

复烤烟叶异地醇化过程中生物活性的变化

汪长国^{1,2} 李宁^{1,2} 寇明钰^{1,2} 冯广林^{1,2} 杨文敏^{1,2}

吴艳^{1,2} 刘林^{1,2} 戴亚^{1,2*} 张燕^{3*}

(1. 减害降焦四川省重点实验室,成都 610066; 2. 川渝中烟工业有限责任公司,成都 610066;
3. 云南省烟草质量监督检测站,昆明 650106)

摘要 以复烤烟叶为试验材料,研究了异地醇化过程中生物活性的变化。结果表明:复烤烟叶异地醇化过程中,醇化初期叶面微生物数量和生物酶活性迅速上升,之后随着醇化的进行而逐渐下降;中部烟叶叶面微生物数量总体大于上部和下部烟叶,并可检出蛋白酶活性,而上部和下部烟叶均未能检出其活性,纤维素酶和淀粉酶活性均为中部>上部>下部烟叶,而蔗糖酶活性为下部>中部>上部烟叶;同等级复烤烟叶存放于西昌烟叶仓库的生物活性水平高于成都烟叶仓库。

关键词 复烤烟叶; 醇化; 微生物; 酶; 生物活性

中图分类号 S 572

文章编号 1007-4333(2013)02-0105-05

文献标志码 A

Changes of biological activity of flue-cured tobacco leaves from different places aging

WANG Chang-guo^{1,2}, LI Ning^{1,2}, KOU Ming-yu^{1,2}, FENG Guang-lin^{1,2}, YANG Wen-min^{1,2},
WU Yan^{1,2}, LIU Lin^{1,2}, DAI Ya^{1,2*}, ZHANG Yan^{3*}

(1. Sichuan Key Laboratory for Harmful Component and Tar Reduction in Cigarette, Chengdu 610066, China;

2. China Tobacco Chuanyu Industrial Co., Ltd, Chengdu 610066, China;

3. Yunnan Provincial Tobacco Quality Supervision and Inspection Station, Kunming 650106, China)

Abstract The changes of biological activity during different place aging were studied using flue-cured tobacco leaves as the experimental materials. The results showed that during different place aging the amount of microorganisms and enzyme activity of flue-cured tobacco leaves grew rapidly during the early period of aging, but gradually reduced along with the aging. The amount of microorganisms on central flue-cured tobacco leaves was generally higher than those from the upper and bottom flue-cured tobacco leaves. The activity of protease in central flue-cured tobacco leaves was also detected, but no activity was identified from the upper and bottom flue-cured tobacco leaves. The order for the activity of cellulase and amylase was central > upper > bottom flue-cured tobacco leaves, while the order for the activity of sucrase was bottom > central > upper flue-cured tobacco leaves. It was found that the biological activity of the same degree flue-cured tobacco leaves in the Xichang tobacco leaves warehouse was higher than that of the Chengdu tobacco leaves warehouse.

Key words flue-cured tobacco leaves; aging; microorganism; enzyme; biological activity

烤烟品质除受品种、生态条件、栽培技术等因素的影响外,烟叶的初烤、复烤和醇化等也对其有显著

影响。烟叶醇化过程中的微生物和酶及相关化学物质的协调作用,能诱发一系列生理生化反应,而微生

收稿日期: 2012-09-07

基金项目: 四川省立项项目(2009JY0153)

第一作者: 汪长国,高级工程师,主要从事烟草化学及生物应用技术研究, E-mail: wgcx@163.com

通讯作者: 戴亚,教授,主要从事烟草化学及生物大分子结构—活性关系研究, E-mail: dycy@263.net

张燕,副研究员,主要从事化学研究, E-mail: yanzhkm@sina.com

物和酶的作用贯穿于烟叶醇化始终,对烟叶品质影响较大^[1-4]。微生物不仅可以通过自身生命力作用于烟叶,而且还通过其代谢产生的生物酶参与烟叶的生理生化反应,促进烟叶中大分子化合物的转化^[5];醇化过程中随着酶促反应的进行,烟叶中多酚氧化酶和过氧化物酶在有氧条件下,可催化酚类氧化成醌、再进一步聚合形成与烟叶颜色和香味有关的黑色素化合物^[6],淀粉酶和蛋白酶与烟叶中大分子物质的降解有密切关系,其降解发生的美拉德反应对提高烟叶香气质量具有重要作用^[7];有研究表明,将微生物或酶用于烟叶醇化可缩短醇化时间、提高烟叶品质和改善烟气特性等^[7-10]。因此,研究醇化过程中微生物和酶的变化规律,对调控微生物和酶的作用、提高醇化效率、乃至揭示烟叶醇化机理等具有重要意义。关于烟叶在醇化过程中的微生物和酶的变化研究已有不少报道^[5,10-16],但关于复烤烟叶异地醇化叶面微生物和生物酶的变化研究尚未见报道。本研究将相同试材(复烤烟叶 B₃F、C₃F、X₃F)置于异地不同醇化条件的仓库中,通过测定醇化过程中不同时间点的烟叶生物活性情况,试图揭示复烤烟叶异地醇化过程中叶面微生物数量和4种生物酶活性的变化规律,为进一步研究烟叶醇化机理及人工参与调控烟叶醇化进程提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

