

复合酶处理废弃烟末制备烟用美拉德香精

游霞¹, 刘彩红¹, 崔步云¹, 李雅琪¹, 韦凤杰², 吴鸣建^{*1}

(1. 郑州大学 化工与能源学院, 河南 郑州 450001; 2. 河南烟草公司, 河南 郑州 450002)

摘要: 利用 α -淀粉酶和 β -淀粉酶的复合酶酶解烟草废弃物、浓缩酶解液与特定的氨基酸进行美拉德反应来制备烟用香精。通过单因素实验确定最适酶解条件: 质量分数 0.2% α -淀粉酶和质量分数 3% β -淀粉酶, 酶解时间 7 h, pH 5.4, 温度 50 $^{\circ}\text{C}$; 在酶解制备的美拉德反应基液中加入氨基酸后, 通过正交实验优化美拉德反应条件: 反应系含水率 15%, 反应时间 5 h, pH 8, 反应温度 115 $^{\circ}\text{C}$ 。经验证实验可知, 酶解液中还原糖的质量浓度提高了 28.07%, 通过 GC-MS 分析表明, 从美拉德反应产物中共检测 100 种物质, 其中与烟草香味有关的化合物有 57 种, 相对质量分数为 71.277%。

关键词: 烟草废弃物; 淀粉酶; 美拉德反应; GC-MS 分析

中图分类号: 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2018)10-1114-06

Preparation of Maillard Tobacco Flavoring with Tobacco Waste by Complex Enzymatic Extraction

YOU Xia¹, LIU Caihong¹, CUI Buyun¹, LI Yaqi¹, WEI Fengjie², WU Mingjian^{*1}

(1. Chemical and Energy Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Henan Tobacco Company, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Amylases were used to hydrolyze tobacco waste, and amino acid was added to the concentrated hydrolysate solutions for Maillard reaction to the preparation of cigarette flavoring. By single factor experiment, the optimal enzymatic hydrolysis conditions were determined as follows: the amylase 0.2%, beta amylase 3%, reaction time 7 h, pH 5.4, temperature 50 $^{\circ}\text{C}$; verified experiment shows that the enzymolysis solutions of the quality volume concentration of reducing sugar increased by 28.07%. Amino acid was added into Maillard reaction solutions, and the optimal conditions of Maillard reaction were as follows: pH 8, reaction temperature 115 $^{\circ}\text{C}$, reaction time 5 h, the moisture content of the reaction system 15%. By the analysis of GC/MS, a total of 100 kinds of chemical components were identified in Maillard reaction products. Among them, there were 57 kinds of compounds which related to tobacco aroma, accounting for 71.277% of the total content.

Keywords: tobacco waste, amylases, Maillard reaction, GC-MS

收稿日期: 2016-05-30

* 通信作者: 吴鸣建(1957—), 男, 河南郑州人, 工学博士, 教授, 主要从事天然产物与药物化学研究。E-mail: wumj@zzu.edu.cn

引用本文: 游霞, 刘彩红, 崔步云, 等. 复合酶处理废弃烟末制备烟用美拉德香精[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(10): 1114-1119.

中国烟草的种植面积和产量均居世界前列,但其中 20%~30%烟叶是不能用作卷烟原料的,这不仅浪费资源,还污染环境,因此合理综合利用烟草废弃物变得尤为重要^[1]。

美拉德反应又称为非酶棕色化反应,主要是氨基化合物与羰基化合物之间的复杂反应,美拉德反应会产生很多致香物质,其中大部分也是烟草中重要的香味成分。目前对烟草废弃物的综合利用主要是从中提取茄尼醇、烟碱、蛋白质、果胶、烟酰胺和黄酮类物质,但附加值较低。烟草中水溶性糖中还原糖的质量分数可达 25%,非还原糖可达 5%;不溶性的多糖中淀粉和果胶的质量分数可达 8%,在酶的作用下水解为单糖,即能为美拉德反应提供足够的碳源^[2-10]。

