



龙章德,苏赞,李季刚,等. 一种改善广西百色地区烟叶品质的混合微生物发酵技术[J]. 轻工学报,2021,36(5):59-66.

LONG Z D, SU Z, LI J G, et al. A mixed microbial fermentation technology for improving the quality of tobacco leaves in Baise, Guangxi[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(5):59-66. DOI:10.12187/2021.05.008

中图分类号:TS414 文献标识码:A 文章编号:2096-1553(2021)05-0059-08

一种改善广西百色地区烟叶品质的混合微生物发酵技术

A mixed microbial fermentation technology for improving the quality of tobacco leaves in Baise, Guangxi

龙章德¹, 苏赞¹, 李季刚¹, 薛云¹, 刘启斌¹, 宁振兴¹, 毛多斌², 魏涛²

LONG Zhangde¹, SU Zan¹, LI Jigang¹, XUE Yun¹, LIU Qibin¹, NING Zhenxing¹, MAO Duobin², WEI Tao²

1. 广西中烟工业有限责任公司技术中心, 广西南宁 530001;

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 Guangxi Industrial Co., Ltd., Nanning 530001, China;

2. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

关键词:

B3F 烟叶; 常规化学成分; 致香成分; 混合微生物发酵技术; 正交试验

Key words:

B3F tobacco leave; conventional chemical component; aroma component; mixed microbial fermentation technology; orthogonal test

摘要:在酿酒酵母发酵预处理广西百色地区 B3F 烟叶的基础上, 采用嗜麦芽寡养单胞菌对该烟叶进一步发酵, 通过单因素试验和正交试验确定其最佳发酵条件; 对比分析混合微生物发酵前后广西百色地区 B3F 烟叶常规化学成分和致香成分的变化, 并研究发酵后该烟叶感官评吸品质的提升水平。结果表明: 嗜麦芽寡养单胞菌的最佳发酵条件为接种量 8 mL、发酵温度 34 ℃、发酵时间 60 h、湿度 70%, 在该条件下发酵后烟叶的石油醚提取物质量分数达到 16.50%; 混合微生物发酵后烟叶常规化学成分中总糖和还原糖含量均有所增加, 烟叶糖碱比由 6.77 提高到 7.55; 烟叶中 6 种重要的致香成分(巨豆三烯酮、大马酮、茄酮、二氢大马酮、香叶基丙酮和二氢猕猴桃内酯)的质量浓度比发酵前增加了 6.65%, 烟叶香气质、香气饱满度均有所增加, 烟叶刺激性和杂气均降低。

收稿日期: 2021-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31801535); 河南省留学人员科技活动项目(2019-03); 广西中烟对外合作项目(2019450000340011)

作者简介: 龙章德(1970—), 男, 广西壮族自治区百色市人, 广西中烟工业有限责任公司工程师, 博士, 主要研究方向为烟草生物化工。

通信作者: 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。

Abstract: Based on the fermentation pretreatment of B3F tobacco leaves in Baise, Guangxi by *Saccharomyces cerevisiae*, the tobacco leaves were further fermented by oligotrophic maltophilia. The optimum fermentation conditions were determined by single factor test and orthogonal test; The changes of conventional chemical components and aroma components of B3F tobacco leaves in Baise, Guangxi before and after mixed microbial fermentation were compared and analyzed, and the improvement level of sensory evaluation quality of B3F tobacco leaves after fermentation was studied. The results showed that the optimum fermentation conditions of oligotrophic maltophilia were inoculation amount of 8 ml, fermentation temperature of 34 °C, fermentation time of 60 h and humidity of 70%. Under these conditions, the mass fraction of petroleum ether extract of fermented tobacco leaves reached 16.50%. After mixed microbial fermentation, the contents of total sugar and reducing sugar in conventional chemical components of tobacco leaves increased, and the sugar alkali ratio of tobacco leaves increased from 6.77 to 7.55. The mass concentration of six important aroma components in tobacco leaves (megaketene, damascus, eggplant, dihydrodamadone, vanillin and dihydrokiwifruit lactone) increased by 6.65% compared with that before fermentation. After fermentation, the aroma quality and aroma plumpness of tobacco leaves increased, and the irritation and miscellaneous gas of tobacco leaves decreased.

