

# 低次烟叶发酵制备烟草香料的研究

许春平, 杨琛琛, 方金辉

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001)

**摘要:**以低次烟叶为原材料,将其水提取物,添加10%的葡萄糖,接种1%的金星产香酵母SP-3,灭菌后在30℃的条件下发酵7d,制备出特色烟草浸膏.采用同时蒸馏萃取法萃取烟草浸膏的致香成分,并利用气相色谱-质谱联用进行分析.结果表明该特色烟草浸膏中有5-甲基糠醛、 $\beta$ -苯乙醇、乙酰基吡咯、巨豆三烯酮、3-甲基吲哚等特殊香味成分.在100g烟丝中,添加0.01~0.05g的特色烟草浸膏能与烟香协调,增大香气量,烟气柔和细腻、余味纯净,比没有经过发酵的普通烟草浸膏的加香效果更好.

**关键词:**产香酵母;低次烟叶;烟草浸膏;致香成分

**中图分类号:**TS411 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2013.01.008

## Preparation of tobacco flavor from discarded tobacco leaves by fermentation

XU Chun-ping, YANG Chen-chen, FANG Jin-hui

(College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** The tobacco concrete from discarded tobacco leaves were prepared by fermentation of aroma producing yeast XINJING SP-3. The process was as following: extract of discarded tobacco leaves was added 10% glucose and 1% yeast. After sterilization, the tobacco extract was fermented at 30℃ for 7 d. The flavor was extracted by simultaneous distillation extraction and the volatile components of extract were analyzed by GC-MS. Comparing with common tobacco extract, the special aroma components of the extract were: 5-methyl furfural,  $\beta$ -phenyl ethyl alcohol, acetyl pyrrole, megastigmatrienone, 3-methyl indole, etc. Addition of 0.01 g to 0.05 g special tobacco flavor to 100 g cigarette could augment and enhance the aroma and taste of smoking tobacco and reduce irritancy of the smoking cigarette. The special tobacco flavor could preferably improve the aroma property of tobacco than the normal tobacco flavor.

**Key words:** aroma producing yeast; discarded tobacco leaves; tobacco concrete; flavor components

## 0 引言

低次烟叶是卷烟生产中产生的大宗副产品,这些副产品的物质成分与干烟叶几乎完全相同.因此,合理开发利用低次烟叶,可产生巨大的经济效益和良好的社会与环境效益. K. K. Meher 等<sup>[1]</sup>利用

烟草废弃物发酵产甲烷;胡小玲等<sup>[2]</sup>从废弃烟叶中提取烟碱生产烟碱农药;张怡等<sup>[3]</sup>为废次烟草乃至已经提取过烟碱或茄尼醇的废烟渣的再利用提供了新途径,降低了综合生产成本;孙世中等<sup>[4]</sup>以云南废弃烟叶为原料,采用去除烟碱的预处理方法和半固态发酵方法,提高燃料酒精产率,产物还包括

收稿日期:2012-09-11

基金项目:郑州市科技局科技攻关项目(10PTGG339-2)

作者简介:许春平(1977—),男,河南省焦作市人,郑州轻工业学院特聘教授,博士,主要研究方向为烟草生物技术.

有重要用途的烟碱.深入开展低次烟叶的基础及应用研究,开发出适用于中式卷烟的新型香原料,是卷烟调香技术工程方面研究工作之一<sup>[5]</sup>.本文拟采用发酵技术处理低次烟叶,制备特色烟草浸膏,并与未经发酵制得普通烟草浸膏的化学成分和加香效果进行对比,为低次烟叶再利用提供科学依据.

## 1 实验

### 1.1 材料与试剂

广烟5号烤烟低次烟叶,产自广西;产香酵母金星 SP-3,郑州轻工业学院烟草相关实验室提供;乙醇、乙酸苯乙酯天津市瑞金特化学品有限公司产,二氯甲烷,上海南汇化学试剂厂产,均为分析纯.