利用美拉德反应制备的烟用香精,因其具有天然、健康和安全的特性而倍受青睐^[11],大部分研究主要集中在以单糖和氨基酸为原料来研究美拉德反应^[12],而以烟草废弃物为原料的研究较少。作者是以烟草废弃物为原料来制备美拉德烟用香精,作者以 α -淀粉酶和 β -淀粉酶的复合酶处理烟草废弃物,以复合酶解液为主要碳源,外加氨基酸为氮源,通过美拉德反应制备烟用香精;采用 GC-MS 分析美拉德反应产物的化学成分,并评价其感官效果,以期对烟用香精的制备和烟草废弃物的利用化提供技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

烟草废弃物:由河南省平顶山烟叶示范田提供,50℃烘干,粉碎,过 80 目筛; α -淀粉酶和 β -淀粉酶:南宁庞博生物工程有限公司提供;其他试剂均为分析纯。

FW-400A 倾斜式高速万能粉碎机:北京中兴伟业仪器有限公司产品;98-3 数显磁力搅拌器:郑州凯鹏实验仪器有限公司产品;752N 紫外可见分光光度计:上海精密科学仪器有限公司产品;

Agilent7890A/5975C 气相色谱质谱联用仪:美国安捷伦科技有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 美拉德反应基液的制备 将废弃烟末置于圆底烧瓶中,按照一定料液质量体积比加入柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液,加入 α -淀粉酶和 β -淀粉酶,调节 pH,在适当的温度下电动搅拌反应一段时间。在 5 000 r/min 下离心 30 min,取上清液,旋蒸浓缩。

1.2.2 美拉德反应 在装有温度计、回流冷凝管的烧瓶中依次加入美拉德反应基液、丙二醇与水的混合溶剂 60 mL,用质量分数 10% NaOH 或 6 mol/L HCl 调节 pH,在 115℃下,反应 5 h,反应结束后,在冰水浴中冷却。

1.2.3 还原糖和水溶性总糖的测定 还原糖:参考文献[5]提供的方法;水溶性总糖:DNS 比色法。

1.2.4 美拉德反应产物质量评定

1)褐变程度的测定 取 1 mL 美拉德反应产物使其溶于 10 mL 的蒸馏水中,参比为蒸馏水,在 752N 型紫外分光光度计下测定 420 nm 下的吸光值,吸光值越大,其颜色强度就越大,说明美拉德反应越充分,得到的反应物色泽越好^[6]。

2)风味评价 把制备的 Maillard 反应产物样品装入喷雾器中,喷雾器喷洒到低档次的烟丝上,其中确保喷物量为烟丝质量的 1.5%,把喷洒过的烟丝经过相应处理后,由评吸小组进行感官评吸^[8],对其香气、光泽、协调性、刺激性、余味、杂气 6 项指标进行评吸打分,评分标准如表 1。

1.2.5 GC-MS 分析条件

1)美拉德反应产物醚溶性成分的分离 取 30 mL 美拉德反应的产物,加 15 g NaCl 使其饱和,再分别加入 40、40、20 mL 乙醚,依次萃取,然后用无水硫酸钠干燥,过滤,在旋转蒸发器中浓缩至 1 mL,进行气质联用仪器分析^[7]。

2)色谱检测条件 色谱柱:DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μ m);程序升温:60℃保持 3 min,以 5℃/min 的速度升至 250℃,并保持 20 min;进样温

表 1 各单项指标评分标准

Table 1 Score standard about each single index

评分	香气	光泽	协调性	刺激性	余味	杂气
30~50	较粗糙、淡薄	较暗淡	尚未协调	略有	尚舒适、尚净	略有
50~75	稍粗糙、充实	较油润	较协调	微有	较舒适、较净	微有
75~100	清雅、浓郁	油润	协调	无	舒适、干净	无