0 引言

广西百色地区具有土壤矿质营养含量高、日照充足、全年无霜期等烟草种植优势,是广西烟草最适宜的种植区之一,近年来也成为广西最大的烤烟种植区,但是广西百色 B3F 烟叶因香气量不足、杂气重、感官品质差等特点限制了其在卷烟配方中的应用。

目前,利用微生物处理低等次烟叶以提高其感官品质,已成为改善烟叶品质的一种重要方式。如 C. F. English 等^[1]从烟叶表面分离得到芽孢杆菌属的嗜热芽孢杆菌属,纯培养或混合培养后接种烟叶,抽吸时可以产生令人愉悦的香气;黄晓春^[2]分离得到降碱增香的菌株,研究表明,经过菌剂处理的烟叶,其香气质和香气量都得到提升,烟碱含量降低,烟叶品质得到改善,可用性得以提高;赵铭钦^[3]在烟叶表面筛选出巨大芽孢杆菌 BCK,对其进行诱变处理得到对淀粉和蛋白质降解活性较高的菌株 B8,利用该菌株发酵烟叶后,苯甲醛、苯乙醛、苯乙醇、茄酮、 β -大马酮、巨豆三烯酮的 3 种异构体、西柏三烯-4-醇等的含量增加明显;度有朋等^[4]在发酵了 1~2 a 的烟叶上筛选出 22 株优势菌株,经 7 个月烟叶发酵,达到了现有技术发酵 3 a

的效果,增香提质作用明显。

近年来,研究人员还发现,利用混合菌种发酵烟叶的品质明显强于单一菌种发酵。混合微生物处理技术能有效降解烟叶中淀粉、蛋白质、木质素、果胶等大分子物质,从而明显改善烟叶品质^[5-8]。J. C. Dai 等^[9]从烤烟烟叶上筛选到嗜热枯草芽孢杆菌 ZIM3 和工程菌株 ZIM1,烟叶经发酵后,淀粉和纤维素的生物降解效率提高了 30%~48%,整体感官品质得到提升;巩效伟等^[10]分别用产香微生物 CXJ-3 枯草芽孢杆菌、CXJ-7 西姆芽孢杆菌和 CXJ-12 短小芽孢杆菌及其复合菌剂处理梗丝,发现,处理后梗丝的总糖、还原糖和挥发性香气成分含量均显著提升,其中以复合菌剂处理效果最好。帅瑶^[11]使用解淀粉芽孢杆菌 GUHP86 与 GZU03 复配菌种对大理红大 CL314 烟叶进行发酵,发现芳樟醇、 β -大马酮、 β -紫罗兰酮等香味物质的相对含量增加,且复合菌发酵比单菌发酵和自然发酵对烟叶品质提升作用更明显。

本实验室前期已经建立成熟的酿酒酵母发酵烟叶技术,并分离得到一株嗜麦芽寡养单胞菌,该菌可以将烟叶中 2,7,11-西柏三烯-4,6-二醇类物质转化为香味物质,进而有效改善烟叶品质^[12-14]。在前期实验中,采用酿酒酵母和

嗜麦芽寡养单胞菌分别发酵广西百色 B3F 烟叶,烟叶品质虽有一定改善但是效果并不明显. 鉴于此,本文拟利用酿酒酵母和嗜麦芽寡养单胞菌对广西百色 B3F 烟叶进行混合微生物发酵处理,确定嗜麦芽寡养单胞菌的最佳发酵条件;分析混合微生物发酵前后烟叶常规化学成分、致香成分的变化,并研究发酵后烟叶感官评吸品质的提升效果,以期提高百色 B3F 烟叶的利用率.

1 材料与方法

1.1 材料

烟叶:广西百色 B3F 烟叶(广西中烟工业有限责任公司技术中心提供),将烟叶粉碎后过 40 mm 的分样筛,制成实验样品备用.

