



引用格式:黄申,马宁,王琼波,等.再造烟叶浓缩液增香菌的筛选、鉴定与发酵优化[J].轻工学报,2020,35(2):33-41.

中图分类号:TS414 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.02.005

文章编号:2096-1553(2020)02-0033-09

# 再造烟叶浓缩液增香菌的筛选、鉴定与发酵优化

## Screening, identification and fermentation optimization of flavor-enhancing microbial from reconstituted tobacco concentrate

黄申<sup>1</sup>,马宁<sup>1</sup>,王琼波<sup>2</sup>,霍梦杰<sup>1</sup>,周利峰<sup>1</sup>,冯颖杰<sup>3</sup>,杨峰<sup>4</sup>,  
毛多斌<sup>1</sup>

HUANG Shen<sup>1</sup>,MA Ning<sup>1</sup>,WANG Qiongbao<sup>2</sup>,HUO Mengjie<sup>1</sup>,ZHOU Lifeng<sup>1</sup>,  
FENG Yingjie<sup>3</sup>,YANG Feng<sup>4</sup>,MAO Duobin<sup>1</sup>

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;

2. 漯河医学高等专科学校 食品营养系,河南 漯河 462002;

3. 河南中烟工业有限责任公司 技术中心,河南 郑州 450001;

4. 河南卷烟工业烟草薄片有限公司,河南 许昌 461000

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

2. Department of Food Nutrition, Luohe Medical College, Luohe 462002, China;

3. Technology Center, China Tobacco He'nan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou 450001, China;

4. He'nan Cigarette Industry Tobacco Sheet Co., Ltd., Xuchang 461000, China

### 关键词:

再造烟叶浓缩液;增香菌;筛选;鉴定;产蛋白霉菌

### Key words:

reconstituted tobacco concentrate;  
flavor-enhancing microbial; screening; identification;  
*Planomicrobium* sp.

**摘要:**采用稀释涂布平板法,从再造烟叶浓缩液中筛选分离得到一株增香菌株 HS-1,对该菌株进行鉴定和发酵培养条件优化,进而对最优培养条件下发酵再造烟叶浓缩液中中性香味成分进行分析.结果表明:菌株 HS-1 为产蛋白霉菌属 (*Planococcus* sp.),其最佳发酵培养条件为发酵温度 30 ℃,接种量 5%,发酵时间 36 h;该培养条件下,经菌株 HS-1 发酵的再造烟叶浓缩液中,中性香味成分总含量由发酵前的 56.845% 提高到 72.527%,且中性香味成分的种类和含量均有所增加,其中 5-甲基糠醛和  $\beta$ -紫罗兰酮为发酵后新增成分,苯甲醇、苯乙醛、2-乙酰基吡咯、苯乙醇、茄酮、 $\beta$ -大马酮、二氢猕猴桃内酯、巨豆三烯酮等成分均有不同程度增加.

收稿日期:2019-10-16

基金项目:国家自然科学基金项目(21546012,31600042)

作者简介:黄申(1981—),男,河南省淮阳县人,郑州轻工业大学副教授,博士,主要研究方向为烟草生物技术和生物化工.

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:** A flavor-enhancing strain HS-1, was screened and isolated from the reconstituted tobacco concentrate by dilute coating plate method. The strain was identified and the culture conditions for fermentation of the strain were optimized. The neutral aroma components of the reconstituted tobacco concentrate fermented under the optimal culture conditions were analyzed. The results showed that HS-1 was *Planococcus* sp., the optimal culture conditions for fermentation were fermentation temperature of 30 °C, inoculation amount of 5%, and fermentation time of 36 h. Under this culture condition, the total content of neutral aroma components in the reconstituted tobacco concentrate fermented by HS-1 was increased from 56.845% before fermentation to 72.527%, and the types and contents of neutral aroma components had increased. 5-methylfurfural and  $\beta$ -ionone were new ingredients after fermentation, the components such as benzyl alcohol, phenylacetaldehyde, 2-acetylpyrrole, phenethyl alcohol, solanone,  $\beta$ -damascenone, dihydroactinidiolide and megastigmatrienone had increased in varying degrees after fermentation.

