



徐清泉,李石头,黄申,等.烟草源微生物及其应用研究进展[J].轻工学报,2021,36(5):42-50.

XU Q Q, LI S T, HUANG S, et al. Review on tobacco-derived microorganisms and its application [J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(5): 42-50. DOI: 10.12187/2021.05.006

中图分类号: TS41⁺4 文献标识码: A 文章编号: 2096-1553(2021)05-0042-09

烟草源微生物及其应用研究进展

Review on tobacco-derived microorganisms and its application

徐清泉¹, 李石头¹, 黄申², 毛多斌²

XU Qingquan¹, LI Shitou¹, HUANG Shen², MAO Duobin²

- 1. 浙江中烟工业有限责任公司 技术中心, 浙江 杭州 310024;
- 2. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001

- 1. Technology Center, China Tobacco Zhejiang Industrial Co., Ltd., Hangzhou 310024, China;
- 2. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

关键词:

烟草源微生物; 烟草生物技术; 烟叶发酵

Key words:

tobacco-derived micro-organism; biotechnology in tobacco; tobacco fermentation

摘要:烟草源微生物是适应并来源于烟草化学环境的一类微生物,其筛选、生理生化功能挖掘及应用技术研究对卷烟提质、增香、减害具有重要意义。综述了烟草源微生物的来源、类型,以及其在烟叶发酵处理、再造烟叶浓缩液发酵处理、烟草香料制备等方面的应用研究进展,分析了烟草源微生物在资源体系构建、功能挖掘、烟叶处理作用机制研究等方面存在的薄弱环节及问题,从加强基础理论研究和深入开展应用技术研究两方面展望了烟草源微生物的发展前景。

收稿日期: 2021-07-16

基金项目: 中国烟草总公司重点科技研发项目(中烟办[2020]66号)

作者简介: 徐清泉(1971—),男,四川省广安市人,浙江中烟工业有限责任公司高级工程师,主要研究方向为卷烟产品研发与工艺。

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、香精香料、生物催化与转化。

Abstract: Tobacco-derived microorganisms refer to a class of microorganisms that adapt to and come from the chemical environment of tobacco. The screening, physiological and biochemical function mining and application technology research of these microorganisms are of great value for cigarette quality improvement, aroma enhancement and harm reduction. This paper reviews the sources and types of tobacco-derived microorganisms, as well as the application in tobacco leaf fermentation treatment, reconstituted tobacco leaf concentrate fermentation treatment and tobacco flavor preparation. The weak links and problems of tobacco-derived microorganisms were analyzed in the construction of resource system, function mining and the study of tobacco treatment mechanism. The development prospect of tobacco-derived microorganisms was prospected from the aspects of strengthening basic theoretical research and deepening applied technology research.

0 引言

在烟草生长、调制和陈化过程中,烟叶表面、烟田土壤、烟草水浸提物都存在大量微生物,即烟草源微生物。该类微生物是指除烟草内生菌外,适应并来源于烟草化学环境的微生物,包括可培养和不可培养两类。不同微生物的功能和作用不同,在一定条件下,有些具有降解蛋白质^[1]、淀粉^[2]、果胶^[3]等烟草基本成分的作用,有些具有降解西柏烯类^[4]、类胡萝卜素^[5]等烟草香味前体物的作用,还有一些具有降解烟碱^[6]、甾醇^[7]、香豆素^[8]等有害化学成分的作用。烟草源微生物的功能决定其可在一定程度上改变烟草的化学组成,进而改变烟草的吸味品质。可见,合理利用烟草源微生物能够增加卷烟香气、强化风格特征、减少杂气、减轻刺激、降低危害,达到提升卷烟品质的目的。因此,烟草源微生物的分离鉴定和功能挖掘具有重要的研究价值。本文拟对烟草源微生物的种类、功能及应用进行综述,分析该类微生物应用中的瓶颈问题,并对该领域技术发展进行展望,旨在为烟草源微生物的挖掘、功能开发及其在烟草加工中的应用提供参考。