菌株:酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ULI3^[12],嗜麦芽寡养单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia*(中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提供,其保藏编号为 CGMCC No: 13905).^[13]

1.2 主要仪器与设备

主要仪器设备:SW-CJ-IF 型单人双面净化工作台,苏州净化设备有限公司产;LDZX-50KBS 型立体压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂产;同时蒸馏萃取装置,郑州科技玻璃仪器厂产;DLSB-1020 低温冷却循环泵,郑州国瑞仪器有限公司产;DHP-9162 恒温培养箱,太仓市科教器材厂产;7890C GC-MS 色谱联用仪,美国 Agilent 公司产.

1.3 培养基配制

酿酒酵母培养基(M1)^[12,14]: 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.

嗜麦芽寡养单胞菌培养基(M2)^[13]: KNO_3 1.0 g/L, KH_2PO_4 0.5 g/L, $NaCl$ 0.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L,

麦芽糖 1 g/L.

1.4 实验方法

1.4.1 菌株培养 从-80℃冰箱中取出酿酒酵母,转接固体培养基(M1培养基,另加入 20 g/L 琼脂),在 28℃培养箱里培养 24 h. 挑选较大的菌落,接入 30 mL 的 M1 液体培养基中,在 28℃、180 r/min 条件下培养 24 h,获得种子液. 以体积分数为 2% 的接种量接种于 300 mL M1 液体培养基中,在相同条件下培养 24 h. 将菌液以 8000 r/min 的转速离心 10 min,去除上清液,将沉淀溶于 30 mL 无菌水中,重复两次,备用.

从-80℃冰箱中取出嗜麦芽寡养单胞菌,转接 M2 固体培养基,在 30℃培养箱里培养 12 h. 挑选较大的菌落,接入 30 mL 的 M2 液体培养基中,在 30℃、180 r/min 条件下培养 12 h,获得种子液. 以体积分数为 2% 的接种量接种于 300 mL M2 液体培养基中,在相同条件下培养 12~16 h. 将菌液以 8000 r/min 的转速离心 10 min,弃上清液,将沉淀溶于 30 mL 无菌水中,重复两次,备用.

1.4.2 酿酒酵母发酵预处理 根据文献[14]的方法对广西百色 B3F 烟叶进行发酵预处理:取 10 mL 酿酒酵母菌悬液,均匀喷洒在 50 g 广西百色 B3F 烟叶上,在温度 30℃,湿度 70% 的恒温恒湿箱中用密封袋密封培养 48 h.

1.4.3 嗜麦芽寡养单胞菌发酵条件单因素试验设计 使用嗜麦芽寡养单胞菌将经酿酒酵母发酵预处理后的广西百色 B3F 烟叶进行进一步发酵. 由于烟叶石油醚提取物包括挥发油、树脂、油脂、脂肪酸、蜡质、类脂物和色素,常常被作为衡量烟叶品质和香气的重要指标. 因此,本文以 50 g 预处理广西百色 B3F 烟叶为研究对象,以石油醚提取物质量分数为指标,优化嗜麦芽寡养单胞菌的发酵条件^[15].

1) 接种量:分别取 2 mL、4 mL、6 mL、8 mL

和 10 mL 嗜麦芽寡养单胞菌悬液均匀喷洒在预处理烟叶上,补充水分至湿度为 70%,在 28 ℃ 条件下发酵 24 h,发酵结束后测定石油醚提取物质量分数。

2) 发酵温度:取 5 mL 嗜麦芽寡养单胞菌悬液均匀喷洒在预处理广西百色 B3F 烟叶上,补充水分至湿度 70%,分别在 22 ℃、24 ℃、26 ℃、28 ℃、30 ℃、32 ℃、34 ℃ 和 36 ℃ 条件下发酵 24 h,发酵结束后测定石油醚提取物质量分数。

3) 发酵时间:取 5 mL 嗜麦芽寡养单胞菌悬液均匀喷洒在预处理广西百色 B3F 烟叶上,补充水分至湿度为 70%,在 28 ℃ 条件下分别发酵 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 和 72 h,发酵结束后测定石油醚提取物质量分数。

