



黄申, 闫美玲, 芦尧, 等. 不同香型再造烟叶浓缩液化学成分和微生物组差异性研究[J]. 轻工学报, 2021, 36(5): 51-58.

HUANG S, YAN M L, LU Y, et al. Study on the difference of chemical composition and microbiome of different flavor types of reconstituted tobacco leaf concentrate[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(5): 51-58.

DOI: 10.12187/2021.05.007

中图分类号: TS411 文献标识码: A 文章编号: 2096-1553(2021)05-0051-08

不同香型再造烟叶浓缩液化学成分和微生物组差异性研究

Study on the difference of chemical composition and microbiome of different flavor types of reconstituted tobacco leaf concentrate

黄申¹, 闫美玲¹, 芦尧¹, 田泱源², 毛多斌¹, 芦昶彤³, 陈芝飞³, 冯颖杰³

HUANG Shen¹, YAN Meiling¹, LU Yao¹, TIAN Yangyuan², MAO Duobin¹, LU Changtong³, CHEN Zhifei³, FENG Yingjie³

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;
 2. 河南卷烟工业烟草薄片有限公司, 河南 许昌 461000;
 3. 河南中烟工业有限责任公司 技术中心, 河南 郑州 450000
1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. He'nan Cigarette Industry Tobacco Sheet., Ltd., Xuchang 461000, China;
3. Technology Center, China Tobacco He'nan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China

关键词:

再造烟叶浓缩液;
常规化学成分;
中性香味成分;
微生物

Key words:

reconstituted tobacco leaf concentrate;
conventional chemical component;
neutral aroma component;
microbial

摘要:以浓香型、中间香型及清香型再造烟叶浓缩液为研究对象,运用连续流动法对比其常规化学成分含量,利用GC-MS法检测比较其中性香味成分差异,并通过高通量测序法比较不同香型浓缩液中微生物群落结构和多样性的差异。结果表明:浓香型浓缩液除水溶性总糖质量分数较低外,其他常规化学成分质量分数均高于其他香型浓缩液;清香型浓缩液中 α -大马酮、巨豆三烯酮等香味物质质量浓度较高,浓香型浓缩液中烟碱、乙酰基吡咯等质量浓度较高,中间香型浓缩液的大部分香味物质质量浓度介于两者之间;清香型浓缩液细菌物种多样性最大,浓香型浓缩液真菌物种多样性最大,3种浓缩液的优势细菌菌属都是芽孢杆菌属(*Bacillus*),清香型浓缩液和中间香型浓缩液优势真菌菌属是德巴利氏酵母属(*Debaryomyces*),浓香型浓缩液是多型汉逊酵母菌(*Ogataea*)。

收稿日期: 2021-06-07

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); 河南中烟工业有限责任公司重点科技研发项目(2021410001300023)

作者简介: 黄申(1981—),男,河南省周口市人,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及生物化工。

通信作者: 冯颖杰(1990—),男,安徽省宿州市人,河南中烟工业有限责任公司工程师,主要研究方向为烟草微生物技术。

Abstract: Taking the strong-flavor, intermediate-flavor and clear-flavor reconstituted tobacco leaf concentrates as the research object, the contents of conventional chemical components was compared by continuous flow method, the differences of neutral aroma components were detected by GC-MS, and the differences of microbial community structure and diversity in different flavor concentrates were compared by high-throughput sequencing. The results showed that the content of water-soluble total sugar in strong-flavor concentrate was lower, and the content of other conventional chemical components was higher. The contents of α -damascenone and megastigmatrienone were higher in the clear-flavor, the contents of nicotine and acetylpyrrole were higher in the strong-flavor, and the contents of most flavor components in intermediate-flavor were in the middle. The species diversity of bacteria in clear-flavor concentrate was the largest, and the species diversity of fungi in strong-flavor concentrate was the largest. The dominant bacterial genera of the three concentrates were *Bacillus*, the dominant fungal genera of the strong-flavor and intermediate-flavor concentrates were *Debaryomyces*, and the strong-flavor concentrated fragrance was *Ogataea*.

