

产半纤维素酶的苔藓放线酸菌对烟草上部叶品质的影响

郝捷¹, 郭春生¹, 张宝¹, 马尚毅¹, 张磊¹, 洪杰¹, 王胜利¹, 丁海¹,
刘星明¹, 申国明^{2*}, 吴元华², 张立²

1 内蒙古昆明卷烟有限责任公司, 内蒙古 呼和浩特

2 中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛

郝捷, 郭春生, 张宝, 马尚毅, 张磊, 洪杰, 王胜利, 丁海, 刘星明, 申国明, 吴元华, 张立. 产半纤维素酶的苔藓放线酸菌对烟草上部叶品质的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 3089-3104.

HAO Jie, GUO Chunsheng, ZHANG Bao, MA Shangyi, ZHANG Lei, HONG Jie, WANG Shengli, DING Hai, LIU Xingming, SHEN Guoming, WU Yuanhua, ZHANG Li. Effect of a hemicellulase-producing strain of *Actinacidiphila bryophytorum* on the quality of upper tobacco leaves[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(7): 3089-3104.

摘要:【目的】提高烟草上部叶片的整体品质。【方法】从烟草土壤中分离到一株产半纤维素酶的菌株, 鉴定为苔藓放线酸菌(*Actinacidiphila bryophytorum*)。对该菌株进行培养条件优化后制成粗酶液喷施于烟草上部叶, 对处理后的烟叶进行物理特性、化学成分等方面的效果评价。【结果】该菌株的最佳发酵条件为接种量 4%, 培养温度 30 °C, 培养基 pH 6.0, 培养时间 36 h。将不同浓度的酶制剂(50、100、150、200、250 U/mL)喷施于烟草上部叶片表面, 评价其外观质量、常规化学成分、木质纤维素含量和感官评价。结果表明, 150 U/mL 酶制剂处理效果最优。与对照组相比, 烟叶在成熟度、颜色、特性和结构方面均有改善, 总分提高 5.15 分。总糖和还原糖含量分别提高了 29.87% 和 35.77%, 烟碱含量降低了 16.10%。纤维素、半纤维素和木质素含量分别下降 16.37%、20.22% 和 17.13%。增加了香气特性, 减少了杂气。【结论】利用苔藓放线酸菌 S2 菌株发酵制备的酶制剂, 改善了烟叶外观品质, 提高了水溶性总糖和还原糖含量, 降低了木质纤维素含量, 改善了烟叶的香气、烟味和口感, 对烟叶品质有所改善。

关键词: 烟叶质量; 半纤维素酶; 外观质量; 化学成分; 感官评价

资助项目: 内蒙古昆明卷烟有限责任公司科技项目(202315010534-JS-061, 202315010534-JS-062)

This work was supported by the Inner Mongolia Kunming Cigarette Limited Liability Company Technology Project (202315010534-JS-061, 202315010534-JS-062).

*Corresponding author. E-mail: shengguoming@caas.cn

Received: 2024-12-30; Accepted: 2025-02-24; Published online: 2025-04-25

Effect of a hemicellulase-producing strain of *Actinacidiphila bryophytorum* on the quality of upper tobacco leaves

HAO Jie¹, GUO Chunsheng¹, ZHANG Bao¹, MA Shangyi¹, ZHANG Lei¹, HONG Jie¹,
WANG Shengli¹, DING Hai¹, LIU Xingming¹, SHEN Guoming^{2*}, WU Yuanhua², ZHANG Li²

¹ Inner Mongolia Kunming Cigarette Limited Liability Company, Hohhot, Inner Mongolia, China

² Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao, Shandong, China

Abstract: [Objective] To improve the overall quality of upper tobacco leaves. [Methods] We isolated a hemicellulase-producing bacterium from tobacco soil and identified it as *Actinacidiphila bryophytorum*. After optimizing the culture conditions of this strain, we prepared the crude enzyme liquid, which was sprayed on upper tobacco leaves. The physical properties and chemical composition of the treated tobacco leaves were then evaluated. [Results] The optimal fermentation conditions for the strain were an inoculation rate of 4%, pH 6.0, and incubation at 30 °C for 36 h. Enzyme preparations of different concentrations (50, 100, 150, 200 and 250 U/mL) were then sprayed on the surface of upper tobacco leaves, and the appearance quality, conventional chemical composition, lignocellulose content, and sensory scores of the tobacco leaves were evaluated. The results indicated that treatment of the enzyme preparation at 150 U/mL performed better than other treatments. Compared with the control group, the 150 U/mL treatment increased the overall score for the appearance quality (maturity, color, characteristics, and structure) of tobacco leaves by 5.15 points. Additionally, this treatment increased the total sugar content and reducing sugar content by 29.87% and 35.77%, respectively. Meanwhile, it decreased the content of nicotine, cellulose, hemicellulose, and lignin by 16.10%, 16.37%, 20.22%, and 17.13%, respectively. Furthermore, the aroma characteristics were enhanced, and off-flavors were reduced. [Conclusion] The enzyme preparation produced by the fermentation of *A. bryophytorum* S2 improves the appearance quality, increases the soluble total sugar and reducing sugar content, and reduces the lignocellulose content of tobacco leaves, thus improving the overall quality of tobacco leaves.

Keywords: tobacco leaf quality; hemicellulase; appearance quality; chemical composition; sensory evaluation

烟草作为全球重要的经济作物，在农业经济和相关产业中扮演着关键角色^[1]。然而，随着消费者对烟草品质要求的提高，如何有效改善烟叶品质已成为烟草种植和加工领域亟待解决的关键问题^[2-3]。烟叶的品质主要体现在外观质量、化学成分和香气特性等方面^[4-7]，这些指标不仅直接影响到烟草制品的市场竞争力，也是决定其经济价值的重要因素^[8-10]。

半纤维素是烟叶细胞壁的重要组成部分之一^[11]，与纤维素和木质素共同为叶片提供结构支撑^[12]。这些成分之间的相互作用决定了烟叶的强度、刚性和柔韧性^[13]。半纤维素含量约占烟叶细胞壁的 15%–20%^[14]，在烟草的生长、质量和加工过程中发挥着重要作用^[15]。然而，成熟阶段的上部烟叶存在半纤维素含量过高导致叶片落黄慢的情况。过高的半纤维素会导致细

胞壁增厚, 限制营养和水分的吸收^[16], 还会对烟叶的感官质量和加工性能产生不利影响。因此, 如何有效降低烟叶中半纤维素含量对于提升烟叶品质具有重要应用价值。

基于绿色农业的发展趋势, 酶工程技术为调节烟叶化学成分以改善烟草品质提供了创新思路。酶作为一种绿色高效的生物催化剂^[17-19], 已被证明能有效协调烟叶中的化学成分, 改善烟叶品质^[20-21]。李志豪等^[22]将一株产木聚糖酶的蜡样芽孢杆菌作用于雪茄烟叶上, 烟叶中半纤维素降低了 6.63%, 纤维素含量降低了 8.19%, 叶绿醇、油酸、正二十六烷和正三十一烷等香气物质的含量均得到提升。Li 等^[23]从雪茄外包装叶表面分离出一株产纤维素酶的芽孢杆菌, 并将其施用于烟叶中, 结果显示该菌株提高了烟草纤维素的降解率(达 31.7%), 同时增加了总香气物质含量(提升 26.1%)。然而, 目前关于应用半纤维素酶改善烟草成熟阶段生长和质量的研究尚无太多报道。

本研究从烟草种植土壤中分离出半纤维素酶生产菌株, 优化了酶制备的最佳发酵条件, 并以落黄延迟的成熟烟草植株的上部叶片为研究对象, 分别设置不同浓度的酶制剂处理, 通过测定烟草外观质量、物理性质、化学成分、木质纤维素含量和感官质量等指标, 评估酶制剂的作用效果。本研究不仅为酶在农业中的应用提供了重要的理论依据和技术支持, 同时也为进一步探讨半纤维素酶在改善烟叶品质中的作用机制提供了宝贵的参考。未来的研究可以进一步优化酶处理工艺, 并探索其在不同烟草品种和种植环境中的适用性, 为烟草产业的可持续发展提供更多的技术支持。