4) 发酵湿度:取 5 mL 嗜麦芽寡养单胞菌悬液均匀喷洒在预处理广西百色 B3F 烟叶上,补充水分至湿度分别为 30%、40%、50%、60% 和 70%,在 28 ℃ 条件下发酵 24 h,发酵结束后测定石油醚提取物质量分数。

1.4.4 正交试验设计 以石油醚提取物质量分数为指标,选取发酵接种量(A)、发酵温度(B)、发酵时间(C)、和发酵湿度(D)进行四因素三水平正交试验,以确定嗜麦芽寡养单胞菌最佳发酵条件。正交试验各因素水平见表 1。

表 1 正交试验各因素水平表

Table 1 The table of various factors levels of orthogonal test

水平	A/mL	B/℃	C/h	D/%
1	4	30	36	50
2	6	32	48	60
3	8	34	60	70

1.4.5 烟叶品质提升效果分析 用嗜麦芽寡养单胞菌悬液在最佳条件下对预处理广西百色 B3F 烟叶进行发酵;用等量的无菌水,均匀喷洒在预处理广西百色 B3F 烟叶上,在同样的温湿度下密封培养同样的时间,作为对照组;以未用

菌株发酵的广西百色 B3F 烟叶为空白组。对比分析发酵前后烟叶常规化学成分和致香成分的变化,研究发酵前后该烟叶感官评吸品质的提升水平,以确定发酵后烟叶总体品质的提升情况。

1) 常规化学成分的测定。参照文献[16-19]中的方法测定烟叶中总植物碱、总氮、钾、氯的含量;参照文献[20]中的方法测定烟叶中总糖、还原糖和淀粉的含量。

2) 烟叶致香成分的提取。称取 30 g 过 40 mm 分样筛的烟末,置于 1000 mL 圆底烧瓶中,再加入 100 g 的无水硫酸钠和 400 mL 纯净水,振荡摇匀后,放入同时蒸馏萃取装置一端的电热套加热,在装置的另一边水浴锅中连接一个装有 100 mL 二氯甲烷的 250 mL 圆底烧瓶,两边同时进行 60 ℃ 水浴加热,从第一次的加热回流开始计时,2.5 h 后得到含有 100 mL 二氯甲烷的萃取液。对萃取液进行萃取分离,得到中性萃取液,在中性萃取液中加入一定量的无水硫酸钠进行冷藏干燥,静置过夜后将样品蒸馏浓缩至 1 mL 左右,用 GC-MS 进行定量分析。

GC 测试条件:HP-5 MS 毛细管柱(60 m×250 μm×0.25 μm);进样口温度为 240 ℃;载气为 He(纯度为 99.999%),流速为 1.0 mL/min;分流模式为不分流进样,进样量为 1.0 μL。升温程序:设置 50 ℃(4 min)后以 3 ℃/min 的速度升温到 70 ℃(5 min),再以 2 ℃/min 的速度升温到 100 ℃(17 min),然后以 2 ℃/min 的速度升温到 120 ℃(10 min),最后以 6 ℃/min 的速度升温到 280 ℃。

MS 测试条件:传输线温度 280 ℃;离子源温度 280 ℃;四级杆温度 150 ℃;电子倍增器电压 2.28 kV;电离方式为电子轰击(EI),电子能量 70 eV;溶剂延迟 10 min;全扫描检测,扫描质量范围(m/z)35~500 amu。

3) 烟叶感官评吸方法。邀请 13 位专业评吸

人员,每位评吸人员在上午的同一时间段分别对单料烟进行评吸,每次抽吸6支卷烟,对每种单料烟进行3次评吸.要求所有的专业评吸人员在规定的时间内完成评吸,否则评吸结果作废.打分时按照单料烟九分制相关标准^[21],从烟叶的香气质、香气量、浓度、刺激性、杂气、劲头、余味7项指标进行感官评吸.

1.5 数据处理

采用 Excel 2016 对实验数据进行统计分析,利用 SPSS 17.0 进行显著性差异分析.

