



引用格式:魏涛,陈顺心,黄申,等. $\beta$ -胡萝卜素降解菌 HC-3 发酵条件优化及其对再造烟叶浓缩液增香效果研究[J]. 轻工学报,2020,35(2):24-32.

中图分类号:TS41<sup>+</sup>3 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.02.004

文章编号:2096-1553(2020)02-0024-09

# $\beta$ -胡萝卜素降解菌 HC-3 发酵条件优化及其对再造烟叶浓缩液增香效果研究

## Optimization of fermentation conditions of $\beta$ -carotenes degradating strain HC-3 and its effect on aroma enhancement of reconstituted tobacco concentrate

魏涛,陈顺心,黄申,钱玉梅,赵彩梦,毛多斌

WEI Tao, CHEN Shunxin, HUANG Shen, QIAN Yumei, ZHAO Caimeng, MAO Duobin

郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001

School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

### 关键词:

$\beta$ -胡萝卜素; 发酵条件; 香味成分; 再造烟叶浓缩液

### Key words:

$\beta$ -carotene; fermentation condition; aroma component; reconstituted tobacco concentrate

**摘要:**运用单因素试验和正交试验,对 $\beta$ -胡萝卜素降解菌株 HC-3 的发酵条件进行优化,并将最佳发酵条件下得到的菌株 HC-3 发酵液应用于再造烟叶浓缩液中以研究其增香效果.结果表明:菌株 HC-3 发酵降解 $\beta$ -胡萝卜素的最佳条件为 NaNO<sub>3</sub> 质量浓度 3 g/L,蔗糖质量浓度 30 g/L,酵母粉质量浓度 3 g/L,初始 pH 值 7.0,在该发酵条件下 $\beta$ -胡萝卜素降解率可达 93.35%.经菌株 HC-3 处理后,再造烟叶浓缩液中的二氢猕猴桃内酯、4,7,9-巨豆三烯-3-酮、4-羟基- $\beta$ -二氢大马酮、9-羟基-4,7-巨豆三烯酮、柠檬酸三乙酯、4-(3-羟基丁基)-3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮、肉豆蔻酸和新植二烯这 8 种香味成分含量明显提高;与未经处理的再造烟叶浓缩液相比,利用菌株 HC-3 处理后的再造烟叶浓缩液制得的片基香气质较好、香气量较足、香气浓度较高、杂气量较低.

收稿日期:2019-10-24

基金项目:国家自然科学基金项目(21406210);河南省高校科技创新人才项目(18HASTIT040);郑州轻工业大学星空众创空间孵化项目(2018ZCKJ327)

作者简介:魏涛(1980—),男,河南省焦作市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为烟草生物技术.

通信作者:毛多斌(1962—),男,河南省南阳市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为烟草化学和烟草香精香料.

**Abstract:** The fermentation conditions of  $\beta$ -carotene degrading strain HC-3 were optimized by single factor experiment and orthogonal experiment, and the fermentation liquid of strain HC-3 obtained under the optimal fermentation conditions was applied to the reconstituted tobacco concentrate to study its aroma enhancing effect. The results showed that the best fermentation conditions for  $\beta$ -carotene degradation were 3 g/L of  $\text{NaNO}_3$ , 30 g/L of sucrose, 3 g/L of yeast powder and 7.0 of initial pH value. Under this condition, the degradation rate of  $\beta$ -carotene could reach 93.35%. After being treated by strain HC-3, the eight flavor components of dihydroactyl lactone, 4,7,9-Mega three ene -3- ketone, 4- hydroxyl - $\beta$ -two hydrogen damascene, 9-hydroxy-4,7-Mega three ene ketene, triethyl citrate, 4- (3-hydroxyl butyl) -3,5,5- three methyl -2- cyclohexene -1- ketone, tetradecanoic acid and neophytadiene in the reconstituted tobacco concentrate were significantly increased. Compared with the untreated reconstituted tobacco concentrate, the fragrances made from the reconstituted tobacco concentrate treated by strain HC-3 had better quality, more aroma, higher aroma concentration and lower offensive odor content.