四川会东红花大金元复烤烟叶,等级为 B₃F、C₃F、X₃F。含水率为 11.0%~13.0%,采用纸箱包装(200 kg/箱),包装密度为 267.9 kg/cm³,每 4 箱 1 个木托脚,堆码高度 8 层。

1.2 供试复烤烟叶异地醇化方法

成都和西昌是川渝中烟工业有限责任公司所属的 2 个烟叶存贮地点,两地的气候有差异,成都烟叶仓库(简称:成都库)的年平均气温 16~18℃、相对湿度为 65%~75%,西昌烟叶仓库(简称:西昌库)

的年平均气温 18~20℃、相对湿度为 70%~80%。

相同等级的供试复烤烟叶为 2008 年 9—11 月在同一复烤厂加工的同一批样品,取样后将样品分别运送至成都库和西昌库进行自然醇化,醇化时间为 32 个月,分别在醇化 6、12、18、22、26、29、32 个月时进行取样,测定烟叶叶面微生物数量和烟叶中生物酶活性。

1.3 复烤烟叶叶面微生物的分离^[12]

1.3.1 培养基

分离细菌、真菌培养基分别采用牛肉膏蛋白胨培养基和改良马丁培养基。

1.3.2 分离方法

烟叶样品粉碎后,按常规方法^[17]进行平板稀释分离,于 28℃下培养 2~7 d,然后计数。

1.4 复烤烟叶中生物酶活性的测定及感官质量的评价方法

参照文献^[18]的方法测定烟叶中蛋白酶和纤维素酶活性,参照文献^[19]的方法测定烟叶中淀粉酶和蔗糖酶活性。

2 结果与分析

2.1 复烤烟叶异地醇化过程中叶面微生物及生物酶的数量特征

将测定的复烤烟叶异地醇化过程中叶面微生物数量和生物酶活性进行了描述统计分析,结果见表 1 和表 2。从表 1 可知,在醇化过程中,叶面微生物数量存在广泛变异,细菌和真菌数量变化程度有所不同,真菌变异系数为 216.50%、细菌变异系数为 70.16%,说明在醇化过程中发生了较剧烈的变化,且真菌的变化程度远大于细菌;从其分布状况看,其峰度系数均大于 0,为尖峭峰,数据大多集中在平均值附近,其偏度系数均大于 0,为正向偏态峰。从表 2 可知,在醇化过程中,4 种生物酶活性亦存在广泛变异,不同生物酶活性变化程度亦有所不同,4 种生物酶活性的变异系数均大于 100%,说明在醇化过

表 1 复烤烟叶异地醇化过程中叶面微生物数量的描述统计分析

Table 1 Descriptive statistics of the amount of microorganisms on flue-cured tobacco leaves surface from different place aging

指标 Index	变幅/(10 ³ cfu/g) Range	均值 Mean×10 ³	标准差 Sd.	变异系数/% C. V.	峰度系数 Kurtosis	偏度系数 Skewness
细菌 bacteria	0.35~24.03	6.68	4.69	70.16	3.44	1.45
真菌 fungus	0.00~26.39	2.43	5.26	216.50	13.84	3.61

表 2 复烤烟叶异地醇化过程中酶活性的描述统计分析

Table 2 Descriptive statistics of enzyme activity in flue-cured tobacco leaves from different place aging

指标 Index	变幅/(10 ³ U/g) Range	均值 Mean	标准差 Sd.	变异系数/% C. V.	峰度系数 Kurtosis	偏度系数 Skewness
蛋白酶 Protease	0.00~15.98	1.76	4.12	233.80	4.26	2.30
纤维素酶 Cellulase	0.00~2.97	0.51	0.80	158.85	1.75	1.59
淀粉酶 Amylase	0.00~3.87	1.09	1.20	109.54	-1.00	0.57
蔗糖酶 Sucrase	0.00~9.98	3.26	3.49	107.37	-1.44	0.45