## 0 引言

再造烟叶是以卷烟生产过程中产生的废弃烟草物质(烟末、烟梗、碎烟片等)为原料,采用物理或化学方法重新组合加工制成的片状或丝状再生产品,可用作卷烟填充料<sup>[1]</sup>。目前,再造烟叶通常按8%~10%的质量分数加入到卷烟配方中,起到降焦减害的作用<sup>[2-3]</sup>。虽然,再造烟叶已经成为卷烟产品必不可少的重要原料,但再造烟叶中性香味成分的含量与天然烟叶相比有较大的差距,这是再造烟叶在感官品质上与天然烟叶存在差距的重要原因<sup>[4-6]</sup>。引起中性香味成分含量差异的主要原因有两点:一是再造烟叶原料基础较差;二是经过萃取浓缩、高温烘干等工艺过程后,烟草原料中性香味成分大量流失。为提高再造烟叶的香气量,目前普遍采用的增香技术是添加香精香料,该方法属于外源性增香,能够通过掩盖杂气和协调香气的方式对产品进行修饰和完善,从而进一步彰显产品风格,但是该方法不能改变产品根源性的感官品质不佳的缺陷。因此,为提升再造烟叶的感官品质,有必要开展内源性增香技术的研究<sup>[7-9]</sup>。

产香微生物可以利用其体内分泌的各类酶,将中性香味前体物质转化为中性香味物质,而烟草提取液和浓缩液可以为产香微生物生长

提供充足的碳源、氮源和其他营养成分,该方法即为内源性增香技术。因此,筛选能适应再造烟叶浓缩液环境并能增加再造烟叶浓缩液香气量、提升再造烟叶浓缩液香气质的微生物,具有重要的理论和应用价值<sup>[10-12]</sup>。目前,采用微生物发酵来改善再造烟叶香气品质的研究相对较少。鉴于此,本文拟从再造烟叶浓缩液中筛选出能够产香的微生物,并对其最优培养条件和增香效果进行研究,以期对内源性增香技术的发展提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

材料:再造烟叶浓缩液 KM-13(QTX), QTX-18, ZY-01, ZY-02, X-2, TS-0002, TS-0003, TS-0005,均由河南卷烟工业烟草薄片有限公司产。

试剂:胰蛋白胨(生物级)、酵母提取物(生物级),英国Oxford公司产;NaCl,无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH, HCl,无水乙醇,CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,以上试剂均为分析纯,上海麦克林生化科技有限公司产。

仪器:LDZX-50KBS型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂产;DHP-9162型恒温培养箱,TH2-C型恒温摇床,太仓市科教器材厂产;6890a/5975c型气相色谱-质谱联用仪,美国安捷伦公司产;R-1001VN型旋转蒸

发仪,郑州长城科工贸有限公司产;ZDHW型调温电热套,北京中兴伟业仪器有限公司产;J6-MI型冷冻离心机,美国Beckman公司产;SW-CJ-1F型超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司产;DLSB-1020型低温冷却液循环泵,郑州国瑞仪器有限公司产;BSA323S型电子天平,赛多利科学仪器有限公司产;MS205DU型分析天平,瑞士梅特勒-托利多公司产.

## 1.2 培养基

察式液体培养基:  $K_2HPO_4$  1 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g/L, KCl 0.5 g/L,  $NaNO_3$  3 g/L,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 g/L, 蔗糖 30 g/L, 121 °C, 20 min 高压灭菌, 4 °C 保存.

察式固体培养基: 在每 L 察式液体培养基中加入 20 g 琼脂粉, 即得.

LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g/L, NaCl 20 g/L, 酵母粉 5 g/L, 121 °C, 20 min 高压灭菌, 4 °C 保存.

LB 固体培养基: 在每 L LB 液体培养基中加入 20 g 琼脂粉, 即得.

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 菌源的富集

取 0.5 mL 不同来源的再造烟叶浓缩液样品, 接种到装有 30 mL LB 液体培养基的三角瓶中, 于 30 °C, 150 r/min 条件下培养 12 h, 得到菌源 A. 取 0.5 mL 不同来源的再造烟叶浓缩液样品, 接种到装有 30 mL 察氏液体培养基的三角瓶中, 于 28 °C, 150 r/min 条件下培养 2 d, 得到菌源 B<sup>[13]</sup>.

### 1.3.2 菌种的筛选

分别移取 0.5 mL 菌源 A 和 0.5 mL 菌源 B, 接种到 30 mL 质量分数为 50% 的再造烟叶浓缩液(灭菌)中, 于 30 °C, 150 r/min 条件下培养 3 d. 然后分别移取 1 mL 样品, 按照  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  浓度梯度进行稀释, 再分别移取

100  $\mu$ L 稀释菌液到 LB 固体培养基和察氏固体培养基上进行平板涂布, 每个浓度梯度平行涂布 3 个平板. 待操作完成后, 将平板倒置于培养箱中, 于 30 °C 温度下培养 2~3 d, 观察菌株是否生长. 从长有菌株的平板中挑选出形态较好的单菌落, 于平板中反复划线进行分离纯化, 只有目标菌生长即可确认为纯培养. 单菌落活化后进化液体培养, 将菌种置于甘油管内, 放于 -80 °C 冰箱保存.