## 0 引言

类胡萝卜素属于质体色素,一般存在于叶绿体结构内部,由8个异戊二烯残基单位构成,是含40个碳原子的萜烯化合物的总称<sup>[1-2]</sup>。作为一种非常重要的天然色素,类胡萝卜素普遍存在于水果(如柠檬、葡萄、菠萝、橙子、草莓等)、蔬菜(如西红柿、红辣椒、胡萝卜等)、鲜花(如花菱草、万寿菊、水仙花等)、部分海洋动物、微生物和昆虫体内,类胡萝卜素也是一种重要的香味前体物质<sup>[3-4]</sup>。依据分子两端化学结构的不同,类胡萝卜素可分为 $\beta$ -胡萝卜素、 $\alpha$ -胡萝卜素、 $\gamma$ -胡萝卜素、 $\delta$ -胡萝卜素、 $\epsilon$ -胡萝卜素和其他异构体。在烟叶调制、陈化和加工过程中,类胡萝卜素持续的降解作用不但可以提升烟叶中性香味物质的总量,所形成的产物还可进一步经氧化、还原、脱水等化学变化产生更多重要的烟草香味成分<sup>[5-6]</sup>。类胡萝卜素经氧化作用,可分别在 $\text{C}_9$ - $\text{C}_{10}$ ,  $\text{C}_{11}$ - $\text{C}_{13}$ ,  $\text{C}_{13}$ - $\text{C}_{15}$ 等双键位置发生断裂<sup>[7-10]</sup>,生成一系列重要的烟草香味成分,如二氢大马酮、大马酮、二氢猕猴桃内酯、紫罗兰酮、环柠檬醛、氧代异氟尔酮等<sup>[11-13]</sup>。

再造烟叶是利用烟草加工过程中产生的烟草废弃物(烟末、碎烟片、片烟、烟梗等),经过

重新加工组合而成的烟叶替代物。其主要加工过程包括烟草原料预处理、水萃取、浓缩、制浆、抄造、涂布、干燥、后处理等。在再造烟叶生产过程中,烟草提取浓缩液的作用是为涂布工序提供香气量充足且质量稳定、性能均一的涂布液,而涂布液的品质又直接决定了再造烟叶产品的内在品质<sup>[14-16]</sup>。目前普遍采用物理方法与化学方法制备烟草浓缩液,但存在香味物质含量低、种类少、副产物较多等问题,而采用微生物技术制备烟草浓缩液,具有转化率高、专一性高、香味物质品质高等优势,因而成为提升再造烟叶浓缩液及其制品品质的重要方法之一。此前有人报道过 $\beta$ -胡萝卜素降解产香菌株,但降解率较低,一般在80%以下<sup>[7-8]</sup>,也未见 $\beta$ -胡萝卜素降解菌应用于再造烟叶浓缩液的相关报道。魏涛等<sup>[17]</sup>从再造烟叶浓缩液中筛选到一株 $\beta$ -胡萝卜素降解产香菌株,为大肠杆菌HC-3,初步发现其对于 $\beta$ -胡萝卜素具有较好的降解效果。在此基础上,本文拟研究 $\beta$ -胡萝卜素降解菌株HC-3的最佳发酵条件,以获得 $\beta$ -胡萝卜素的最优降解率,并进一步对该菌株发酵液应用于再造烟叶浓缩液的增香效果进行研究,以期解决再造烟叶浓缩液品质较低、利用率较低等相关技术问题。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

**1.1.1 主要材料与试剂** 大肠杆菌 (*Enterobacter* sp.) HC-3, 由郑州轻工业大学食品与生物工程学院实验室筛选与保存;  $\beta$ -胡萝卜素标样, 购于百灵威科技有限公司;  $\beta$ -胡萝卜素(纯度 95%), 购于陕西帕尼尔生物科技有限公司。

碳源: 蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、乳糖和果糖; 氮源:  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 胰蛋白胨和尿素; 酵母粉; 以上试剂均为分析纯, 购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

再造烟叶浓缩液 TS-01, 由河南卷烟工业烟草薄片有限公司提供。

### 1.1.2 主要培养基

无碳源培养基:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{KCl}$  0.5 g/L,  $\text{NaNO}_3$  3 g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L,  $\beta$ -胡萝卜素 15 mg/L。

无碳源无氮源培养基:  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{KCl}$  0.5 g/L,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g/L,  $\beta$ -胡萝卜素 15 mg/L。

### 1.1.3 主要仪器

7890C GC-MS 色谱联用仪, 美国 Agilent 公司产; 2600 UC/VIS 紫外可见分光光度计, 美国 UNIC 公司产。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 单因素试验

**1.2.1.1 碳源对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响分析方法** 选取无碳源培养基, 分别添加蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、乳糖和果糖作为碳源, 调整初始 pH 值为 7.0, 灭菌制得发酵培养基, 在温度 30 °C 条件下, 摇床 150 r/min 培养 24 h, 通过比较不同碳源下菌株细胞干重和  $\beta$ -胡萝卜素降解率, 选择发酵培养基的最佳碳源。将该最佳碳源分别以质量浓度 10 g/L,