1 微生物的来源与类型

关于烟草源微生物的研究最早可追溯到1858年,J. B. C. Koller^[9]为了提升发酵速率,使用外源性酿酒酵母菌对烟叶进行发酵处理。此

后,研究人员对烟草微生物的相关研究逐步展开。烟草源微生物按照来源,可分为烟叶表面微生物、烟田土壤微生物和再造烟叶浓缩液微生物等。

1.1 烟叶表面微生物

由于雪茄烟草品质与发酵密切相关,因此,从烟表面分离微生物并进行雪茄处理的发酵技术研究成为微生物处理烟草最早的研究。19世纪末期,研究人员发现雪茄烟叶表面微生物主要是细菌和霉菌,并分离培养了部分细菌用于雪茄烟草发酵^[10]。1937年,J. J. Reid等^[11]研究了雪茄烟叶在调制过程中的表面菌群组成及其变化,发现菌群主要由芽孢杆菌(*Bacillus*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)、曲霉菌(*Aspergillus*)、青霉菌(*Penicillium*)、根霉菌(*Rhizopus*)和毛霉菌(*Mucor*)组成,其中芽孢杆菌为优势种。W. G. Frankenburg^[12]首次对美国种植的4个年份雪茄烟叶发酵前后烟碱含量变化进行了分析,发现经过发酵后的雪茄烟叶,烟碱含量均有不同程度降低,平均值降低了38%~57%,个别烟叶降低值高达97%。1950年,C. O. Jensen等^[13]从发酵的威斯康星州雪茄烟叶中分离到7株细菌,其中4株在灭过菌烟草上生长时产生热量,发现在某些阶段发酵活跃的烟草表面含有7亿/g细菌,发酵温度随细菌数量的增加而升高,细菌在雪茄烟叶整株调制过程中起主导作用。C. F. English等^[14]从发酵的康涅狄格阔叶烟草表面分离出芽孢杆菌属的嗜热菌,包括枯

草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 和羧状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*), 且开发出可增强雪茄烟“出汗”作用的微生物, 枯草芽孢杆菌和羧状芽孢杆菌发酵宾夕法尼亚外包皮 B 包芯叶后产生一种使人愉快的香气. 对烤烟烟叶表面微生物菌群的分析及动态变化研究, 国内外学者已有大量报道. 韩锦峰等^[15]考查了烟叶表面微生物在烤烟发酵进程中不同阶段的变化, 发现烟叶未发酵阶段微生物的数量最多, 且微生物数量随着发酵时间的延长而逐渐减少, 优势菌株为芽孢杆菌属微生物. 此后, 赵铭钦等^[16]发现, 在烤烟叶面微生物中, 细菌占绝对优势并以芽孢杆菌属为主, 霉菌中青霉为优势菌群, 放线菌 (*Actinomycetes*) 中以链霉菌 (*Streptomyces*) 为主. 2007 年, M. D. Giacomo 等^[17]分析烤烟表面微生物的动态变化后发现, 在烟叶发酵期间, 酵母菌、乳酸杆菌、葡萄球菌数量依次减少, 随着温度和 pH 值的升高, 芽孢杆菌和放线菌逐步成为优势菌. 2010 年, J. W. Huang 等^[18]发现, 陈化后的烟叶较陈化前细菌群落有所降低, 但不可培养微生物更为丰富, 且二者的优势菌均为芽孢杆菌、假单胞菌 (*Pseudomonadaceae*). 2020 年, Q. Y. Zhang 等^[19]系统考查了新鲜烟叶和陈化后烟叶的微生物群落变化, 发现烟叶的优势微生物主要包括假单胞菌属、芽孢杆菌属、甲基杆菌属、不动杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、新球孢菌属和枝孢菌属.

近年来, 随着生物技术的不断发展, 运用组学技术分析烟叶表面微生物种群及其变化已有不少研究成果. 2014 年, 伍雪莹等^[20]对云南昆明和河南襄县陈化烤烟进行高通量测序和生物信息学鉴定, 发现表面微生物优势种群为芽孢杆菌、肠杆菌 (*Enterobacteriaceae*)、假单胞菌和黄单胞菌 (*Xanthomonadaceae*). 2017 年, 苏加坤等^[21]运用宏基因组技术分析了陈化烟叶表

面微生物, 发现细菌中芽孢杆菌属和假单胞菌属为优势菌, 真菌中的优势菌是曲霉属. 2020 年, 牟丹等^[22]从陈化烟叶表面分离细菌和真菌, 细菌以芽孢杆菌属为优势种群, 真菌以曲霉属和青霉属为优势种群. 2021 年, B. B. Hu 等^[23]系统研究了烟叶在烤制过程中微生物种群的变化, 发现细菌群落的组成比较简单, 且优势种群占比较高, 而真菌的多样性明显优于细菌且种群更稳定.

