

响应面分析法优化处理烟叶模块用酶配方的研究

李季刚¹, 潘连华¹, 普元柱^{2*}, 包秀萍², 王松峰², 李 仙²

(1. 广西中烟工业有限责任公司 技术中心, 广西 南宁 530001; 2. 云南瑞升烟草技术(集团)有限公司, 云南 昆明 650106)

摘要: 为降解烟叶模块中的淀粉和蛋白质, 以酶处理后烟叶模块的感官评吸得分为评价指标, 采用响应面分析法优化了酶处理烟叶模块的最佳酶用量。结果表明: 最佳酶用量为淀粉酶 16 U/g、糖化酶 130 U/g、风味蛋白酶 68 LAPU/g。此条件下处理后的烟叶模块感官评吸得分为 59.50, 与预测值 59.27 相近, 说明响应面回归模型可靠。处理后的烟叶模块淀粉和蛋白质有所降解, 降解率分别为 24.47% 和 13.13%, 感官抽吸品质明显改善。

关键词: 酶; 烟叶模块; 淀粉; 蛋白质; 响应面分析法

中图分类号: S572 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)02-0050-04

Research on Optimizing Enzyme Formula for Treating Tobacco Leaf Module by Response Surface Methodology

LI Ji-gang¹, PAN Lian-hua¹, PU Yuan-zhu^{2*}, BAO Xiu-ping², WANG Song-feng², LI Xian²

(1. Technology Center of China Tobacco Guangxi Industrial Co., Ltd., Nanning 530001, China;

2. Yunnan Reascend Tobacco Technology (Group) Co., Ltd., Kunming 650106, China)

Abstract: In order to reduce the contents of starch and protein in tobacco leaf module and to improve the smoking quality, the best dose of enzyme added in tobacco leaf module was studied by response surface methodology with the sensory evaluation scores as the evaluation index. The results showed that optimum contents of amylase, glucoamylase and flavored proteinase were 16 U/g, 130 U/g and 68 LAPU/g, respectively. After such optimum treatment, the sensory evaluation score reached to 59.50, very close to the predictive value of 59.27, which revealed the validity of the regression equation. Moreover, the content of starch and protein in tobacco leaf module respectively decreased by 24.47% and 13.13%, and the sensory characters were obviously enhanced.

Key words: enzyme; tobacco leaf module; starch; protein; response surface methodology

酶在改善烟叶抽吸品质方面具有非常重要的作用^[1-3]。近年来, 就如何有效地利用酶制剂来调控和加速烟叶的内在成分向有利于提高卷烟质量方面转化, 国内外做了大量的研究工作并取得了一定的成果, 但在工业上却一直未得到广泛应用^[4]。其中一个原因在于, 这些研究工作主要集中在采用酶制剂改善单一等级烟叶原料, 而通常一个卷烟产品的叶组配方是由多个不同类型、等级、地区和年份的原料组成, 若对配方中用到的原料分别做酶降解处理, 势必增加工业成本。因此, 从单一原料处理转向模块化处理更容易实现工业上的应用。

卷烟分组加工技术的提出和实现, 为酶在卷烟工业上的应用提供了可行条件。卷烟分组加工技术是指对配方中不同烟叶原料以化学成分和单料烟感官质量评吸为依据确定模块组合, 再对不同模块有针对性地制定合适的加工方式, 一方面最大限度地保留原料原有的优异品质, 另一方面有效去除原料本身的不良因素, 以充分突出产品的个性特征, 生产出满足消费者需求且具有市场竞争力的高品质卷烟产品^[5-7]。为了更好地与卷烟工艺相结合, 实现酶降解技术在卷烟工业中的应用, 本研究首次以某牌号卷烟配方中的一个模块为原料, 以对卷烟吸食品质

收稿日期: 2012-08-31

作者简介: 李季刚(1978-), 男, 广西容县人, 助理工程师, 本科, 主要从事卷烟配方研究技术工作。E-mail: hnqbxcd@126.com

* 通讯作者: 普元柱(1984-), 男, 云南玉溪人, 助理工程师, 硕士, 主要从事烟用香料研究。E-mail: pyz-2004@163.com

有不良影响的淀粉和蛋白质为降解目标,结合其工艺处理条件,通过响应曲面分析法优化酶处理配方,探讨酶制剂对模块中淀粉和蛋白质含量的影响,以期酶制剂在卷烟工业中的应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

烟叶模块由湖南邵阳烟叶上部橘黄二级(B_2F)、中部橘黄三级(C_3F),云南昭通烟叶上部橘黄三级(B_3F)、中部橘黄三级(C_3F)、中部橘黄四级(C_4F),贵州烟叶上部橘黄二级(B_2F)、中部橘黄三级(C_3F)等按一定比例组成。主要试剂包括淀粉酶(酶活性为10 000 U/g,夏盛实业集团有限公司)、糖化酶(酶活性为100 000 U/g,杰诺生物酶有限公司)、风味蛋白酶(酶活性为1 000 LAPU/g,丹麦诺维信生物制品有限公司)。其中,1 LAPU指1 min水解1 mmol L-亮氨酸-对硝基苯胺所需要的酶量。

1.2 仪器与设备

添加剂加料设备(自制)、Binder KBF240 恒温恒湿箱(德国,宾德)、填烟器(德国 GIZEH 金字塔填烟器)、电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)、AA3 连续流动化学分析仪(德国 BRAN + LUBBE)等。

1.3 试验方法

1.3.1 酶配方响应面试验设计 通过单因素试验筛选及参考文献[8-9],选取淀粉酶用量(X_1)、糖化酶用量(X_2)、风味蛋白酶用量(X_3)作为响应曲面法考察因素。以1、0、-1代表其高、中、低水平,以处理效果 Y (酶处理后烟叶模块的感官评吸得分)为响应值,根据 Box-Behnken 原理,设计三因素三水平15个试验组合(3个中心试验)的响应面分析试验。各响应因子的试验水平见表1。

表1 酶配方响应面试验因素水平

水平	因素		
	$X_1/(U/g)$	$X_2/(U/g)$	$X_3/(LAPU/g)$
-1	10	60	60
0	20	120	75
1	30	180	90

1.3.2 酶的施加及酶解条件 称取一定量混合好的烟叶模块,然后按表1的试验方案取一定量的酶制剂配方溶液,用自制加料设备以加料方式均匀喷加到试验烟叶模块上,把烟叶放入恒温恒湿箱中,将相对湿度调至 $60\% \pm 5\%$,温度为 $(30 \pm 2)^\circ C$,模拟卷烟在线工艺处理6 h。处理后的烟叶在 $120^\circ C$ 条件下灭活,切丝,备用。

1.3.3 感官评价指标及量化方法 感官评价指标及量化方法参照标准 YC/T138-1998 及文献[10]。卷烟评吸专家小组由10人组成,分别对处理后烟叶模块的香气质、香气量、杂气、浓度、劲头、刺激性、余味、燃烧性和灰色共9个单项指标进行打分(每个单项的分值为1~9分,9个单项总分为81分),然后计算单项平均分,精确至0.01。感官质量评吸得分以各单项平均得分之和表示,精确至0.01。

1.3.4 烟叶化学成分测定方法 常规化学成分采用连续流动分析仪检测,总糖、还原糖含量测定依据烟草行业标准 YC/T 159-2002 进行,总植物碱、总氮、淀粉、蛋白质、挥发碱含量测定分别依据烟草行业标准 YC/T 160-2002、YC/T 161-2002、YC/T 283-2009、YC/T 249-2008、YC/T 35-1996 进行;石油醚提取物依照 YC/T 176-2003 检测;总挥发酸依照文献[11]的方法测定。

2 结果与分析

2.1 酶配方响应面试验结果

根据 Box-Behnken 设计原理,进行三因素三水平的试验方案设计,试验结果见表2,其中,试验号1-12是析因试验,试验号13-15是中心试验。析因试验为自变量取值在 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维顶点;中心试验为区域的中心点,重复3次,用以估计试验误差。

表2 酶配方响应面试验方案及结果

试验号	X_1	X_2	X_3	Y
1	-1	-1	0	52.50
2	+1	-1	0	56.21
3	-1	+1	0	52.92
4	+1	+1	0	52.36
5	-1	0	-1	53.90
6	+1	0	-1	53.06
7	-1	0	+1	55.44
8	+1	0	+1	54.18
9	0	-1	-1	58.38
10	0	+1	-1	54.74
11	0	-1	+1	54.88
12	0	+1	+1	56.14
13	0	0	0	58.66
14	0	0	0	58.94
15	0	0	0	59.22

2.2 感官评分模型的建立及其显著性检验

利用 Design-Expert 7.16 软件对表2试验数据进行多元回归拟合,得到感官评吸得分(Y)对淀粉酶用量(X_1)、糖化酶用量(X_2)、风味蛋白酶用量(X_3)的二次多项回归模型为:

$$Y = 58.94 - 0.73X_1 + 0.73X_2 - 0.52X_3 - 1.07X_1X_2 + 1.22X_1X_3 - 0.11X_2X_3 - 1.78X_1^2 - 3.67X_2^2 - 1.13X_3^2$$

通过对上述回归方程进行方差分析,验证回归模型及各参数的显著度,结果见表 3。由方差分析可知:模型的 F 值为 138.99, $P=0.0001 < 0.01$,表明试验所采用的二次模型是极显著的,在统计学上有意义。失拟项用来表示模型与试验拟合的程度,即二者差异的程度,本试验中失拟项的 P 值为 $0.6483 > 0.05$,表明该模型失拟因素不显著;模型调整后的决定系数 $R_{\text{Adj}}^2 = 0.9889$,大于 90%,说明模型拟合程度良好,试验误差小,该模型是合适的,因此,可用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析。

由表 3 各项的 P 值可知,一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 差异极显著 ($P < 0.01$),说明淀粉酶用量、糖化酶用量、风味蛋白酶用量对感官评吸得分的影响是极显著的。交互项 X_1X_2 、 X_1X_3 差异极显著 ($P < 0.01$),说明淀粉酶与糖化酶,以及淀粉酶与风味蛋白酶的交互项对感官评吸得分有极显著影响;交互项 X_2X_3 差异不显著 ($P > 0.05$);二次项 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 均达极显著水平 ($P < 0.01$)。

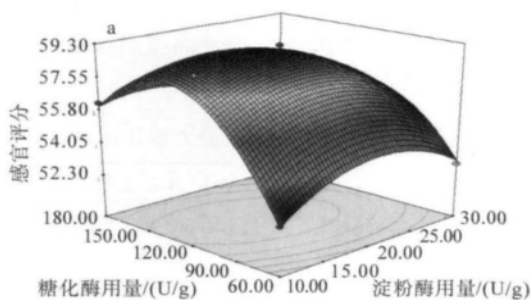


表 3 酶配方响应面试验结果的方差分析

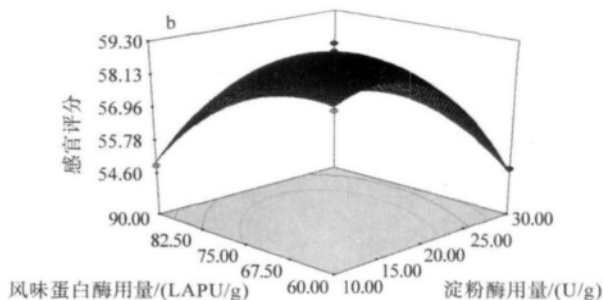
方差来源	总和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	81.22	9	9.02	138.99	0.0001	**
X_1	4.22	1	4.22	64.99	0.0005	**
X_2	4.22	1	4.22	64.99	0.0005	**
X_3	2.20	1	2.20	33.96	0.0021	**
X_1X_2	4.56	1	4.56	70.21	0.0004	**
X_1X_3	6.00	1	6.00	92.45	0.0002	**
X_2X_3	0.04	1	0.04	0.68	0.4474	
X_1^2	11.65	1	11.65	179.43	0.0001	**
X_2^2	49.63	1	49.63	764.42	0.0001	**
X_3^2	4.70	1	4.70	72.46	0.0004	**
残差	0.32	5	0.07			
失拟项	0.17	3	0.06	0.71	0.6483	
纯误差	0.16	2	0.08			
总和	81.54	14				

$$R^2 = 0.9960 \quad R_{\text{Adj}}^2 = 0.9889$$

注: *、** 分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$,即模型或考察因素有显著、极显著影响; R^2 和 R_{Adj}^2 分别表示模型的决定系数和模型调整后的决定系数。

2.3 最佳酶用量的确定和试验验证

利用 Design-Expert 7.16 软件对数据进行处理,得到酶配方与烟叶模块感官评吸的响应面三维图(图 1)。从图 1 可直观地看出,淀粉酶、糖化酶和风味蛋白酶对烟叶模块感官评吸得分的影响均存在 1 个极值点,对响应值的影响不是简单的线性关系。



a. 淀粉酶和糖化酶交互作用; b. 淀粉酶和风味蛋白酶交互作用

图 1 酶配方与烟叶模块感官评吸的响应曲面

对二次多项式回归方程求解,得当 $X_1 = -0.41$ 、 $X_2 = 0.17$ 、 $X_3 = -0.46$ 时, Y 有最大值 59.27,即当淀粉酶用量为 15.86 U/g、糖化酶用量为 129.97 U/g、风味蛋白酶用量为 68.01 LAPU/g 时,处理得到的烟叶模块感官抽吸品质最好。微调淀粉酶用量为 16 U/g、糖化酶用量为 130 U/g、风味蛋白酶用量为 68 LAPU/g,进行最佳酶用量处理工艺验证试验,得到处理后的烟叶模块感官评吸得分为 59.50,与模型预测值 59.27 相差较小,从而验证了二次响应面回归模型的有效性。

感官质量评吸发现,处理后的烟叶模块烟气醇

和细腻,甜润感增加,生青杂气去除,刺激降低,余味改善,抽吸舒适性明显提升,特别是烟气甜润感显著提升。

2.4 最佳酶用量处理对模块化学成分的影响

采用试验中得到的最佳酶用量条件,将淀粉酶、糖化酶、风味蛋白酶分别按 16 U/g、130 U/g、68 LAPU/g 用量复配后,以加料方式均匀地喷加到 200 g 试验烟叶模块上,按 1.3.2 的条件进行酶处理,之后对烟叶模块化学成分进行分析(表 4)。由表 4 可知,烟叶模块经酶处理后,其淀粉和蛋白质有

所降解,降解率分别为 24.47%和 13.13%;此外,总糖、还原糖、挥发酸、石油醚提取物提升率分别达到

6.98%、6.31%、13.95%和 2.39%,烟碱、总氮、挥发碱含量有一定降低。

表4 最佳酶用量处理的烟叶模块化学成分

%

样品	总糖	还原糖	烟碱	总氮	淀粉	蛋白质	挥发酸	挥发碱	石油醚提取物
空白样品	21.20	19.50	3.63	2.07	4.25	5.71	0.43	0.26	5.03
处理样品	22.68	20.73	3.18	1.84	3.21	4.96	0.49	0.24	5.15

注:空白样品和处理样品分别表示未经酶处理和经最佳酶用量处理的烟叶模块。

3 结论与讨论

烟叶发酵是改善烟叶香味品质、提高烟叶可用性的重要环节,是卷烟工业中提高产品质量的一种初加工方法。目前,普遍认为烟叶发酵是由酶、化学氧化和微生物三者协同作用完成的^[4]。利用酶促反应来改善烟叶发酵质量的研究较多,主要集中在改善单一等级烟叶原料方面,但在工业应用上较为复杂^[12]。针对这一问题,本研究在卷烟叶组配方的基础上,将不同等级烟叶原料按卷烟叶组配方方式组合成烟叶模块,从而将各等级烟叶原料特点进行互补协调,凸显部分原料的香气特征,集中各等级原料的缺陷并进行有针对性的提质处理。与现有的针对单一等级烟叶原料分别处理的方法相比,模块化处理的次数减少,工业成本降低,处理条件更容易控制,在工业上更易于实现应用。