30 g/L, 50 g/L, 70 g/L 和 90 g/L 添加至发酵培养基, 在所述条件下对菌株 HC-3 进行培养, 确定其适宜质量浓度。

**1.2.1.2 氮源对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响分析方法** 选取无碳源无氮源培养基, 在最佳碳源及其最佳质量浓度的条件下, 分别添加  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 胰蛋白胨和尿素作为氮源, 调整初始 pH 值为 7.0, 灭菌制得发酵培养基, 在温度 30 °C 条件下, 摇床 150 r/min 培养 24 h, 通过比较不同氮源下菌株细胞干重和  $\beta$ -胡萝卜素降解率, 选择发酵培养基的最佳氮源。将该最佳氮源分别以质量浓度 1 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 7 g/L 和 9 g/L 添加至发酵培养基, 在所述条件下对菌株 HC-3 进行培养, 确定其适宜质量浓度。

**1.2.1.3 酵母粉质量浓度对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响分析方法** 选取无碳源无氮源培养基, 在最佳碳源、氮源及其最佳质量浓度的条件下, 调整初始 pH 值为 7.0, 灭菌制得发酵培养基, 将酵母粉分别以质量浓度 1 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 7 g/L 和 9 g/L 添加至发酵培养基, 在温度 30 °C, 摇床 150 r/min 条件下, 对菌株 HC-3 培养 24 h, 比较  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重, 确定其适宜质量浓度。

**1.2.1.4 初始 pH 值对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响分析方法** 选取无碳源无氮源培养基, 添加最佳质量浓度的碳源、氮源和酵母粉, 分别调整初始 pH 值至 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 和 9.0, 灭菌制得发酵培养基。在温度 30 °C, 摇床 150 r/min 条件下, 对菌株 HC-3 培养 24 h, 比较  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重, 确定适宜初始 pH 值。

**1.2.1.5 培养温度对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响分析方法** 选取无碳源无氮源培养基, 添加最佳质量浓度的碳源、氮源和酵母粉, 调整至最佳初始 pH 值, 灭菌制得发酵

培养基,分别于 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C 和 45 °C 条件下,摇床 150 r/min 对菌株 HC-3 培养 24 h,通过比较  $\beta$ -胡萝卜素的降解率和菌株细胞干重,确定适宜培养温度。

### 1.2.2 正交试验

以单因素试验结果为基础,选取 4 个影响较大的因素设计  $L_9(3^4)$  正交试验,以确定菌株 HC-3 的最佳发酵条件。

### 1.2.3 烟支样品的制备

将最佳发酵条件下所得菌株 HC-3 发酵液和再造烟叶浓缩液 TS-01 按 1:100 的体积比混合处理,在温度为 30 °C, pH 值为 6.0 条件下,摇床 150 r/min 处理 72 h。

将菌株 HC-3 发酵液处理前和处理后的再造烟叶浓缩液按 39% 涂布率分别涂布至相应片基上,在 90 °C 条件下烘 10 min,回潮至水分含量 12.5% 后切丝卷制成烟支,再将相应烟支在温度  $(22 \pm 2)$  °C,相对湿度  $(60 \pm 5)\%$  的恒温恒湿箱中平衡 48 h<sup>[18]</sup>。

### 1.2.4 $\beta$ -胡萝卜素降解率和香味物质含量的测定方法

采用分光光度计方法测定  $\beta$ -胡萝卜素的降解率,具体方法参见文献[19]。采用 GC-MS 分析方法检测再造烟叶浓缩液中香味物质的含量,具体方法参见文献[17]。

### 1.2.5 感官评价方法

采用文献[20]中的方法对 1.2.3 制备的烟支样品进行感官评价,以实际评吸结果来检验菌株 HC-3 发酵液对再造烟叶浓缩液处理后产生的效果。评价小组由 15 位评委组成。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

#### 2.1.1 碳源对 $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响

碳源对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干

重的影响如图 1 所示。由图 1 可知,菌株 HC-3 利用碳源的能力依次为:蔗糖 > 乳糖 > 麦芽糖 > 果糖 > 葡萄糖,且菌株 HC-3 利用蔗糖的能力明显优于其他碳源, $\beta$ -胡萝卜素降解率达到 87.5%,菌株细胞干重达到 39.2 g/L。这可能是因为蔗糖是一种非还原性双糖,可以被菌株缓慢吸收,为其生长提供必要的碳源和能量,并确保其可以完全降解底物  $\beta$ -胡萝卜素。而葡萄糖是还原性单糖,虽然其可被菌株快速吸收,但会导致菌株对  $\beta$ -胡萝卜素的降解率降低。乳糖和麦芽糖因不易水解故不易被该菌株利用。