1.2 烟田土壤微生物

多年烟叶种植土壤中, 也存在适应烟草化学成分微生物. 王家和^[24]从不同烟区土壤中分离鉴定出包括腐霉菌 (*Pythium spp.*), 镰刀菌 (*Fusarium spp.*)、疫霉菌 (*Phytophthora spp.*) 等 13 个类群的真菌区系. 2005 年, 湛方栋等^[25]对贵州烤烟的根际微生物进行研究, 占有优势的细菌群、真菌群、放线菌群分别为假单胞杆菌、青霉属和链霉菌属. 2006 年, 刘训理等^[26]对烟草根系细菌的研究表明, 芽孢杆菌属、微球菌属及假单胞菌属微生物为优势种群. 2012 年, 王娜等^[27]发现青霉属、木霉属 (*Trichoderma*)、镰孢菌属 (*Fusarium*) 和曲霉属为山东烤烟根系主要真菌种群. 2020 年, 李正风等^[28]考查了云南不同地区的烟田土壤中的真菌, 发现镰刀菌属 (*Fusarium*) 真菌为烟田微生物优势菌属. 总体而言, 烟田土壤微生物的构成与典型土壤微生物相似, 但由于前者生长环境中含有烟草化学成分而稍有不同.

1.3 再造烟叶浓缩液微生物

再造烟叶浓缩液中的微生物源于加工原料 (如烟片、烟梗、烟末等), 由于原料加工过程中存在高温环节, 因而其微生物组成又与原料中的微生物组成有差异. 2015 年, H. G. Liu 等^[29]分析了废次烟叶提取液中的细菌群落结构, 优势门类和属类分别为厚壁菌门 (*Firmicutes*)、变形菌门 (*Proteobacteria*) 和乳酸杆菌属、赖氨酸

杆菌属. 同年,何厚龙^[30]对废烟叶提取浓缩液进行检测发现,优势细菌和真菌分别为乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)和假丝酵母属(*Candida*). 2016年,陈小敏等^[31]对烟叶表面微生物进行高通量测序发现,芽孢杆菌、假单胞菌及微球菌(*Micrococcaceae*)为优势细菌属. 同年,舒明等^[32]考查了废次烟末浸提液中的微生物种群,发现细菌数量丰富,芽孢杆菌属为优势种属. 2019年,王充等^[33]对再造烟叶浓缩液中微生物的多样性进行测序,分析表明,真菌种群占80%以上,主要为酿酒酵母属(*Kazachstania*)和假丝酵母属,其余为细菌种群,主要为乳酸杆菌属和链球菌属(*Streptococcus*).

综上所述,烟草源微生物来源主要包括烟叶表面、烟田土壤、再造烟叶浓缩液等,其类型主要包括细菌和真菌,其中细菌以芽孢杆菌、假单胞菌及微球菌为优势菌属,真菌以酵母、曲霉和青霉为优势菌属. 多数情况下,细菌为优势菌种,但再造烟叶浓缩液中也存在真菌占优势的情况.

2 烟草源微生物应用现状

2.1 烟叶发酵

烟草源微生物应用于烟草发酵,最早的报道为1858年J. B. C. Koller^[9]将酵母菌接种于雪茄烟中进行发酵,此后,利用烟草源微生物对雪茄和其他烟草进行发酵处理的研究报道不断出现. 20世纪70—80年代,在我国烟草工业打叶复烤尚未推广之前,烟叶快速发酵为企业广泛采用的烟叶处理方式;打叶复烤推广之后,烟草企业普遍采用自然陈化方式,以改善烟草的吸食品质. 然而,自然陈化存在周期长、占用库存等问题,因此使用微生物发酵处理片烟或单料烟的研究应运而生. 1997年,韩锦峰等^[15]将从烟草中分离的优势菌混合接种于烟叶并进行发酵,发现烟叶品质得以改善,糖、蛋白质和烟

碱含量都明显降低. 1998年,罗家基等^[34]证实,接种芽孢杆菌属微生物于烟叶中,发酵7 d后,低档烟叶品质提高,且发酵后的烟叶中氨基酸含量提高. 2012年,川渝中烟工业有限责任公司^[35]将蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和解淀粉芽孢杆菌接种于烤烟并进行发酵10~40 d,发现烟草中纤维素、蛋白质、果胶等含量明显降低,评吸品质与自然醇化烟叶相比,无明显差异. 同年,李宁等^[36]将一株具有降蛋白功能的蜡样芽孢杆菌接种于发酵雪茄烟中,发现该菌的增香提质作用明显. 2017年,陕西中烟工业有限责任公司^[37]公布了一种用于烟叶快速发酵的复合芽孢杆菌制剂专利,该专利指出,用复合芽孢杆菌制剂对烟叶发酵24~60 h后,可明显提高烟叶香气质、香气量及甜感. 2019年,薛磊等^[38]将一株具有蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性且可降解 β -胡萝卜素复合功能的芽孢杆菌YN14接种于烟丝表面并进行发酵,发现发酵后的烟丝香气质和香气量均得到改善,感官品质得到提高.

