

密集烘烤烤烟细胞壁主要成分及降解酶变化研究

霍开玲¹, 宋朝鹏^{1,2}, 张卫建², 武圣江¹, 余金恒³, 宫长荣¹

(1. 河南农业大学 烟草学院, 河南 郑州 450002; 2. 南京农业大学 农学院, 江苏 南京 210095;
3. 百色市烟草公司, 广西 百色 533000)

摘要: 采用河南农业大学设计制造的电热式温湿自控密集烤烟箱, 研究了烘烤过程中烟叶细胞壁主要成分及其酶活性变化。结果表明, 密集烘烤条件下细胞壁成分中可溶性果胶含量先升后降, 原果胶含量、纤维素含量持续降低。细胞壁降解酶活性随着烘烤过程的进行而升高, 在 48℃ 达到峰值后迅速降低。其中果胶甲酯酶(PE)和多聚半乳糖醛酸酶(PG)关系密切, 共同促进果胶降解; 纤维素酶主要是促进纤维素降解。细胞壁组分的降解是细胞壁降解酶综合作用的结果。

关键词: 密集烘烤; 烤烟; 果胶; 纤维素; 细胞壁降解酶

中图分类号: S572 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0166-04

The Study on the Changes Cell Wall Components and Degrading Enzyme Activities in Flue-cured Tobacco during Bulk Curing Process

HUO Kai-ling¹, SONG Zhao-peng^{1,2}, ZHANG Wei-jian²,
WU Sheng-jiang¹, YU Jin-heng³, GONG Chang-rong¹

(1. College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Agronomy, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Baise Tobacco Company of Guangxi Province, Baise 533000, China)

Abstract: The changes of main components of flue-cured tobacco cell walls and the activities of the cell wall degrading enzyme during flue-curing were researched by using the electric-heated flue curing barn designed and made by Henan Agricultural University. The contents of soluble pectin increased at first and then decreased while the contents of protopectin and cellulose decreased continuously during the bulk curing process. The activities of the cell wall degrading enzyme increased following with the process of flue-curing. The activities decreased after reaching to the peak value 48℃. The activities of pectinesterase(PE) was closely related with polygalacturonase(PG). The interaction of PE and PG promoted the degradation of pectin. The action of Cellulase was mainly promoted the cellulose's degradation. The degradation of cell wall components resulted from the synthetic action of the cell wall degrading enzyme.

Key words: Bulk curing; Flue-cured tobacco; Pectin; Cellulose; Cell wall-degrading enzyme

烟草细胞壁物质是构架性碳水化合物, 主要包括纤维素、半纤维素、木质素和果胶等成分, 占烤烟烟叶干物质质量的 26% ~ 35%^[1]。细胞壁物质含量与烟叶部位、颜色、厚度和烟叶油分等品质因素密切相关^[1]。研究表明, 以细胞壁物质存在的碳水化合物在卷烟燃吸时会产生不良影响, 特别是低次烟叶中纤维素、半纤维素、木质素和果胶含量较高, 还原糖和可溶性总糖含量较低, 致使烟叶刺激性强、青

杂气重、吸味辛辣、涩口, 从而使烟叶的香气不能充分显露^[2,3]。烟叶调制是烟叶生产的关键技术环节, 调制过程中各阶段的温湿度条件对烟叶的外观特征和内部物质转化都有很大影响。细胞壁物质在烘烤过程中的变化状况对烟叶烘烤品质产生重要影响^[4]。然而迄今为止, 有关烟叶细胞壁物质降解规律的研究多集中在发酵和初加工过程^[5-7], 在密集烘烤条件下的降解规律及其降解酶活性变化的研究

收稿日期: 2010-07-21

基金项目: 国家烟草专卖局资助项目(110200302007); 河南省烟草专卖局资助项目(HYKJ200701)

作者简介: 霍开玲(1985-), 女, 河南信阳人, 在读硕士, 主要从事烟草调制生理研究。

通讯作者: 宫长荣(1948-), 男, 河南荥阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事烟草调制与加工研究。

尚不多见。本研究就此进行了研究,旨在探讨烘烤过程中细胞壁主要成分和关键酶活性的变化规律,为通过烘烤工艺调控烟叶内含物质变化,实现烘烤工艺的优化提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验于 2007—2008 年进行。试验材料取自于河南省宜阳县,试验田土壤质地为红粘土,土壤肥力中等。供试烤烟品种为中烟 100,5 月 5 日移栽,种植行距 120 cm,株距 50 cm。土壤碱解氮 49.52 mg/kg,速效磷 6.8 mg/kg,速效钾 145.31 mg/kg,pH 8.49。施纯氮 45.0 kg/hm²,N:P₂O₅:K₂O=1:2:3。田间管理按优质烤烟栽培生产技术规范进行。以中部烟叶(第 11~12 位叶)为试验材料,成熟采收。

1.2 烘烤处理

采用河南农业大学设计的电热式温湿自控密集烤烟箱以三段式烘烤工艺正常烘烤。装烟密度为 70 kg/m³。分别于烤前(以 30℃ 表示)及烘烤开始后干球温度刚升到 38、42、48、54℃ 和烤后(以 68℃ 表示)随机取样。切去叶尖和叶基,留叶中部。一份用于生理生化指标的测定。另一份于烘箱中 105℃ 下杀青 5 min,然后在 60℃ 下烘干、粉碎,过 250 μm 筛,用于细胞壁成分的测定。

1.3 测定项目和方法

1.3.1 细胞壁主要成分含量的测定 原果胶含量和可溶性果胶含量的测定采用咔唑比色法^[8],纤维素含量测定采用容量法^[9]。略有改进:取研细的烟样 1 g 加 2% 的盐酸 150 mL 放入 250 mL 磨口烧瓶中,回流冷凝 4 h;取下烧瓶后用烧结玻璃漏斗抽滤,用蒸馏水洗涤残渣至无 Cl⁻ 为止(用银离子检验),弃去滤液。将残渣全部移入烧杯中,加 80% 浓硫酸 150 mL,摇匀,静置 3 h,使纤维素全部溶解,沿烧杯壁慢慢加入蒸馏水 200 mL,置 80℃ 水浴上加热 5 h,其间搅拌数次,并适当补充水量,冷却后定容至 1 000 mL。取干洁试管 2 支,分别加入样品水解液 1 mL、5% 的酚溶液 1 mL,摇匀后快速加入 80% 硫酸 5 mL,摇匀后放置 10 min,然后再于 25℃ 水浴保温 20 min,取出于 490 nm 下比色,记录 OD 值。对照标准曲线查出还原糖(mg)含量,根据纤维素含量(mg/g)=还原糖含量(mg)×样液稀释倍数×0.9/样品重量(g)求出纤维素含量。

1.3.2 细胞壁降解酶活性测定 称 0.5 g 烟叶用 10% 的 NaCl 研磨,过滤,离心,调上清液的 pH 为 3~4,另外在残渣中加少量水,洗去不溶物质,然后再用

NaCl 提取,离心,合并提取液。取上清液用于 PE 和 PG 活性测定。测定方法按照汤章程^[10]的方法。其中 PE 以在 30 min 内释放出 1 mmol 的 CH₃O⁻ 定为一个 PE 酶活力单位(U),结果以 U/mg 蛋白质表示;PG 以每小时释放 1 mmol 的还原基定为一个酶活力单位(U),结果以 U/mg 蛋白质表示;称 0.5 g 烟叶加入 16 mL 40 mmol/L(pH 5.2)的醋酸钠缓冲液,内含 NaCl 100 mmol/L,2% (V/V) 巯基乙醇和 5% (W/V) PVP (K-30),冰浴研磨 25 000 × g 冷冻(2℃)离心 20 min,取上清液用于纤维素酶活性测定。测定方法采用 DNS 显色法^[11]。定义在 pH 值为 5.0 40℃ 条件下每分钟水解 CMC 释放出 1 μg 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活单位(U),结果以 U/mg 蛋白质表示。

1.3.3 烟叶可溶性蛋白质 采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[12]测定,以牛血清蛋白做标准曲线。

以上各指标测定均重复 3 次。

1.3.4 数据分析 采用 SPSS16.0 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 烘烤过程中果胶酶活性及果胶含量变化

2.1.1 果胶酶活性变化 PE 作用于半乳糖醛酸 C-6 羧基上的甲醇基,破坏多聚半乳糖醛酸链间钙的横向联接而导致细胞分离,使果胶降解^[13]。PG 以脱甲醇基的多聚半乳糖醛酸为作用对象,因此 PE 的活动可能是 PG 活动的必要前提^[14]。PE(以鲜质量计)随着烘烤过程的进行而变化,先上升至峰值后快速下降。PE 酶活在 48℃ 之前呈较快上升趋势,48℃ 时活性最高之后迅速下降(图 1);PG 是主要的细胞壁水解酶之一,其变化趋势和 PE 基本一致,在 48℃ 之前呈上升趋势,在 48℃ 达到峰值后快速下降(图 1)。相关分析表明:PE 与 PG 呈极显著正相关($P < 0.01$)。

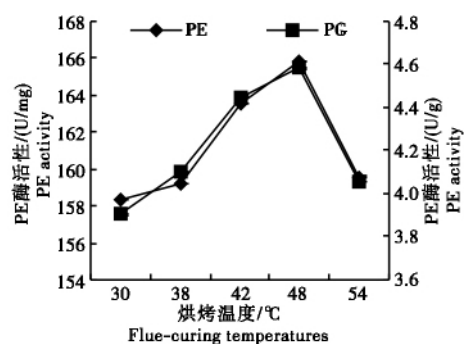


图 1 烘烤过程烟叶 PE 和 PG 酶活性

Fig. 1 Activities of PE and PG in tobacco leaves during the flue-curing process

2.1.2 果胶含量变化 果胶是细胞壁中胶层的主要

组分,含量过高会导致卷烟焦油量升高。由图 2 可知,可溶性果胶在 48℃ 之前含量上升,在 48℃ 达到峰值之后持续下降。整个烘烤过程中可溶性果胶含量由 2.376% 减少到 2.315%;原果胶主要存在于细胞壁的初生壁中,在稀酸和原果胶酶的作用下可转变为可溶性果胶^[15]。由图 2 可知,原果胶含量在 42℃ 之前缓慢降低,在 42~48℃ 的温度段迅速降低,之后保持不变。原果胶含量在烘烤过程中由 2.562% 降至 2.074%。

总果胶含量是可溶性果胶含量与原果胶含量的总和,能够更好地表述果胶含量的变化。从图 2 可以看出总果胶含量总体趋势降低,从烘烤开始至升温到 42℃ 时有所升高,随后迅速下降。烟叶总果胶

含量在烘烤过程中由 4.938% 下降到 4.389%。

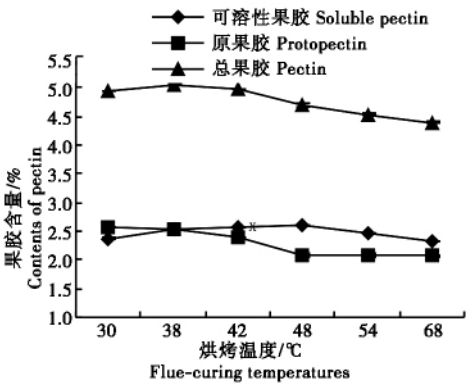


图 2 烘烤过程中烟叶果胶含量的变化
Fig. 2 Changes of pectin content in tobacco leaves during the flue-curing process

表 1 烘烤过程中细胞壁主要成分含量及降解酶活性的相关分析

Tab 1 Correlation between carotene and enzyme activities in tobacco leaves during the flue-curing process

项目 Item	纤维素 Cellulose	纤维素酶 Cellulase	PE	PG	可溶性果胶 Soluble pectin	原果胶 Protopectin	总果胶 Pectin
纤维素 Cellulose	1						
纤维素酶 Cellulase	-0.251	1					
PE	-0.427	0.932*	1				
PG	-0.378	0.979**	0.986**	1			
可溶性果胶 Soluble pectin	0.187	0.947*	0.824	0.900*	1		
原果胶 Protopectin	0.990**	-0.332	-0.517	-0.464	0.089	1	
总果胶 pectin	0.940**	0.038	-0.210	-0.123	0.498	0.908*	1

注: ** . 表示 0.01 的显著水平; * . 表示 0.05 的显著水平。 Note: ** . Significantly at 0.01 level; * . Significantly at 0.05 level.