在确定最佳碳源为蔗糖后,继续研究蔗糖质量浓度对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响,结果如图 2 所示。由图 2 可知,当蔗糖质量浓度小于 30 g/L 时,菌株对  $\beta$ -胡萝卜素的降解率较高;当蔗糖质量浓度大于 30 g/L 时,菌株对  $\beta$ -胡萝卜素的降解率开始缓慢降低。这可能是因为当蔗糖质量浓度高于 30 g/L 时,菌株优先利用过量的蔗糖,导致  $\beta$ -胡萝卜素不能很好地被降解;当蔗糖质量浓度为 30 g/L 时,菌株可以正常生长并完全降解底物。因此,选择碳源蔗糖的最佳质量浓度为 30 g/L。

#### 2.1.2 氮源对 $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响

氮源对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干

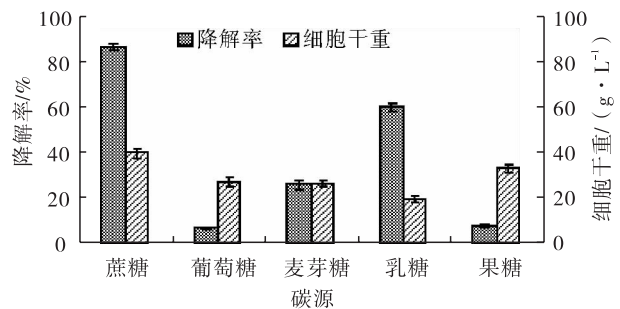


图 1 碳源对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响

Fig. 1 Effect of carbon source on the degradation rate of  $\beta$ -carotene and cell dry weight of strain

重的影响如图3所示.由图3可知,菌株HC-3在氮源为NaNO<sub>3</sub>的培养基中对β-胡萝卜素降解率最高,达86.1%,同时菌株细胞干重达到39.8 g/L.在确定最佳氮源为NaNO<sub>3</sub>后,继续研究NaNO<sub>3</sub>质量浓度对β-胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响,结果如图4所示.由图4可知,当NaNO<sub>3</sub>质量浓度低于3 g/L时,该菌株对β-胡萝卜素的降解率随着NaNO<sub>3</sub>质量浓度的增加而升高;当NaNO<sub>3</sub>质量浓度为3 g/L时,该菌株对β-胡萝卜素的降解率最高;当NaNO<sub>3</sub>质量浓度高于3 g/L时,该菌株对β-胡

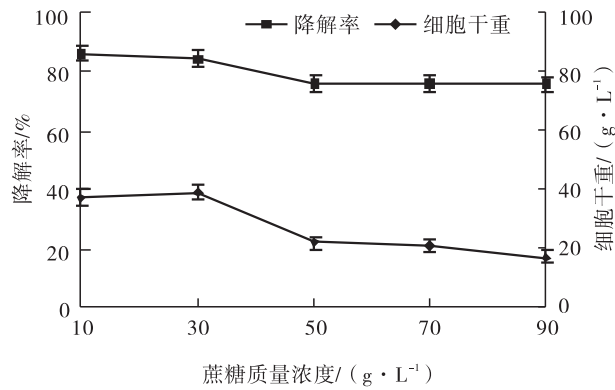


图2 蔗糖质量浓度对β-胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响

Fig. 2 Effect of sucrose mass concentration on the degradation rate of β-carotene and cell dry weight of strain

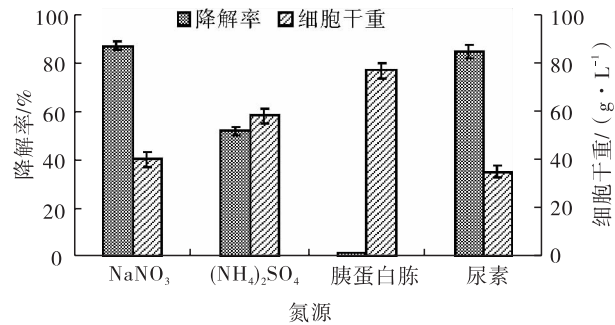


图3 氮源对β-胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen source on the degradation rate of β-carotene and cell dry weight of strain

萝卜素的降解率呈下降趋势.这可能是因为氮源过多,会使菌体生长过于旺盛,pH升高,代谢产物积累困难.因此,选择氮源NaNO<sub>3</sub>的最佳质量浓度为3 g/L.