0 引言

烟草薄片是卷烟工业的重要原料,再造烟叶浓缩液(以下称浓缩液)作为烟草薄片的主要成分,提高其品质具有重要价值^[1-2]。目前,对烟草薄片常规化学成分及致香成分多有研究报告^[3-5],形成了系统的标准及检测方法,然而,对不同香型再造烟叶浓缩液化学成分差异进行的系统研究则相对较少。

近年来,采用高通量测序技术研究烟草微生物群落结构已有报道。R. E. Tyx 等^[6]研究了干鼻烟、湿鼻烟等烟草制品中微生物的多样性和分类丰度,共鉴定出来自放线菌门、厚壁菌门、变形菌门等的 33 菌属;B. B. Hu 等^[7]采用高通量测序方法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。舒明等^[8]对生产过程中的烟叶水提液进行了高通量测序,发现烟叶水提液中细菌种群组成非常丰富,其优势菌属是乳杆菌属(*Lactobacillus*)和赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)。陈泽斌等^[9-10]研究发现,烟草组织中有丰富的微生物,且芽孢杆菌属细菌是其优势种群。H. G. Liu 等^[11]为研究烟叶浓缩液细菌群落结构,对烟叶浓缩液进行了焦磷酸测序,发现浓缩液中优势属为乳杆菌属、赖氨

酸芽孢杆菌属和假单胞菌属(*Pseudomonas*)。王冲等^[12]通过 18S rDNA 和 16S rDNA 测序发现,再造烟叶浓缩液微生物真菌种群的丰富度和多样性低于细菌。但目前尚未发现不同香型再造烟叶浓缩液中微生物对比分析的相关报道。

鉴于此,本文拟对浓香型、中间香型和清香型 3 种香型再造烟叶浓缩液的化学成分、中性香味成分及微生物组进行研究,通过连续流动法测定其常规化学成分,采用 GC-MS 法检测其中性香味成分,并通过高通量测序分析其微生物组,以期揭示不同香型再造烟叶浓缩液化学成分及微生物组差异。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

材料:浓香型再造烟叶浓缩液(以下简称为浓香型浓缩液)、中间香型再造烟叶浓缩液(以下简称为中间香型浓缩液)、清香型再造烟叶浓缩液(以下简称为清香型浓缩液)。不同香型烟叶原料均由河南卷烟工业烟草薄片有限公司提供,浓缩液制备工艺如下:将不同香型烟末、烟梗,分别和水以固液比 1:4 的比例混合,在 50 °C 条件下浸提,用挤干机挤出水萃液,浓缩成干物质量为 40%、波美度为 25 °Bé、密度为 1.22 g/cm³ 的不同香型浓缩液。

主要试剂:二氯甲烷(色谱纯),购自天津

市凯通化学试剂有限公司。

主要仪器: Agilent 6890a/5975c 型 GC-MS 色谱联用仪, 美国 Agilent 公司产; J6-MI 型冷冻离心机, 美国 Beckman 公司产; San+ 连续流动分析仪, 荷兰 Skalar 公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 常规化学成分检测 常规化学成分主要包括氯、水溶性总糖、总植物碱、总氮和钾, 其含量测定按烟草行业标准(连续流动法)进行测定^[13-17]。

1.2.2 中性香味成分检测 取浓缩液样品 20.5 mL 置于 1000 mL 的圆底烧瓶中, 加入 500 mL 的水和沸石, 同时蒸馏萃取 150 min, 获得二氯甲烷萃取液约 80 mL, 参考黄申等^[18]的方法对浓缩液的中性香味成分进行提取, 并采用 GC-MS 法进行分析。

1.2.3 浓缩液 16S rDNA 和 ITS rDNA 序列测序 取浓缩液样品于 10 000 r/min、4 °C 条件下离心 20 min, 收集菌体细胞沉淀后送上海生工生物工程股份有限公司测序, 流程如下。

1) Illumina 测序: Illumina MiseqTM/HiseqTM 测得的图像经碱基识别分析转化为原始测序序列。

2) 数据预处理: 使用 cutadapt 去除 Miseq 测序时添加的引物接头; 根据 PE reads 之间的 overlap 关系使用 PEAR 将成对 reads 拼接成一条序列; 从拼接后数据中分割出各样本数据并校正序列方向; 使用 PRINSEQ 切除 reads 尾部低质量值碱基。