随着微生物技术的快速发展,利用其他烟草源微生物发酵处理烟叶的相关报道也不断出现. 2010年,黄晓春^[39]利用一株具有降烟碱的节杆菌(*Arthrobacter* sp.)处理烟叶5~7 d后,发现烟叶香气量提高、香气质改善、刺激性减弱,综合品质得到明显提高. 2017年,李勇等^[40]将从废弃红大烟叶表面筛选得到的出芽短梗霉菌(*Aureobasidium pullulans*)用于发酵烟叶5 d,发现处理后的烟丝杂气减轻、刺激性减少,香气质明显得到改善. 2017年,黄申等^[41]将一株嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*, H3-1)接种于新鲜烟叶上,烤制5~7 d后发现,烟叶中茄酮含量较对照组增加2倍,同时烟叶的吸食品质得到提高. 2018年,四川省食品发酵工业研究设计院^[42]利用霍氏肠杆菌处理烟叶以增加烟叶清甜香,发现发酵后烟叶中总糖

含量提升至 37.42%。

在利用细菌发酵烟叶以提升烟草品质的同时,亦有关于真菌在烟叶增香提质中应用研究的报道。2002年,周瑾等^[43]利用假丝酵母在 28℃ 下发酵低次烤烟碎片 6 d 后,发现该菌可明显改善低次烤烟碎片的香味品质,可溶性还原糖降解率达 51.98%。2009年,甄达文等^[44]利用产香酵母菌+德氏乳酸菌+根霉菌组合发酵烟叶,发现该混合菌可明显增加烟叶香气、改善烟叶质量,发酵后烟叶中醇类、烯炔类、有机酸类等物质含量增加。2010年,高文霞^[45]利用曲霉属和木霉属的真菌发酵烟叶 12 d,发现烟叶的吸味品质得到提升,发酵过程中淀粉酶、蛋白酶、多酚氧化酶和过氧化物酶活性增加。2018年,贵州大学^[46]利用毕赤氏酵母和东方伊萨酵母混合菌处理烟草 15~20 d,发现该混合菌可增加烟草的玫瑰香、蜂蜜香和酒香。

2.2 再造烟叶浓缩液发酵

再造烟叶浓缩液为水样环境,理论上更适合微生物发挥作用,因此,烟草源微生物处理再造烟叶浓缩液是重要的应用窗口。2004年,郑勤安^[47]将增香菌、干酵母与蛋白酶混合,对体积分数为 20% 的烟叶萃取浓缩液进行发酵处理 8 h 后,发现再造烟叶中常规化学成分的比例更加协调与平衡,其中总糖含量下降 84%,有效降低了再造烟叶的刺激性,增加了烟香,改善了吸味。2019年,叶建斌等^[48]利用类芽孢杆菌制备静息细胞发酵处理再造烟叶原料浸提液,结果表明,发酵后样品中蛋白质和还原糖含量降低,糠醛、糠酮等致香组分增幅明显,处理后再造烟叶样品的感官品质明显提升。2020年,黄申等^[49]从再造烟叶浓缩液中筛选分离得到一株蛋白霉菌属(*Planococcus* sp. HS-1),经该菌株发酵 36 h 后,再造烟叶浓缩液中的中性香味成分含量提高了 15.68%。2020年,河南中烟工业有限责任公司^[50]将谷氨酸棒状杆菌

(*Corynebacterium glutamicum*) 接种于烟草浸提液,制备出烤甜香型烟草浸膏,该浸膏烤甜香韵明显增加。同年,吉林烟草工业有限责任公司^[51]将酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)接种于烟草提取液并进行发酵,发现处理后的提取物中酯类、酮类、醇类、酚类、炔类、醛类等香味物质含量明显增加,有效改善了卷烟的吸味品质。