### 2.1.3 酵母粉质量浓度对β-胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响

酵母粉质量浓度对β-胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响如图5所示.由图5可知,酵母粉对β-胡萝卜素降解速率的影响非常明显,当酵母粉质量浓度低于3 g/L时,菌株对β-

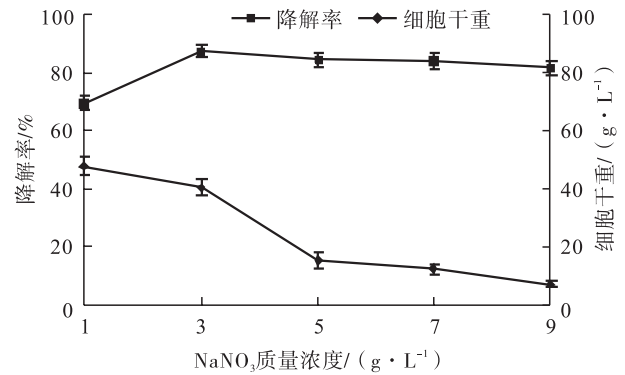


图4 NaNO<sub>3</sub>质量浓度对β-胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响

Fig. 4 Effect of NaNO<sub>3</sub> mass concentration on the degradation rate of β-carotene and cell dry weight of strain

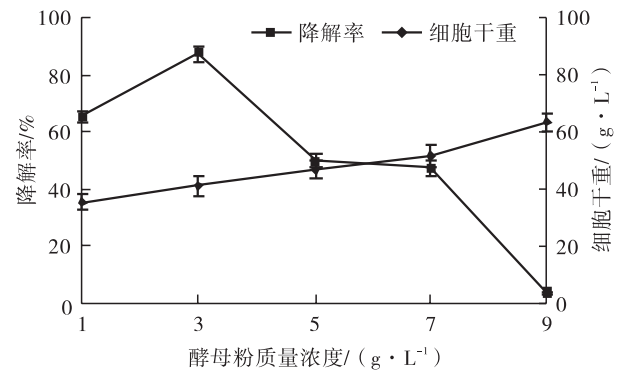


图5 酵母粉质量浓度对β-胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响

Fig. 5 Effect of yeast powder mass concentration on the degradation rate of β-carotene and cell dry weight of strain

胡萝卜素的降解能力最高;之后,降解率随着酵母粉质量浓度的增加而显著下降;当酵母粉质量浓度为 9 g/L 时,菌株生长最好,但是对底物的降解能力最低.因此,选择酵母粉的最佳质量浓度为 3 g/L.

#### 2.1.4 初始 pH 值对 $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响

微生物机体内的反应一般都是酶促反应,而酶促反应都会有一个最适的 pH 值范围.初始 pH 值对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响如图 6 所示.由图 6 可知,发酵液的初始 pH 值对  $\beta$ -胡萝卜素降解率影响极大,在初始 pH 值小于 7.0 时,菌株 HC-3 对  $\beta$ -胡萝卜素的降解能力随 pH 值的增大而增大;当初始 pH 值大于 7.0 时,菌株 HC-3 对  $\beta$ -胡萝卜素的降解率缓慢下降.因此,选择最佳初始 pH 值为 7.0.

#### 2.1.5 培养温度对 $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响

微生物不同的生理活动均要求相应的温度,温度不仅影响酶活还能够影响酶促反应速率.培养温度对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响如图 7 所示.由图 7 可知,温度在 35  $^{\circ}\text{C}$  时,降解率达到最高,菌株细胞干重较高,

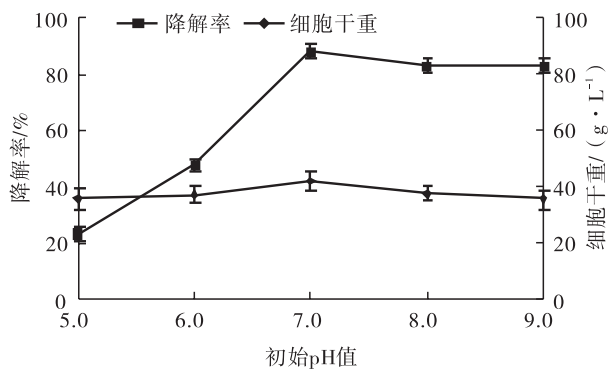


图 6 初始 pH 值对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响

Fig. 6 Effect of initial pH value on the degradation rate of  $\beta$ -carotene and cell dry weight of strain