### 1.2 仪器

TRACE GC Ultra—DSQ II 型气谱-质谱联用仪(GC-MS),美国热电科技有限公司产;蒸汽湿热高压灭菌器,上海三申医疗器械有限公司产;同时蒸馏萃取装置,郑州玻璃仪器厂产;旋转蒸发器 RE-52A,上海亚荣生化仪器厂产;SHZ-D 循环式真空泵,巩义市予华仪器有限公司.

### 1.3 实验方法

**1.3.1 产香酵母的复苏和传代复活** 将保藏的产香酵母分别接种和涂布于装有 YPD 固体培养基的试管和培养皿中,一式两份.2 d 后选取长势良好个大的单菌落接种并继续传代涂布培养.最后,制成需要的 YPD 液体试管培养菌液用于接种<sup>[6]</sup>.

**1.3.2 低次烟叶处理工艺** 1) 粉碎过筛.将低次烟叶粉碎,并过 400 目的筛子,得到低次烟叶粉末.

2) 制备低次烟叶水提液.称取 60 g 低次烟叶粉末加入 1 000 mL 的烧瓶中,并加入 650 mL 水用电热套回流提取 4 h,共进行 5 组.将提取液合并,静置过夜,用纱布过滤得到低次烟叶滤液,在 60 °C 下减压浓缩成密度为(1.200 0 ± 0.008 0) g/cm<sup>3</sup>的低次烟叶水提物.

3) 产香酵母对低次烟叶浸提液进行发酵处理.分别选取低次烟叶水提物各 20 g 加入 2 个 20 mL 锥形瓶中,加入 10% 的葡萄糖,搅拌均匀后,放置于蒸汽湿热高压灭菌器中 120 °C 灭菌 30 min.冷却后在超净工作台上,将 1% 的金星产香酵母菌液接种于其中一个锥形瓶中作为实验组,另一个接种 1% 的无菌水作为对照组.搅拌均匀后置于相同的恒温培养摇床中进行发酵.发酵结束后,经纱布过滤,用

5 倍量(w/w)95%乙醇回溶,静置过夜,经微孔膜过滤后,在 60 °C 下减压浓缩至密度为(1.200 0 ± 0.008 0) g/cm<sup>3</sup>,制得特色烟草浸膏<sup>[7-8]</sup>.未经发酵处理,则制得普通烟草浸膏.

4) 浸膏质量评价方法.取烟草浸膏 10 g,精确加入 20 mL 的蒸馏水于浸膏中,搅匀,测定其相对密度.取测定相对密度的上述烟草浸膏稀释液,用 pH 计测定 pH 值,并根据表 1 对浸膏进行综合评价.

表 1 浸膏质量综合评分表

指标	要求	分值
色泽	深红棕色	20
香气	清甜香,具有烟草的特征香,醇香	25
透发性	透发性强	20
感官评价	降低刺激性,提高卷烟整体品质	35

**1.3.3 致香成分分析** 前处理步骤:称取 4.5 g 烟草浸提液发酵样品放入 200 mL 圆底烧瓶中,加入 100 mL 蒸馏水,搅拌均匀;量取 20 mL 二氯甲烷放入 50 mL 尖底烧瓶中,进行同时蒸馏萃取.萃取 2 h 后,取出盛有二氯甲烷的烧瓶,加入一定浓度的乙酸苯乙酯作为内标物,混合均匀后,浓缩至 1 mL 即可进行仪器分析.设所检测出的物质相对于内标的校正因子为 1,采用相对定量的方法计算各致香成分的含量<sup>[9]</sup>.

GC-MS 分析条件<sup>[10]</sup>:色谱柱为 HP-5MS (50 m × 0.25 mm × 0.25 μm) 毛细管柱;进样温度 250 °C;分流比 5:1;延迟 5 min;载气 He, 1 mL/min;升温程序:50 °C (1 min) 以 5 °C/min 升到 250 °C (5 min);传输线温度 270 °C;离子源 EI 源;电子能量 70 eV;扫描范围 50 ~ 650 amu;使用 Wiley 谱库和 Minilab 谱库进行检索,并结合标准质谱峰面积和有关文献,确定致香成分,根据内标法计算各致香成分在烟草浸膏中的含量.