3) OTU 聚类: 提取各样本优化序列中的非重复序列(不含单序列); 16S 使用 Blast 比对 GTDB 数据库; ITS 使用 Blast 比对 UNITE 数据库, 按照 97% 相似性对非重复序列进行 OTU 聚类, 在分类学水平上统计各样本的群落组成; 基于 OTU 聚类分析结果, 对 OTU 进行多样性指数分析, 包括 PCA 分析、物种分布韦恩图分析、相对丰度分析。

2 结果与讨论

2.1 常规化学成分分析

不同香型浓缩液常规化学成分质量分数如表 1 所示。由表 1 可知, 清香型、中间香型和浓香型浓缩液水溶性总糖质量分数不同, 其中清香型最高, 为 9.6%, 中间香型次之, 浓香型最低, 为 9.2%。浓香型的总植物碱、氯、总氮质量分数较高, 分别为 1.2%、0.7%、1.6%, 中间香型和清香型较低, 分别为 1.1%、0.6%、1.5%, 这与已有研究结果^[4-6]大致相同。浓香型和清香型浓缩液钾质量分数均为 2.8%, 中间香型为 2.7%。总体看来, 不同香型浓缩液常规化学成分间的差异符合不同香型烟叶化学成分的差异, 这种差异是由于原料的差别导致的。

表 1 不同香型浓缩液常规化学成分质量分数

香型	水溶性总糖	总植物碱	氯	钾	总氮
浓香型	9.2	1.2	0.7	2.8	1.6
中间香型	9.5	1.1	0.6	2.7	1.5
清香型	9.6	1.1	0.6	2.8	1.5

2.2 中性香味成分分析

采用归一化法对清香型、中间香型和浓香型浓缩液离子流进行分析, 得到不同香型浓缩液中性香味成分结果(见表 2)。由表 2 可知, 中间香型浓缩液的香味成分种类最多, 浓香型次之, 清香型最少; 2-乙酰基呋喃仅在浓香型浓缩液中检出, 但质量浓度较少, 为 0.418 μg/mL; 法尼基丙酮仅在清香型浓缩液中检出且质量浓度较高, 为 11.395 μg/mL。清香型浓缩液中 α-大马酮和二氢猕猴桃内酯质量浓度较高, 分别为 5.279 μg/mL 和 3.218 μg/mL, 中间香型和浓香型较少; 巨豆三烯酮和金合欢醇质量浓度差异最显著, 清香型浓缩液中分别为 22.476 μg/mL 和 0.777 μg/mL, 中间香型浓缩液分别为 13.776 μg/mL 和 0.349 μg/mL, 浓香型浓缩液中的分别为 11.135 μg/mL 和 0.364 μg/mL, 这

两种香味物质在清香型浓缩液中的质量浓度是其他香型浓缩液的近2倍;浓香型浓缩液中芳樟醇和2-乙酰基吡咯质量浓度最高,分别为0.285 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和2.745 $\mu\text{g}/\text{mL}$,中间香型次之,清香型最低,这与已有研究结果^[3]大致相同。

2.3 微生物组分析

2.3.1 Illumina 测序分析 将浓香型、中间香型和清香型浓缩液3种样品的Illumina测序原始数据上传到NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),其SRA号分别为SRR14936429、SRR14993896和SRR14936360,经过denovo注释获得了不同香型浓缩液中微生物的有效序列数(见表3)。由表3可知,3种浓缩液细菌微生物序列数呈现差异,其中清香型浓缩液中细菌微生物有效序列数最多,为94 533,浓香型次之,中间香型最少;真菌序列数呈现差异显著,其中中间香型中真菌微生物有效序列数最多,为108 666,清香型次之,