度:250 ℃;载气:纯 He,载气流量:1 mL/min;分流比 10:1;进样量为 1 μ L。

3)质谱检测条件 离子源温度:230 ℃;质量扫描范围为 35~500;离子源电子能量:60 eV。MS 谱图:NIST 质谱数据图进行检索。

2 结果与讨论

2.1 单一酶解对还原糖质量体积浓度的影响

由图 1 可看出,酶解液上清液中还原糖的质量浓度随着酶用量的增加而增加,最后趋于平衡。 α -淀粉酶质量分数在 0~0.1%之间时,还原糖的质量浓度随着 α -淀粉酶质量分数的增加而快速增加,在 0.1%~0.2%之间时, α -淀粉酶质量分数增加速率明显没有 0~0.1%的快,当 α -淀粉酶质量分数为 0.2%时,还原糖质量浓度达到最大值,再继续增加 α -淀粉酶用量对还原糖质量浓度几乎没有变化,因此 α -淀粉酶用量的最适区间为 0.1%~0.2%。

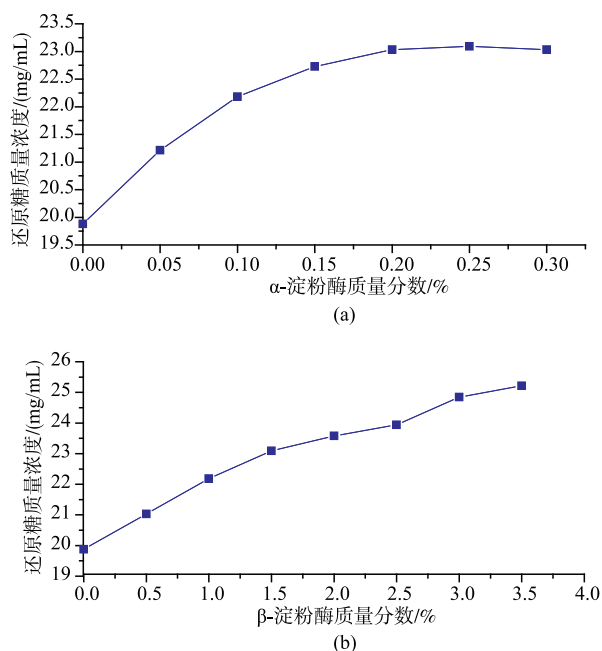


图 1 α -淀粉酶和 β -淀粉酶质量分数对还原糖质量浓度的影响

Fig. 1 Influence of α -Amylase and β -Amylase content on the quality volume concentration of reducing sugar

β -淀粉酶质量分数在 0~2.0%时,还原糖的质量浓度随着 β -淀粉酶质量分数的增加而剧烈增加,当 β -淀粉酶质量分数在 2.0%~3.5%时,还原糖质量浓度虽随着 β -淀粉酶质量分数增加而增加,但增加幅度明显没有 0~2%之间变化的大,仍有增长的

趋势。因此,选择 β -淀粉酶的最适质量分数变化范围为 2%~3%。

2.2 复合酶配比组合的筛选

由图 2 可看出,当双酶复配时,会表现出不同于两种酶的活性,可促进反应,也可抑制反应。整体还原糖的质量体积浓度先随着复合酶用量的增加而增加,增加到最大值,接着还原糖的质量体积浓度随复合酶用量增加又降低。当 α -淀粉酶用量变化时,总体变化趋势是一致的,当 β -淀粉酶质量分数在 2%~3%时,会发现两条曲线几乎是重合的,还原糖的质量浓度成上升趋势,说明在这区间, α -淀粉酶的用量对还原糖的质量浓度影响很小;当 β -淀粉酶质量分数在 3%~4%时,两条曲线完全分开,此时还原糖的质量浓度呈下降趋势, α -淀粉酶质量分数为 0.2%时,还原糖的质量浓度相对高点。综合可得双酶复配组合最佳为:质量分数 0.2% α -淀粉酶+3% β -淀粉酶。