2 结果与分析

2.1 嗜麦芽寡养单胞菌发酵条件单因素试验结果

2.1.1 接种量 接种量对石油醚提取物质量分数的影响如图1所示.由图1可知,石油醚提取物质量分数先随着嗜麦芽寡养单胞菌接种量的增加而升高,当接种量为6 mL时,石油醚提取物质量分数达到最大,之后随着接种量的增加呈降低趋势.这可能是因为接种量过大,菌体生长期细胞数量过多,影响了烟叶表面原有微生物的种群和代谢,造成石油醚提取物质量分数的降低.因此,选取嗜麦芽寡养单胞菌发酵适接种量为6 mL.

2.1.2 发酵温度 发酵温度对石油醚提取物质量分数的影响如图2所示.由图2可知,随

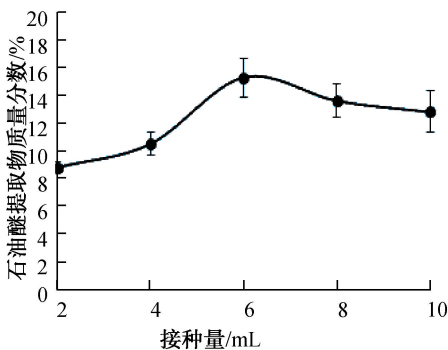


图1 接种量对石油醚提取物质量分数的影响

Fig. 1 Effect of inoculation amount on mass fraction of petroleum ether extract

着发酵温度的增加,石油醚提取物的质量分数先增加,当发酵温度为32℃时,石油醚提取物质量分数最大.随着发酵温度的进一步增加,石油醚提取物质量分数开始降低,可能是温度过高抑制了嗜麦芽寡养单胞菌的生长和代谢.因此,选取嗜麦芽寡养单胞菌适宜发酵温度为32℃.

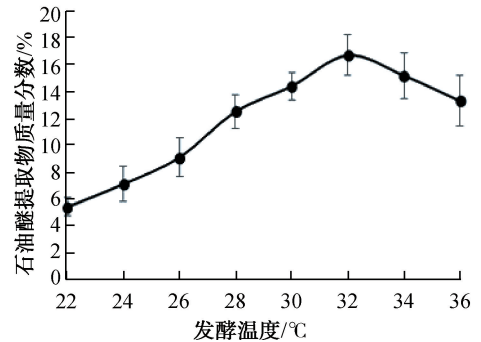


图2 发酵温度对石油醚提取物质量分数的影响

Fig. 2 The influence of fermentation temperature on the mass fraction of petroleum ether extract

2.1.3 发酵时间 发酵时间对石油醚提取物质量分数的影响如图3所示.由图3可知,在前48 h内,随着发酵时间的延长,石油醚提取物的质量分数逐渐增大,当发酵时间为48 h时,其质量分数达到最大,之后随着时间的延长,石油醚提取物质量分数缓慢降低.因此,选取嗜麦芽寡养单胞菌适宜发酵时间为48 h.

2.1.4 发酵湿度 发酵湿度对石油醚提取物质量分数的影响如图4所示.由图4可知,随着湿度的增加,石油醚提取物的质量分数呈先

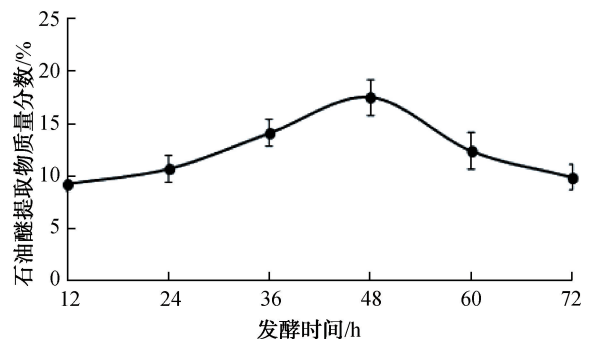


图3 发酵时间对石油醚提取物质量分数的影响

Fig. 3 The influence of fermentation time on the mass fraction of petroleum ether extract

升高后降低的趋势. 当发酵湿度为 60% 时, 石油醚提取物的质量分数达到最大, 这是由于发酵湿度较低时, 不能达到酶的活性和满足嗜麦芽寡养单胞菌生长繁殖的条件, 随着湿度的增加, 逐渐达到微生物生长的最佳条件; 但发酵湿度过高时, 烟叶易结块, 影响其散热, 有可能产生霉变, 影响嗜麦芽寡养单胞菌的生长和代谢. 因此, 选取嗜麦芽寡养单胞菌适宜发酵湿度为 60%.

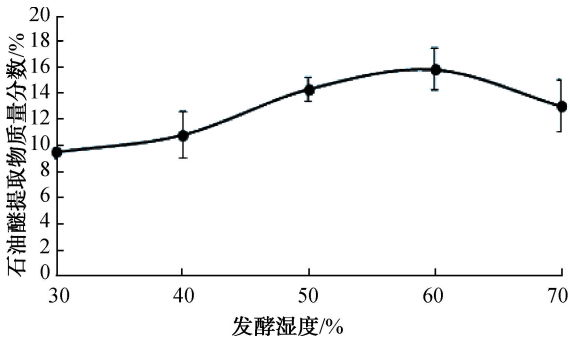


图 4 发酵湿度对石油醚提取物质量分数的影响
Fig. 4 The influence of fermentation humidity on the mass fraction of petroleum ether extract

2.2 正交试验结果

正交试验结果见表 2, 正交试验结果方差分析见表 3. 由极差结果可知, 影响石油醚提取物质量分数的因素大小依次为 $R_A > R_B > R_C > R_D$, 即接种量 > 发酵温度 > 发酵时间 > 发酵湿度; 由方差分析结果可知, 接种量对石油醚提取物质量分数影响极显著, 发酵温度、发酵时间和发酵湿度对其影响不显著, 正交试验结果最优组合是 $A_3B_2C_1D_3$. 因此, 最佳发酵条件是接种量 8 mL, 发酵温度 32 °C, 发酵时间 36 h, 发酵湿度 70%. 在此发酵条件下, 石油醚提取物质量分数为 16.50%.

表 2 正交试验结果

Table 2 Orthogonal test results

试验号	A	B	C	D	石油醚提取物质量分数/%
1	1	1	1	1	12.79
2	1	2	2	2	13.03
3	1	3	3	3	14.88
4	2	1	2	3	13.67
5	2	2	3	1	15.48
6	2	3	1	2	14.43
7	3	1	3	2	15.08
8	3	2	1	3	16.50
9	3	3	2	1	15.82
k_1	13.57	13.85	14.58	14.70	
k_2	14.53	15.00	14.17	14.18	
k_3	15.80	15.04	15.15	15.01	
R	2.23	1.19	0.98	0.83	

表 3 正交试验结果方差分析

Table 3 Orthogonal test results of variance analysis

方差来源	自由度	偏差平方和	均方	F
A	2	22.614	11.307	19.153**
B	2	8.283	4.142	7.015
C	2	4.334	2.167	3.670
D	2	3.184	1.592	2.696
误差	18	10.626	0.590	
总和	27	5 828.622		

注: $F_{0.01}(2, 10) = 7.56; F_{0.05}(2, 10) = 4.10$.

2.3 发酵前后烟叶常规化学成分分析

混合微生物发酵前后 B3F 烟叶常规化学成分质量浓度如表 4 所示. 由表 4 可知, 在嗜麦芽寡养单胞菌的最佳发酵条件下, 微生物不仅分解淀粉等生物大分子, 使烟叶的总糖和还原糖质量浓度明显增加, 还可降低该类大分子物质对吸食品质的影响; 烟碱、钾、氯和总氮的变化不明显, 糖碱比和钾氯比的升高有利于提高烟叶的燃烧性. 烟叶常规化学成分比例的变化使其内部趋于协调, 整体更为和谐, 改善了卷烟的吸味品质, 从而提高了烟叶的感官品质.

表 4 混合微生物发酵前后 B3F 烟叶常规化学成分质量浓度

Table 4 Mass concentration of conventional chemical components in B3F tobacco leaves before and after mixed microbial fermentation

样品	总糖/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	还原糖/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	烟碱/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	钾/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	氯/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	总氮/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	钾氯比	糖碱比
空白组	127.2	125.4	18.8	30.7	3.8	2.30	8.08	6.77
对照组	129.8	130.5	18.7	30.9	3.7	2.30	8.35	6.94
试验组	140.5	138.9	18.6	31.1	3.6	2.36	8.64	7.55

2.4 发酵前后烟叶致香成分分析

混合微生物发酵前后烟叶中致香成分对比分析如表 5 所示。由表 5 可知,经酿酒酵母和嗜麦芽寡养单胞菌混合微生物发酵处理的广西 B3F 烟叶总致香成分质量浓度增加 64.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$,总体变化不明显,但巨豆三烯酮、大马酮、茄酮、二氢大马酮、香叶基丙酮和二氢猕猴桃内酯这 6 种重要致香成分总量变化较大,质量浓度由 2 455.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 提高到 2 619.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$,增加了 6.65%。烟叶的化学组成中,羰基化合物(酮类)和类脂类物质对烟叶香味具有重要影响。利用酵母菌固态发酵烟叶,可以有效增加烟叶中羰基化合物(酮类)和类脂类化学物质,进而改善烟叶的品质,已有相关文献报道。胡志忠等^[22]利用产香酵母对贵州烟叶进行固态发酵,发现在最佳发酵条件下,烟叶新增多种重要致香物质,其中包括糠醇、金合欢醇、 β -环柠檬醛等。陈笃建^[23]用产香酵母处理低等级烟叶,处理前后烟叶成分和烟气成分差异不大,但香味物质巨豆三烯酮、正十六酸、香叶基丙酮、香叶醇等相对百分含量发生变化,改善了烟叶吸食品质。这与本文的研究结果一致。

2.5 感官评吸结果分析

混合微生物发酵前后 B3F 烟叶的感官评吸结果如表 6 所示。由表 6 可知,与空白组和对照组相比,试验组的香气质和余味均有所增

加,刺激性和杂气减轻,烟气更加醇和细腻,卷烟余味舒适度增加,感官品质提高;试验组评吸分数为 44.0,相比对照组有 1.0 分的提高,表明混合微生物发酵改善了烟叶的吸味品质。

3 结论

本文以广西百色 B3F 烟叶为研究对象,在酿酒酵母对广西百色地区 B3F 烟叶进行发酵预处理的基础上,采用嗜麦芽寡养单胞菌对该烟叶进一步发酵,通过单因素试验和正交试验确定最佳发酵条件,建立了混合微生物发酵广西百色地区 B3F 烟叶技术;对比分析了混合微生物发酵前后广西百色地区 B3F 烟叶常规化学成分和致香成分的变化,并研究发酵后该烟叶感官评吸品质的提升水平。结果表明:嗜麦芽寡养单胞菌发酵最佳工艺条件,接种量为 8 mL,发酵温度为 34 $^{\circ}\text{C}$,发酵时间为 60 h,湿度为 70%,在该条件下石油醚提取物质量分数为 16.50%;混合微生物发酵后烟叶常规化学成分中总糖和还原糖含量均有所增加,烟叶糖碱比由 6.77 提高到 7.55,烟叶中巨豆三烯酮、大马酮、茄酮、二氢大马酮、香叶基丙酮和二氢猕猴桃内酯 6 种重要致香成分质量浓度增加了 6.65%,这在一定程度上有效改善了烟叶的吸味品质;发酵后烟叶香气质有所增加,刺激性和杂气减轻,烟叶内化学成分间更趋于协调,卷烟

表 5 混合微生物发酵前后烟叶中致香成分对比分析

Table 5 Comparative analysis of aroma components in tobacco leaves before and after mixed microbial treatment

样品	巨豆三烯酮	大马酮	茄酮	二氢大马酮	香叶基丙酮	二氢猕猴桃酯	6 种重要致香成分总量	致香成分总量
空白组	1 235.23	55.80	563.15	319.21	93.22	189.07	2 455.68	9 990.98
对照组	1 239.54	56.90	570.24	325.32	95.12	192.23	2 479.35	10 021.87
试验组	1 276.09	57.90	595.82	378.96	99.07	211.17	2 619.01	10 055.19

表 6 混合微生物发酵前后 B3F 烟叶的感官评吸结果

Table 6 Sensory evaluation results of B3F tobacco leaves before and after mixed microbial fermentation 分

样品	香气质	香气量	浓度	刺激性	杂气	劲头	余味	总分
空白组	7.0	6.0	6.0	6.4	5.6	6.0	6.0	43.0
对照组	7.0	6.0	6.0	6.5	5.7	6.0	6.1	43.3
试验组	7.2	6.0	6.0	6.6	6.0	6.0	6.2	44.0

余味舒适度增加。本文所建立的酿酒酵母和嗜麦芽寡养单胞菌混合微生物发酵技术,可有效提高广西百色 B3F 烟叶的品质,今后需进一步完善该混合微生物发酵的中试放大工艺条件,以加快其在不适用烟叶提质增香中的推广应用。

参考文献:

- [1] ENGLISH C F, BELL E J, BERGER A J. Isolation of thermophiles from broad leaf tobacco and effect of pure culture inoculation on cigar aroma and mildness[J]. *Applied Microbiology*, 1967, 15(1): 117.
- [2] 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.
- [3] 赵铭钦. 烤烟陈化的生理生化机制与叶面优势微生物的分离筛选及增香效应[D]. 郑州: 河南农业大学, 2009.
- [4] 虞有朋, 王刚, 段旺军, 等. 利用生物技术对烤烟发酵的研究[J]. *食品与发酵科技*, 2020, 56(2): 69.
- [5] 单宏英. 陈化烟叶表面有益微生物的分离筛选、鉴定及应用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [6] 魏涛, 陈顺心, 黄申, 等. β -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.
- [7] 胡腾飞, 焦凯旋, 黄启蒙, 等. 固态发酵产香菌株筛选分析研究[J]. *农产品加工*, 2020, 4: 52.
- [8] 颜克亮, 武怡, 曾晓鹰, 等. 基于提质减害的烟叶醇化技术研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(3): 450.
- [9] 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.
- [10] 巩效伟, 段焰青, 汪显国, 等. 产香微生物复合处理提升梗丝品质的研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2016, 31(5): 862.
- [11] 帅瑶. 微生物发酵口含烟原料提质增香的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- [12] WEI T, JIA B L, HUANG S, et al. Purification and characterization of a novel β -carotene-9', 10'-oxygenase from *Saccharomyces cerevisiae* ULI3[J]. *Biotechnology Letter*, 2015, 37(10): 1993.
- [13] 郑州轻工业学院. 一株嗜麦芽寡养单胞菌及其应用: 201710804907. 7[P]. 2019-11-22.
- [14] 贾蓓蕾. α -胡萝卜素降解产香菌株的分离鉴定、发酵条件优化及酶特性研究[D]. 郑州: 郑州轻工业学院, 2015.
- [15] 邵金良, 黎其万, 刘宏程, 等. 烟草中石油醚提取物测定方法改进[J]. *中国烟草学报*, 2010, 31(1): 41.
- [16] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 植物碱的测定 连续流动法: YC/T 160—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 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 尹建雄, 卢红, 谢强, 等. 3, 5-二硝基水杨酸比色法快速测定烟草水溶性总糖、还原糖及淀粉的探讨[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2007, 22(6): 829.
- [21] 国家烟草专卖局. 烟草在制品感官评价方法: YC/T 415—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [22] 胡志忠, 姜宇, 刘鸿, 等. 利用产香酵母发酵技术改善烟叶品质[J]. *食品与机械*, 2018, 34(11): 200.
- [23] 陈笃建. 产香酵母对低次烟叶吸食品质的影响[J]. *贵州农业科学*, 2013, 41(4): 44.