1 材料与方法

1.1 土壤和烟叶样品

实验田地位于湖南省郴州市仁义镇长江村, 土壤样品取自该实验田烟草种植土壤。参试烟

草品种为‘湘烟 6 号’, 选择生长一致、株高相似、叶色相同且叶片完好的烟草植株。

1.2 培养基

用于菌株筛选的富集培养基(g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, KH_2PO_4 1.0, NaCl 0.5, 木聚糖 2.0; 用于初筛的培养基(g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, KH_2PO_4 1.0, NaCl 0.5, 木聚糖 2.0, 琼脂 17.0; 用于酶生产的发酵培养基(g/L): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0, KH_2PO_4 1.0, NaCl 0.5, 木聚糖 5.0, 酵母粉 5.0。

1.3 半纤维素酶生产菌株筛选

将 5.0 g 烟草种植土样加入 100 mL 富集培养基中, 在 28 °C、180 r/min 摇床条件下培养 3–4 h 进行富集。富集液随后按浓度 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 进行稀释。每个稀释液取 100 μL , 分别接种到初筛培养基上, 置于 28 °C 恒温培养箱中培养 2–3 d。筛选出透明圈较大的菌株, 根据透明圈直径与菌落直径的比值初步判断其产酶能力。

1.4 菌株鉴定与表型观察

菌株鉴定通过 16S rRNA 基因和 18S rRNA 基因测序进行。通过 BLAST 序列比对确定菌株的物种。

1.5 菌株半纤维素酶活测定

选定的菌株以 4% 的接种量接种到发酵培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 1 d。发酵液 6 000 r/min 离心 10 min, 上清液通过 100 kDa 离心超滤管浓缩和过滤, 获得粗酶液^[24]。依据 GB/T 23874—2009 的分光光度法测定木聚糖酶活。

1.6 菌株培养条件的优化

试验设置温度、培养基初始 pH 值、接种量和培养时间 4 个单一因素。原始条件设定为: 温度 30 °C, 初始 pH 6.0, 培养时间 48 h, 接种量 4%。测试的温度分别为 16、25、30、32 和 37 °C。测试的 pH 值分别为 4.0、5.0、6.0、7.0

和 8.0, 通过 1 mol/L HCl 或 NaOH 溶液进行调整。测试的接种量分别为 2%、4%、6%、8% 和 10%。测试的培养时间分别为 24、36、48、72、96 和 120 h。在每次试验中, 改变一个发酵参数。通过测定酶活来确定最优培养条件。

1.7 田间烟草上部叶片酶制剂处理

田间试验所使用的粗酶液制备方法同 1.5。田间试验采用随机区组设计, 每个区组包含 5 排, 每排长 20 m, 面积为 130 m², 区组间设有 0.5 m 宽的走道用于取样。试验地块之间设置保护行。实验设置 5 个处理组(T1、T2、T3、T4、T5)和 1 个对照组(CK)。烟草收获前 7–10 d, 选择和标记成熟度相似的烟草植物上第 3 片至第 4 片叶进行酶处理实验, 每组喷施 30 片叶。使用微雾喷雾器分别喷施菌株 S2 生产的不同浓度的粗酶溶液(T1、T2、T3、T4 和 T5 浓度分别为 50、100、150、200 和 250 U/mL), 粗酶液获取方式与 1.5 节相同, 以喷施水为对照, 每组重复 3 次。采摘时用直径为 1.5 cm 的打孔器对每片烟叶取样, 放置在–80 °C 保存, 用于烟叶的叶绿素含量测定。初步烘烤后, 对叶片进行分级, 保留 B2F 及以上等级的叶片进行成分分析。叶片烘干后进行研磨, 并通过 40 目筛网筛分。进一步烘干后置于真空干燥器中备用。

1.8 叶绿素含量测定

叶绿素含量可以作为烟草植物生长健康状况的一个重要指标, 通过测定叶绿素含量可以判断烟草植株生长发育状况是否良好。每组称取 1.7 节中保存的烟样 0.2 g, 共 3 份, 加入少量石英砂和碳酸钙粉末以及 3 mL 95% 乙醇到研钵中研磨, 再加入 10 mL 95% 乙醇继续研磨至烟叶变白, 将提取液用滤纸过滤除掉残渣, 再用 95% 乙醇冲洗干净滤纸、研钵和残渣, 直至颜色消失, 将提取的叶绿体色素移入容量瓶中, 定容至 25 mL, 以 95% 乙醇为空白对照, 分别测定各组提取液在 665、649 和 470 nm 下的吸光值, 按照公式(1)–(4)分别计算叶绿素 a、叶绿

素 b、总叶绿素和类胡萝卜素的浓度(mg/L), 计算出色素浓度后再按照公式(5)计算各色素的含量(mg/g)。

$$C_a = 13.95OD_{665} - 6.88OD_{649} \quad (1)$$

$$C_b = 24.96OD_{649} - 7.32OD_{665} \quad (2)$$

$$C_{a+b} = C_a + C_b \quad (3)$$

$$C_{x.c} = (1\ 000OD_{470} - 2.05C_a - 114.8C_b) \times 245 \quad (4)$$

$$\text{叶绿体色素含量} = (\text{叶绿素浓度} \times \text{提取液体积} \times \text{稀释倍数}) / 0.2 \quad (5)$$

式中: C_a 为叶绿素 a 含量, C_b 为叶绿素 b 含量, C_{a+b} 为总叶绿素含量, $C_{x.c}$ 为类胡萝卜素含量。

1.9 外观质量评定

外观质量评定小组由具有高级烟叶分级资格的人员组成。根据国家标准 GB 2635—92 (<https://openstd.samr.gov.cn/bzgk/gb/newGbInfo?hcno=CD0A065B8C67DC1EC3ABBB52D7457B9E&refer=outter>), 评定小组对初步烘烤后的烟叶的成熟度、颜色、结构、油分、身份和色泽强度进行评估。每个指标按 10 分制评分, 满分为 100 分, 各指标的比例如下: 成熟度 30%、颜色 15%、结构 20%、油分 15%、身份 10%、色度 10%。详细的评分标准见表 1。

1.10 物理特性测定

物理特性指标主要测定叶片密度、拉力和柔韧性。叶片密度: 每个处理组随机选取 10 片烟叶, 用直径为 1.5 cm 的打孔器对烟叶打孔用于测定叶片密度(g/dm²), 每片打 5 个圆片, 放入铝盒中烘干恒重后称重, 按公式(6)计算; 拉力: 每个处理组随机选取 10 片烟叶, 每片烟叶裁切 1 个长为 10 cm、宽为 1.5 cm 的叶片组织, 用拉力仪(上海保圣实业发展有限公司)测定烟叶的拉力值(N/mm), 去掉最大值和最小值, 剩余 8 个数值取平均值; 柔韧性: 每片烟叶裁切 1 个长为 2.5 cm、宽为 2.5 cm 的叶片组织, 用柔软度仪(上海保圣实业发展有限公司)测定烟叶的柔韧性(mN), 去掉最大值和最小值, 剩余 8 个数值取平均值。

$$\text{叶片密度} = \text{圆片总干重} / (50 \times \text{每片圆片面积}) \quad (6)$$

表1 外观质量评估标准

Table 1 Evaluation standard of appearance quality

Indicator	Characteristic	Score
Maturity	Mellow	8–10
	Ripe	7–10
	Mature	4–7
	Unripe	0–4
	Premature	5–8
Leaf structure	Open	7–10
	Firm	4–7
	Close	2–4
	Tight	0–2
Body	Medium	7–10
	Less thin	4–7
	Fleshy	4–7
	Thin	0–4
Color	Heavy	0–4
	Lemon	6–9
	Orange	7–10
	Red	5–8
	Greenish	3–8
Oil	Variegated	0–6
	Rich	8–10
	Oily	5–8
	Lessoily	3–5
	Lean	0–3
Color intensity	Deep	8–10
	Strong	6–8
	Moderate	4–6
	Weak	2–4
	Pale	0–2

1.11 化学成分分析

通过近红外光谱法测定化学成分的含量, 包括总糖、还原糖、烟碱、总氮、钾和氯化物^[25]。近红外光谱仪(聚光科技有限公司)的参数设置如下: 波数范围 10 000–3 800 cm^{-1} , 光谱分辨率为 8 cm^{-1} , 扫描次数为 64 次。样品置入近红外光谱仪进行全波长扫描, 然后将数据与流动分析仪(赛默飞世尔科技公司)的测量结果进行相关分析。