因此,选择最适培养温度为 35  $^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2 正交试验结果

在单因素试验的基础上,选取 4 个影响较大的因素,即蔗糖质量浓度(A)、 $\text{NaNO}_3$  质量浓度(B)、酵母粉质量浓度(C)和初始 pH 值(D),设计  $L_9(3^4)$  正交试验,正交试验因素水平如表 1 所示,正交试验结果如表 2 所示.由表 2 可知,影响  $\beta$ -胡萝卜素降解率的因素主次为  $C > B > A > D$ ,即酵母粉质量浓度  $>$   $\text{NaNO}_3$  质量浓度  $>$  蔗糖质量浓度  $>$  初始 pH 值.降解率方差分析结果如表 3 所示.由表 3 可知,酵母粉质量浓度对  $\beta$ -胡萝卜素降解率影响显著.菌株 HC-3 的最佳发酵条件为  $A_3B_2C_2D_1$ ,即蔗糖质量浓度 30 g/L,  $\text{NaNO}_3$  质量浓度 3 g/L,酵母粉质量浓度 3 g/L,初始 pH 值 7.0.经验证,在此最佳发酵条件下,菌株 HC-3 对  $\beta$ -胡萝卜素的降解率为 93.35%.

## 2.3 再造烟叶浓缩液处理前后的香味成分分析

以菌株 HC-3 处理前的再造烟叶浓缩液为对照组、菌株 HC-3 处理后的再造烟叶浓缩液为实验组,菌株 HC-3 处理前后再造烟叶浓缩液香味成分的变化如表 4 所示.由表 4 可知,菌株 HC-3 处理前后再造烟叶浓缩液中 46 种香味成分发生变化,其中 8 种主要香味成

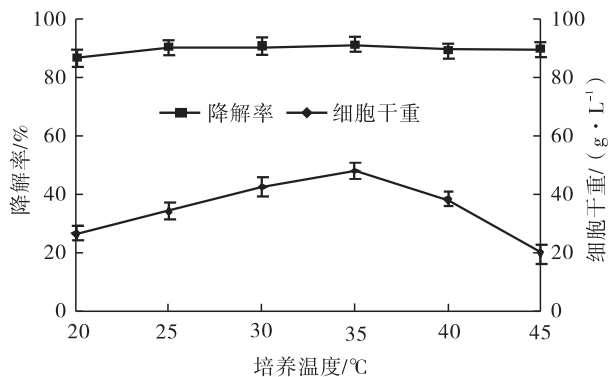


图 7 培养温度对  $\beta$ -胡萝卜素降解率和菌株细胞干重的影响

Fig. 7 Effect of culture temperature on the degradation rate of  $\beta$ -carotene and cell dry weight

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment table

水平	因素			
	A/(g · L <sup>-1</sup> )	B/(g · L <sup>-1</sup> )	C/(g · L <sup>-1</sup> )	D
1	10	2	2	7.0
2	20	3	3	7.5
3	30	4	4	8.0

表2 正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal test

试验号	因素				降解率/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	42.64
2	1	2	2	2	92.35
3	1	3	3	3	71.32
4	2	1	2	3	88.73
5	2	2	3	1	89.95
6	2	3	1	2	18.81
7	3	1	3	2	79.96
8	3	2	1	3	61.06
9	3	3	2	1	90.63
k <sub>1</sub>	68.770	70.443	40.837	74.407	
k <sub>2</sub>	65.830	81.120	90.570	63.707	
k <sub>3</sub>	77.217	60.253	80.410	73.703	
极差 R	11.387	20.867	49.733	10.700	
最佳方案	A <sub>3</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	
因素主次	C > B > A > D				

表3 降解率方差分析结果

Table 3 Analysis of variance of degradation rate

差异来源	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	209.646	2	0.975	19.000	
B	653.245	2	3.040	19.000	
C	4 142.679	2	19.276	19.000	*
D	214.918	2	1.000	19.000	
误差	214.92	2			

注: \* 表示差异显著(P < 0.05)

分含量明显提高,分别为二氢猕猴桃内酯(提高0.616%)、4,7,9-巨豆三烯-3-酮(提高0.765%)、4-羟基-β-二氢大马酮(提高0.933%)、9-羟基-4,7-巨豆三烯酮(提高2.730%)、柠檬酸三乙酯(提高0.535%)、4-(3-羟基丁基)-3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮(提高0.071%)、肉豆蔻酸(提高

表4 菌株 HC-3 处理后再造烟叶

浓缩液香味成分的变化

Table 4 Changes of aroma component in reconstituted tobacco concentrate before and after treatment with strain HC-3

序号	保留时间/min	化合物名称	相对含量/%	
			对照组	实验组
1	13.051	甲基庚烯酮	0.216	0.166
2	15.322	(+)-柠檬烯	0.382	0.367
3	16.307	苯甲醇	0.435	0.378
4	18.175	2-乙酰基吡咯	0.446	0.403
5	19.892	十一烷	0.093	0.063
6	21.106	苯乙醇	0.297	0.303
7	26.578	正十二烷	0.454	0.519
8	29.758	1,2,3,4-四氢-1,1,6-三甲基萘	0.111	0.098
9	31.844	十九烷	0.071	0.096
10	32.395	苯乙酸	0.517	0.320
11	33.190	正十三烷	0.402	0.419
12	36.162	烟碱	0.167	0.525
13	36.290	1,5,8-三甲基-1,2-二氢萘	0.140	0.236
14	37.505	茄酮	1.724	1.634
15	38.487	大马酮	0.113	0.152
16	39.071	5-亚乙基-1-甲基环庚烯	0.149	0.138
17	39.566	正十四烷	0.137	0.305
18	39.859	香兰素	0.181	0.156
19	42.514	1,3-二乙酰基-2-咪唑烷酮	0.147	0.127
20	42.857	香叶基丙酮	0.151	0.163
21	43.303	2,3-二氢-2-甲基苯并呋喃	0.279	0.129
22	47.063	二氢猕猴桃内酯	0.367	0.983
23	50.113	4,7,9-巨豆三烯-3-酮	0.534	1.299
24	51.425	正十六烷	0.458	0.218
25	52.423	4-羟基-β-二氢大马酮	1.862	2.795
26	54.177	9-羟基-4,7-巨豆三烯酮	6.462	9.192
27	55.216	柠檬酸三乙酯	0.432	0.967
28	57.091	4-(3-羟基丁基)-3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮	1.977	2.048
29	61.017	肉豆蔻酸	0.411	0.928
30	61.990	脱氢伏草叶醇	0.347	0.235
31	62.122	十八烷	0.139	0.180
32	64.144	新植二烯	29.953	39.130
33	68.006	法尼基丙酮	0.383	0.389
34	68.475	棕榈酸甲酯	0.367	0.423
35	70.144	异萜萜亭	0.759	0.623
36	70.935	棕榈酸	8.649	6.722
37	76.458	7,10,13-十六碳三烯酸甲酯	0.577	0.616
38	78.419	亚油酸	0.916	0.707
39	78.709	α-亚麻酸	3.233	3.007
40	79.718	硬脂酸	0.601	0.695
41	85.748	正二十六烷	1.184	1.829
42	88.328	香叶基香叶醇	0.164	0.197
43	91.175	正二十四烷	5.165	6.895
44	92.922	二十五烷	0.168	0.210
45	97.321	正二十七烷	0.782	1.154
46	98.263	四十四烷	5.485	7.704

0.517%) 和新植二烯(提高 9.177%)。

## 2.4 感官评吸结果

再造烟叶浓缩液处理前后的评吸效果如表 5 所示。由表 5 可知,与未处理的再造烟叶浓缩液相比,经菌株 HC-3 处理后的再造烟叶浓缩液综合得分提高 0.7 分,所得片基香气质较好、香气量较足、香气浓度较高、杂气量较低。

表 5 再造烟叶浓缩液处理前后的感官评吸结果

Table 5 Sensory evaluation results of reconstituted tobacco concentrate before and after treatment

样品	香气质	香气量	浓度	柔细度	余味	杂气	刺激性	总分
处理前	7.0	6.0	6.0	7.0	7.0	6.0	7.0	46.0
处理后	7.2	6.2	6.1	7.0	7.0	6.2	7.0	46.7