**1.3.4 卷烟加香评价** 分别称取 0.01 g, 0.05 g, 0.10 g, 0.15 g 普通烟草浸膏和特色烟草浸膏,分别用 5 mL, 95% 乙醇溶解后喷洒于 100 g 烟丝上.加香烟丝于(22 ± 1) °C 和相对湿度 65% 环境中平衡 48 h,制成卷烟,然后由郑州轻工业学院评吸专家评吸.对照样为添加 95% 乙醇的加料未加香烟丝.

## 2 结果与分析

### 2.1 发酵工艺优化结果

将 1% 的金星产香酵母菌液接种于锥形瓶中作

为实验组,对照组接种 1% 的无菌水. 搅拌均匀后置于相同的恒温培养摇床中进行发酵. 发酵结束后按照表 1 浸膏质量综合评分表对浸膏的质量进行评价,并得出最佳发酵工艺. 如图 1 所示,经过工艺优化,确定其最佳发酵条件为:发酵温度 30 ℃,摇床转速 200 r/min,发酵时间 7 d.

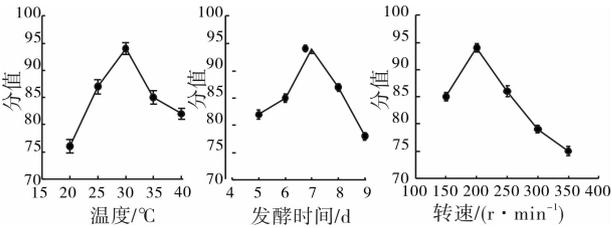


图 1 温度、发酵时间和转速对浸膏质量的影响

普通烟草浸膏和特色烟草浸膏 2 种的提取方法相同,所得到 2 种不同类型的烟草浸膏颜色都是深红棕色,酸度差别不大,在 9.4 左右,相对密度也都在 1.171 g/cm<sup>3</sup> 左右;但经产香发酵处理的特色烟草浸膏透发性增强,香气更加醇和.

## 2.2 特色烟草浸膏的致香成分分析

将普通烟草浸膏和特色烟草浸膏分别用二氯甲烷进行同时蒸馏萃取后,收集其致香成分,加入一定浓度的乙酸苯乙酯作为内标物,并利用 GC-MS 进行致香成分的定性定量分析. 普通和特色烟草浸膏致香成分列于表 2.

从表 2 可知,普通烟草浸膏致香成分较少,而发酵后烟草浸膏致香成分则增加很多,尤其是前端挥发性较强的小分子物质变得丰富. 经产香处理后,尼古丁的含量降低,这主要是由于其他香气物质含量增加的缘故. 特色烟草浸膏的特征致香成分中,5-甲基糠醛的相对含量为 3.75 μg/g,可赋予卷烟焦糖香特征;2-乙酰基吡咯的相对含量为 4.60 μg/g,添加在卷烟中可以增加烘烤香,改善余味,使烟气更加馥郁丰满;β-苯乙醇的相对含量为 3.45 μg/g,可以赋予烟草清甜的花香;巨豆三烯酮的相对含量为 6.23 μg/g,可使卷烟香气的协调性增强,在卷烟的增香、掩盖杂气方面有显著的作用;3-甲基吡啶的相对含量为 2.91 μg/g,在卷烟中具有明显的增香作用. 拥有这些致香物质的发酵烟草浸膏不仅可以使得烟气更加丰满浓郁,而且具有提高烟香细腻性和甜润性的作用,并赋予卷烟香气特殊的醇和酿香风味,提高卷烟的整体品质.