1.12 木质纤维素含量测定

通过 NREL 方法测定纤维素、半纤维素和木质素的含量^[26], 将烟样烘干后用研磨机研磨至 60 目过筛, 并干燥至恒重。在 121 $^{\circ}\text{C}$ 、1.1 MPa 条件下, 使用浓度为 72% 的 H_2SO_4 对样品进行酸解, 使纤维素和半纤维素分解为可溶性糖分, 而木质素保持不溶。通过过滤分离出不溶性木质素和其他残渣。通过测定滤液中还原糖的含量计算纤维素和半纤维素的含量, 滤渣质量即为木质素的含量。HPLC 具体参数如下: 样品注射体积为 20 μL , 流动相为 2.5 mmol/L H_2SO_4 , 流速为 0.4 mL/min, 分析运行时间为 25 min。

1.13 感官评定

烟叶的感官评定由专家小组进行, 参照行业评定标准 YC/T 415—2011《烟叶加工中的感官评定方法》(<https://std.samr.gov.cn/hb/search/stdHBDetailed?id=8B1827F1BE15BB19E05397BE0A0AB44A>) (表 2)。香气特征包括风格典型性、香气质量、香气浓度、挥发性、强度和异味; 烟雾特征包括浓度、顺滑度、刺激性、舒适度、甜度、干度和清洁度。总分由香气质量、香气浓度、挥发性、杂味、顺滑度、刺激性、舒适度、甜度、干度、清洁度、燃烧性和灰分颜色等项目的得分汇总而得。得分越高, 表示烟叶的感官质量越好。

1.14 数据分析

数据使用 SPSS 20.0 和 Microsoft Excel 2016 软件进行整理和分析。采用 Duncan 方法对多组数据进行显著性差异分析, 显著性水平设定为 $P < 0.05$, 显著性差异通过字母 a、b、c 和 d 表示。

2 结果与分析

2.1 烟草种植土壤中的菌株筛选与酶活测定

分离获得 5 株菌株(S1–S5), 其中 S2、S3 和

表2 烟草感官质量评估标准

Table 2 Evaluation standard of tobacco sensory quality

Indicator	Characteristic	Score	Indicator	Characteristic	Score
Style typicality	Typical	5	Concentration	Strong	9
	More typical	4		Relatively strong	7–8
	Fairly typical	3		Medium	5–6
	Rather weak	2		Relatively mild	3–4
	Weak	1		Mild	1–2
Quality of aroma	Good	9	Smoothness	Gentle	9
	Better	7–8		Relatively gentle	7–8
	Medium	5–6		Medium	5–6
	Rather poor	3–4		Relatively rough	3–4
	Poor	1–2		Rough	1–2
Volume of aroma	Sufficient	9	Irritability	None	9
	More sufficient	7–8		Slight	7–8
	Fairly sufficient	5–6		Present	5–6
	Present	3–4		Relatively large	3–4
	Less	1–2		Large	1–2
Volatility	Clear	9	Comfort level	Comfortable	9
	More clear	7–8		Relatively comfortable	7–8
	Moderate	5–6		Fairly comfortable	5–6
	Rather dull	3–4		Slightly uncomfortable	3–4
	Dull	1–2		Uncomfortable	1–2
Strength	Very large	9	Sweetness	Strong	9
	Relatively large	7–8		Relatively strong	7–8
	Moderate	5–6		Medium	5–6
	Relatively small	3–4		Weak	3–4
	Small	1–2		None	1–2
Off-flavors	None	9	Dryness	Dry	9
	Slightly	7–8		Relatively dry	7–8
	Present	5–6		Medium	5–6
	Relatively heavy	3–4		Relatively humid	3–4
	Heavy	1–2		Humid	1–2
Cleanliness	Clean	9	Combustibility	Strong	9
	Relatively clean	7–8		Relatively strong	7–8
	Medium	5–6		Medium	5–6
	Relatively poor	3–4		Relatively poor	3–4
	Poor	1–2		Flame out	1–2
Ash color	White	5			
	Ashy white	4			
	Grayish white	3			
	Grayish black	2			
	Black	1			

S4 表现出较大的透明圈(图 1A)。对这 5 株筛选菌株分泌的酶活进行测定(图 1B)。未接种的对照组(CK)未显示酶活。S2 菌株的酶活最高, 达到了 9.74 U/mL。S1 和 S3 菌株的酶活接近, 分别为 6.91 U/mL 和 7.01 U/mL。S4 和 S5 菌株的酶活接近, 分别为 5.56 U/mL 和 5.77 U/mL。这些结果表明, S2 菌株可高产木聚糖酶(属半纤维素酶), 因此被选为后续实验的研究对象。

2.2 菌株鉴定与表型观察

通过 16S rRNA 基因和 18S rRNA 基因测序对 S2 菌株进行鉴定, 根据 BLAST 序列比对, S2 菌株与苔藓放线酸菌(*Actinacidiphila bryophytorum*)的相似度达 99.25%。采用 MEGA 7.0.14 软件, 通过邻接法构建了系统发育树(图 2A)。革兰氏染色结果为革兰氏阳性(图 2B)。在显微镜下观察, 其形态不规则, 细胞周围有显著的丝状突出物, 其菌落呈放射状(图 2C、2D), 从而确定菌株 S2 为苔藓放线酸菌。

2.3 S2 菌株培养条件的优化

对 S2 菌株的培养时间、初始 pH 值、温度和接种量进行优化。菌株的酶活在培养 36 h 时达到最高值(图 3A), 为 16.88 U/mL, 此后由于

营养耗竭、废物积累和细胞死亡等因素, 酶活逐渐下降。在 pH 6.0 的酸性条件下, 菌株的酶活最高(图 3B), 达到 13.96 U/mL, 表明该菌株更适宜在微酸性环境中培养。随着温度的升高, 菌株的酶活逐渐增加, 在 30 °C 时达到最高值 12.97 U/mL (图 3C)。然而, 温度进一步升高会对酶活产生不利影响(图 3C)。随着接种量从 2% 增加到 4%, 酶活得到提高(图 3D), 在 4% 接种量时酶活性达到 17.82 U/mL 的最高值。

这些结果表明, S2 菌株的最佳培养条件为: 接种量 4%、温度 30 °C、pH 6.0、培养时间 36 h。在这些最佳条件下培养 S2 菌株, 制备粗酶液用于后续的田间处理实验。

2.4 酶制剂对烟叶的影响

2.4.1 酶制剂对烟叶叶绿素含量的影响

如图 4 所示, CK 组的总叶绿素含量为 0.36 mg/g, 类胡萝卜素含量为 0.14 mg/g, 总叶绿素含量随酶制剂浓度的增加呈下降趋势, T5 处理组(0.20 mg/g)下降最为明显, 相较于 CK 组降低了 44.44%; 不同处理组中的类胡萝卜素含量相较于 CK 组均有下降, 但组间差异不明显。图 5 所示为采摘时不同处理组的代表性烟叶,

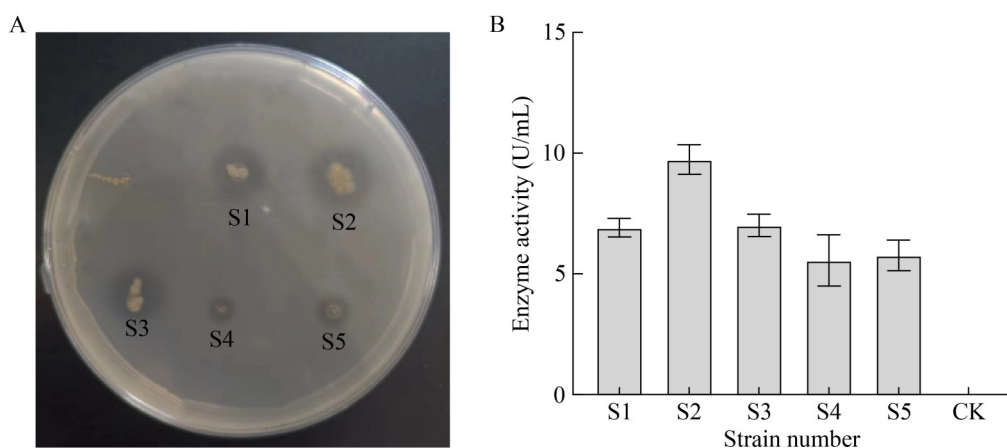


图1 筛选菌株和木聚糖酶活测定。A: 从烟草种植土壤中分离得到的5个菌株(S1-S5); B: 5个菌株(S1-S5)的酶活测定。

Figure 1 Screening of strains and measurement of enzyme activity. A: Five strains (S1-S5) were isolated from the tobacco planting soil; B: The enzyme activity assay of the five strains (S1-S5).