2.2 烘烤过程中纤维素酶活性及纤维素含量变化

纤维素是烤烟细胞壁的主要成分,对卷烟吸食品质有重要影响。纤维素含量过多时,烟叶组织粗糙,容易破碎,并且燃烧后产生呛人的气味。由图 3 可知,烘烤过程中烟叶纤维素酶活变化动态呈先上升后下降的趋势。在 42℃ 之前纤维素酶活性快速上升,42~48℃ 维持在较高的水平,之后快速下降。烟叶纤维素含量在烘烤过程中呈降低趋势,且在 42~54℃ 纤维素含量下降迅速。在整个烘烤过程中,烟叶纤维素含量(以鲜质量计)从 236.454 mg/g 降至 194.632 mg/g。

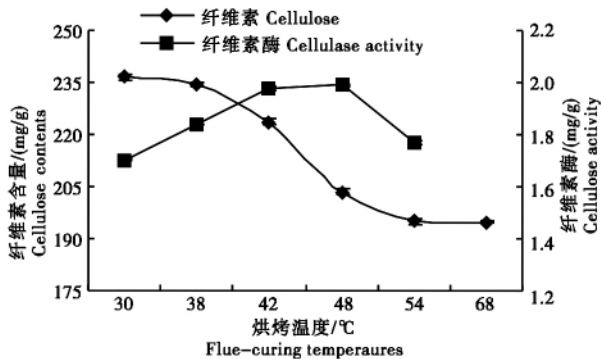


图 3 烘烤过程中烟叶纤维素含量和纤维素酶活性的变化
Fig. 3 Changes of cellulose content and cellulase activity in tobacco leaves during the flue-curing process

3 讨论

3.1 细胞壁酶活性变化规律

酶活性变化与烘烤温湿度密切相关^[16]。试验结果表明:在 42~48℃ 之间 PE 和 PG 酶活性较高,在此过程中果胶降解较为迅速,说明果胶酶活性与果胶降解密切相关^[17]。相关分析表明:PE 和 PG 呈极显著正相关,说明 PE 和 PG 关系密切,共同促进果胶降解。可溶性果胶和 PG 呈显著正相关,可能是在定色中期以前由于 PE 和 PG 把原果胶降解为可溶性果胶所致。纤维素酶在 42~48℃ 的烘烤过程中活性较高,而此期纤维素含量则下降较快,说明纤维素酶促进纤维素的降解可能在变黄后期和定色前期起重要作用。纤维素酶与 PG 呈极显著正相关,表明二者在细胞壁物质降解中关系密切;纤维素酶与 PE 呈显著正相关,说明在烘烤过程中烟叶细胞壁物质降解是细胞壁降解酶综合作用的结果^[18]。

3.2 细胞壁主要成分变化规律

烘烤变黄后期和定色期是果胶含量、纤维素含量变化最剧烈的阶段,也是烟叶内干物质转化的关键时期^[19]。在 30~48℃ 的烘烤过程中烟叶原果胶含量降低和可溶性果胶含量升高是同步进行的,由此推测此阶段的原果胶可能向可溶性果胶转变^[20]。

在 48℃ 以后原果胶基本保持不变而可溶性果胶快速下降,说明 PE 或 PG 在 48℃ 以前主要是促进原果胶的降解,在 48℃ 以后则主要是促进可溶性果胶的降解。纤维素含量在变黄后期和定色前期迅速降低,使细胞壁“经纬结构”^[21]松散,果胶在此期也快速降解使细胞壁中胶层溶解,而此期烟叶勾尖卷边、失水 40% 左右^[22],说明细胞壁物质降解有可能是引起烟叶变软塌架的主要原因之一。原果胶、总果胶与纤维素呈极显著正相关,说明原果胶、总果胶与纤维素含量的变化趋势总体一致,细胞壁物质的降解不仅与果胶降解有关还与纤维素结构变化有关^[23]。变黄期烟叶黄色的固定以变黄为基础通过失水干燥实现。细胞壁物质解体,使烟叶细胞质体和膜结构的破坏变得容易^[22],导致细胞内区间结构被破坏,若湿球温度控制不当,烟叶内充足的水分、各种物质、酶类和自由出入细胞的氧气混杂在一起,会加快酶促棕色化反应导致烟叶褐变。因此此期烟叶水分控制显得尤为重要,充分协调变黄和干燥是提高烟叶烘烤质量的关键^[24]。

