,使烤烟的风味得到了提升。

### 3 结语

枯草芽孢杆菌YY-10具有木质素过氧化物酶活力,能够降解木质素。经发酵后将菌株YY-10粗酶液喷洒至烤烟表面,有效改善了烤烟的感官质量。经处理过后烤烟香气量增加,香气质提升,甜感和细腻度更丰富。不同

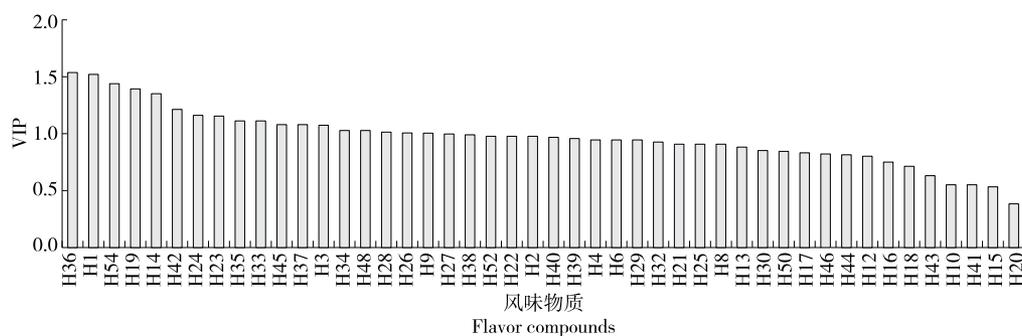


图 12 烤烟挥发性风味物质 VIP 值

Figure 12 VIP value plot of volatile flavor compounds in flue-cured tobacco

的发酵营养源的 YY-10 发酵粗酶液,在作用于烤烟后对风味的改善效果不同。烟梗、葡萄糖、大豆蛋白胨、 $K^+$  作为发酵营养源时,可以提高烤烟的风味。烤烟经 YY-10 粗酶液处理后酸不溶性木质素降解率达 31.04%。经 YY-10 粗酶液处理后的烤烟香味挥发性物质含量增多,其中木质素降解风味物质愈创木酚、苯甲醛和苯乙醛的含量分别提高至 0.037, 0.506, 0.500  $\mu\text{g/g}$ 。后续可进一步对 YY-10 菌株产 Lip 酶进行纯化与酶学性质分析,并扩大不同类型烟叶的改性研究,探索其在低温调香、绿色加工等领域的综合价值,为烟草工业的高质量发展提供新策略和技术支撑。

### 参考文献

- [1] 路瑶,魏贤勇,宗志敏,等.木质素的结构研究与应用[J].化学进展,2013,25(5):838-858.  
LU Y, WEI X Y, ZONG Z M, et al. Structural investigation and application of lignins[J]. Progress in Chemistry, 2013, 25(5): 838-858.
- [2] CULLERÉ L, SAN-JUAN F, CACHO J. Characterisation of aroma active compounds of spanish saffron by gas chromatography-olfactometry: quantitative evaluation of the most relevant aromatic compounds[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1866-1871.
- [3] NIETO-ROJO R, ANCÍN-AZPILICUETA C, GARRIDO J J. Sorption of 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol on yeast cell walls, using a synthetic wine[J]. Food Chemistry, 2014, 152: 399-406.
- [4] ZONG P J, JIANG Y, TIAN Y Y, et al. Pyrolysis behavior and product distributions of biomass six group components: starch, cellulose, hemicellulose, lignin, protein and oil[J]. Energy Conversion and Management, 2020, 216: 112777.
- [5] 刘晓冰,孟霖,梁盟,等.武陵山区烤烟上部叶片纤维素、木质素含量与质量指标间相关性研究[J].中国农学通报,2015,31(7):235-240.  
LIU X B, MENG L, LIANG M, et al. Correlation analysis of the content of cellulose and lignin and quality indices in upper leaves of flue-cured tobacco from Wulingshan area[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(7): 235-240.
- [6] 臧亚楠,孔宁川,李地艳,等.烟草木质素的研究概况[J].云南农业大学学报(自然科学),2015,30(5):822-828.  
ZANG Y N, KONG N C, LI D Y, et al. Advanced researches on lignin of tobacco[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2015, 30(5): 822-828.
- [7] 李晓,王宇,姚二民,等.漆酶降解梗丝中木质素工艺条件的优化[J].食品与生物技术学报,2019,38(1):156-159.  
LI X, WANG Y, YAO E M, et al. Optimization of the process conditions for the degradation of the lignin in the cut stem by laccase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(1): 156-159.
- [8] 阴耕云,肖冬,王凯,等.基于16S rRNA基因测序分析烟叶发酵过程中表面微生物的多样性[J].食品与生物技术学报,2024,43(3):102-112.  
YIN G Y, XIAO D, WANG K, et al. Analyzing microbial diversity on tobacco leaves surface during fermentation process based on 16S rRNA gene sequencing[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(3): 102-112.
- [9] 卢婷,李勇,李韶阳,等.固态发酵对烟丝中挥发性风味物质的影响[J].食品与生物技术学报,2024,43(11):163-172.  
LU T, LI Y, LI S Y, et al. Effects of solid-state fermentation on volatile flavor compounds in cut tobacco[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(11): 163-172.
- [10] 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]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(12): 85-95.
- [11] 刘文莉,张娟,堵国成,等.一株胶红酵母 *Rhodotorula mucilaginosa* YG14 的筛选及混菌发酵提高梗丝品质[J].食品与生物技术学报,2021,40(9):64-72.  
LIU W L, ZHANG J, DU G C, et al. Screening and mixed fermentation of *Rhodotorula mucilaginosa* YG14 to improve tobacco stems quality[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(9): 64-72.
- [12] IYER A P, MAHADEVAN A. Lignin degradation by bacteria[J]. Progress in Industrial Microbiology, 2002, 36: 311-330.

- [13] ZHU D C, ZHANG P P, XIE C X, et al. Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 44.
- [14] SUR A, NAYAK K K, PARKHEY P, et al. Isolation and identification of lignin degrading bacteria residing in mandeepkhohol cave of Chhattisgarh: a RAPD study[J]. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 2021, 58(2): 148-155.
- [15] 张庆芳, 于宗莲. 一株高效木质素降解细菌的筛选及产酶条件的优化[J]. *中国农业科技导报*, 2014, 16(2): 143-148.
- ZHANG Q F, YU Z L. A strain of lignin-degrading bacteria's screening and optimization of enzyme-producing condition[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2014, 16(2): 143-148.
- [16] 田林双. 木质素降解相关酶类测定标准方法研究[J]. *畜牧与饲料科学*, 2009, 30(10): 13-15.
- TIAN L S. Research on standard method for determining ligninolytic enzyme activity[J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2009, 30(10): 13-15.
- [17] 朱刚, 吴林, 陈明杰, 等. 草菇锰过氧化物酶编码基因生物信息学分析及其转录水平和酶活性的测定[J]. *菌物学报*, 2013, 32(5): 919-927.
- ZHU G, WU L, CHEN M J, et al. Bioinformatic, gene expression and enzyme activity analyses of manganese peroxidases in *Volvariella volvacea*[J]. *Mycosystema*, 2013, 32(5): 919-927.
- [18] 楚文娟, 李文伟, 李颖. 酶解—温和酸解法分离烟梗木质素[J]. *广东化工*, 2015, 42(17): 75-76.
- CHU W J, LI W W, LI H. Isolation of lignin from tobacco stem by the method of enzymatic hydrolysis-mild acidolysis[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2015, 42(17): 75-76.
- [19] 楚文娟, 李文伟, 李颖, 等. 近红外光谱法快速测定河南烟叶中木质素的含量[J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(18): 72-75.
- CHU W J, LI W W, LI H, et al. Rapid determination of lignin content in Henan tobacco leaves by near infrared spectroscopy[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2016, 44(18): 72-75.
- [20] ZHOU S, XU Y B, WANG C H, et al. Pyrolysis behavior of pectin under the conditions that simulate cigarette smoking[J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2011, 91(1): 232-240.
- [21] 罗玲, 杨杰, 许自成, 等. 四川烤烟碱和总氮含量分布特点及对评吸质量的影响[J]. *郑州轻工业学院学报(自然科学版)*, 2012, 27(1): 33-36.
- LUO L, YANG J, XU Z C, et al. Distribution characteristics of nicotine and total nitrogen contents in flue-cured tobacco and their effects to smoking quality in Sichuan province[J]. *Journal of Zhengzhou University of Light Industry (Natural Science)*, 2012, 27(1): 33-36.
- [22] 沈晗, 江佳楠, 汤朝起, 等. 烟叶主要含氮化合物含量与感官质量的关系[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2017, 32(3): 558-563.
- SHEN H, JIANG J N, TANG Z Q, et al. Study on relationship between the main nitrogen compounds and sensory quality in flue-cured tobacco leaves[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2017, 32(3): 558-563.
- [23] 李广才, 余玉梅, 胡建军, 等. 湖南烤烟主要化学成分与评吸质量的非线性关系解析[J]. *中国烟草学报*, 2012, 18(4): 17-26.
- LI G C, YU Y M, HU J J, et al. Non-linear relationship between chemical compositions and smoking quality in flue-cured tobacco in Hunan province[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2012, 18(4): 17-26.
- [24] 杨莉, 杨义, 郑碧君, 等. 木质素降解菌的筛选及其对酒糟的预处理研究[J]. *生物质化学工程*, 2024, 58(5): 45-52.
- YANG L, YANG Y, ZHENG B J, et al. Screening of lignin-degrading fungal strain and its pretreatment of distillers' grains[J]. *Biomass Chemical Engineering*, 2024, 58(5): 45-52.
- [25] 刘扬, 卓座品, 石晨, 等. 闻香识茶: 武夷岩茶地域香代谢组及离子组基础[J]. *中国科学: 生命科学*, 2022, 52(2): 273-284.
- LIU Y, ZHOU Z P, SHI C, et al. Scent of tea: metabolome and ionome basis of regional aroma of Wuyi rock tea[J]. *Scientia Sinica (Vitae)*, 2022, 52(2): 273-284.
- [26] 郭双飞. 藏红花花瓣风味分析与生物活性的研究[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2023: 17-22.
- GUO S F. Studies on flavor analysis and bioactivity of *Saffron petals*[D]. Shanghai: Shanghai Institute of Technology, 2023: 17-22.
- [27] SLAGHENAUFI D, PERELLO M C, MARCHAND-MARION S, et al. Quantitative solid phase microextraction - Gas chromatography mass spectrometry analysis of five megastigmatrienone isomers in aged wine[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 813: 63-69.
- [28] 陶星宇, 邓科磊, 汤尚文, 等. 烘烤温度对黑米挥发性风味物质的影响[J]. *食品科技*, 2022, 47(8): 138-145.
- TAO X Y, DENG K L, TANG S W, et al. Effects of baking temperature on volatile organic compounds in black rice[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(8): 138-145.
- [29] 洪林欣, 童星, 孙乐常, 等. 酶解前后牡蛎肉风味变化研究[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(20): 120-128.
- HONG L X, TONG X, SUN L C, et al. Study on flavor changes of oyster meat before and after enzymatic digestion[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(20): 120-128.
- [30] 梅雪莹. 木质素衍生物催化转化制备芳香含氧化学品研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2024: 50-55.
- MEI X L. Catalytic conversion of lignin derivatives for the preparation of aromatic oxygenated chemicals[D]. Shanghai: East China Normal University, 2024: 50-55.
- [31] BUGG T D H. The chemical logic of enzymatic lignin degradation[J]. *Chemical Communications*, 2024, 60(7): 804-814.
- [32] BUGG T D H, AHMAD M, HARDIMAN E M, et al. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi[J]. *Natural Product Reports*, 2011, 28(12): 1 883-1 896.