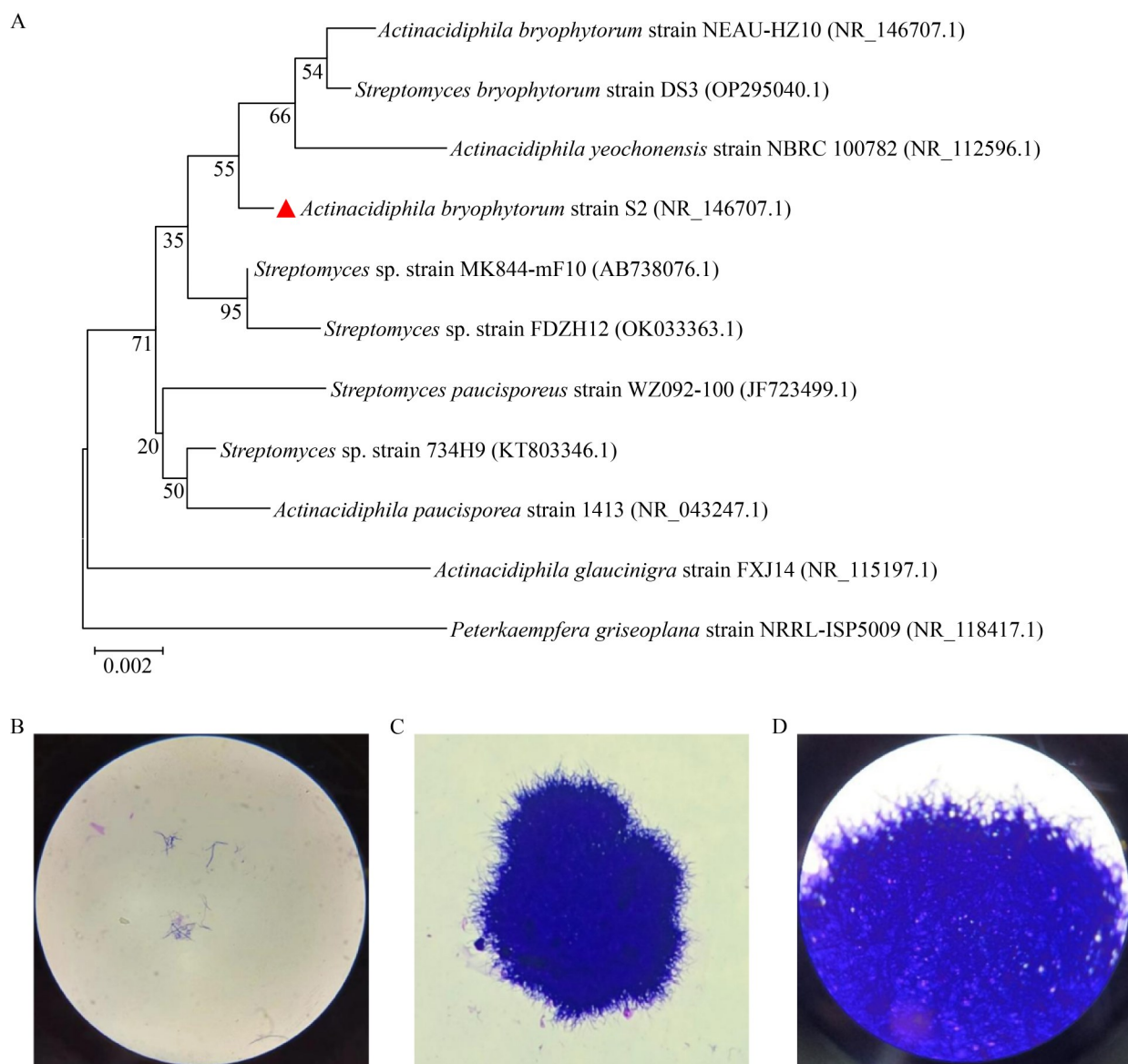


图2 筛选菌株S2的特征。A：基于16S rRNA基因序列的菌株S2系统发育树(标尺0.002表示水平方向上每单位长度对应基因组中每个位点2%的碱基替换频率，分支节点上的数字表示该分支结构的置信度，括号中的序号表示NCBI数据库中记录的基因序列编号)；B：菌株S2显微镜100×观察；C：菌株S2显微镜400×观察；D：菌株S2显微镜1 000×观察。

Figure 2 Characteristics of screened strain S2. A: Phylogenetic tree of strain S2 based on 16S rRNA gene sequence (The scale bar “0.002” indicates that each unit length in the horizontal direction corresponds to a 2% base substitution frequency per site in the genome. The numbers on the branch nodes represent the confidence levels of the branching structure. The serial numbers in parentheses refer to the gene sequence accession numbers recorded in the NCBI database); B: Strain S2 observed under a microscope at 100× magnification; C: Strain S2 observed under a microscope at 400× magnification; D: Strain S2 observed under a microscope at 1 000× magnification.

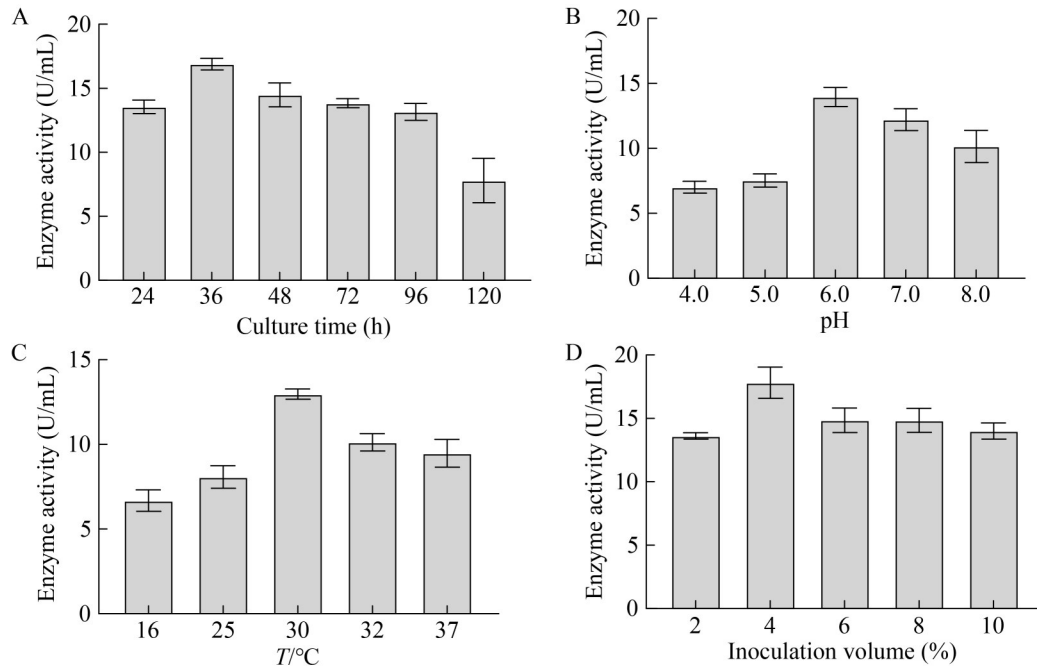


图3 菌株S2培养条件优化。A: 不同培养时间下菌株S2的酶活; B: 不同pH值下菌株S2的酶活; C: 不同温度下菌株S2的酶活; D: 不同接种量下菌株S2的酶活。

Figure 3 Optimization of cultivation conditions of strain S2. A: Enzyme activity of strain S2 with different cultivation times; B: Enzyme activity of strain S2 with different pH values; C: Enzyme activity of strain S2 with different temperatures; D: Enzyme activity of strain S2 with different inoculation volumes.