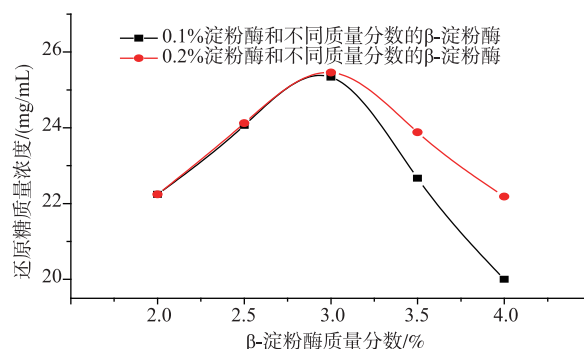


图 2 复合酶质量分数对还原糖质量浓度的影响

Fig. 2 Influence of compound enzyme content on the quality volume concentration of reducing sugar

2.3 复合酶酶解单因素实验分析

将质量分数 0.2% α -淀粉酶和 3% β -淀粉酶对废弃烟末进行酶解,分别考察酶解时间、酶解温度和酶解 pH 对酶解的影响。

2.3.1 酶解温度对复合酶酶解废弃烟末效果的影响 由图 3 可见,酶解液上清液中还原糖质量浓度是先增加至最大值后降低的趋势。在温度由 30 ℃开始升高时,热运动加快,使酶的反应速度加快,温度至 50℃时,这时还原糖的质量浓度达到最大值,继续增加温度,酶的反应速度会快速降低,此时温度过高会使酶蛋白的结构发生变化,导致蛋白酶部分失活,因此复合酶的最适温度为 50 ℃。

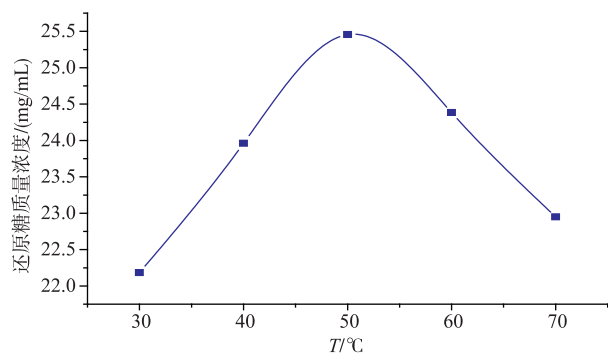


图3 温度对还原糖质量浓度的影响

Fig. 3 Influence of compound enzyme content on the quality volume concentration of reducing sugar

2.3.2 酶解时间对复合酶酶解废弃烟末的影响

由图4可以看出,还原糖的质量浓度总体变化趋势是:先增加最后趋于平衡的。在1~7 h内,说明溶液中有足够的多糖与酶结合,使还原糖质量浓度增加,速度也比较快,随着反应的进行,多糖逐渐消耗,与酶结合量减少,当反应进行到7 h时,还原糖的质量浓度到达最大值,之后缓慢变化,趋于平衡。因此,时间的最佳选择为7 h。

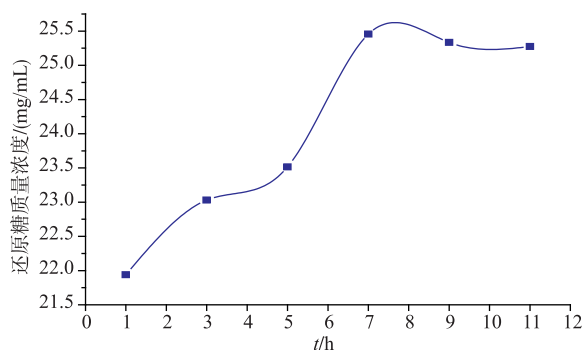


图4 时间对还原糖质量体积浓度的影响

Fig. 4 Influence of reaction time on the quality volume concentration of reducing sugar

2.3.3 酶解 pH 对复合酶酶解废弃烟末效果的影响

由图5可看出,还原糖的质量浓度变化的整体趋势是:随着pH值的增加先增加后降低的。随着pH的增加,酶活性随pH的增加而变大,当pH值增加到5.4时,还原糖的质量浓度达到最大值25.46 mg/mL,此时酶的反应速率也是最快的,随着pH的继续增加,酶催化活性受到抑制,反应速率降低,还原糖的质量体积浓度也有所降低。因此,复合酶的最适pH值为5.4。