2.3 烟用香料制备

近年来,利用烟草源微生物发酵烟草、天然产料、香味前提物等制备烟用香料日益受到烟草行业的重视。吴长伟等^[52]从红大品种烟叶表面筛选得到一株增香微生物并用于烟草提取物发酵,将制成的香料添加到卷烟中能提升其香气量、增加烟气细腻性和甜润感,检测后发现, β -大马酮、 β -紫罗兰酮、茄酮等香气成分较发酵前有所增加。王娜等^[53]利用产香酵母发酵处理烟叶后制备的烟草浸膏可提高烟香细腻度和甜润性,处理后的浸膏中呋喃酮、呋喃醇、巨豆三烯酮等香味成分含量较处理前明显提高。许春平等^[54]利用金星产香酵母 SP-3 发酵处理烟草得到一种烟草浸膏,该浸膏与烟香谐调,烟气柔和、细腻,且该浸膏中 5-甲基糠醛、 β -苯乙醇、乙酰基吡咯、巨豆三烯酮、3-甲基吡啶等成分含量明显提高。烟草源微生物不仅可以发酵烟草及烟草提取物,而且还可以处理类胡萝卜素等香味前体物质获得烟用香料。E. R. Bustamante 等^[55]利用旭日孢子菌和解淀粉芽孢杆菌混合发酵叶黄素,得到了 7,8-二氢- β -紫罗兰醇(95.2%)、7,8-二氢- β -紫罗兰酮(3.7%)和 β -紫罗兰酮(1.1%)的混合香料。S. A. Contreras 等^[56]将分离得到的地霉属和芽孢杆菌属混合菌用于发酵叶黄素,制备的香料可产生类似烟草的香气,其中 7,8-二氢- β -紫罗兰醇、 β -紫罗兰酮、7,8-二氢- β -紫罗兰酮、3-羟基- β -紫罗兰酮等为香料重要成分。

2.4 烟草有害物降解

2.4.1 烟碱降解 关于微生物发酵处理烟叶降解烟碱的报道最早可追溯到 W. G. Frankenburg^[12] 的研究,后续出现大量关于微生物降解烟碱的报道.可降低烟草中烟碱含量的微生物主要有巴氏微杆菌 (*Pasteurella*)、根瘤菌 (*Rhizobium*)、嗜麦芽寡养单胞菌、副短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus*) 等.1997年, M. Civilini 等^[57] 对比分析了不同菌株降解烟碱的效果,发现恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 效果最好.2005年, A. D. Ruan 等^[58] 从烟草废弃物污染的土壤中筛选得到假单胞杆菌,发现该菌对烟碱 (1.3 g/L) 25 h 的降解率可达 99.6%. C. M. Chen 等^[59] 从烟草中筛选出一株假单胞菌,在最适 pH 值和温度下,烟碱的降解率最高约为 73.1%.2010年, W. H. Zhong 等^[6] 将假单胞杆菌接种于烟碱培养基中进行培养 12 h 后,烟碱 (1.6 g/L) 的降解率为 97%.2012年, L. Zhao 等^[60] 分离出一株尼古丁降解菌株 (*Pseudomonas stutzeri*) ZCJ,该菌株可耐受 4.5 g/L 的尼古丁,固态发酵 7 d 后,可使烟叶中尼古丁含量下降 32.24%.2013年,伍良伟^[61] 筛选得到嗜组氨酸节杆菌 (*Arthrobacter histidinolorans* EA-17),优化条件下该菌对含量为 4 g/L 烟碱发酵液的降解率达 95.63%.

2.4.2 亚硝胺降解 烟草领域中关于亚硝胺微生物降解的研究主要集中在烟草特有亚硝胺 (TSNA),多采用高效反硝化细菌 (Denitrifying bacteria) 来达到降低 TSNA 的目的.2004年,祝明亮等^[62] 从白肋烟中筛选得到 6 株内生菌,经处理后的白肋烟中 TSNA 含量最多降低了 99.88%.2017年,孙政^[63] 从烟叶和土壤中分离纯化得到两株恶臭假单胞菌,接种于烤烟烟叶表面,在 28 °C 发酵 21 d 后,发现烟叶中 N 亚硝基降烟碱 (NNN) 和 4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮 (NNK) 含量分别下降了 56.48% 和 57.83%. X. T. Wei 等^[64] 分离出一种具有低硝

酸盐还原能力的高亚硝酸盐还原的解淀粉芽孢杆菌 DA9,经该微生物处理后的烟叶中亚硝酸盐含量降低了 32%,总 TSNA 含量降低了 47%, NNN、NNK 和 N-亚硝基新烟草碱 (NAT) 分别降低了 48%、12% 和 35%.