### 1.3.3 菌种的驯化

将筛选后保存的菌种活化后, 在 LB 液体培养基或察氏液体培养基中过夜培养, 按 1% 的接种量接种到质量分数为 75% 的再造烟叶浓缩液(灭菌)中, 于 30 °C, 150 r/min 条件下培养 3 d; 按上述条件转接一次后, 再按 1% 的接种量接种到质量分数为 100% 的再造烟叶浓缩液(灭菌)中, 于 30 °C, 150 r/min 条件下培养 3 d; 按上述条件再转接一次后, 驯化完成. 接着, 利用稀释涂布平板法获得单菌落, 利用 LB 液体培养基或察氏液体培养基培养后, 将菌种置于甘油管中, 放于 -80 °C 冰箱中保存.

### 1.3.4 增香菌的确认

将驯化后保存的菌种活化后, 按 1% 的接种量接种到 LB 液体培养基中, 将摇瓶置于 30 °C, 150 r/min 的摇床中培养 12 h, 获得种子液, 再按 5% 的接种量转接到装有 30 mL 质量分数为 100% 的再造烟叶浓缩液的三角瓶中, 将其置于 30 °C, 150 r/min 的摇床中培养 24 h. 同时, 将等体积的无菌水作为对照添加到装有 30 mL 质量分数为 100% 的再造烟叶浓缩液中, 在相同的培养条件下培养 24 h. 发酵完成后进行中香味成分分析, 使香味成分含量增加的菌种即为增香菌.

### 1.3.5 菌株鉴定

**1.3.5.1 形态观察和革兰氏染色** 在显微镜下观察菌株形态, 参照文献[16]的方法进行菌

株的革兰氏染色。

### 1.3.5.2 16S rDNA 序列扩增、测序和系统发育分析

用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取目标菌株基因组 DNA。PCR 反应引物为细菌 16S rDNA 通用引物,上游引物为 5'-AGTTT-GATCMTGGCTCAG-3',下游引物为 5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3',引物由上海生物工程有限公司合成。PCR 反应体系为: Taq 酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L, 上游引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, 下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, 10  $\times$  Buffer (10  $\mu$ mol/L) 2.5  $\mu$ L, DNA 模板 (50 ng/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, dNTP (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O (灭菌蒸馏水) 19.8  $\mu$ L。测序由上海生物工程有限公司完成。利用 BLAST 软件将得到的基因序列在 NCBI GeneBank 中进行同源性检测,利用 MEGA 5.1 软件构建 16S rDNA 基因序列系统进化树,进行系统发育分析。

### 1.3.6 再造烟叶浓缩液中性香味成分的提取和分析

**1.3.6.1 中性香味成分的提取** 移取再造烟叶浓缩液 25 mL 放入 1000 mL 的圆底蒸馏烧瓶中,加入 500 mL 蒸馏水和 100 g 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 后,进行加热;向浓缩瓶中加入 80 mL 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,在 60  $^{\circ}$ C 恒温水浴中加热 2.5 h。萃取后的溶液分别用质量分数为 5% 的稀 HCl 和质量分数为 5% 的稀 NaOH 洗涤 3 次,得到中性香味成分提取液,加入适量的无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,干燥过夜。于 60  $^{\circ}$ C 恒温水浴条件下浓缩至 1 mL,进行 GC-MS 分析<sup>[14-15]</sup>。

**1.3.6.2 中性香味成分的分析** GC-MS 分析条件如下。

色谱条件: Agilent HP - 5MS 色谱柱 (30 m  $\times$  250  $\mu$ m  $\times$  0.25  $\mu$ m); 进样口温度 280  $^{\circ}$ C; 载气为高纯 He (99.999%), 流速为 1.0 mL/min; 升温程序为初始温度 50  $^{\circ}$ C, 保持 4 min, 然后以 2  $^{\circ}$ C/min 的速率升温至 240  $^{\circ}$ C,

结束;不分流;进样量 1.0  $\mu$ L;采用全扫模式。

质谱条件:传输线温度 280  $^{\circ}$ C;离子源温度 280  $^{\circ}$ C;四极杆温度 150  $^{\circ}$ C;电离方式为电子轰击(EI),电子能量 70 eV;溶剂延迟时间 8 min;全扫质量范围( $m/z$ )为 35 ~ 550 u。

### 1.3.7 再造烟叶浓缩液增香菌发酵条件的优化

**1.3.7.1 单因素试验** 取多个 100 mL 的再造烟叶浓缩液 TS - 0005,分别储存于 250 mL 的三角瓶中,加入一定量的增香菌,利用同时蒸馏萃取法,分别考察发酵温度、接种量、发酵时间 3 个因素对再造烟叶浓缩液中性香味成分含量的影响。考察发酵温度的影响时,将发酵温度设为 26  $^{\circ}$ C, 28  $^{\circ}$ C, 30  $^{\circ}$ C, 32  $^{\circ}$ C, 34  $^{\circ}$ C 共 5 个梯度,接种量 5%,发酵时间 24 h;考察接种量的影响时,将接种量设为 1%, 3%, 5%, 7%, 9% 共 5 个梯度,发酵温度 30  $^{\circ}$ C,发酵时间 24 h;考察发酵时间的影响时,将发酵时间设为 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h 共 5 个梯度,发酵温度 30  $^{\circ}$ C,接种量 7%。

**1.3.7.2 正交试验** 结合单因素试验结果,选取合理的水平,根据参考文献[17-18]中的方法进行正交试验。

### 1.3.8 感官评价

将未经发酵处理(对照组)和经发酵处理(实验组)的再造烟叶浓缩液按照 39% 的涂布率涂布于再造烟叶片基上,于 90  $^{\circ}$ C 条件下烘 10 min,回潮至含 12.5% 水分,切丝卷烟,作为样品,由河南卷烟工业烟草薄片有限公司组织 11 名评吸专家进行评吸。

39% 涂布率所需再造烟叶浓缩液的计算方法为先称取再造烟叶片基,由再造烟叶片基的质量推算出再造烟叶浓缩液的质量,公式如下。

$$\text{再造烟叶浓缩液质量} =$$

$$\text{再造烟叶片基质量} \times 0.88 \times 1.64 + 0.5$$

$$\text{回潮加水质量} = \text{再造烟叶浓缩液质量} \times 1.6$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 增香菌的筛选与确认结果

从初烤后不同牌号的再造烟叶浓缩液中筛选到1株能增加再造烟叶浓缩液香气的增香菌株 HS-1. 经 GC-MS 检测分析后发现,该菌株使苯甲醇、苯乙醛、苯乙醇、 $\beta$ -二氢大马酮、 $\beta$ -大马酮的含量相比发酵前均有不同程度的增加.

### 2.2 增香菌株 HS-1 的鉴定结果

#### 2.2.1 菌株 HS-1 的形态学特征

菌株 HS-1 的菌落形态如图 1 所示. 由图 1 可知,菌株 HS-1 的菌落表面有光泽,边缘整齐. 经革兰氏染色后,在显微镜( $\times 100$ )下观察菌株 HS-1 的微观形态,结果如图 2 所示. 由图 2 可知,菌体分布均匀,呈丝状,菌体大小为  $2 \mu\text{m}$  左右.

#### 2.2.2 菌株 HS-1 的进化树分析

对菌株 HS-1 基因组 DNA 进行 PCR 扩增,得到 1425 bp 的核酸序列. 在 NCBI Genebank 数据库中进行 BLAST 同源性分析,发现菌株 HS-1 扩增出的 1425 bp 核酸序列与 *Planococcus* sp. 的同源性为 100%. 菌株 HS-1 与其相似菌株的 16S rDNA 区域序列系统进化树如图 3 所示. 由图 3 可知,菌株 HS-1 与产蛋白霉

菌(*Planomicrobium* sp.) 聚为一类. 结合形态学特征和进化树分析结果,初步鉴定菌株 HS-1 为产蛋白霉菌属.

### 2.3 增香菌株 HS-1 发酵条件的优化结果

#### 2.3.1 单因素试验结果

#### 2.3.1.1 发酵温度对再造烟叶浓缩液中性香味成分含量的影响

发酵温度对再造烟叶浓缩液中性香味成分含量的影响如图 4 所示. 由图 4 可知,随发酵温度的升高,中性香味成分含量呈先增加后减少的趋势. 这可能是因为随着发酵温度的上升,菌落生长代谢和繁殖的酶失去活性,以至于发酵周期缩短. 因此,确定正交试验中发酵温度水平范围为  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.3.1.2 菌株 HS-1 接种量对再造烟叶浓缩液中性香味成分含量的影响

菌株 HS-1 接种量对再造烟叶浓缩液中性香味成分含量的影响如图 5 所示. 由图 5 可知,随增香菌接种量的升高,中性香味成分含量呈先增加后减少的趋势. 这可能是因为增香菌接种量超过一定值后达到饱和状态,中性香味成分含量不会因增香菌接种量增加再次明显增加. 因此,确定正交试验中增香菌接种量水平范围为 3%, 5%, 7%, 9%.

#### 2.3.1.3 发酵时间对再造烟叶浓缩液中性香味成分含量的影响

发酵时间对再造烟叶浓缩液中性香味成分含量的影响如图 6 所示. 由图 6

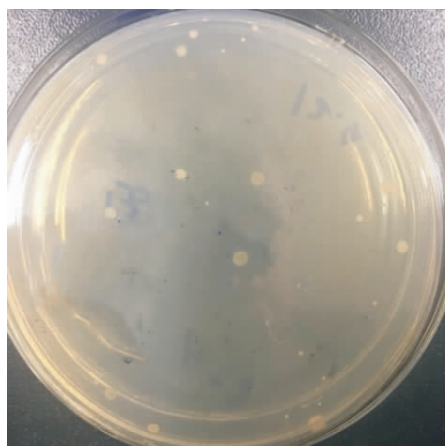


图 1 菌株 HS-1 的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of HS-1

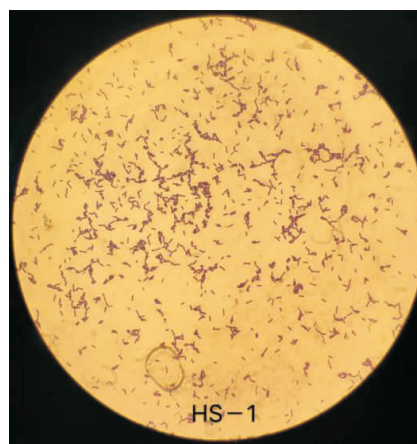


图 2 革兰氏染色后菌株 HS-1 的微观形态

Fig. 2 Micromorphology of HS-1 after Gram staining

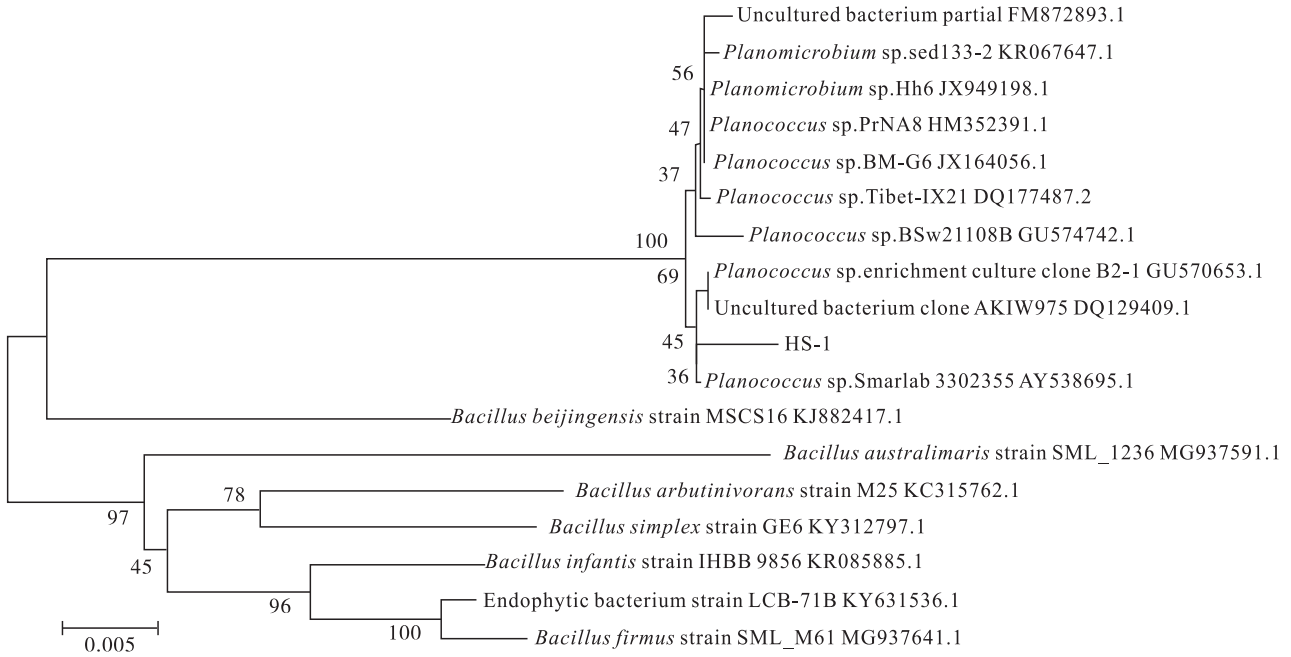


图3 菌株HS-1与其相似菌株的16S rDNA区域序列系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree between HS-1 and its relatives based on 16S rDNA region sequence

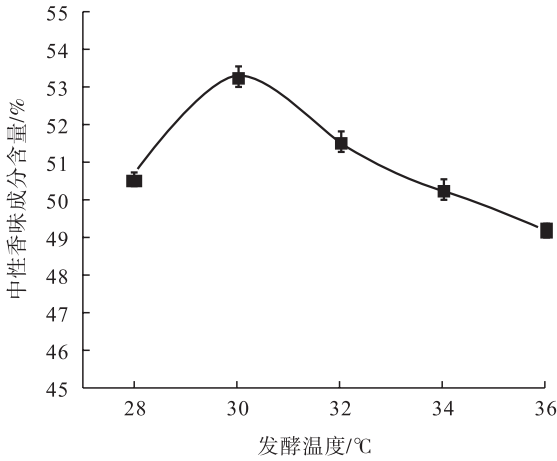


图4 发酵温度对再造烟叶浓缩液中  
性香味成分含量的影响

Fig. 4 Effects of fermentation temperatures on the content of neutral aroma components of reconstituted tobacco concentrate

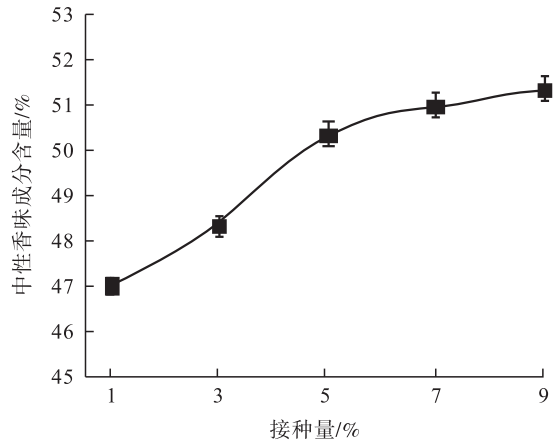


图5 菌株HS-1接种量对再造烟叶浓缩液中  
性香味成分含量的影响

Fig. 5 Effect of inoculation amount of HS-1 on the content of neutral aroma components of reconstituted tobacco concentrate

可知,随着发酵时间的延长,浓缩液中性香味成分含量呈先增加后减少的趋势.这可能是因为发酵时间过长,导致增香菌在浓缩液中腐烂、变质,不再增香.总体上,在试验中,随着时间的增加,中性香味成分含量增大的趋势并不明显,因

此,确定正交试验中发酵时间水平范围为12 h, 24 h,36 h,48 h.

### 2.3.2 正交试验结果

在单因素试验的基础上,选取发酵温度(A)、接种量(B)、发酵时间(C)为设计因素,以

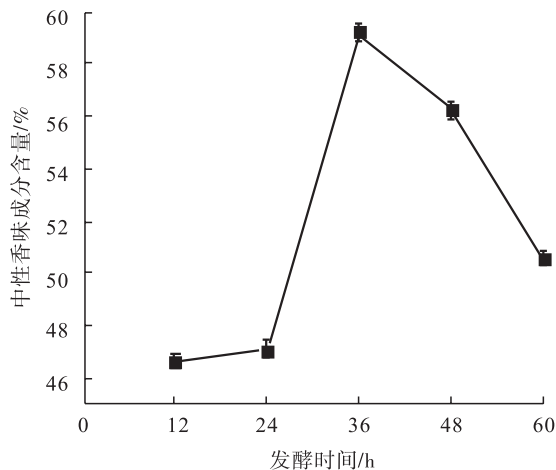


图6 发酵时间对再造烟叶浓缩液中中性香味成分含量的影响

Fig.6 Effect of fermentation time on the content of neutral aroma components of reconstituted tobacco concentrate

再造烟叶浓缩液的中性香味成分含量为指标进行  $L_{16}(4^3)$  正交试验. 正交试验因素水平见表1, 正交试验设计与结果见表2, 各因素方差分析见表3.

由表2可知, 各因素对发酵后再造烟叶浓缩液中性香味成分含量影响大小的顺序为  $B > C > A$ , 即接种量对中性香味成分含量的影响最大, 发酵时间次之, 发酵温度的影响最小. 再造烟叶浓缩液发酵的最佳条件是  $A_2B_2C_3$ , 即发酵温度为  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , 接种量为  $5\%$ , 发酵时间为  $36\text{ h}$ . 由表3可知, 接种量对再造烟叶浓缩液中性香味成分含量影响显著, 发酵温度、发酵时间对其影响均不显著.

### 2.3.3 验证试验结果与分析

为了验证正交试验结果的准确性, 在最佳发酵条件下做了3次验证试验, 对再造烟叶浓缩液在最佳条件下发酵前后的中性香味成分进行 GC-MS 分析, 结果如表4所示. 由表4可知, 经菌株 HS-1 发酵后, 再造烟叶浓缩液中性香味成分总含量为  $72.527\%$ , 明显高于正交试验

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/ $^\circ\text{C}$	B/%	C/h
1	28	3	12
2	30	5	24
3	32	7	36
4	34	9	48

表2 正交试验设计与结果

Table 2 Orthogonal test design and results

试验号	因素			中性香味成分含量/%
	A	B	C	
1	1	1	1	62.537
2	1	2	2	66.030
3	1	3	3	66.949
4	1	4	4	67.052
5	2	1	2	63.805
6	2	2	1	68.629
7	2	3	4	69.741
8	2	4	3	69.574
9	3	1	3	64.276
10	3	2	4	68.037
11	3	3	1	63.973
12	3	4	2	67.948
13	4	1	4	63.872
14	4	2	3	68.437
15	4	3	2	67.054
16	4	4	1	63.552
$K_1$	262.568	254.490	258.691	
$K_2$	271.749	271.133	264.837	
$K_3$	264.234	267.717	269.236	
$K_4$	262.915	268.126	268.702	
$k_1$	65.642	63.623	64.673	
$k_2$	67.937	67.783	66.209	
$k_3$	66.059	66.929	67.309	
$k_4$	65.729	67.032	67.176	
极差 R	2.295	4.160	2.636	

表3 各因素方差分析

Table 3 Analysis of variance of each factor

差异来源	偏差平方和	均方	自由度	F 值	P 值	显著性
A	0.001 397	0.000 466	3	2.70	0.139	
B	0.004 117	0.001 372	3	7.95	0.016	*
C	0.001 774	0.000 591	3	3.43	0.093	

注: \* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

表4 再造烟叶浓缩液发酵前后  
中性香味成分含量

Table 4 Content of neutral aroma components  
before and after fermentation of  
reconstituted tobacco concentrate

序号	化合物	中性香味成分含量/%	
		对照组	实验组
1	5-甲基糠醛	—	0.373
2	苯甲醇	0.172	0.623
3	苯乙醛	0.516	1.044
4	2-乙酰基吡咯	0.738	1.345
5	苯乙醇	0.438	1.003
6	1,2,3,4-四氢-1,1,6-三甲基萘	0.184	0.295
7	茄酮	1.073	1.963
8	$\beta$ -大马酮	0.717	1.134
9	$\beta$ -紫罗兰酮	—	1.463
10	二氢猕猴桃内酯	0.697	1.115
11	巨豆三烯酮	4.082	6.792
12	$\beta$ -二氢大马酮	1.301	2.325
13	叶绿醇	45.890	51.580
14	木香烯内酯	1.037	1.472
	总量	56.845	72.527

中中性香味成分的总含量,其中,5-甲基糠醛和 $\beta$ -紫罗兰酮为发酵后所产生的化合物;苯甲醇、苯乙醛、2-乙酰基吡咯、苯乙醇、茄酮、 $\beta$ -大马酮、二氢猕猴桃内酯、巨豆三烯酮等成分均有不同程度增加,其中苯甲醇、苯乙醛、苯乙醇、 $\beta$ -二氢大马酮、 $\beta$ -大马酮的含量分别是发酵前的3.6倍、2倍、2.2倍、1.8倍和1.6倍。因此,在发酵温度为30℃,接种量为5%,发酵时间为36h的条件下,对再造烟叶浓缩液进行发酵处理以提高中性香味成分的含量是可行的。