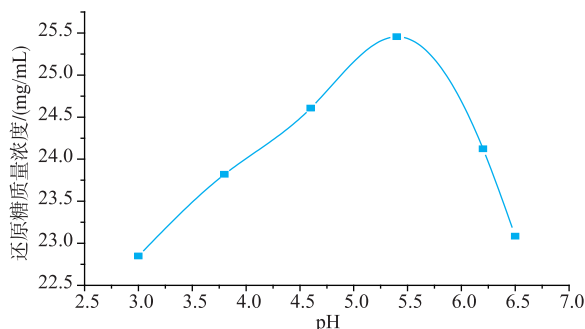


图5 pH对还原糖质量浓度的影响

Fig. 5 Influence of pH on the quality volume concentration of reducing sugar

2.4 美拉德反应工艺的优化

2.4.1 氨基酸种类的确定 根据酶解液中还原糖的质量体积浓度计算出浓缩液中还原糖的质量,采用氨基酸与糖类的摩尔比为1:1进行美拉德反应。各取3 g的L-丙氨酸、L-谷氨酸、L-半胱氨酸、L-胱氨酸、L-苯丙氨酸分别与6.06、3.67、4.46、2.25、3.25 g的复合酶酶解的浓缩液加入圆底烧瓶中,再加入51 mL的1,2-丙二醇与9 mL的蒸馏水,用质量分数10%NaOH或6 mol/L HCl调节pH 7,反应温度为100 °C,在磁力搅拌器中回流5 h。经过相应的处理,测定美拉德反应产物的颜色强度和评吸得分,结果见图6。

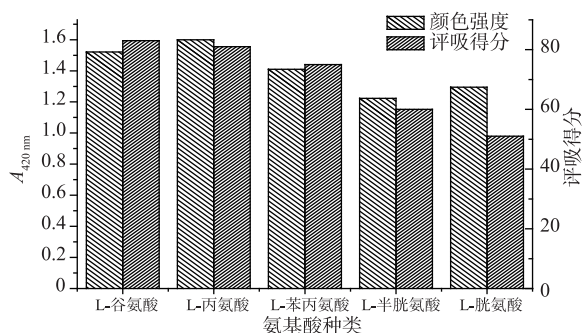


图6 氨基酸的种类对美拉德反应的影响

Fig. 6 Effect of the kind of amino acid on Maillard reaction

氨基酸种类的不同,会使美拉德反应速率不同,其美拉德反应产物的组成与香气特征也不同,由图6可知,L-谷氨酸、L-丙氨酸、L-苯丙氨酸、L-半胱氨酸、L-胱氨酸的颜色强度分别为:1.521、1.6、1.41、1.223、1.295,L-丙氨酸数值最高,说明其反应比其他氨基酸反应充分。评吸得分分别为83、81、75、60、51,虽然L-谷氨酸评吸得分最高,但其反应

程度没有 L-丙氨酸大, 因此选择氨基酸为 L-丙氨酸。

2.4.2 正交试验优化美拉德反应的工艺 试验中, 根据含水量、反应时间、反应温度和 pH 值等因素的影响, 设计正交试验 (如表 2) 在不同条件下合成了一系列新型香料。通过感官评吸和褐变程度, 确定试验的最佳条件。

表 2 3 水平 4 因素 $L_9(3^4)$ 正交表
Table 2 Orthogonal table for $L_9(3^4)$

编号	pH A	温度 B/℃	时间 C/h	反应系含水率 D/%	颜色强度
实验 1	6	85	1	5	0.970
实验 2	6	100	3	15	1.214
实验 3	6	115	5	25	1.575
实验 4	7	85	3	25	1.083
实验 5	7	100	5	5	1.291
实验 6	7	115	1	15	1.402
实验 7	8	85	5	15	1.554
实验 8	8	100	1	25	1.324
实验 9	8	115	3	5	1.295
均值 1	1.253	1.202	1.232	1.185	
均值 2	1.259	1.276	1.197	1.390	
均值 3	1.391	1.424	1.473	1.327	
极差 R	0.138	0.222	0.276	0.205	