3 结论与展望

本文综述了烟草源微生物的来源、种类、功能及应用,分析了该研究领域的现状及薄弱环节.随着烟草工业生物技术研究的不断发展,烟草微生物处理技术作为烟草行业发展的重要工具和支撑将发挥越来越重要的作用.目前,学界和业界对烟草微生物应用研究的系统性和深入性尚不能适应烟草工业发展的需求,微生物处理技术在烟草加工中的应用仍不成熟,其主要瓶颈和制约因素如下.一是尚未建立烟草源微生物资源体系.目前,烟草源微生物菌种资源分散于不同的研究团队,阻碍了微生物资源的有效利用,需要进一步开发烟草微生物菌种资源,构建开放共享的微生物菌种资源库.二是烟草源微生物的功能有待深入挖掘.从已有文献报道来看,研究人员注重烟草源微生物的筛选、分离和鉴定,近年来也有少量关于利用现代组学技术开展菌种鉴定的报道,但对微生物功能的研究报道较少.三是对烟草源微生物对烟草处理作用机制研究不够深入.已有报道中,研究多集中在微生物降解烟碱等特定分子作用机制上,而在微生物提升烟叶品质的研究方面,又更多注重烟草源微生物在不同条件下对烟草吸味品质的影响,缺乏微生物产香和提升品质作用机制的深入研究.四是缺乏关于烟草源微生物处理库存不适用烟叶应用技术的研究.烟叶生产与卷烟加工之间的结构性矛盾会产生库存不适用烟叶,在现行烟草产业链条中,烟草微生物技术主要应用环节包括烟叶初烤、打叶复烤、陈化、再造烟叶浓缩液的制备等,且已有不

少研究成果。但近年来烟草工业中不适用烟叶库存压力增大,针对不适用烟叶的微生物处理应用技术相关的研究也较为缺乏。

依据现代生物技术的发展并结合研究现状,未来的研究重点和发展方向可集中于以下两个方面。第一,运用微生物现代组学技术结合现代分析等技术,加强烟草源微生物基础理论研究。开展烟草源微生物的发现、分离及鉴定,深入挖掘重要烟草源微生物的功能,明确功能作用机制,并建立烟草源微生物资源大数据体系;系统研究微生物处理烟叶的微生物组、宏基因组、宏转录组、代谢组及关键酶学特性,结合各组学和关键酶的酶学特性,揭示特定微生物处理烟叶成分机理;开展不同产地、品种和年份烟草的表面微生物在卷烟加工生产相关过程中的消长及时空变化规律,揭示其对烟草化学成分和吸食品质的影响;深入开展烟草表面微生物的微生物生态系统研究,阐明重要烟草微生物的生理生化功能及其在烟草环境系统适应性和定植作用原理。第二,深入开展烟草源微生物应用技术研究。针对不同加工环节,明确相关影响因素,确定烟草源微生物处理烟草的相关工艺技术条件、规范、标准,开展微生物处理烟草生产线的技术与开发;开展不同烟草源微生物培养工艺放大及条件优化技术研究,确定相关工艺技术规范与标准。

参考文献:

- [1] HE F, WANG T, WANG Z Y, et al. Effects of temperature and humidity on protein degradation and related enzyme activities in tobacco leaf in yellowing stage [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2014, 20(5):80.
- [2] DAI J C, DONG A J, XIONG G X, et al. Production of highly active extracellular amylase and cellulase from *Bacillus subtilis* ZIM3 and a recombinant strain with a potential application in tobacco fermentation [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11:1539.
- [3] 代同成. 片烟产果胶酶细菌的鉴定及酶活测定 [J]. *微生物学通报*, 2011, 38(6):816.
- [4] 黄申, 夏璠, 魏涛, 等. 烟叶中西柏三烯-4,6-二醇降解产香菌的分离与鉴定 [J]. *轻工学报*, 2017, 32(6):73.
- [5] MARIANA U, MARIA P G. β -carotene biotransformation to obtain aroma compounds [J]. *Ciência E Tecnologia De Alimentos*, 2010, 30(3):822.
- [6] ZHONG W H, ZHU C J, SHU M, et al. Degradation of nicotine in tobacco waste extract by newly isolated *Pseudomonas* sp. ZUTSKD [J]. *Biore-source Technology*, 2010, 101(18):6935.
- [7] YE J B, ZHAN Z, JI Y, et al. Degradation of phytosterols in tobacco waste extract by a novel *Paenibacillus* sp. [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2017, 64(6):843.
- [8] 郑州轻工业学院. 一株降解香豆素的恶臭假单胞菌及应用: 201910654904. 9 [P]. 2019-09-17.
- [9] KOLLER J B C. *Der Tabak in naturwissenschaftlicher [M]. Auqsberg: Landwirt Schaftlicher and Technischer Beziehung*, 1858.
- [10] JOHNSON J. Studies on the fermentation of tobacco [J]. *Journal of Agricultural Research*, 1934, 49(2):173.
- [11] REID J J, MCKINSTRY D W, HALEY D E. The fermentation of cigar-leaf tobacco [J]. *Science*, 1937, 86(2235):404.
- [12] FRANKENBURG W G. Transformation products of nicotine in fermented tobacco [J]. *Science*, 1948, 107(2782):427.
- [13] JENSEN C O, PARMELE H B. Fermentation of cigar-type tobacco [J]. *Industrial & Engineering Chemistry*, 1950, 42(3):519.
- [14] ENGLISH C F, BELL E J, BERGER A J. Isola-

- tion of thermophiles from broadleaf tobacco and effect of pure culture inoculation on cigar aroma and mildness[J]. *Applied Microbiology*, 1967, 15(1):117.
- [15] 韩锦峰,叶波平. 陈化发酵期间烤烟叶面微生物活性及其应用研究[J]. *中国烟草科学*, 1997, 18(4):13.
- [16] 赵铭钦,张维群. 陈化期间烤烟叶片中生物活性变化的研究[J]. *华中农业大学学报*, 2000, 19(6):537.
- [17] GIACOMO M D, PAOLINO M, SILVESTRO D, et al. Microbial community structure and dynamics of dark fire-cured tobacco fermentation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3):825.
- [18] HUANG J W, YANG J K, DUAN Y Q, et al. Bacterial diversities on unaged and aging flue-cured tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(2):553.
- [19] ZHANG Q Y, GENG Z Z, LI D L, et al. Characterization and discrimination of microbial community and co-occurrence patterns in fresh and strong flavor style flue-cured tobacco leaves[J]. *MicrobiologyOpen*, 2020, 9(7):e965.
- [20] 伍雪莹,梁书利,韩双艳,等. 不同陈化期烤烟叶表细菌的多样性及发育分析[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(18):28.
- [21] 苏加坤,徐达,郭磊,等. 基于宏基因组测序的烟叶表面微生物多样性分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(4):1538.
- [22] 牟丹,周家喜,张鑫,等. 烟叶陈化过程可培养微生物的生态功能[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(2):362.
- [23] HU B B, GU K Y, GONG J S Q, et al. The effect of flue-curing procedure on the dynamic change of microbial diversity of tobaccos[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11:5354.
- [24] 王家和. 烤烟根部真菌区系及其致病性研究[J]. *云南农业大学学报*, 1994, 9(2):95.
- [25] 湛方栋,陆引罡,关国经,等. 烤烟根际微生物群落结构及其动态变化的研究[J]. *土壤学报*, 2005, 42(9):51.
- [26] 刘训理,王超,吴凡,等. 烟草根际微生物研究[J]. *生态学报*, 2006(2):552.
- [27] 王娜,吕国忠,孙晓东,等. 烟草根际土壤真菌多样性的研究[J]. *菌物学报*, 2012, 31(6):827.
- [28] 李正风,钟莉,朱杰,等. 云南烟草根际土壤真菌群落演替特征[J]. *西南农业学报*, 2020, 33(7):1545.
- [29] 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]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(1):469.
- [30] 何厚龙. 废烟叶水提液醇化过程中微生物多样性分析以及功能微生物的筛选鉴定和特性研究[D]. 杭州:浙江工业大学, 2015.
- [31] 陈小敏,林影,梁书利. 烟叶表面微生物群落结构鉴定及其产酶分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(7):1760.
- [32] 舒明,樊虎,刘金莉,等. 基于高通量测序的废次烟末水提液中细菌群落分析[J]. *烟草科技*, 2016, 49(4):1.
- [33] 王充,龙章德,孟丹丹,等. 造纸法再造烟叶浓缩液中微生物群落结构分析及应用[J]. *烟草科技*, 2019, 52(3):39.
- [34] 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.
- [35] 川渝中烟工业有限责任公司. 一种缩短烟叶发酵周期的微生物制剂及其应用: 201210167608.4[P]. 2012-09-12.
- [36] 李宁,汪长国,曾代龙,等. 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)筛选鉴定及在雪茄烟叶发酵中的应用研究[J]. *中国烟草学报*, 2012, 18(2):65.

- [37] 陕西中烟工业有限责任公司. 一种用于烟叶快速发酵的赋香复合微生物制剂及其应用: 201710684820.0[P]. 2017-11-17.
- [38] 薛磊, 郑泽浩, 郭志刚, 等. 烟草增香细菌的筛选及其作用效果[J]. 中国烟草科学, 2019, 40(5): 60.
- [39] 黄晓春. 降碱增香微生物制剂改善烟叶品质研究与应用[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2010.
- [40] 李勇, 王猛, 陈剑明, 等. 出芽短梗霉 OF-01 菌株的筛选及其在烟草香料中的应用[J]. 轻工学报, 2017, 32(4): 49.
- [41] 黄申, 夏璠, 钱玉梅, 等. 西柏三烯-4, 6-二醇降解产香菌培养基条件优化[J]. 烟草科技, 2017, 50(12): 55.
- [42] 四川省食品发酵工业研究设计院. 一种使用生物技术醇化发酵“清甜香”型烤烟烟叶的方法: 201811071853.9[P]. 2018-11-30.
- [43] 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.
- [44] 甄达文, 于铁妹, 朱珊珊, 等. 利用酶法与微生物发酵法制备天然烟用香料[J]. 食品工业科技, 2009, 30(12): 268.
- [45] 高文霞. 烤烟增香微生物优异菌株的研究及其对烟叶品质的影响[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [46] 贵州大学. 一种混菌发酵烟草的方法: 201810798971.3[P]. 2018-12-28.
- [47] 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.
- [48] 叶建斌, 毛多斌, 张展, 等. 类芽孢杆菌发酵原料浸提液提升再造烟叶品质[J]. 中国烟草学报, 2019, 25(1): 33.
- [49] 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.
- [50] 河南中烟工业有限责任公司. 一种基于生物发酵的烤甜香型烟草浸膏及制备方法: 201911185217.3[P]. 2020-02-28.
- [51] 吉林烟草工业有限责任公司. 一种酿酒酵母菌及其在制备烟用香料中的应用: 201911029721.4[P]. 2020-01-10.
- [52] 吴长伟, 杨清, 杨蕾, 等. 微生物休止细胞发酵制备烟草浸膏及其在卷烟中的应用[J]. 河南农业科学, 2013, 42(1): 155.
- [53] 王娜, 李丹, 程书峰, 等. 产香酵母菌处理烟叶碎片制备特色烟草浸膏的工艺研究[J]. 香料香精化妆品, 2010(2): 4.
- [54] 许春平, 杨琛琛, 方金辉. 低次烟叶发酵制备烟草香料的研究[J]. 郑州轻工业学院(自然科学版), 2013, 28(1): 34.
- [55] BUSTAMANTE E R, ROBLEDO G M, ORTIZ M A, et al. Bioconversion of lutein using a microbial mixture: maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 68(2): 174.
- [56] CONTRERAS S A, JIMENEZ M, SANCHEZ S. Bioconversion of lutein to products with aroma [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54(4): 528.
- [57] CIVILINI M, DOMENIS C, SEBASTIANUTTO N, et al. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms [J]. Waste Management & Research, 1997, 15(4): 349.
- [58] RUAN A D, HANG M, PENG X H, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain HF-1, capable of degrading nicotine [J]. Research in Microbiology, 2005, 156(5/6): 700.
- [59] CHEN C M, LI X M, YANG J K, et al. Isolation of nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. Nic22, and its potential application in tobacco processing [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(3): 226.

- process[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(1):469.
- [12] 王充,龙章德,孟丹丹,等.造纸法再造烟叶浓缩液中微生物群落结构分析及应用[J].烟草科技,2019,52(3):33.
- [13] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品氯的测定 连续流动法:YC/T 162—2011[S].北京:中国标准出版社,2011.
- [14] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品水溶性糖的测定 连续流动法:YC/T 159—2019[S].北京:中国标准出版社,2019.
- [15] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品总植物碱的测定 连续流动(硫氰酸钾)法:YC/T 468—2013[S].北京:中国标准出版社,2013.
- [16] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品总氮的测定 连续流动法:YC/T 161—2002[S].北京:中国标准出版社,2002.
- [17] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品钾的测定 连续流动法:YC/T 217—2007[S].北京:中国标准出版社,2007.
- [18] 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.
- [19] BUSTAMANTE E R, ROBLEDO G M, ORTIZ M A, et al. Bioconversion of lutein using a microbial mixture; maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 68(2):174.
- [20] 叶建斌,王璐,杨峰,等.类芽孢杆菌发酵原料浸提液提升再造烟叶品质[J].中国烟草学报,2019,25(1):33.

(上接第50页)

- [60] ZHAO L, ZHU C J, GAO Y, et al. Nicotine degradation enhancement by *Pseudomonas stutzeri* ZCJ during aging process of tobacco leaves[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2012, 28(2):2077.
- [61] 伍良伟.降解烟碱微生物的筛选及在烟秆腐熟发酵中的应用[D].武汉:华中农业大学,2013.
- [62] 祝明亮,李天飞,汪安云.白肋烟内生细菌的分离鉴定及降低N-亚硝胺含量研究[J].微生物学报,2004,44(4):422.
- [63] 孙政.降低烟草亚硝胺目的菌的筛选及应用研究[D].武汉:华中农业大学,2017.
- [64] WEI X T, DENG X W, CAI D B, et al. Decreased tobacco-specific nitrosamines by microbial treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* da9 during the air-curing process of burley tobacco [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 62(52):12701.