## 3 结论

本文运用单因素试验和正交试验,对  $\beta$ -胡萝卜素降解菌株 HC-3 的发酵条件进行了优化,并将最佳发酵条件下得到的菌株 HC-3 发酵液应用于再造烟叶浓缩液,结合感官评吸考察该菌株的增香效果。结果表明:菌株 HC-3 发酵降解  $\beta$ -胡萝卜素的最佳条件为  $\text{NaNO}_3$  质量浓度 3 g/L,蔗糖质量浓度 30 g/L,酵母粉质量浓度 3 g/L,初始 pH 值 7.0,在该发酵条件下  $\beta$ -胡萝卜素降解率可以达到 93.35%。经该菌株处理后,再造烟叶浓缩液中的二氢猕猴桃内酯、4,7,9-巨豆三烯-3-酮、4-羟基- $\beta$ -二氢大马酮、9-羟基-4,7-巨豆三烯酮、柠檬酸三乙酯、4-(3-羟基丁基)-3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮、肉豆蔻酸和新植二烯这 8 种香味成分含量明显提高;与未处理再造烟叶浓缩液相比,经菌株 HC-3 处理后的再造烟叶浓缩液制得的片基香气质较好、香气量较足、香气浓度较高、杂气量较低,综合得分提高了 0.7 分。该  $\beta$ -胡萝卜素降解产生致香物质的新技术有助于提高再造烟叶浓缩液品质和利

用率,也为我国再造烟叶生物增香提供了一种新的途径和方法。

## 参考文献:

- [1] 李爱军,代慧娟,姜本,等. 烟草类胡萝卜素研究进展[J]. 安徽农业科学,2008,36(6): 2364.
- [2] EROGLU A, HRUSZKEWYCZ D P, CURLEY-JR R W, et al. The eccentric cleavage product of  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -apo-13-carotenone, functions as an antagonist of RXRa[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2010,504(1): 11.
- [3] CHU D Y, XIE Y Q, HONG S Q, et al. Major carotenoids in tobacco laminae: Identification and quantification by HPLC with photodiode array detection[J]. Asian Journal of Chemistry, 2010,22(4): 2635.
- [4] LEFFINGWELL J C. Carotenoids as flavour & Fragrance precursors[J]. Leffingwell Reports, 2002,2(3):1.
- [5] 李福枝,刘飞,曾晓希,等. 天然类胡萝卜素的研究进展[J]. 食品工业科技,2007,28(9): 227.
- [6] 王瑞新. 烟草化学[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [7] HARRISON P J, BUGG T D. Enzymology of the carotenoid cleavage dioxygenases: Reaction mechanisms, inhibition and biochemical roles[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014,544(4): 105.
- [8] SILVA I, ROCHA S M, COIMBRA M A. Quantification and potential aroma contribution of  $\beta$ -ionone in marine salt[J]. Flavour and Fragrance Journal,2010,25(4): 93.
- [9] SCHWARTZ S H, QIN X Q, ZEEVAART J A D. Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants[J]. The Journal of Biological Chemistry,2001,276(27): 25208.



- [10] MARASCOI E K, VAY K, DANNERT S C. Identification of carotenoid cleavage dioxygenases from *Nostoc* sp. PCC 7120 with different cleavage activities[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(42): 31583.
- [11] NONIER M F, GAULEJAC N V D, VIVAS N, et al. Characterization of carotenoids and degradation products in oak wood incidence on the flavour of wood[J]. *Comptes Rendus Chimie*, 2004, 7(6/7): 689.
- [12] 刘金霞. 烤烟类胡萝卜素的提取分离、氧化降解与加香应用研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2008.
- [13] KANEKO H, HARADA M. 4-Hydroxy- $\beta$ -damascone and 4-Hydroxy-dihydro- $\beta$ -damascone from Cigar tobacco[J]. *Agricultural Biology Chemistry*, 1972, 36(1): 168.
- [14] 张溪, 刘皓月, 惠岚峰, 等. 造纸法再造烟叶的研究进展[J]. *天津造纸*, 2018, 40(1): 2.
- [15] 戴路, 卢昕博, 吴志宏, 等. 加工工艺对再造烟叶感官品质的影响[J]. *食品工业*, 2017, 38(10): 31.
- [16] 孙先玉, 孙博, 李冬玲, 等. 造纸法再造烟叶加工技术研究进展[J]. *生物质化学工程*, 2011, 45(6): 49.
- [17] 魏涛, 杨坤鹏, 黄申, 等. 降解 $\beta$ -胡萝卜素产香菌株的分离鉴定及降解酶学性质[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(4): 94.
- [18] 蔡冰, 王建新, 陈祖刚, 等. 造纸法再造烟叶致香成分的分析[J]. *烟草科技*, 2002(6): 19.
- [19] 贾蓓蕾, 魏涛, 黄申, 等.  $\alpha$ -胡萝卜素降解产香菌株的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 41(1): 34.
- [20] 邱晔, 王建, 马讯, 等. 造纸法再造烟叶感官评价方法的研究[J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(18): 4351.