表 2 普通浸膏与特色浸膏致香成分结果分析

序号	保留时间/min	化学成分	匹配度/%	普通浸膏/(μg·g <sup>-1</sup> )	特色浸膏/(μg·g <sup>-1</sup> )
1	7.71	5-甲基糠醛	83	—	3.75
2	8.04	吡啶	82	—	2.01
3	9.92	苯乙醛	94	—	4.24
4	10.17	4-甲基-5H-咪唑酮	78	—	1.08
5	10.60	糠醛	82	—	1.02
6	10.87	2-乙酰基吡咯	91	—	4.60
7	11.17	5-甲基-2-羟基吡啶	78	0.82	2.75
8	11.63	3-甲基-2-丁酮	81	—	1.15
9	12.09	β-苯乙醇	72	0.53	3.45
10	13.43	1-十三烯	81	—	5.75
11	13.87	丁二酸二乙酯	72	—	1.15
12	14.28	4,5-二甲基壬烷	91	—	1.15
13	15.4	2-甲基十二烷	73	—	5.75
14	15.79	十四烷氧乙醇	91	—	2.30
15	16.02	乙酸苯乙酯(内标物)	90	17.64	12.45
16	17.65	尼古丁	91	3.80	2.14
17	19.77	甲基丙烯酸月桂酯	86	—	4.64
18	21.02	溴代十八烷	72	1.20	3.45
19	21.05	壬醛	64	—	4.60
20	21.39	1,2-环氧十二烷	64	1.17	1.63
21	22.31	1,2-环氧十六烷	74	2.80	—
22	22.84	4-甲基-4-庚烯-3-醇	72	—	2.14
23	23.12	十二烷基异戊酯	91	—	1.03
24	24.29	1-十八烯	86	—	2.63
25	25.28	巨豆三烯酮	81	3.12	6.23
26	25.36	2-戊基癸酮	72	—	1.59
27	26.47	香叶醇	91	0.27	1.36
28	26.63	二十六醇	87	1.17	4.84
29	26.85	四氢喹啉	91	0.53	0.89
30	27.05	薄荷烯	94	—	1.3
31	27.15	柠檬烯	90	—	2.45
32	28.19	吡啶	83	—	0.64
33	28.24	油酸	93	—	2.90
34	28.70	环十五烷	73	0.84	1.05
35	28.91	异胡薄荷醇	91	—	1.52
36	30.28	茄酮	87	0.94	0.98
37	30.71	十七烷酮	87	0.68	3.68
38	32.87	棕榈酸	91	—	1.47
39	33.36	十二烯基丁二酸酐	83	—	2.38
40	34.37	β-紫罗兰酮	78	—	1.92
41	35.20	石竹烯	70	0.48	0.58
42	35.31	5-正丁基-δ-戊内酯	79	0.32	1.89
43	35.52	亚油酸	95	0.94	4.24
44	36.68	硬脂酸	97	2.10	18.98
45	39.55	二十碳饱和脂肪酸	83	1.24	4.99
46	41.13	3-甲基吡啶	91	0.60	2.91
47	41.88	二十八醇	76	1.58	3.63
48	42.21	邻苯二甲酸二辛酯	95	—	2.11
49	42.56	二十二酸	62	—	1.30
50	44.48	1-甲基吡啶	91	0.52	2.73
51	52.56	麦角甾烯醇	75	0.15	—
52	55.01	豆甾醇	91	1.18	—

### 2.3 卷烟加香结果与分析

烟支感官舒适度各指标评吸结果见表3。在100 g 供试烟丝中添加0.10 g 的普通烟草浸膏后,能与烟香谐调,提高香气质,增大香气量,减小刺激性,余味较好;添加量达0.15 g 时,刺激性稍大,烟

气有所改变;添加0.05 g 的特色烟草浸膏能与烟香谐调,增大香气量,烟气柔和细腻,余味纯净;添加量达到0.10 g 时,加香感略重,香气过于显露,不够协调,余味有残留。

表3 烟支感官舒适度评价结果表

编号	香气	刺激性	杂气	余味
对照	香气量较充足,香气质较好	刺激略明显,有灼舌感觉,喉部略不舒适	略有杂气	余味舒适、尚纯净
1	香气较细腻	刺激略减小,灼舌感明显减少,喉部舒适度增加明显	杂气略减轻	余味尚舒适
2	烟气状态、圆润感较好	刺激明显减小,灼舌感明显减少	杂气明显减轻	余味舒适,有回甜感
3	烟气状态、圆润感较好	刺激明显减小,灼舌感明显减少	杂气明显减轻	余味舒适,回甜感较强
4	香气欠自然	灼舌感明显减少,刺激减轻	杂气略有	有些发涩
5	香气细腻,润感尚好	刺激略减小,灼舌感明显减少	杂气略减轻	余味舒适,有回甜感
6	烟气状态、圆润感较好	刺激明显减小,灼舌感明显减少,喉部舒适度增加明显	杂气明显减轻	比较舒适,回甜感较强
7	香气欠自然	刺激性减轻,灼舌感减少	杂气略有	比较舒适,回甜感较强
8	香气欠自然,烟气状态尚好	刺激减小	杂气略增加	有些发涩