浓香型最少。

2.3.2 OTU 聚类分析 对OTU代表序列采用GTDB数据库和UNITE数据库进行聚类分析,结果见表4。由表4可知,3种香型浓缩液中共测得芽孢杆菌属(*Bacillus*)、乳杆菌属、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、苯基杆菌属(*Phenylobacterium*)、慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、土地芽孢杆菌属(*Terribacillus*)6个细菌属类,酵母菌属(*Issatchenkia*)、假丝酵母菌属(*Candida*)、季也蒙酵母属(*Meyerozyma*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、曲霉属(*Aspergillaceae*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、短梗霉属(*Aureobasidium*)、须腹菌属(*Rhizopogon*)等11个真菌属类。3个样品所共有的菌属有8个,主要有2个优势属类,分别是芽孢杆菌属和乳酸杆菌属。结果表明,清香型浓缩液中的细菌多样性最大,中间香型次之,浓香型最小;浓香型浓缩液中的真菌多样性最大,中间香型次之,清香型最小。

表2 不同香型浓缩液中性香味成分表

Table 2 Neutral aroma components of different flavor concentrates

序号	保留时间/min	CAS号	名称	匹配度/%	中性香味成分质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
					浓香型	中间香型	清香型
1	15.83	930-60-9	4-环戊烯-1,3-二酮	91	1.629	2.017	1.387
2	16.28	100-42-5	苯乙烯	95	0.659	1.884	—
3	17.53	1192-62-7	2-乙酰基呋喃	72	0.418	—	—
4	20.36	3857-25-8	5-甲基-2-呋喃甲醇	90	—	0.349	—
5	20.85	100-52-7	苯甲醛	94	0.674	0.620	0.566
6	21.01	620-02-0	5-甲基呋喃醛	90	0.541	0.418	0.389
7	25.71	5989-27-5	(+)-柠檬烯	97	0.605	0.310	—
8	26.01	100-51-6	苯甲醇	95	1.953	2.086	2.312
9	26.80	122-78-1	苯乙醛	91	5.092	5.127	4.064
10	28.05	1072-83-9	2-乙酰基吡咯	91	2.745	2.681	2.332
11	30.83	78-70-6	芳樟醇	97	0.285	0.216	0.226
12	31.83	1960-12-8	苯乙醇	91	1.825	1.934	2.140
13	34.06	1125-21-9	4-氧代异佛尔酮	95	0.202	0.216	0.212
14	34.70	637-69-4	4-甲氧基苯乙烯	91	—	—	0.103
15	48.20	1954-11-5	烟碱	94	0.128	0.674	0.492
16	50.75	23726-93-4	α -大马酮	98	4.443	4.261	5.279
17	54.87	3796-70-1	香叶基丙酮	78	—	0.403	—
18	59.93	15356-74-8	二氢猕猴桃内酯	97	2.371	2.622	3.218
20	77.25	4602-84-0	金合欢醇	78	0.364	0.349	0.777
21	75.04	4674-50-4	(+)-香柏酮	89	0.772	2.918	—
22	80.63	1117-52-8	法尼基丙酮	94	—	—	11.395
23	61.65	38818-55-2	巨豆三烯酮 a	98	1.068	1.427	2.367
24	62.69	38818-55-3	巨豆三烯酮 b	99	4.994	6.288	10.042
25	64.66	38818-55-4	巨豆三烯酮 c	86	1.437	1.535	2.288
26	65.37	38818-55-5	巨豆三烯酮 d	99	3.636	4.526	7.779

注:—表示未检出。

表3 不同香型浓缩液中微生物有效序列数
Table 3 Number of effective sequence strips in different flavor concentrates

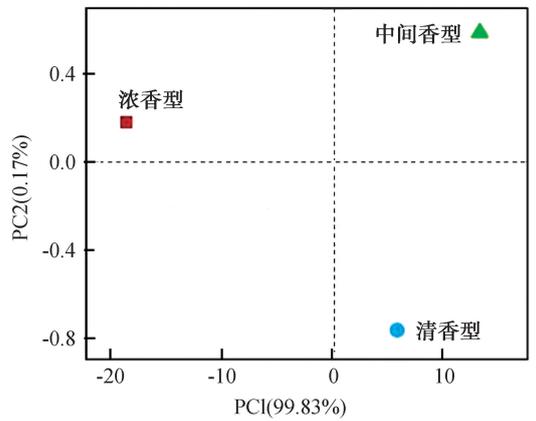
测序	浓香型	中间香型	清香型
16S	93 361	85 127	94 533
ITS	37 761	108 666	41 829