在现有报道基础上,本研究以酶处理后烟叶模块的感官评吸得分为评价指标,应用试验设计软件 Design-Expert 7.16,采用响应曲面法建立了烟叶模块酶处理工艺条件的二次多项式数学模型,分析了各因子对响应值的影响。结果表明,淀粉酶、糖化酶、风味蛋白酶用量对烟叶模块处理效果(感官评吸得分)有极显著影响,在一定范围内加大淀粉酶、糖化酶、风味蛋白酶用量能够显著提升烟叶模块的感官抽吸品质;淀粉酶与糖化酶,以及淀粉酶与风味蛋白酶之间存在显著交互作用;建立的二次响应面回归模型拟合程度高,试验误差小。优化得到的最佳酶用量为:淀粉酶 16 U/g、糖化酶 130 U/g、风味蛋白酶 68 LAPU/g。此条件下处理后的烟叶模块感官评吸得分为 59.50,与模型预测值 59.27 相差较小,表明利用响应面分析法得到的酶用量参数真实可靠,具有实用价值。处理后的烟叶模块淀粉、蛋白质、烟碱等含量下降,还原糖、挥发酸、石油醚提取物含量上升,感官抽吸品质明显改善,如刺激降低,烟

气甜润感显著提升,表明本研究得到的最佳酶用量在降解淀粉和蛋白质、改善烟叶模块抽吸品质方面是可行的,但在实际应用中还需考虑酶制剂与卷烟所加香料的协调性,所以还需在工业线上做进一步的中试验证。

参考文献:

- [1] 蒋承耿,何建华,徐彦军,等.采收方式对红花大金元烟叶淀粉酶活性及烤后质量的影响[J].现代农业科技,2010(22):54-55.
- [2] 王怀珠,杨焕文,郭红英,等.不同烘烤条件下烟叶淀粉降解酶活性变化[J].河南农业科学,2005(6):30-33.
- [3] 龚顺禹,杨焕文,王怀珠,等.烟叶中淀粉降解酶活性与烘烤温湿度度的关系研究[J].华北农学报,2005,20(4):17-20.
- [4] 陶红,沈光林,赵谋明.酶技术改善烟叶品质的研究进展[J].现代食品科技,2008,24(7):737-740.
- [5] 于录,阮晓明,卢在雨,等.叶组配方的分组加工模块设计[J].烟草科技,2006(7):11-13.
- [6] 贺红卫,张风侠.卷烟制丝分组加工工艺技术研究进展[J].中国科技博览,2010(21):322-323.
- [7] 王松峰,张勃,孙敬国,等.中国部分烤烟产区模块配方烟叶品质特色分析[J].河南农业科学,2011,40(4):78-81.
- [8] 李晓,刘凤珠,姚光明.酶解法改善烟叶吸味品质的试验[J].烟草科技,2002(3):14-17.
- [9] 谢会雅,朱列书,牛艳丽.利用酶制剂降解烤烟烟叶中淀粉和蛋白质的研究[J].中国烟草科学,2008,29(6):23-26.
- [10] 吉松毅,闫洪洋,张志明,等.云南大理烤烟外观质量与感官质量的相关性研究[J].安徽农业科学,2012,40(6):3539-3543.
- [11] 于瑞国,王蕾,孟广宇,等.烟草及烟草制品总挥发酸的测定——连续流动法[J].分析测试学报,2005,24(5):101-103.
- [12] 武怡,曾晓鹰,胡巍耀,等.一种提升低等级烟叶原料品质的方法:中国,102326857A[P].2012-01-25.