根据细胞壁降解酶在烘烤中的变化规律,在 42℃ 适当延长烘烤时间,使细胞壁酶活性保持在较高水平,促进细胞壁物质充分降解,从而提高烟叶的品质和可用性。为进一步探讨如何优化调控烘烤工艺提供思路。通过试验发现,细胞壁物质降解是细胞壁降解酶综合作用的结果,而引起烟叶细胞壁结构和组分变化的深层原因还有待进一步研究。

4 结论

烘烤过程中 PE 和 PG 关系密切,共同促进果胶降解。纤维素酶促进纤维素降解。烘烤过程中可溶性果胶含量先升后降,原果胶含量、纤维素含量持续降低。细胞壁成分的降解及结构的改变,引起烟叶发软塌架。因此在烘烤过程中要特别重视温湿度的调控,在 42℃ 适当延长烘烤时间,使细胞壁降解酶保持较高活性,促进细胞壁物质降解,同时又要适时排湿,防止烟叶发生褐变,从生理意义上提高烟叶品质和可用性。

参考文献:

- [1] 李兴波, 闫克玉, 闫洪洋, 等. 河南烤烟(40 级)细胞壁物质含量及规律性研究[J]. 郑州轻工业学院学报, 1999, 14(3): 27-30.
- [2] D Layten Davis, Mark T Nielsen. 烟草—生产, 化学和技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 255-257.
- [3] Schlotzauer W S. Pyrolytic studies on the contribution of tobacco leaf constituents to the formation of some catechols[J]. Agric. Food Chem, 1982, 30: 372-274.
- [4] Bacon C W, Wenger R. Chemical changes in tobacco during flue-curing[J]. Ind Eng Chem, 1952 (44): 292.
- [5] 邓国宾, 李雪梅, 李成斌, 等. 降果胶菌改善烟叶品质研究[J]. 烟草科技, 2003(11): 17.
- [6] 闫克玉, 闫洪洋, 李兴波, 等. 烤烟烟叶细胞壁物质的对比分析[J]. 烟草科技, 2005(10): 6-11.
- [7] 周元清, 周丽清, 章新, 等. 用生物技术降解木质素提高烟梗使用价值初步研究[J]. 玉溪师范学院学报, 2006, 6(22): 61-63.
- [8] 韩雅珊. 食品化学实验指导[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 32-33.
- [9] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 45-48.
- [10] 汤章程. 现代植物生理学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 12.
- [11] [德]B. 施特马赫著, 嘉渊译. 酶的测定方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 104-107.
- [12] 李合生, 孙群, 赵世杰. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 184-185.
- [13] Fischer R L, Bennett A B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1991, 42: 175-703.
- [14] Dahodwalas, HumPhrey A, Weibel M. Pectic enzymes—individual and concerted kinetic behavior of pectinesterase and pectinase[J]. Jour Food Sci, 1974, 39: 920-926.
- [15] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 93-112.
- [16] 王怀珠, 杨焕文, 郭红英. 烘烤条件对烤烟淀粉降解及相关酶活性的影响[J]. 中国烟草学报, 2005, 11(5): 35-38.
- [17] Ketsa S, Daengkanit T. Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase, β -galactosidase and cellulase in ripening durian harvested at different stages of maturity[J]. Sci Hortic, 1999, 80: 181-188.
- [18] 赵博, 饶景萍. 柿果实采后胞壁多糖代谢及其降解酶活性的变化[J]. 西北植物学报, 2005, 25(6): 1199-1202.
- [19] 肖波, 陈建军, 吕永华, 等. 采收方法对烤烟植株上部叶烘烤特性的影响[J]. 植物生理学通讯, 2008, 44(2): 221-224.
- [20] 罗自生. 柿果实采后软化过程中细胞壁组分代谢和超微结构的变化[J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31(6): 651-656.
- [21] 茅林春, 张上隆. 果胶酶和纤维素酶在桃果实成熟和絮败中的作用[J]. 园艺学报, 2005, 28(2): 107-111.
- [22] 官长荣. 烟草调制学[M]. 郑州: 中国农业出版社, 2003: 192-195, 217-219.
- [23] Seymour G B, Gross K C. Cell wall disassembly and fruit softening[J]. Postharvest News Infarm, 1996, 7(3): 45-52.
- [24] 官长荣, 王能如, 汪耀富. 烟叶烘烤原理[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 127-129.