表4 不同香型浓缩液 OTU 聚类结果
Table 4 Results of OTU cluster of different flavor concentrates

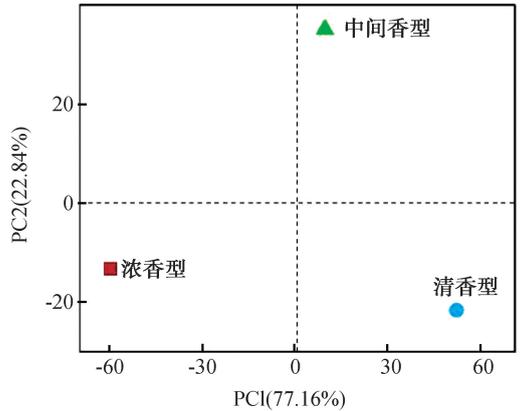
菌种	属	浓香型	中间香型	清香型
细菌	<i>Bacillus</i>	46 531	61 182	62 573
	<i>Lactobacillus</i>	33 772	13 211	19 628
	<i>Burkholderia</i>	42	183	35
	<i>Phenylobacterium</i>	44	233	42
	<i>Bradyrhizobium</i>	23	77	17
	<i>Terribacillus</i>	29	35	3
	真菌	<i>Issatchenkia</i>	5 632	30
<i>Candida</i>		961	60	0
<i>Meyerozyma</i>		117	26	4
<i>Fusarium</i>		258	38	0
<i>Ilyonectria</i>		75	0	0
Aspergillaceae		73	4	0
<i>Rhodotorula</i>		131	0	0
<i>Aureobasidium</i>		354	5	0
<i>Rhizopogon</i>		176	0	0
<i>Millerozyma</i>		134	5	0
<i>Hannaella</i>		68	0	0

2.3.3 PCA 物种相似度分析 为分析不同香型浓缩液微生物群落组成之间的差异和距离,运用方差分析,将样品菌属的差异反映在二维坐标图上(坐标轴为能最大限度反映样品间差异的两个特征值)浓缩液中细菌微生物和真菌微生物 PCA 分析图,如图 1 所示.样品的菌属多样性越相似,图中距离越近.由图 1a)可知,清香型与中间香型距离较近,而与浓香型之间距离较远,说明清香型与中间香型浓缩液之间细菌多样性相似度较大,而与浓香型浓缩液之间细菌多样性相似性较小;由图 1b)可知,清香型和浓香型距离较近,而与中间香型浓缩液之间距离较远,说明清香型和浓香型真菌多样性相似度较大,而与中间香型浓缩液之间相似性较小.

2.3.4 物种分布韦恩图分析 为统计不同香型浓缩液中共有的和独有的 OUT 微生物群落,



a) 细菌微生物



b) 真菌微生物

图 1 浓缩液中细菌微生物和真菌微生物 PCA 分析图

Fig. 1 PCA diagram of bacterial and fungal in the concentrates

分析 OTU 数目组成相似性及重叠情况,绘制物种分布韦恩图(见图 2).由图 2a)可知,3 种浓缩液共有细菌菌属为 67 种,清香型和中间香型共有 47 种,清香型和浓香型共有 1 种,中间香型独有细菌菌属最多,为 59 种,清香型次之,为 21 种,浓香型最少,为 3 种;由图 2b)可知,3 种浓缩液共有真菌菌属 9 种,中间香型和浓香型共有 54 种,中间香型和清香型共有 7 种,未检测到清香型和浓香型共有真菌菌属,浓香型独有真菌菌属最多,为 104 种,中间香型次之,为 28 种,清香型最少,为 1 种.

2.3.5 相对丰度分析 为研究不同香型浓缩液的微生物丰度,确定优势菌属,进行相对丰度分析,结果见图 3.由图 3a)可知,浓香型、中间香型和清香型 3 种浓缩液主要有两个优势细菌

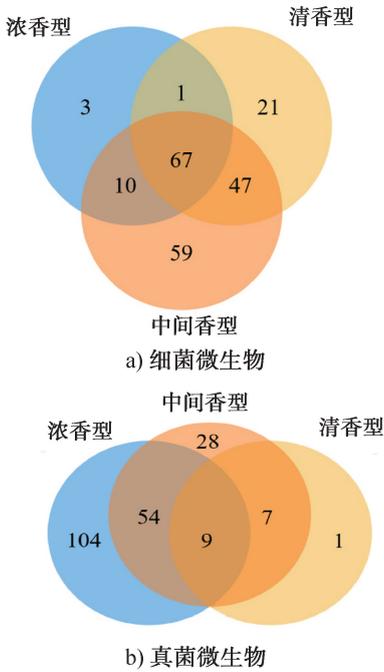


图2 浓缩液中细菌微生物和真菌微生物 OTU 分布韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of bacterial and fungal OTU distribution in the concentrates

属类:芽孢杆菌属和乳杆菌属. 其中,中间香型相对丰度最高,占比77.59%,清香型次之,占比73.62%,浓香型最低,占比57.61%;乳杆菌属在浓香型中相对丰度最高,占比41.76%,清香型次之,占比23.1%,中间香型最低,占比16.76%;其他菌属相对丰度很低. 由图3b)可知,3种浓缩液中真菌微生物相对丰度呈现显著差异,浓香型的优势菌属类为多型汉逊酵母菌属(*Ogataea*)和酵母菌属,相对丰度分别为48.25%和15.38%;中间香型的优势菌属类为德巴利氏酵母属(*Debaryomyces*)和假丝酵母菌属,相对丰度分别为48.81%和49.08%;清香型的优势菌属类为德巴利氏酵母属,相对丰度为99.79%. 对浓缩液中微生物群落结构分析已经发现,其优势细菌菌属为乳杆菌属、芽孢杆菌属、链球菌属(*Streptococcus*)和假单胞菌属,优势真菌菌属为酿酒酵母属(*Kazachstania*)和假丝酵母菌属^[8,11-12],这与本文研究结果大致相同. 综上所述,浓香型、中间香型和清香型浓

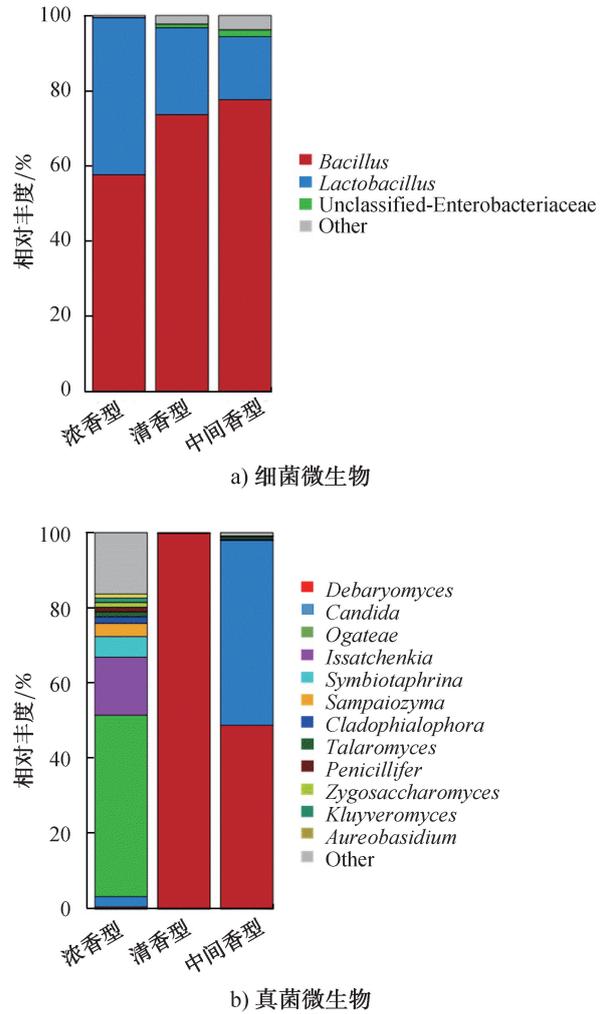


图3 浓缩液中细菌微生物和真菌微生物相对丰度 Fig. 3 Relative abundance of bacteria and fungi in the concentrates

缩液样品中有相当数量的共有微生物种群,其中细菌微生物种群大致相同,真菌微生物种群差异较大.

从属水平上分析样品微生物群落组成,发现芽孢杆菌属和乳杆菌属均属于厚壁菌门,多型汉逊酵母菌属和德巴利氏酵母属均属于子囊菌门,其中乳酸杆菌能够利用糖产生乳酸,芽孢杆菌能产生芽孢,酵母菌发酵醇化浓缩液,它们都可以适应浓缩液高糖、高渗透压的环境,且在不同香型浓缩液中的分布各不相同. 3种样品中,水溶性总糖含量较高的浓缩液乳酸杆菌相对丰度较低,芽孢杆菌相对丰度较高,说明乳酸杆菌属细菌和芽孢杆菌属细菌对不同香型烟叶

浓缩液环境表现出不同的耐受力。可能的原因是乳酸杆菌属细菌利用糖产生乳酸,受代谢产物的抑制数量较少,相反,芽孢杆菌属细菌能够通过形成芽孢成功地适应环境,因此在清香型和中间香型浓缩液中呈现明显的数量优势。3种不同香型浓缩液中水溶性糖含量越高,浓缩液中芽孢杆菌相对丰度越高,巨豆三烯酮、2-乙酰基呋喃含量越高。这可能是由于浓缩液中芽孢杆菌越多,微生物利用再造烟叶浓缩液中类胡萝卜素、还原糖、氨基酸产生香味物质的数量越多、品质越好,因此清香型中性香味成分的数量和质量呈现明显优势。已有研究^[19-20]也发现,芽孢杆菌属微生物具有类似的功能。

3 结论

本研究运用连续流动法对不同香型浓缩液常规化学成分含量进行对比,发现清香型浓缩液中水溶性总糖质量分数较高,浓香型浓缩液中总植物碱、氯和总氮质量分数较高,中间香型浓缩液中常规化学成分质量分数大多在两者之间。利用GC-MS法对不同香型浓缩液中性香味成分进行检测,发现清香型浓缩液 α -大马酮、二氢猕猴桃内酯、巨豆三烯酮和金合欢醇的质量浓度较高,浓香型中芳樟醇和乙酰基吡咯质量浓度较高,中间香型中性香味成分种类最多,质量浓度大多在清香型与浓香型之间。利用高通量测序对不同香型浓缩液中细菌和真菌群落结构和多样性进行分析,发现清香型浓缩液中细菌物种多样性最大,浓香型真菌物种多样性最大;3种样品的优势细菌菌属均为芽孢杆菌属和乳酸杆菌属,浓香型的优势真菌菌属类为多型汉逊酵母菌属和酵母菌属,中间香型和清香型为德巴利氏酵母属。该研究能够为我国不同香型风格再造烟叶浓缩液的生物处理及利用研究提供理论参考。

参考文献:

- [1] 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(1):65.
- [2] 王加深,刘晓晖,吉雄.国产造纸法再造烟叶在烤烟型卷烟产品改造中的应用[J].烟草科技,2004(3):9.
- [3] 赵晓丹,史宏志,钱华,等.不同类型烟草常规化学成分与中性致香物质含量分析[J].华北农学报,2012,27(3):234.
- [4] 黄兰,葛少林,汪华,等.造纸法再造烟叶萃取液与浓缩液固形物含量的测定[J].烟草科技,2018,51(10):64.
- [5] 席元肖,魏春阳,宋纪真,等.不同香型烤烟化学成分含量的差异[J].烟草科技,2011,50(4):1.
- [6] TYX R E, STANFILL S B, KEONG L M, et al. Characterization of bacterial communities in selected smokeless tobacco products using 16S rDNA analysis[J]. PLOS ONE, 2016, 11(1): e0146939.
- [7] 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(1): 5354.
- [8] 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.
- [9] 陈泽斌,夏振远,雷丽萍,等.烟草可培养内生细菌的分离及多样性分析[J].微生物学通报,2011,38(9):1347.
- [10] JIANG Y L, CHEN X, ZHAO G K, et al. Endophytic fungal community of tobacco leaves and their potential role in the formation of "cherry-red" tobacco[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 658116.
- [11] 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.
- [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.