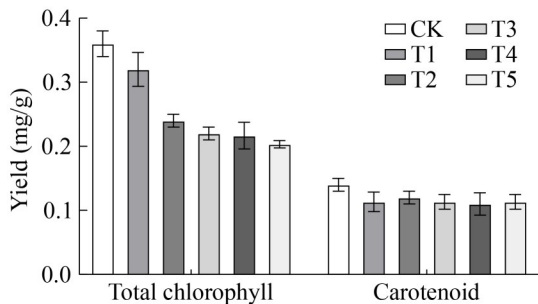


图4 不同处理组总叶绿素含量和类胡萝卜素含量。T1-T5为使用酶制剂进行烟草上部烟叶处理的5个处理组, 处理使用的酶浓度分别为50、100、150、200、250 U/mL。

Figure 4 Different treatment groups' total chlorophyll content and carotenoid content. T1-T5 represent five treatment groups using enzymatic preparations for the treatment of upper tobacco leaves, with enzyme concentrations of 50, 100, 150, 200 and 250 U/mL applied in each group, respectively.

可见不同处理组间烟草叶片的叶色存在明显差异, 颜色随酶制剂浓度的提升而逐渐变黄。

2.4.2 酶制剂对烟叶外观质量的影响

烟叶外观质量的评估反映了其成熟度和健康状况^[27]。不同浓度酶制剂处理的烤烟叶外观质量评分由外观质量评价组给出(表3)。CK 对照组烟叶尚熟, 颜色为柠檬黄, 叶片厚度中等, 结构尚疏松, 有油分, 杂色稍有。

使用酶制剂处理的烟叶在成熟度、颜色和结构等方面均有改善。T3 处理组的总得分最高(77.30 分), 比对照组(72.15 分)提高了 5.15 分。推测对照组烟叶中高含量的木质纤维素使其细胞壁紧实, 限制了养分和水分的吸收, 导致生长缓慢。相比之下, T1-T4 处理组的烟叶使用了半纤维素酶, 该酶可以降解木质纤维素, 使细胞壁相对松散, 有利于养分和水分的吸收。

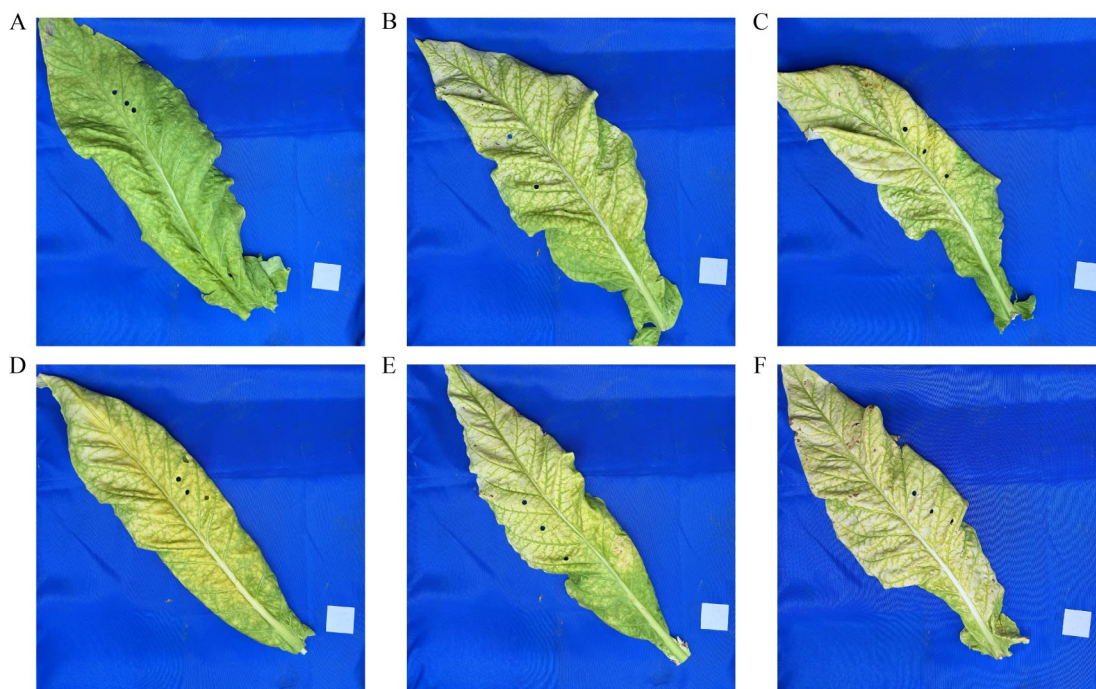


图5 不同处理组采摘前图像采集

Figure 5 Image collection before harvesting for different treatment groups. A: CK; B: T1; C: T2; D: T3; E: T4; F: T5.

表3 酶处理后烟叶外观质量评估

Table 3 Evaluation of tobacco leaf appearance quality after enzyme treatment

Group	Maturity	Color	Body	Structure	Oil	Color intensity	Total score
CK	7.7	7.9	7.3	7.3	6.6	5.4	72.15
T1	8.0	8.0	7.8	7.5	6.7	5.6	74.45
T2	8.1	8.3	8.4	7.8	6.8	5.7	76.65
T3	8.2	8.3	8.0	8.1	6.7	6.0	77.30
T4	8.1	8.2	8.0	7.7	6.8	5.8	76.00
T5	8.0	8.0	7.6	7.8	7.5	5.5	75.95

因此, 经过酶制剂处理的烟叶外观质量得到了提高。

2.4.3 酶制剂对烟叶物理特性的影响

烟叶的物理特性直接影响其质量评估。如图 6 所示, 未经酶制剂喷施的 CK 组的叶片密度为 4.66 g/dm^2 , 拉力为 4.62 N/mm , 柔韧性为 266.2 mN , 经酶制剂喷施后的烟叶在这些指标

上均有下降, 且随酶制剂浓度的增加呈降低趋势, 其中, T5 处理组(叶片密度为 3.91 g/dm^2 , 拉力为 2.89 N/mm , 柔韧性为 203.0 mN)降低最明显, 相较于 CK 组分别降低了 16.09%、37.45% 和 23.74%。可能由于半纤维素酶降解了烟叶中的木质纤维素, 疏松了叶片结构, 进而叶片密度下降, 叶片变得更柔软, 与 2.4.2 节的外观质量结果一致。

2.4.4 酶制剂对烟叶常规化学成分的影响

烟叶的化学成分协调对烟草制品的整体质量、口感和可燃性起着至关重要的作用^[28]。如图 7 所示, 酶处理组的总糖和还原糖含量均高于对照组。其中, T3 处理组的总糖(含量为 31.87%)和还原糖(含量为 27.75%)提升最多, 比对照组(总糖含量为 24.54%, 还原糖含量为 20.44%)分别增加了 29.87% 和 35.77%。酶处理组的烟碱含量低于对照组, 其中 T4 组(烟碱含量为 1.94%)的降幅最多, 较对照组(烟碱含量为

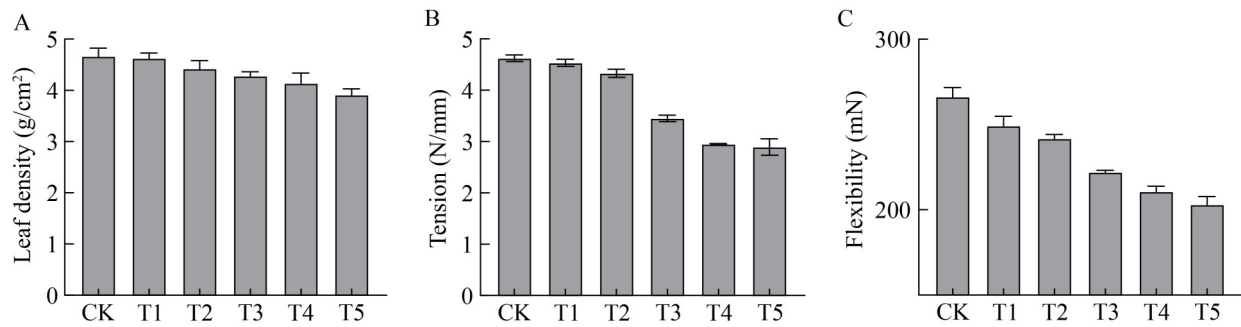


图6 酶处理后烟叶的物理特性变化。A: 不同处理组叶片密度; B: 不同处理组烟叶拉力; C: 不同处理组柔韧性。

Figure 6 Changes in the physical properties of tobacco leaves after enzyme treatment. A: Leaf density of tobacco in different treatment groups; B: Tensile strength of tobacco in different treatment groups; C: Flexibility of tobacco in different treatment groups.

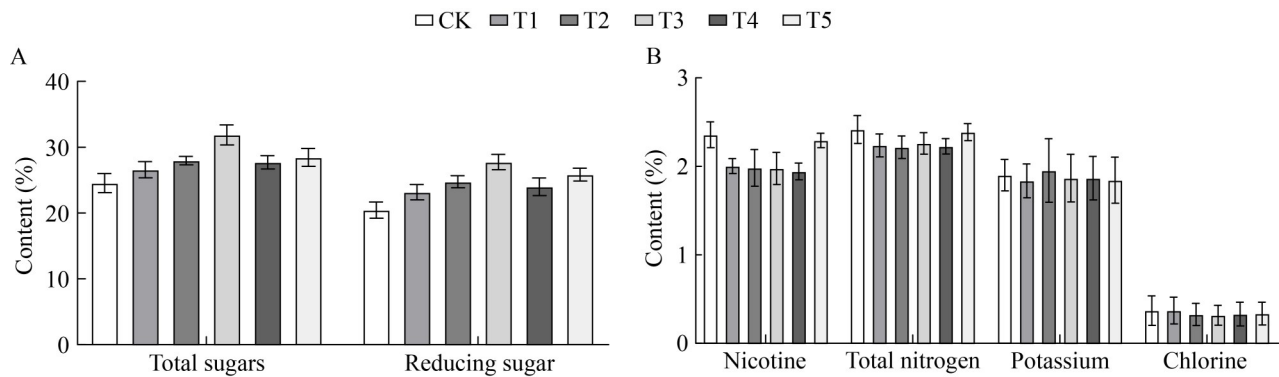


图7 酶处理后烟叶的化学成分变化。A: 不同处理组之间总糖和还原糖水平的比较; B: 不同处理组之间烟碱、总氮、钾和氯含量的比较。

Figure 7 Chemical composition of tobacco leaves after enzyme treatment. A: Comparison of total sugar and reducing sugar among different treatment groups; B: Comparison of nicotine, total nitrogen, potassium, and chlorin among different treatment groups.

2.36%)降低了 17.80%。

总糖与还原糖含量的增加, 归因于半纤维素酶对木质纤维素的分解作用, 促使多糖转化为单糖。总糖和还原糖的增加改善了烟叶的整体质量。糖分能够增强烟草的风味、香气和口感, 使香烟更加诱人, 同时提高可燃性, 增加烟雾的顺滑度^[29]。经过酶处理后, 各处理组的烟碱含量均有所下降。高烟碱含量的烟草往往具有更强烈、更刺激的味道^[30], 可能导致吸烟者产生强烈的刺激感。由于烟碱是烟草中的主

要成瘾物质, 并且对健康构成严重风险, 酶制剂处理的烟叶可以进一步提高烟草的安全性^[31]。酶制剂对烟叶中的总氮、钾和氯化物含量几乎无影响。上述结果表明, 酶制剂在协调烟叶化学成分方面发挥了重要作用, 主要通过增加总糖和还原糖含量, 同时降低烟叶中的烟碱含量。

2.4.5 酶制剂对烟叶木质纤维素含量的影响

如图 8 所示, 测量了烟叶的木质纤维素含量。处理组 T3 (纤维素含量 41.42%, 半纤维素含量 13.93%, 木质素含量 22.30%)的木质纤维

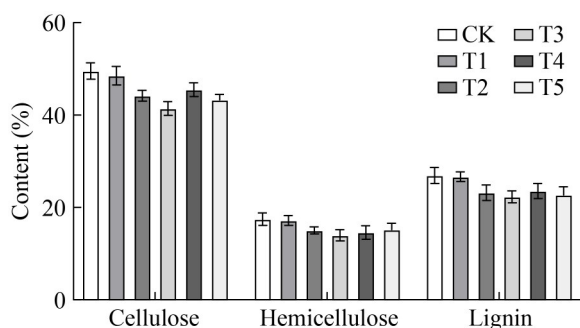


图8 酶处理后烟叶的木质纤维素含量

Figure 8 Lignocellulose content of tobacco leaves after enzyme treatment. The contents of cellulose, hemicellulose, and lignin were measured.

素含量降幅最多, 分别比对照组(纤维素含量 49.53%, 半纤维素含量 17.46%, 木质素含量 26.91%)减少了 16.37%、20.22% 和 17.13%。根据结果, CK 组烟叶中的木质纤维素含量相对较高, 这与 2.4.2 节中的分析一致。经过酶处理后, 烟叶的木质纤维素含量总体减少^[32]。纤维素、半纤维素和木质素共同构成了木质纤维素的复合结构, 是烟叶细胞壁的重要组成部分。半纤维素酶的主要作用是降解半纤维素, 其作用使细胞壁变得更松散, 从而暴露了纤维素和木质素, 使得这些成分更容易受到其他酶的降解, 与图 8 所示的各处理组相较于 CK 组的木质纤维素含量均有不同程度下降的结果一致。同时, 这一结果也解释了 2.4.3 中处理组在叶片密度、拉力和柔韧性指标降低的原因。过高的木质纤维素含量会影响烟叶的燃烧特性, 导致燃烧不完全或火焰不稳定, 这不仅影响烟草的燃烧效率和烟雾质量, 还会掩盖烟叶中的芳香成分, 导致吸烟时香气变得微弱甚至产生不愉快的味道^[33]。结果表明, 酶处理能够减少烟叶中的木质纤维素含量。

2.4.6 酶制剂对烟叶感官特性的影响

由专家小组进行的感官评估结果见表 4。CK 对照组烟在香气特征上属于中性香型, 风格彰显度属于较典型, 香气质较好, 香气量尚足,

透发性中等, 劲头适中, 有杂气, 浓度适中, 刺激性中等, 尚舒适, 甜度中等, 燃烧性较强, 灰分白灰。酶处理后, 香气强度、挥发性、浓度、清洁度、燃烧性和灰色等指标未发生变化。除了 T5 组外, 所有酶处理组的得分普遍优于对照组。其中, T1 组的总得分最高, 主要表现在香气质量(提高 1.0 分)、舒适度(提高 0.5 分)和甜度(提高 0.5 分)的提升, 同时减少了异味(提高 0.5 分)和刺激性(提高 0.5 分)。T5 组得分最低(72.0), 这一现象可以归因于过量酶浓度导致烟叶成分的过度降解, 从而损害了烟草的原始香气和味道。在其他处理组中, 香气质量和异味得分普遍提高。推测对照组烟叶中的高木质纤维素含量导致了较厚的细胞壁和较小的细胞间隙, 降低了燃烧性, 并影响了发酵和香气的形成。半纤维素酶可以减少木质纤维素含量, 适当的木质纤维素含量有利于烟叶的发酵和香气释放。结果表明, 适当的酶浓度能够有效改善烟叶的香气特性并减少异味, 而过量的酶浓度则会损害烟草的原始香气和味道。

3 讨论

本研究从植烟土壤中筛选出 5 株菌株, 并通过透明圈法和酶活测定确定了 S2 菌株为最优产酶菌株。S2 菌株被鉴定为苔藓放线酸菌 (*Actinacidiphila bryophytorum*), 其酶活高于其他 4 株菌株。通过对 S2 菌株培养条件的优化, 确定了最佳条件为接种量 4%、温度 30 °C、pH 6.0 和培养时间 36 h。这些条件与 Lee 等^[34]研究的木聚糖酶生产菌株的最佳培养条件相似。Irfan 等^[35]通过定点突变技术对来源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的木聚糖酶进行了改造, 优化后的木聚糖酶在 70 °C 下处理 30 min 后仍保持 80% 以上的活性。本研究为确保不影响生态环境的稳定性, 未涉及此类改进, 这可能限制其在高温或极端 pH 等条件下的效果。因此酶制剂喷施需在无风雨且温度适宜的天气进行, 否则

表4 酶处理后烟叶的感官评估得分

Table 4 Sensory evaluation scores of tobacco leaves after enzyme treatment

Scoring item	Group					
	T1	T2	T3	T4	T5	CK
Aroma characteristics						
Aroma type	N	N	N	N	N	N
Style typicality	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Quality of aroma	7.0	6.5	6.5	7.0	6.5	6.0
Volume of aroma	7.0	7.0	7.0	7.0	6.5	7.0
Volatility	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Strength	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Off-flavors	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.0
Smoke characteristics						
Concentration	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Smoothness	6.5	6.5	6.5	7.0	6.5	6.5
Irritability	7.0	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Comfort level	7.0	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5
Sweetness	7.0	6.5	6.5	6.5	6.0	6.5
Dryness	6.5	6.5	6.5	7.0	6.5	6.5
Cleanliness	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Combustibility	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Ash color	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Total sensory evaluation score	75.5	73.5	73.5	75.0	72.0	72.5