## 2.4 感官评吸结果

烟支感官舒适度各指标评吸结果见表5。由表5可知,将经增香菌适当发酵处理后的再造烟叶浓缩液涂布于再造烟叶片基上,可提高卷烟的香气质和香气量。

## 3 结论

本文从再造烟叶浓缩液中筛选到一株增香

表5 烟支感官舒适度各指标评吸结果

Table 5 Results of smoking evaluation in the  
sensory comfort of cigarette

样品	香气	刺激性	杂气	余味
对照组	香气欠佳	刺激性大,有灼舌感觉,喉部不舒适	杂气较重	余味尚舒适
实验组	香气较细腻、香气量充足	刺激性减少、喉部舒适度增加明显	略有杂气	余味舒适

菌株HS-1,根据其形态特征和系统进化树分析结果,初步鉴定菌株HS-1为产蛋白霉菌属(*Planococcus* sp.)。通过单因素试验和正交试验,得到菌株HS-1在再造烟叶浓缩液中的最佳发酵条件,即发酵温度30℃,接种量5%,发酵时间36h。在该发酵条件下,再造烟叶浓缩液中的中性香味成分总含量从发酵前的56.845%提高到72.527%。再造烟叶浓缩液经菌株HS-1发酵处理后,中性香味成分的种类和含量均有不同程度的增加,其中5-甲基糠醛和 $\beta$ -紫罗兰酮为发酵后新增成分,苯甲醇、苯乙醛、2-乙酰基吡咯、苯乙醇、茄酮、 $\beta$ -大马酮、二氢猕猴桃内酯、巨豆三烯酮等成分均有不同程度的增加。评吸结果表明,将经增香菌HS-1发酵处理后的再造烟叶浓缩液涂布于再造烟叶片基上,可提高卷烟的香气质和香气量。该研究获得的增香菌HS-1能够有效地改善再造烟叶的香气品质,其在再造烟叶增香领域具有较大的应用潜力。

## 参考文献:

- [1] 吴宇航,李思东.造纸法烟草薄片的研究进展[J].广东化工,2012,39(5):90.
- [2] 戴路,陶丰,袁凯龙,等.造纸法再造烟叶的研究进展[J].中国造纸学报,2013,28(1):65.
- [3] 李丹,刘熙.生物技术应用用于造纸法再造烟叶生产的研究进展[J].现代食品科技,2013,29(6):1463.



- [4] 闫克玉. 烟草化学[M]. 郑州:郑州大学出版社,2002.
- [5] 韩文佳,赵传山. 造纸法烟草薄片发展现状[J]. 黑龙江造纸,2007(4):47.
- [6] 程昌合,吴继忠,廖付,等. 浓缩液醇化处理对烟草薄片致香成分及感官质量的影响[J]. 安徽农学通报,2011,17(1):142.
- [7] WANG W S, WANG Y, YANG L J, et al. Studies on thermal behavior of reconstituted tobacco sheet[J]. *Thermochimica Acta*, 2005, 437(1/2):7.
- [8] LIU H G, HE H L, CHENG C H, et al. Diversity analysis of the bacterial community in tobacco waste extract during reconstituted tobacco process[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(1):469.
- [9] 周瑾,李雪梅,许传坤,等. 利用微生物发酵改良烤烟碎片品质的研究[J]. 烟草科技,2002(6):3.
- [10] 郑勤安. 造纸法再造烟叶生产过程中微生物增质剂的应用研究[J]. 浙江工业大学学报, 2004, 32(4):442.
- [11] 何汉平,贺世梁,蔡冰,等. 造纸法烟草薄片萃取浓缩液酶法降解与增香[C]//中国烟草学会. 中国烟草学会工业专业委员会烟草化学学术研讨会论文集. 海口:[出版者不详],2005:56.
- [12] 张晨,许赣荣,严新龙. 利用酿酒酵母改进烟草萃取液的香气特性[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20):137.
- [13] 贾蓓蕾,魏涛,黄中,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.
- [14] 吴丽君,段佳,李春子,等. 同时蒸馏萃取-气相色谱/质谱法分析烟草中挥发性成分[J]. 分析科学学报,2012,28(6):807.
- [15] 李炎强,洗可法. 同时蒸馏萃取法与水蒸气蒸馏法分离分析烟草挥发性、半挥发性中性成分的比较[J]. 烟草科技,2000(2):18.
- [16] 许甜甜. 苯酚降解菌的分离鉴定及苯酚降解的相关研究[D]. 上海:上海师范大学,2012.
- [17] 赖炜扬,林凯,鹿洪亮,等. 再造烟叶正交优化提取及其化学成分和致香成分分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2016,55(1):144.
- [18] ZHU X L, SU Q D, CAI J B, et al. Optimization of microwave-assisted solvent extraction for volatile organic acids in tobacco and its comparison with conventional extraction methods[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 579(1):88.