由表 2 的数据可知: pH 值、温度、时间、反应系含水率对颜色强度的影响大小。极差的值表现出因素对颜色强度的影响情况, 极差值越大, 说明对颜色强度的影响越深。右表 2 可知, 4 个因素的极差值由大到小分别为: $R_{\text{时间}} > R_{\text{温度}} > R_{\text{反应系含水率}} > R_{\text{pH 值}}$ 。可知时间对美拉德反应影响最深, 其次, 温度, 影响最小的则为 pH 值。

按均值选取最佳水平。通过比较每个因素的 3 个均值大小, 选择均值最大的为最佳水平, 最佳水平为 $A_3B_3C_3D_2$ 。也就是, 美拉德反应的最佳条件为: pH 值为 8、温度 115 ℃、反应时间 5 h、水质量分数为 15%。在此条件下重复进行 3 次试验, 得到颜色强度的平均值为 1.617, 根据卷烟评吸程序得到的评吸得分的平均值为 79。总体来说, 美拉德反应产物的香气比较纯正、干净, 刺激性小。

参考文献:

- [1] PERFETTI T A, RODGMAN A. The complexity of tobacco and tobacco smoke[J]. *Contributions to Tobacco Research*, 2011, 24(5): 215-232.

2.4.3 美拉德反应产物的 GC-MS 分析 酶解烟草废弃物进行美拉德反应得到的产物, 共检测出 100 种物质, 其中与烟草香味有关的化合物有 57 种, 所占的相对百分含量为 71.277%, 如图 7 各种致香成分所占百分比。主要包括吡嗪类、吡咯类、吡啶类、呋喃类、醇类、酸类、呋喃类、酮类、酯类、醛类、酚类、羰基类、芳香族类、烷烃类等, 这些物质大多数由美拉德反应产生的, 作为烟用香精能产生较好的陈烟香, 略带甜香, 烟气细顺。

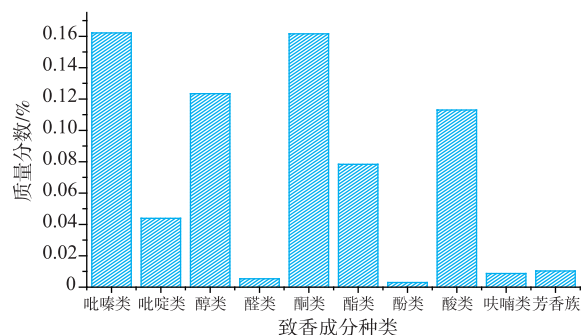


图 7 致香成分质量分数

Fig. 7 Percentage of aroma components

3 结 语

作者以烟草废弃物为原料, 以还原糖得率为指标, 通过单因素试验, 确定酶法制备美拉德反应基液的工艺为: 质量分数 0.2% α -淀粉酶与 3% β -淀粉酶, 温度为 50 ℃, 缓冲溶液 pH 值为 5.4, 反应时间为 7 h, 该条件下还原糖的质量浓度为 25.46 mg/mL。该试验为美拉德反应提供了天然又充足的还原糖, 节省了原料, 使烟草废弃物得到了资源化利用。另外, 利用复合酶酶促水解液和外加氨基酸进行美拉德反应, 通过正交试验确定最佳反应工艺: 外加氨基酸为丙氨酸, pH 值为 8、温度 115 ℃、反应时间 5 h、反应系含水率为 15%。在最佳条件下进行的美拉德反应, 通过 GC-MS 可检测出共检测出 100 种物质, 其中与烟草香味有关的化合物有 57 种, 这些物质具有沁鼻的烘烤味和甜香, 能改善烟草吸食品质, 促进其风味, 对卷烟加香能够起到很好的修饰作用。