会影响酶制剂的效果。对于酶制剂喷施设备及工艺的改进也是后续需要研究的内容。

半纤维素酶处理使烟叶中总叶绿素和类胡萝卜素含量下降,这可能与半纤维素酶加速叶绿素的分解代谢,促进烟叶的落黄过程有关。陈飞程等^[36]的研究中也有类似报道。处理组烟叶的成熟度、颜色和结构得到改善,这可能是因为酶分解了细胞壁,促进了养分吸收和代谢产物的释放。这一结果与 Zhang 等^[37]研究的酶处理对烟草外观质量的改善效果相近。叶片密度、拉力和柔韧性的下降表明酶处理松解了细胞壁结构,使叶片变得更加柔软。这一结果与 Zhang 等^[38]研究的木质纤维素降解的效果一致,进一步证明了酶处理对烟叶物理特性的改善作用。总糖和还原糖含量的增加表明酶处理促进了多糖的分解和单糖的积累。这一结果与

Houfani 等^[39]报道的木聚糖酶对多糖代谢的影响一致。半纤维素酶喷施于烟叶表面通过吸附、穿透、分解半纤维素以及破坏细胞壁结构等作用机制降低了烟叶中木质纤维素的含量。与 Mathews 等^[40]报道的酶处理对木质纤维素降解的效果一致。这一过程不仅改变了烟叶的物理特性,还可能对其代谢活动和品质产生深远影响。酶处理可以有效改善烟叶的燃烧特性和香气释放。香气质量的提高和异味的减少表明酶处理优化了烟叶的香气特性。然而,过量酶浓度(T5 处理组)导致香气受损,表明酶浓度控制的重要性,与 Ning 等^[41]报道的酶处理对烟草香气的影响一致,强调了在实际应用中控制酶的浓度至关重要,以避免产生不良影响。另外,已有报道^[42-44]利用木聚糖酶对玉米、小麦和水稻等农作物进行改良,应用范围更广。本研究

主要针对烟草上部叶的品质进行改良,虽然具备处理的针对性,但其应用范围有一定的局限性。另外,本研究采用的酶制剂的生产成本需要进一步评估。

本文对酶制剂喷施烟叶的研究集中于表观效果,对其机制结合以往报道进行了推测分析,而对其作用机制的深入研究是后续的重点研究内容。为全面理解酶处理对烟叶的影响,并优化其应用效果,后期研究将从酶与细胞壁的相互作用、木质纤维素降解的分子机制、烟叶生理代谢的变化等方面展开,揭示酶处理的深层作用机制,为烟草产业的可持续发展提供理论支持和技术指导,推动酶制剂在烟草种植中的广泛应用。

4 结论

本研究成功从烟草种植土壤中筛选出高效产半纤维素酶的 *Actinacidiphila bryophytorum* S2 菌株,通过系统优化确定其最佳产酶条件为接种量 4%、温度 30 °C、pH 6.0 和培养时间 36 h,建立了高效的产酶工艺。通过田间试验,经 150 U/mL 活性酶液处理的烟叶在理化指标和感官品质方面均呈现改善:总糖和还原糖含量增加,烟碱含量降低,形成了更协调的糖碱比;感官评价显示酶处理提升了香气质量并减少了杂气。本研究成功构建了基于 *Actinacidiphila bryophytorum* 产酶处理烟叶的烟草提质增效技术,为酶工程技术在烟草加工领域的创新应用提供了理论依据和实践示范,对推动我国烟草行业绿色制造技术升级具有重要意义。

致谢

感谢青岛农业大学农业分子生物学科研平台提供的实验设备。

作者贡献声明

郝捷:概念构思、调查、结果分析、审阅与编辑;郭春生:结果分析、软件程序;张宝:

数据分析;马尚毅:概念构思;张磊:可视化;洪杰:数据整理;王胜利:提供资源;丁海:提出研究方法;刘星明:验证,完成呈现;申国明:监督、项目管理、资金支持;吴元华:验证;张立:调查、原稿撰写。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] XUE YC. Smoking cessation programmes in China[J]. *The Lancet*, 2020, 395(10223): e28.
- [2] 陈二龙, 范志勇, 宋朝鹏, 王德勋, 户艳霞, 王新中, 孙军伟, 苏家恩, 贺帆. 烘烤期烟叶霉变发生规律及关键影响因素[J]. *江西农业大学学报*, 2017, 39(5): 877-883.
CHEN EL, FAN ZY, SONG ZP, WANG DX, HU YX, WANG XZ, SUN JW, SU JE, HE F. An analysis of the law and key influencing factors of tobacco leaf mildew during baking[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2017, 39(5): 877-883.
- [3] Zhang LY, Mai J, Shi JF, Ai KB, He L, Zhu MJ, Hu BB. Study on tobacco quality improvement and bacterial community succession during microbial co-fermentation[J]. *Industrial Crops and Products*, 2024, 208: 117889.
- [4] GENG ZL, HE P, GAO HJ, LIU J, QIU J, CAI B. Aroma precursors of cigars from different tobacco parts and origins, and their correlations with sensory characteristics[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1264739.
- [5] WU TN, ZHANG YW, GONG ZW, LU DF. Quantification of tobacco leaf appearance quality index based on computer vision[J]. *IEEE Access*, 2022, 10: 120352-120368.
- [6] HATSUKAMI DK, LUO XH, JENSEN JA, AL' ABSI M, ALLEN SS, CARMELLA SG, CHEN ML, CINCIRIPINI PM, DENLINGER-APTE R, DROBES DJ, KOOPMEINERS JS, LANE T, LE CT, LEISCHOW S, LUO K, JOSEPH MCCLERNON F, MURPHY SE, PAIANO V, ROBINSON JD, SEVERSON H, SIPE C, STRASSER AA, STRAYER LG, TANG MK, VANDREY R, HECHT SS, BENOWITZ NL, DONNY EC. Effect of immediate vs gradual reduction in nicotine content of cigarettes on biomarkers of smoke exposure: a randomized clinical trial[J]. *Jama*, 2018, 320(9): 880-891.
- [7] QIAO X, BING W, WU DX. Aroma style characteristics of flue-cured tobacco leaves from typical tobacco growing areas[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2016, 49(9): 70-75.
- [8] NUR SALSABILA N, TARIK IBRAHIM J, MUMPUNI NINGSIH G. Analysis the competitiveness of indonesian tobacco exports to international markets 2003–2022[J].