程中发生了剧烈的变化,其变化程度为蛋白酶(241.37%) > 纤维素酶(153.58%) > 蔗糖酶(115.35%) > 淀粉酶(110.49%);从其分布状况看,淀粉酶和蔗糖酶的峰度系数小于0,为平阔型,数据比较分散,其余为尖峭峰,数据大多集中在平均值附近,4种生物酶的偏度系数均大于0,为正向偏态峰。

2.2 复烤烟叶异地醇化过程中叶面微生物数量动态变化

2.2.1 叶面细菌数量的变化

如图 1 所示,复烤烟叶异地醇化过程中,各等级烟叶叶面细菌数量呈现出在醇化初期迅速上升(从 0.35×10^3 cfu/g 增至最大 2.40×10^4 cfu/g),而后持续下降的变化规律;相同等级的复烤烟叶存放于西昌库的叶面细菌数量在各个取样点均大于成都库;3个部位叶面细菌数量的变化情况为,同一存放库中中部烟叶叶面细菌数量的最大值均大于上部和下部烟叶的最大值,存放于西昌库的中部烟叶叶面细菌数量在各取样点均大于上部和下部烟叶,存放于成都库的中部烟叶叶面细菌数量在6个月时大于上部和下部烟叶、在12个月时小于上部烟叶而大于

下部烟叶、18个月之后均大于上部和下部烟叶,存放于成都库的上部烟叶叶面细菌数量在6个月时小于下部烟叶,其他时间段均大于下部烟叶,存放于西昌库的上部烟叶细菌数量在6个月和12个月时大于下部烟叶,其他时间段均小于下部烟叶。

2.2.2 叶面真菌数量的变化

由图 2 可知,各等级复烤烟叶叶面真菌数量在异地醇化过程中有明显的变化规律,在醇化初期迅速上升,从 0.13×10^3 cfu/g 增至最大 2.64×10^4 cfu/g,而后持续减少,至22个月始活性很低,均未能检出。相同等级的复烤烟叶存放于西昌库的叶面真菌数量在各个取样点均大于成都库;3个部位叶面真菌数量的变化情况为,同一存放库中中部烟叶叶面真菌数量的最大值均大于上部和下部烟叶的最大值,存放于西昌库的中部烟叶叶面真菌数量在醇化的各取样点均大于上部和下部烟叶,存放于成都库的中部烟叶叶面真菌数量在6和12个月时均小于上部和下部烟叶、之后大于上部和下部烟叶,而两个库中的上部烟叶叶面真菌数量均为在6个月时大于下部烟叶、其他时间段均小于下部烟叶。

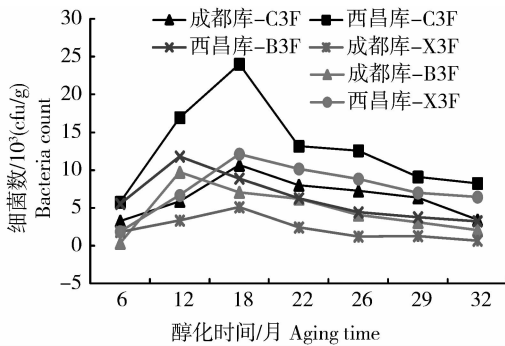


图 1 异地醇化复烤烟叶叶面细菌数量的变化
Fig. 1 Changes of the amount of bacteria on the flue-cured tobacco leaves surface from different place aging

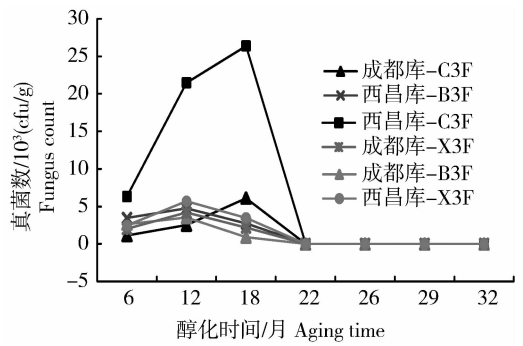


图 2 异地醇化复烤烟叶叶面真菌数量的变化
Fig. 2 Changes of the amount of fungus on the flue-cured tobacco leaves surface from different place aging

2.3 复烤烟叶异地醇化过程中生物酶活性的变化

2.3.1 蛋白酶活性的变化

如图3所示,复烤烟叶异地醇化过程中,中部烟叶可检出蛋白酶活性,而上部和下部烟叶均未能检出活性,可检出蛋白酶活性呈现出初期上升而后期持续下降的单峰曲线变化规律,均在12个月时达到活性高峰,直至26个月始均未能检出活性,且存放于西昌库的烟叶中蛋白酶活性在各取样点均大于成都库。

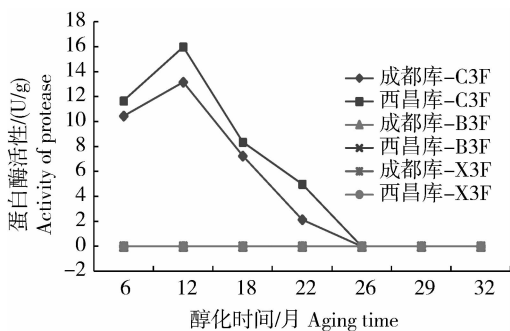


图3 复烤烟叶异地醇化过程中蛋白酶活性的变化

Fig. 3 Changes of activity of protease in flue-cured tobacco leaves of different place aging

2.3.2 淀粉酶活性的变化

从图4可知,复烤烟叶中淀粉酶活性在异地醇化过程中初期上升,到12个月时达到最高值,而后持续下降,至26个月活性很低,均未能检出活性,同等级复烤烟叶在各取样点的活性均为西昌库大于成都库,且存放于同一仓库的3个部位复烤烟叶中该酶活性在各取样点大小均为中部>上部>下部烟叶。

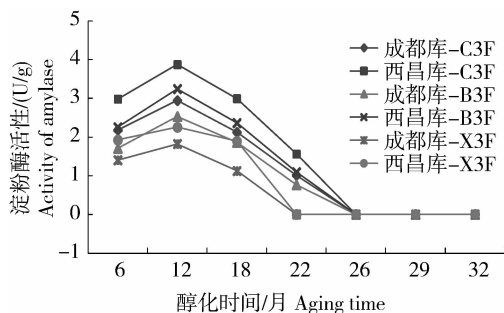


图4 复烤烟叶异地醇化过程中淀粉酶活性的变化

Fig. 4 Changes of activity of amylase in flue-cured tobacco leaves of different place aging

2.3.3 纤维素酶活性的变化

如图5所示,复烤烟叶异地醇化过程中,中部和上部烟叶均能检出纤维素酶活性,而下部烟叶均未能检出活性,可检出纤维素酶活性呈现出初期上升而后期持续下降的单峰曲线变化规律,均在12个月时达到活性高峰,至26个月始均未能检出活性,同等级复烤烟叶在各取样点的活性均为西昌库大于成都库,且存放于同一仓库的3个部位复烤烟叶中该酶活性在各取样点大小均为中部>上部>下部烟叶。

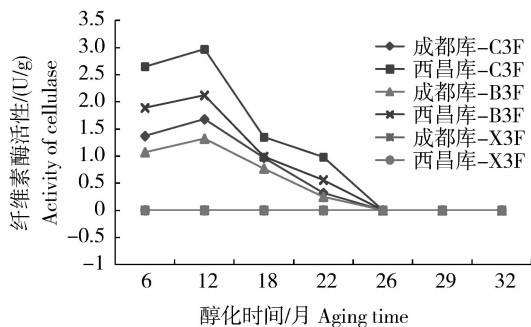


图5 复烤烟叶异地醇化过程中纤维素酶活性的变化

Fig. 5 Changes of activity of cellulase in flue-cured tobacco leaves of different place aging

2.3.4 蔗糖酶活性的变化

由图6可知,复烤烟叶异地醇化过程中,该酶活性在初期上升,到12个月时达到最高值,而后持续下降,至26个月活性很低,均未能检出活性,同等级复烤烟叶在各取样点的活性均为西昌库大于成都库,且存放于同一仓库的3个部位复烤烟叶中该酶活性在各取样点大小均为下部>中部>上部烟叶。

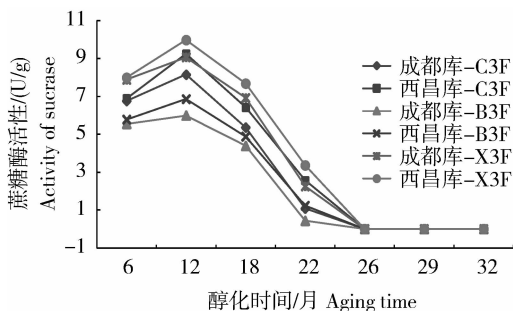


图6 复烤烟叶异地醇化过程中蔗糖酶活性的变化

Fig. 6 Changes of activity of sucrase in flue-cured tobacco leaves of different place aging

3 讨论

复烤烟叶异地醇化过程中,叶面微生物数量从醇化初期的0~18个月迅速上升,之后持续下降,真菌从22个月始均未能检出;生物酶活性亦是从初期上升、均在12个月时达到高峰、之后持续下降,从26个月始均未能检出。究其原因,对叶面微生物而言,可能与在自然醇化环境和烤烟叶面微生物状况的影响下,在醇化初期经初烤和复烤后,叶面营养物质丰富,导致烤后叶面残留的活菌及环境中的微生物在叶面爆发式地生长,微生物的生物活性处于较高的水平,后期随着醇化的进行,逐渐下降,乃至真菌未能检测出;对生物酶而言,可能除烟叶自身的酶外,还有在醇化初期烟叶表面滋生的大量微生物分泌的生物酶,随着醇化的进行,叶面微生物数量逐渐减少,分泌的生物酶也相应减少,导致初期活性高,后期活性下降,至26个月均未能检出,生物酶活性的这种变化趋势与叶面微生物数量的变化趋势一致。

中部烟叶叶面微生物数量整体上大于上部和下部烟叶,并可检出蛋白酶活性,而上部和下部烟叶均未能检出其活性,纤维素酶和淀粉酶活性在各个时间段均为中部>上部>下部烟叶,而蔗糖酶活性为下部>中部>上部烟叶。同等级复烤烟叶存放于西昌库的生物活性水平在各个时间段普遍高于成都库,究其原因可能与西昌库的温度、湿度均高于成都库有关,而这种高温高湿的条件有利于微生物的生长、繁殖以及生物酶的分泌。

由此可知,复烤烟叶异地醇化过程中叶面微生物数量和烟叶中生物酶活性发生了较大的变化且有明显的差异,高温高湿条件下烟叶生物活性水平较高,由此,为调整醇化条件,提高醇化过程中烟叶生物活性水平提供了有力支撑和理论依据。同时,中部烟叶中蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶活性相对较高,而这些生物酶能促进烟叶中大分子物质的转化和致香前体物的形成,加速烟叶的醇化进程,因此,在醇

化过程中可适当加入生物酶制剂调控烟叶品质向所期望的方向转化。

参 考 文 献

- [1] 左天觉. 烟草的生产、生理和生物化学[M]. 朱尊权译. 上海:上海远东出版社,1993:87-89
- [2] 杨虹琦,周翼衡,罗泽明,等. 微生物和酶在烟叶发酵中的作用[J]. 湖南农业科学,2003(6):63-66
- [3] 祝明亮. 烟草微生物学[M]. 北京:科学出版社,2008:2-7
- [4] 卓思楚,郑湖南,齐凌峰,等. 国内烤烟烟叶醇化机理及技术研究进展[J]. 中国农学通报,2012(10):91-94
- [5] 杨金奎,段焰青,陈春梅,等. 醇化烟叶表面可培养微生物的鉴定和系统发育分析[J]. 烟草科技,2008(11):15-19
- [6] 尹建雄. 烟草中多酚化合物及多酚氧化酶研究进展[J]. 广西农业科学,2005(36):284-286
- [7] 任军林,刘振宇. 施加高活性微生物转化酶提高卷烟感官质量的实验[J]. 烟草科技,2000(4):9-10
- [8] 张立昌. 烟叶酶处理的作用效果[J]. 烟草科技,2001(4):7-9
- [9] 姚光明. 降低烟叶中蛋白质含量的研究[J]. 烟草科技,2000(9):6-8
- [10] 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(1):314-318
- [11] 孙敬国,闫铁军,司辉,等. 烤烟醇化过程中酶的作用与变化特征研究进展[J]. 湖北农业科学,2008(10):1207-1211
- [12] 赵铭钦,邱立友,张维群,等. 陈化期间烤烟叶片生物活性变化的研究[J]. 华中农业大学学报,2000(6):537-542
- [13] 赵铭钦,王豹祥,邱立友,等. 不用陈化时期烤烟叶片中酶活性及其相关化学成分分析[J]. 中国农业大学学报,2006,11(4):7-10
- [14] 武德传,周翼衡,李章海,等. 复烤片烟醇化过程中几种化合物含量及相关酶活性的变化[J]. 中国烟草科学,2010(3):78-81
- [15] 曾晓鹰,杨金奎,段焰青,等. 烟叶生物酶活性与其等级和醇化时间的相关性[J]. 烟草科技,2009(5):48-51
- [16] 朱大恒,陈锐,陈再根,等. 烤烟自然醇化与人工发酵过程中微生物变化及其与酶活性关系的研究[J]. 中国烟草学报,2001(2):26-30
- [17] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 北京:高等教育出版社,2006:23-27
- [18] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京:科学出版社,1984:446-447,608
- [19] 邹琦. 植物生理生化实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,1995:56-62