注:卷烟编号1—4号分别代表添加量为0.01 g,0.05 g,0.10 g,0.15 g 普通烟草浸膏的烟支;5—8号分别代表添加0.01 g,0.05 g,0.10 g,0.15 g 特色烟草浸膏的烟支,对照样没有添加烟草浸膏。

评吸结果表明,加入适量的普通烟草浸膏可提高卷烟的香气质和香气量,谐调烟香,减少杂气,降低刺激性,改善余味,但添加量过大会对卷烟烟气产生不利影响;特色烟草浸膏的用量比普通烟草浸膏稍小,加香效果也稍好,这同前面的化学成分分析结果一致。

### 3 结论

本文对产香酵母发酵低次烟叶制备特色烟草浸膏的工艺条件进行优化,包括产香酵母菌接种量、发酵温度、发酵时间,采用同时蒸馏萃取法采集烟草浸膏的致香成分,并利用气相色谱-质谱联用进行了分析。结果表明发酵的优化条件为:将低次烟叶水提物灭菌后,添加10%的葡萄糖,接种1%的金星产香酵母,在30℃的条件下发酵7 d。经产香酵母菌处理低次烟叶后所得到的特色烟草浸膏与未经产香处理的普通烟草浸膏的香味成分比较,特色烟草浸膏致香成分丰富。该特色烟草浸膏中有5-甲基糠醛、 $\beta$ -苯乙醇、2-乙酰基吡咯、巨豆三烯酮、3-甲基吡啶等特征香味成分。将此特色烟草浸膏在卷烟中加以应用,在100 g 烟丝中添加0.01~0.05 g,能与烟香谐调,不仅使烟叶杂气降低,异味减轻,香气质和香气量变佳,吸味醇和,余味纯净舒适,并具有增加烟气浓度、丰富烟香的作用,提高了卷烟的整体品质。

### 参考文献:

- [1] Meher K K, Panchwagh A M, Rangrass S, et al. Biomethanation of tobacco waste [J]. Environmental Pollution, 1995, 90(2):199.
- [2] 胡小玲,岳红,管萍,等.以废次烟叶生产硫酸烟碱新方法的研究[J].化学与应用,2000,12(2):224.
- [3] 张怡,杨天雷,秦旌,等.废次烟草作为载体在固态发酵体系中的综合利用[J].烟草科技,2000(7):5.
- [4] 孙世中,高天荣,赵焱,等.废弃烟叶燃料酒精发酵工艺探索[J].农业工程学报,2009,25(6):245.
- [5] 阮祥稳,任平,陈卫锋.酶对烟叶发酵内在品质的影响[J].食品研究与开发,2005,26(1):67.
- [6] Eglis C F, Bell E J, Berger A J. Isolation of thermophiles from Broadleaf tobacco and effect of pure culture inoculation on cigar aroma and mildness [J]. Appl Microbio, 1967(15):117.
- [7] 罗家基,朱子高,罗毅,等.微生物在烟叶发酵过程中的作用[J].烟草科技,1998(1):6.
- [8] Ana P, Mariana U, Franciaco F, et al. Cleavage of  $\beta$ -carotene for microorganisms isolated in Brazil—A production of  $\beta$ -ionone [J]. Journal of Biotechnology, 2007, 131(2):242.
- [9] 郭灵燕,海洋,杜闯光,等.废次烟叶生物发酵香料中挥发性香气成分的研究[J].化学与生物工程,2009,29(11):76.
- [10] 许国旺.现代实用色谱分析法[M].北京:化学工业出版社,2004.