- International Journal of Scientific Research and Management (IJSRM), 2024, 12(1): 479-487.
- [9] PULJEVIĆ C, KING M, MECIAR I, GARTNER C. Smoking out Australia's growing illicit tobacco market: current trends and future challenges[J]. International Journal of Drug Policy, 2024, 127: 104424.
 - [10] CUMMINGS KM, ROBERSON A, LEVY DT, MEZA R, WARNER KE, FONG GT, XU SS, GRAVELY S, DHUNGEL B, BORLAND R, O'CONNOR RJ, GONIEWICZ ML, SWEANOR DT. Transformation of the tobacco product market in Japan, 2011–2023[J]. Tobacco Control, 2024: tc-2024-058734.
 - [11] YUAN Y, ZOU P, ZHOU JH, GENG YT, FAN JJ, CLARK J, LI YQ, ZHANG CS. Microwave-assisted hydrothermal extraction of non-structural carbohydrates and hemicelluloses from tobacco biomass[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 223: 115043.
 - [12] IRAKI NM, SINGH N, BRESSAN RA, CARPITA NC. Cell walls of tobacco cells and changes in composition associated with reduced growth upon adaptation to water and saline stress[J]. Plant Physiology, 1989, 91(1): 48-53.
 - [13] BASHLINE L, LEI L, LI SD, GU Y. Cell wall, cytoskeleton, and cell expansion in higher plants[J]. Molecular Plant, 2014, 7(4): 586-600.
 - [14] ZHAO HQ, WANG S, YANG RJ, YANG DM, ZHAO YJ, KUANG JH, CHEN LQ, ZHANG R, HU HZ. Side chain of confined xylan affects cellulose integrity leading to bending stem with reduced mechanical strength in ornamental plants[J]. Carbohydrate Polymers, 2024, 329: 121787.
 - [15] ZHAO H, LI ZX, WANG YY, WANG JY, XIAO MG, LIU H, QUAN RD, ZHANG HW, HUANG RF, ZHU L, ZHANG ZJ. Cellulose synthase-like protein OsCSLD4 plays an important role in the response of rice to salt stress by mediating abscisic acid biosynthesis to regulate osmotic stress tolerance[J]. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(3): 468-484.
 - [16] PODGÓRSKA A, BURIAN M, GIECZEWSKA K, OSTASZEWSKA-BUGAJSKA M, ZEBROWSKI J, SOLECKA D, SZAL B. Altered cell wall plasticity can restrict plant growth under ammonium nutrition[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1344.
 - [17] TAGUCHI S. Designer enzyme for green materials innovation: Lactate-polymerizing enzyme as a key catalyst[J]. Frontiers of Chemical Science and Engineering, 2017, 11(1): 139-142.
 - [18] ZHAO CY. Is low-carbon energy technology a catalyst for driving green total factor productivity development? The case of China[J]. Journal of Cleaner Production, 2023, 428: 139507.
 - [19] HUANG ZL, NI DW, CHEN ZW, ZHU YY, ZHANG WL, MU WM. Application of molecular dynamics simulation in the field of food enzymes: improving the thermal-stability and catalytic ability[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 64(31): 11396-11408.
 - [20] RUAN YN, TANG ZX, CHEN ZB, XIA TY. Effects of combined application of chemical fertilizer and microbial fertilizer on the chemical components contents of flue-cured tobacco leaves[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 792(1): 012048.
 - [21] ZHOU KX, CHEN YQ, DENG XH, LI JJ, ZHOU PC, ZHANG DF, ZHANG JP, ZHENG QX, LONG T, CHEN SY, LU YH, FAN JQ. Enzymes Produced by *Paenibacillus amylolyticus* to improve the sensory quality of the upper leaves in flue-cured tobacco[J]. Pakistan Journal of Botany, 2024, 56(5): 1823-1830.
 - [22] 李志豪, 张鸽, 翁志杰, 邓帅军, 李佳轶, 张海波, 刘晓晖, 刘好宝. 一株产木聚糖酶的蜡样芽孢杆菌对雪茄烟叶成分及发酵产物的影响[J]. 生物技术通报, 2022, 38(2): 105-112.
 - [23] LI ZH, ZHANG G, MO ZJ, DENG SJ, LI JY, ZHANG HB, LIU XH, LIU HB. Effects of a xylanase-producing *Bacillus cereus* on the composition and fermented products of cigar leaves[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(2): 105-112.
 - [24] LI DY, HUANG CY, MAO YH, WANG Z, YU J, YANG CL, CHEN X. Screening of cellulase-producing bacteria and their effect on the chemical composition and aroma quality improvement of cigar wrapper leaves[J]. Bioresources, 2022, 17(1): 1566-1590.
 - [25] ZHOU KP, DONG YS, ZHENG H, CHEN B, MAO RF, ZHOU L, WANG YF. Expression, fermentation, purification and lyophilisation of recombinant subtilisin QK in *Pichia pastoris*[J]. Process Biochemistry, 2017, 54: 1-8.
 - [26] WU RX, TIAN ZZ, ZHANG CT, LI DK, TIAN N, XING LX, MA LC, JIANG ZP. Uniformity evaluation of stem distribution in cut tobacco and single cigarette by near infrared spectroscopy[J]. Vibrational Spectroscopy, 2022, 121: 103401.
 - [27] SLUITER A, HAMES B, HAMES BR, RUIZ R, SCARLATA C, SLUITER J, TEMPLETON D, CROCKER D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass[R]. NREL, 2012. <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>.
 - [28] CHEN Y, BIN J, ZOU CM, DING MJ. Discrimination of fresh tobacco leaves with different maturity levels by near-infrared (NIR) spectroscopy and deep learning[J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2021, 2021: 9912589.
 - [29] ZHU ZQ, QI GQ, LEI YB, JIANG DY, MAZUR N, LIU Y, WANG D, ZHU W. A long short-term memory neural network based simultaneous quantitative analysis of multiple tobacco chemical components by near-infrared hyperspectroscopy images[J]. Chemosensors, 2022, 10(5): 164.
 - [30] BUTORAC A, MESIĆ M, BUTORAC J, TURŠIĆ I, BAŠIĆ F, VULETIĆ N, BERDIN M. Influence of biopost and organo upon flue-cured tobacco grown on semigley. II. chemical composition of tobacco leaf and changes in the chemical soil complex[J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 1995, 175(5): 307-316.
 - [31] REN MJ, ZHANG MY, YANG HJ, SHI HZ. Reducing the nicotine content of tobacco by grafting with eggplant[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 285.
 - [32] LEGAZ I, PÉREZ-CÁRCELES MD, deLa CALLE I, ARJONA F, ROCA M, CEJUDO P, LUNA A, OSUNA E.

- Genetic susceptibility to nicotine and/or alcohol addiction: a systematic review[J]. *Toxin Reviews*, 2021, 40(4): 371-382.
- [32] XIAO ZZ, WANG SZ, LUO M, CAI JJ. Combustion characteristics and synergistic effects during co-combustion of lignite and lignocellulosic components under oxy-fuel condition[J]. *Fuel*, 2022, 310: 122399.
- [33] ŚWISŁOWSKI P, ŚMIECHOWICZ B, RAJFUR M. Effects of tobacco smoke on indoor air quality: the use of mosses in biomonitoring[J]. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 2022, 20(1): 485-493.
- [34] LEE JS, KIM KS. Optimization of conditions for the secretion of recombinant KG51 xylanase by *Bacillus subtilis*[J]. *Research Journal of Biotechnology*, 2024, 19(10): 1-12.
- [35] IRFAN M, GONZALEZ CF, RAZA S, RAFIQ M, HASAN F, KHAN S, Shah AA. Improvement in thermostability of xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* C5 by site directed mutagenesis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 111: 38-47.
- [36] 陈飞程, 杨懿德, 段玉锋, 李生栋, 杨洋, 鄢敏, 段卫东. 基于PLS-DA方法分析变黄方式对烤烟品质的影响[J]. *河南农业科学*, 2022, 51(1): 171-179.
- CHEN FC, YANG YD, DUAN YF, LI SD, YANG Y, YAN M, DUAN WD. Effects of different yellowing treatments on the quality of flue-cured tobacco by using partial least squares-discrimination analysis[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2022, 51(1): 171-179 (in Chinese).
- [37] ZHANG W, DENG Q, ZHU BK, XIAO D, CHEN QM, PAN HY, CHEN J. Improving the quality of low-grade tobacco by enzymatic treatment and co-fermentation with yeast and lactic acid bacteria[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2025, 197(1): 613-630.
- [38] ZHANG BC, ZHANG LJ, LI F, ZHANG DM, LIU XL, WANG H, XU ZP, CHU CC, ZHOU YH. Control of secondary cell wall patterning involves xylan deacetylation by a GDSL esterase[J]. *Nature Plants*, 2017, 3: 17017.
- [39] HOUFANI AA, ANDERS N, SPIESS AC, BALDRIAN P, Benallaoua S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars: a review[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2020, 134: 105481.
- [40] MATHEWS SL, GRUNDEN AM, PAWLAK J. Degradation of lignocellulose and lignin by *Paenibacillus glucanolyticus*[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 110: 79-86.
- [41] NING Y, MAI J, HU BB, LIN ZL, CHEN Y, JIANG YL, WEI MY, ZHU MJ. Study on the effect of enzymatic treatment of tobacco on HnB cigarettes and microbial succession during fermentation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(13): 4217-4232.
- [42] PETRY AL, PATIENCE JF. Xylanase supplementation in corn-based swine diets: a review with emphasis on potential mechanisms of action[J]. *Journal of Animal Science*, 2020, 98(11): skaa318.
- [43] AHMAD Z, BUTT MS, AHMED A, KHALID N. Xylanolytic modification in wheat flour and its effect on dough rheological characteristics and bread quality attributes[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2013, 56(6): 723-729.
- [44] BHARDWAJ N, KUMAR B, AGRAWAL K, VERMA P. Bioconversion of rice straw by synergistic effect of in-house produced ligno-hemicellulolytic enzymes for enhanced bioethanol production[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2020, 10: 100352.