- [2] FATHIAZAD F, DELAZAR A, AMIRI R, et al. Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste tobacco leaves[J]. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, 2006, 5(3): 222-227.
- [3] DOCHEVA M, DAGNON S, STATKOVA A S. Flavonoid content and radical scavenging potential of extracts prepared from tobacco cultivars and waste[J]. **Natural Product Research**, 2014, 28(17): 1328-1334.
- [4] WEEK W W. Chemistry of tobacco Constituents in influencing flavor and aroma[J]. **Rec Adv Tob Sci**, 1985, 11(2): 175-200.
- [5] YIN Jianhong, LU Hong, XIE Qiang, et al. A study on rapid colorimetric determination of water soluble total sugar, reducing sugar and starch in tobacco with 3,5-dinitrosalicylic acid [J]. **Journal of Yunnan Agricultural University**, 2007, 22(6): 829-833. (in Chinese)
- [6] AJANDOUZ E H, TCHIAKPE L S, ORE F D, et al. Effects of pH on caramelization and maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems[J]. **Journal of Food Science**, 2001, 66(7): 926-931.
- [7] ZHOU Zhenghong, JIA Zongjian, LI Jing, et al. Study on flavoring effects of maillard reaction products in tobacco[J]. **Journal of Jinan University**, 1999, 20(3): 110-116. (in Chinese)
- [8] XIE Jianping, ZONG Yongli, QU Zhan, et al. Development and application of evaluating method for effect of single flavor on cigarette[J]. **Tobacco Science & Technology**, 2008(4): 5-8. (in Chinese)
- [9] XU Yongjian, ZHAO Rui, TAN Haifeng. Research progress on the comprehensive utilization of tobacco waste [J]. **Journal of Shanxi University of Science & Technology**, 2012, 30(5): 16-21. (in Chinese)
- [10] WANG Yu, NIE Changchun, HU Daming, et al. Research progress on resource utilization of tobacco waste [J]. **Earth and Environment**, 2013, 41(4): 429-432. (in Chinese)
- [11] CHENG chuanling, YANG Yanqin, LIU Shimin et al. Application of maillard reaction products in tobacco industry [J]. **Journal of Zhengzhou University of Light Industry (Natural Science)**, 2014, 29(1): 59-62. (in Chinese)
- [12] ZHANG Duntie, YIN Faqian, RONG Lin et al. Study on the kinetics in the early-stage maillard reaction of the proline-glucose[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(5): 656-659. (in Chinese)

科技信息

日本新开发可以缓解花粉症的功能性保健食品

2018年9月9日,日本爱媛大学与食品制造商“名水冰”共同开发了一款可以缓解花粉症等过敏症状的冰棒。

商品的名称为“W 橘子酸奶冰棒”,将酸奶与清爽柑橘气味相融合,并且使用了4国乳业和伊方服务共同申请的功能性食品“N plus”作为原料。N plus是一种将柑橘果皮和乳制品提取物相组合制成的酸奶,对花粉症等具有抗过敏效果。

[信息来源]食品伙伴网. 日本新开发可以缓解花粉症的功能性保健食品 [EB/OL]. (2018-9-9). <http://news.foodmate.net/2018/09/484022.html>

加拿大批准一种源自里氏木霉的脂肪酶用于面包等产品

2018年9月6日,加拿大卫生部发布NOM / ADM-0123号文件,修订允许使用的食物酶列表,批准来自里氏木霉RF10625菌株(*Trichoderma reesei* RF10625)的脂肪酶(Lipase)作为食品酶,用于面包、面粉、全麦面粉和非标准化烘焙产品等产品中,限量标准均为按照良好生产规范适量使用。

[信息来源]厦门WTO工作站. 加拿大批准一种源自里氏木霉的脂肪酶用于面包等产品 [EB/OL]. (2018-9-10). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn>