



薛云,宁振兴,苏赞,等.基于芽孢杆菌固态发酵技术提高广西河池 C4F 烟叶品质的研究[J].轻工学报,2022,37(5):76-84.  
XUE Y, NING Z X, SU Z, et al. Study on improving the quality of Hechi C4F tobacco leaves in Guangxi by using the solid-state fermentation technology with *Bacillus* sp. [J]. Journal of Light Industry, 2022, 37(5): 76-84.  
DOI:10.12187/2022.05.009

# 基于芽孢杆菌固态发酵技术提高广西河池 C4F 烟叶品质的研究

薛云<sup>1</sup>, 宁振兴<sup>1</sup>, 苏赞<sup>1</sup>, 刘启斌<sup>1</sup>, 王敏<sup>2</sup>, 毛多斌<sup>2</sup>, 龙章德<sup>1</sup>, 魏涛<sup>2</sup>

1. 广西中烟工业有限责任公司 技术中心, 广西南宁 530004;
2. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001

**摘要:**采用芽孢杆菌 ZZ-8 (*Bacillus* sp. ZZ-8) 固态发酵技术处理广西河池地区 C4F 烟叶, 通过单因素试验和响应面试验确定最佳发酵条件, 分析发酵后烟叶常规化学成分和致香成分含量变化, 结合感官评吸评价发酵后烟叶的吸食品质。结果表明: 接种量为 3 mL、发酵温度为 28 ℃、发酵时间为 36 h、相对湿度为 60% 时烟叶石油醚提取物质量分数最高, 为 9.01%; 在该条件下发酵烟叶, 烟叶总糖质量分数由 23.10% 降低至 22.20%, 还原糖质量分数由 22.19% 提高至 22.40%, 糖碱比由 10.23 降低至 9.45; 烟叶经菌株发酵后产生了苯甲醛和  $\beta$ -环柠檬醛 2 种新物质, 致香成分总含量由 170.444  $\mu\text{g/g}$  提高到 186.267  $\mu\text{g/g}$ , 其中大马酮、茄酮、巨豆三烯酮、二氢大马酮、香叶基丙酮和二氢猕猴桃内酯等香味成分含量变化较大; 发酵后烟叶香气有所提升, 刺激性和杂气均降低, 烟气细腻柔和, 余味舒适, 吸食品质提高。

**关键词:** C4F 烟叶; 芽孢杆菌 ZZ-8; 常规化学成分; 致香成分; 固态发酵

**中图分类号:** TS414 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2022)05-0076-09

## 0 引言

广西河池地区 C4F 烟叶因杂气重、吸味品质较差等缺点, 致使在卷烟叶组配方中的使用率较低。为了提高该地区烟叶利用率, 需要对其吸味品质进行改善。已有研究表明利用微生物对不适用烟叶进行处理是改善烟叶品质的重要方式之一<sup>[1-3]</sup>。在一定条件下, 微生物通过自身代谢可以将烟叶中的大分子化合物(如淀粉、蛋白质、果胶和纤维素等)降解为单糖和氨基酸等小分子化合物, 这些小分子化合物经过一系列转化, 生

成醇类、醛类、酸类、酯类和酮类等香味成分, 对于提升烟叶吸食品质具有重要价值和意义<sup>[4-5]</sup>。

郑小嘎<sup>[6]</sup>筛选得到 4 株诱香增质效果较好的真菌菌株, 该菌株处理过的烟叶化学成分更趋协调, 香气和香气量得分均高于对照组, 余味更加舒适, 杂气和刺激性减小; 胡志忠等<sup>[7]</sup>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, 新增的多种重要致香物质(包括糠醇、金合欢醇、 $\beta$ -环柠檬醛等)可以有效改善烟叶品质; 黄静文等<sup>[8]</sup>利用短小芽孢杆菌 Van35 处理烟叶后, 能降低烟叶烟碱、蛋

收稿日期: 2021-08-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31801535); 河南省高校科技创新人才项目(18HASTIT040); 广西中烟对外合作项目(2019450000340011, 2020450000340027)

作者简介: 薛云(1987—), 女, 广西壮族自治区南宁市人, 广西中烟工业有限责任公司工程师, 主要研究方向为烟草加工技术。E-mail: xueyun@126.com

通信作者: 魏涛(1980—), 男, 河南省郑州市人, 郑州轻工业大学教授, 博士, 主要研究方向烟草生物技术。E-mail: weit8008@zzuli.edu.cn

白质含量等,显著增加烟香、降低刺激性、醇和烟气,改善卷烟吸味;巩效伟等<sup>[9]</sup>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分别处理梗丝,与对照相比,梗丝的总糖、还原糖和挥发性香气成分的含量均显著提升,其中复合菌剂处理样品的挥发性成分含量提升最为明显,达 141.466  $\mu\text{g/g}$ ;余玉莎等<sup>[10]</sup>用产香真菌米根霉对烟叶进行发酵,发现能增加烟叶中部分致香成分的含量。

综上所述,利用微生物固态发酵技术处理烟叶是目前改善烟叶品质的重要方法之一,芽孢杆菌和酵母菌是烟叶固态发酵中的常用菌株<sup>[11-13]</sup>。目前还未见利用微生物固态发酵技术来改善广西河池 C4F 烟叶品质的相关报道。鉴于此,本研究拟选取河池 C4F 烟叶为研究对象,利用前期筛选获得的芽孢杆菌对其进行固态发酵处理,通过单因素试验和响应面试验确定最佳发酵条件,对比分析发酵后烟叶常规化学成分和致香成分的变化,结合感官评吸技术评价发酵后的烟叶吸食品质,为改善广西河池 C4F 烟叶品质、提升其利用率的研究提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

主要试剂: Brij 35 溶液(聚乙氧基月桂醚)、二氯异氰尿酸钠,北京百灵威科技有限公司产;硼酸钠,国药集团化学试剂有限公司产;二氯甲烷,天津市凯通化学试剂有限公司产;盐酸,烟台市双双有限公司产。

主要仪器: 400 g 多功能粉碎机,上海树立仪器仪表有限公司产; KQ-700DE 数控超声仪,昆山市超声仪器有限公司产; AA3 连续流动分析仪,德国 SEAL 公司产;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。

实验材料: 广西河池地区 C4F 烟叶,由广西中烟工业有限责任公司技术中心提供,将烟叶粉碎过 40 目分样筛后制成样品备用。芽孢杆菌 ZZ-8 (*Bacillus* sp. ZZ-8),由郑州轻工业大学实验室从河

南初烤烟叶中筛选获得并保存。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 菌株培养** 从 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出 ZZ-8 菌株,转接固体 LB 培养基,在 30  $^{\circ}\text{C}$  培养箱里培养 12 h。挑选较大的菌落,接入 30 mL 的液体 LB 培养基中,在 30  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 的条件下培养 12 h,获得种子液。以 2% 的接种量接种于 300 mL 液体 LB 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,去除上清,将沉淀溶于 30 mL 无菌水中,重复两次,备用。

**1.2.2 烟叶固态发酵单因素试验** 烤烟烟叶石油醚提取物(包括挥发油、树脂、油脂、脂肪酸、蜡质、类脂物和色素)常用作衡量烟叶品质和香气的重要指标,因此,本文以石油醚提取物质量分数为指标,优化芽孢杆菌 ZZ-8 发酵广西河池地区 C4F 烟叶的条件<sup>[14-15]</sup>。

1) 接种量: 取 50 g 烟叶,分别喷洒 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL 和 5 mL 菌悬液在烟叶上,设置相对湿度为 50%,在 28  $^{\circ}\text{C}$  条件下发酵 36 h,发酵结束后测定石油醚提取物质量分数,每个测试组重复 3 次,取平均值,并进行显著性分析。

2) 发酵温度: 取 50 g 烟叶,将 2 mL 菌悬液均匀喷洒在烟叶上,设置相对湿度为 50%,分别在 20  $^{\circ}\text{C}$ 、22  $^{\circ}\text{C}$ 、24  $^{\circ}\text{C}$ 、26  $^{\circ}\text{C}$ 、28  $^{\circ}\text{C}$ 、30  $^{\circ}\text{C}$ 、32  $^{\circ}\text{C}$  和 34  $^{\circ}\text{C}$  条件下发酵 36 h,发酵结束后测定石油醚提取物质量分数,每个测试组重复 3 次,取平均值,并进行显著性分析。

3) 发酵时间: 取 50 g 烟叶,将 2 mL 菌悬液均匀喷洒在烟叶上,设置相对湿度为 50%,在 28  $^{\circ}\text{C}$  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,每个测试组重复 3 次,取平均值,并进行显著性分析。

4) 相对湿度: 取 50 g 烟叶,将 2 mL 菌悬液均匀喷洒在烟叶上,分别设置相对湿度为 30%、40%、50%、60% 和 70%,在 28  $^{\circ}\text{C}$  条件下发酵 36 h,发酵结束后测定石油醚提取物质量分数,每个测试组重复 3 次,取平均值,并进行显著性分析。

**1.2.3 响应面试验** 在单因素试验的基础上,采用 Box-Behnken 中心设计方法设计响应面试验,以石

油醚提取物质量分数( $Y$ )为考查指标,以接种量( $A$ )、发酵温度( $B$ )、发酵时间( $C$ )及相对湿度( $D$ )为自变量,确定菌株发酵最佳条件。

采用 Excel 2016 对实验数据进行统计分析,利用 SPSS 17.0 进行显著性分析,利用 Design-Expert 10.0 对响应面试验设计方案和结果进行分析<sup>[16]</sup>。

**1.2.4 卷烟样品制备** 取 50 g 烟叶,以最优条件进行固态发酵,作为实验组;用等量的无菌水替代菌悬液,均匀喷洒在 50 g 烟叶上,以同样的条件进行发酵,作为对照组。发酵后分别测定烟叶的常规化学成分、致香成分,并将烟叶制成卷烟后进行感官评吸,以明确烟叶固态发酵效果。

**1.2.5 常规化学成分检测** 烟叶中常规化学成分烟碱、氮、还原性糖、淀粉、钾和氯等的含量分别参照烟草行业标准<sup>[17-22]</sup>进行测定。

**1.2.6 致香成分提取及分析** 用天平称取 30 g 过 40 目分样筛的烟末置于 1000 mL 圆底烧瓶中,加入 100 g 无水硫酸钠和 400 mL 纯净水,将其振荡摇匀后放入同时蒸馏萃取装置于 60 °C 水浴加热,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,得到中性的萃取液,再加入一定量的无水硫酸钠进行冷藏干燥,静置过夜后蒸馏浓缩样品至 1 mL 左右,用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)进行定量分析。烟叶致香成分的化学指标均重复测定 3 次,计算其平均值和标准差。

GC 分析条件:HP-5 MS 毛细管柱(60 m × 250 μm × 0.25 μm);进样口温度为 240 °C;载气为 99.999% 高纯度氦气;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:50 °C(保持 4 min),以 3 °C/min 升温到 70 °C(保持 5 min),再以 2 °C/min 升温到 100 °C(保持 17 min),然后以 2 °C/min 升温到 120 °C(保持 10 min),最后以 6 °C/min 升温到 280 °C。

MS 分析条件:传输线温度 280 °C;离子源温度 280 °C;四级杆温度 150 °C;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 35~500 amu。

**1.2.7 卷烟感官评吸方法** 邀请 13 位评吸者,每

位评吸者在上午的同一时间段分别对卷烟进行评吸,每次抽吸 6 支卷烟,对每种卷烟必须进行 3 次评吸,分别从卷烟的香气质、香气量、浓度、刺激性、杂气、劲头、余味 7 项指标进行打分。感官评吸参照文献[23]进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟叶固态发酵条件优化结果

**2.1.1 单因素试验结果** 接种量、发酵温度、发酵时间、相对湿度对石油醚提取物质量分数的影响如图 1 所示。由图 1a)可知,石油醚提取物质量分数随着芽孢杆菌接种量增加而升高,当接种量为 3 mL 时,石油醚提取物质量分数达到最大值 8.3%,显著高于其他接种量( $P < 0.05$ );之后随着接种量增加呈下降趋势。微生物接种量超过一定值会达到饱和状态,石油醚提取物的质量分数不再随着菌接种量增加明显增加,可能是因为菌种接种量过多,影响菌种生长代谢,进而降低相应产物量,因此最佳接种量为 3 mL。由图 1b)可知,发酵温度 28 °C,石油醚提取物质量分数最高,达到 8.0%;随着温度进一步提高,石油醚提取物质量分数开始下降,可能是温度过高抑制了芽孢杆菌的生长和代谢,因此最佳发酵温度为 28 °C。由图 1c)可知,在前 36 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 36 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下降。发酵时间越长,对烟叶外观和品质的影响越大,应控制适当的发酵时间,最佳发酵时间为 36 h。由图 1d)可知,在相对湿度为 60%时,石油醚提取物的质量分数达到最大,低于 60%时,随着相对湿度的增加,石油醚提取物的质量分数逐渐上升,但在超过 60%之后其质量分数呈下降趋势。这是由于发酵烟叶相对湿度低时,会影响酶的活性和芽孢杆菌的生长,随着相对湿度的增加,逐渐达到微生物生长的最佳值;但当烟叶相对湿度过高时,烟叶易结块,影响其散热,有可能产生霉变,不利于芽孢杆菌的生长,影响其代谢,因此烟叶的相对湿度要适量,最佳的发酵相对湿度为 60%。

**2.1.2 响应面试验优化结果** 响应面试验设计与

结果如表 1 所示。利用 Design-Expert 10.0 对各因素进行多元回归拟合,得到回归方程:

$$Y = -169.31 + 11.63A + 9.22B + 0.50C + 0.72D - 0.075AB - 0.023AC + 0.015AD - 1.042 \times 10^{-3}BC - 7.5 \times 10^{-3}BD + 4.17 \times 10^{-4}CD - 1.56A^2 - 0.15B^2 - 5.856 \times 10^{-3}C^2 - 4.683 \times 10^{-3}D^2$$

回归模型方差分析结果如表 2 所示。由表 2 可知,该模型的决定系数  $R^2 = 0.969$ ,说明该方程与实际情况拟合良好,能够准确反映石油醚提取物质量分数与接种量、发酵温度、发酵时间、相对湿度的关系。失拟项  $P = 2.2766$ ,差异不显著,表明建立的二次多元回归模型能运用于烟叶石油醚提取物质量分

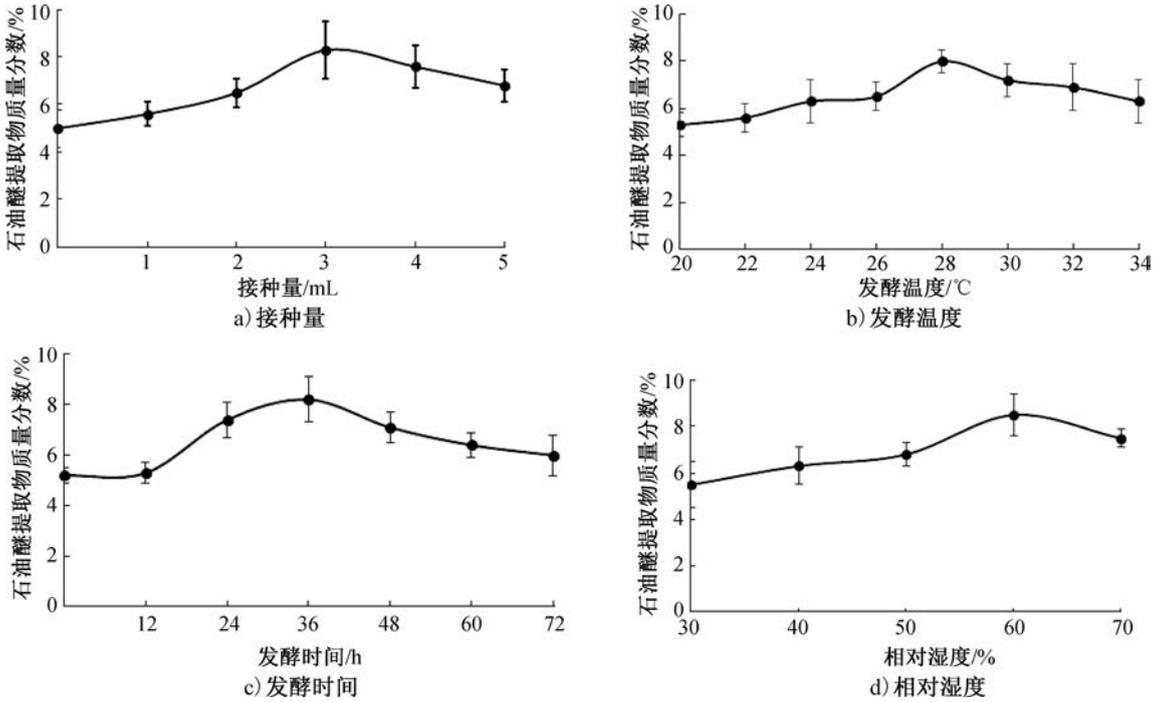


图 1 接种量、发酵温度、发酵时间、相对湿度对石油醚提取物质量分数的影响  
Fig. 1 Effects of inoculation amount, fermentation temperature, fermentation time and relative humidity on the mass fraction of petroleum ether extract

表 1 响应面实验设计与结果

Table 1 Design and results of response surface experiment

实验号	A/mL	B/°C	C/h	D/%	石油醚提取物质量分数/%	实验号	A/mL	B/°C	C/h	D/%	石油醚提取物质量分数/%
1	4	28	48	60	6.8	16	3	28	24	70	7.7
2	2	30	36	60	6.7	17	2	28	48	60	6.5
3	3	28	36	60	9.1	18	2	28	36	50	7.0
4	3	28	36	60	9.0	19	3	28	48	70	7.8
5	3	26	24	60	7.4	20	3	28	24	50	7.5
6	3	30	36	70	7.7	21	4	28	36	70	7.2
7	2	26	36	60	6.1	22	3	26	36	70	8.0
8	4	28	36	50	6.8	23	2	28	24	60	5.6
9	3	26	36	50	7.6	24	3	28	36	60	8.8
10	4	26	36	60	7.1	25	3	30	48	60	7.6
11	2	28	36	70	6.8	26	3	30	24	60	7.4
12	3	30	36	50	7.9	27	3	28	36	60	9.0
13	3	28	48	50	7.4	28	4	28	24	60	7.0
14	3	28	36	60	8.7	29	4	30	36	60	7.1
15	3	26	48	60	7.7						

数的预测。该回归模型达极显著水平,模型中的A、A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup>和D<sup>2</sup>对响应值影响极显著,表明各因素与响应值不是简单的线性关系,二次项与交互项均对结果影响较大。

表2 回归模型方差分析结果

Table 2 Variance analysis of regression model

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	19.810 0	14	1.420 0	31.59	<0.000 1**
A	0.910 0	1	0.910 0	20.26	0.000 5**
B	0.021 0	1	0.021 0	0.47	0.506 4
C	0.120 0	1	0.120 0	2.68	0.124 0
D	0.083 0	1	0.083 0	1.86	0.194 1
AB	0.090 0	1	0.090 0	2.01	0.178 2
AC	0.300 0	1	0.300 0	6.75	0.021 0*
AD	0.090 0	1	0.090 0	2.01	0.178 2
BC	0.002 5	1	0.002 5	0.06	0.816 7
BD	0.090 0	1	0.090 0	2.01	0.178 2
CD	0.001 0	1	0.010 0	0.22	0.643 9
A <sup>2</sup>	15.700 0	1	15.700 0	350.49	<0.000 1**
B <sup>2</sup>	2.380 0	1	2.380 0	53.14	<0.000 1**
C <sup>2</sup>	4.610 0	1	4.610 0	102.98	<0.000 1**
D <sup>2</sup>	1.420 0	1	1.420 0	31.76	<0.000 1**
残差	0.630 0	14	0.045 0		
失拟项	0.520 0	10	0.052 0	1.92	2.276 6
纯误差	0.110 0	4	0.027 0		
总误差	20.440 0	28			

注: \*表示影响显著(P<0.05), \*\*表示影响极显著(P<0.01)。

各因素交互作用对石油醚提取物质量分数影响的响应曲面和等高线分别如图2、图3所示。由图2—3可知,接种量与发酵温度、接种量与相对湿度、发酵温度与发酵时间、发酵温度与相对湿度、发酵时间与相对湿度的交互作用较弱,接种量与发酵时间的交互作用显著;根据曲面陡峭程度及等高线密集程度,可以判断出各因素对石油醚提取物质量分数影响程度的排序为A>C>D>B。该结果与表2所示的回归模型方差分析结果一致。

通过响应面分析预测最佳发酵条件为接种量3 mL、发酵温度28.02℃、发酵时间36.58 h和相对湿度为61.04%,在此条件下石油醚提取物质量分数为8.94%。为便于实际操作,将发酵条件修正为:接种量3 mL、发酵温度28℃、发酵时间36 h和相对湿度为60%,在该条件下进行验证实验,石油醚提取物质量分数为9.01%,与理论预测值接近。

### 2.2 烟叶固态发酵效果分析结果

2.2.1 常规化学成分分析 发酵后烟叶常规化学成分质量分数如表3所示。由表3可知,芽孢杆菌发酵处理后烟叶总糖质量分数由23.10%降低到22.20%,还原糖质量分数由22.19%提高到22.40%,

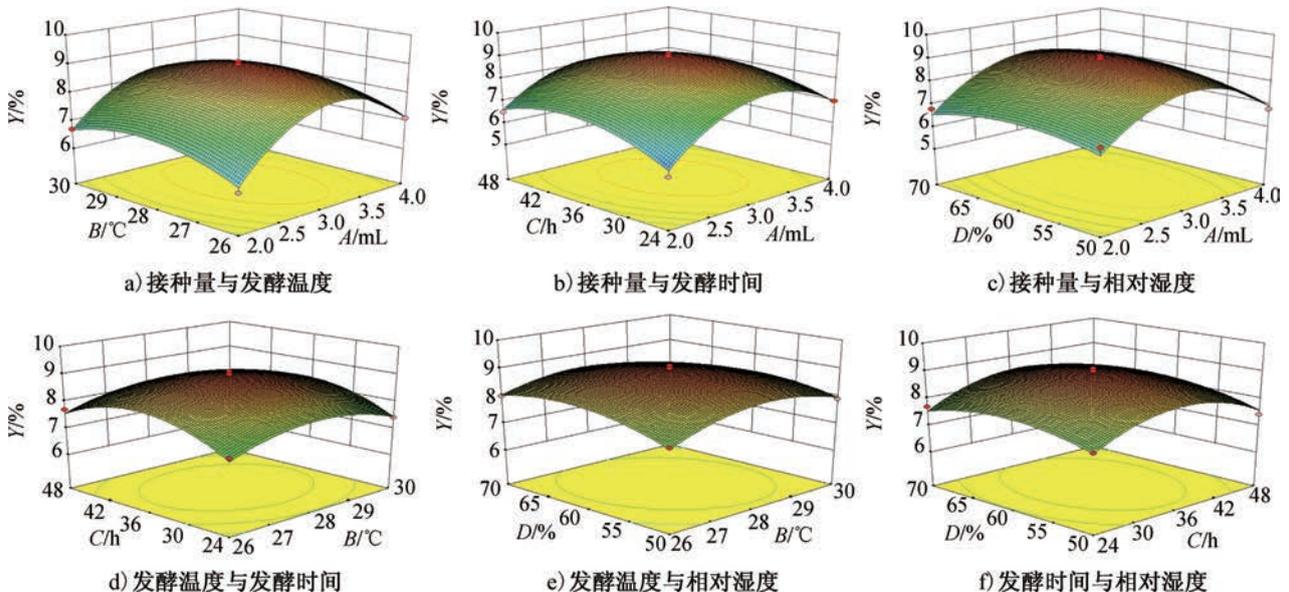


图2 各因素交互作用对石油醚提取物质量分数影响的响应曲面图

Fig. 2 Response surface diagram of the interaction of various factors on the mass fraction of petroleum ether extract

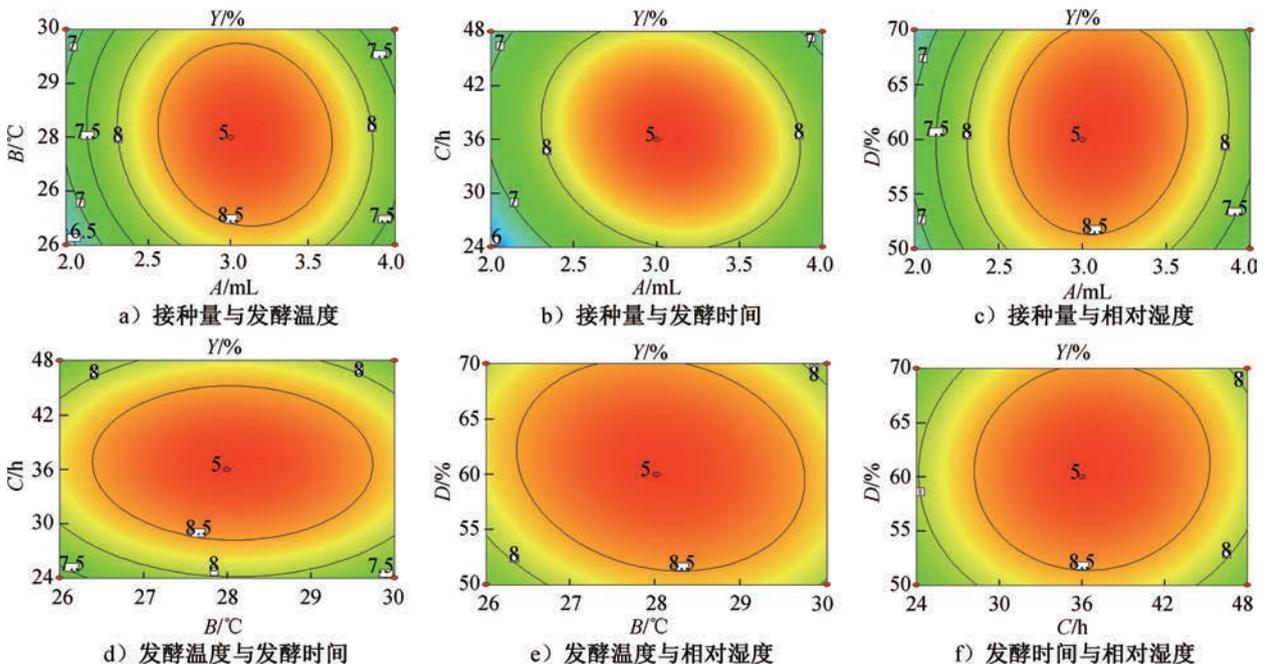


图3 各因素交互作用对石油醚提取物质量分数影响的等高线

Fig. 3 Contour line of the influence of the interaction of various factors on the mass fraction of petroleum ether extract

表3 发酵后烟叶常规化学成分质量分数

Table 3 Mass fraction Routine chemical components in fermented tobacco leaves

处理	总糖/%	还原糖/%	烟碱/%	钾/%	氯/%	钾氯比	糖碱比
对照组	23.10	22.19	2.25	2.01	0.60	3.35	10.23
实验组	22.20	22.40	2.35	1.95	0.69	2.83	9.45

糖碱比由 10.23 降低至 9.45。这可能是因为发酵过程中芽孢杆菌生长消耗总糖,同时由于自身代谢生成少量还原糖;发酵后烟叶的钾氯比降低,可能会引起烟叶的燃烧性降低。

**2.2.2 致香成分分析** 烟叶致香成分中羰基化合物(酮类)和类脂类对烟叶品质具有重要作用,其中重要香味成分包括:巨豆三烯酮、大马酮、茄酮、二氢大马酮、香叶基丙酮、二氢猕猴桃内酯、糠醇、糠醛、苯乙醛、二氢氧异氟尔酮、 $\beta$ -紫罗兰酮、金合欢醇、 $\beta$ -环柠檬醛等。

发酵后烟叶中致香成分含量如表 4 所示。由表 4 可知,经芽孢杆菌发酵后的烟叶致香成分总含量由 170.444  $\mu\text{g/g}$  提高到 186.267  $\mu\text{g/g}$ ,提高 9.0%。其中大马酮、茄酮、巨豆三烯酮、二氢大马酮、香叶基丙酮、二氢猕猴桃内酯等香味成分含量的变化较大,巨豆三烯酮和茄酮是烟叶香气的重要组成部分,能显著增强烟香、改善吸味、调和烟

气,并减少刺激感<sup>[24]</sup>;大马酮、二氢大马酮、香叶基丙酮和二氢猕猴桃内酯是烟叶香气前体物类胡萝卜素的裂解物,是增加烟香和清新香气的主要成分<sup>[3]</sup>。新检出的苯甲醛和 $\beta$ -环柠檬醛是 2 种醛类物质, $\beta$ -环柠檬醛具有甜香,可以增加烟气浓度和减少烟气刺激性,而苯甲醛具有独特甜味,具有醇和烟气的作用<sup>[24]</sup>。

蒿洪欣等<sup>[25]</sup>报道了芽孢杆菌具有降解类胡萝卜素物质的活性,提示了芽孢杆菌具有降解类胡萝卜素物质的代谢途径。本文所使用的菌株 ZZ-8 也属于芽孢杆菌,并且是从以类胡萝卜素( $\beta$ -胡萝卜素和叶黄素)为唯一碳源的筛选培养基中获得的,初步分离得到降解 $\beta$ -胡萝卜素和叶黄素相关酶类,基于以上结果初步推测菌株 ZZ-8 自身能够产生类胡萝卜素降解酶,进而在发酵过程中可以将类胡萝卜素物质转化为大马酮、二氢大马酮、香叶基丙酮、二氢猕猴桃内酯等致香成分。

表4 发酵后烟叶中致香成分含量  
Table 4 Content of aroma components in fermented tobacco leaves

类型	致香成分名称	含量/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )		类型	致香成分名称	含量/( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	
		对照组	实验组			对照组	实验组
酯类和 内酯	亚麻酸甲酯	3.291	3.814	羰基类	$\beta$ -环柠檬醛	—	0.526
	乙酸苜酯	0.196	0.201		茄酮	9.746	11.983
	苯乙酸甲酯	0.038	0.035		巨豆三烯酮	13.686	14.980
	乙酸苯乙酯	0.085	0.095		2-环戊烯-1,4-二酮	1.541	1.412
	二氢猕猴桃内酯	3.109	4.196		$\alpha$ -香茅醛	0.310	0.322
	视黄醇乙酸酯	0.434	0.434		香叶基丙酮	1.310	1.486
	肉豆蔻酸甲酯	0.150	0.156		大马酮	1.111	1.625
	甲基十七碳-5,8,11-三炔酸酯	0.051	0.063		2,6,6-三甲基-2-环己烯-1,4-二酮	0.385	0.384
	棕榈酸乙酯	0.608	0.523		3-羟基- $\beta$ -大马酮	1.776	1.546
	棕榈酸甲酯	2.611	2.914		二氢大马酮	5.012	6.153
	邻苯二甲酸二丁酯	0.463	0.487		2,3-二氢-2,2,6-三甲基苯甲醛	0.263	0.261
	桉-5.11(13)8.12二烯内酯	2.121	2.070		2,2,6-三甲基-1,4-二酮	0.221	0.221
	14-甲基十六烷酸甲酯	0.467	0.485		1,3,7,7-四甲基-2-氧杂双环[4.4.0]-5-癸烯-9-酮	1.358	1.430
	烃类	双戊烯	0.138		0.158	视黄醛	0.317
$\alpha$ -柏木烯		0.176	0.205	糠醛	14.304	14.376	
罗汉柏烯		0.426	0.433	苯乙酮	0.200	0.227	
十四烷		0.066	0.056	$\alpha$ -香附酮	0.449	0.435	
别香枝烯		0.228	0.239	苯甲醛	—	0.746	
西松烯		0.290	0.300	4-(2,4,4-三甲基环己-1,5-二烯基)-丁-3-烯-2-酮	3.208	3.541	
2,6,10-三甲基十二烷		0.070	0.067	5-甲基呋喃醛	0.992	0.990	
苯乙烯		1.983	1.841	甲基庚烯酮	0.178	0.198	
1,4,6-三甲基-5,6-二氢化萘		0.255	0.282	反式-2,4-庚二烯醛	0.072	0.089	
1,2,3,4-四氢-1,1,6-三甲基萘		1.709	1.780	苯乙醛	3.767	3.698	
醇类	糠醇	2.366	2.839	2,5,5,8a-四甲基-2,3,4,4a,6,8-六氢色烯-7-酮	0.548	0.708	
	苜醇	8.009	8.095	3-(2,6,6-三甲基-1-环己烯-1-基)-2-丙烯醛	0.672	0.723	
	5-甲基-2-呋喃甲醇	0.518	0.406	3,5,5-三甲基-4-(3-氧代丁基)环己-2-烯-1-酮	0.246	0.218	
	芳樟醇	0.596	0.638	对甲基苯甲醛	0.097	0.085	
	苯乙醇	3.960	3.812	壬醛	0.180	0.200	
	$\alpha$ -松油醇	0.180	0.197	3,4-脱氢- $\beta$ -紫罗兰酮	0.461	0.508	
	视黄醇	12.505	13.035	反式- $\beta$ -紫罗兰酮	0.774	0.822	
	2E,6E,11Z)-3,7,13-三甲基-10-(2-丙基)-2,6,11-环十四碳三烯-1,13-二醇	39.076	42.832	2,3-二甲基-2-(3-氧代丁基)-环己酮	1.177	1.189	
	2,5,8-三甲基-1,2,3,4-四氢萘-1-醇	3.507	3.764	2-甲基间苯二酚	0.970	0.779	
	3-氧代-紫罗兰醇	1.028	0.773	2,4-二叔丁基苯酚	0.450	0.487	
杂环类	植醇	11.544	13.556				
	2-乙酰基呋喃	0.614	0.613				
	2-乙酰基吡咯	1.542	1.975				
	2,3-二氢-2-甲氧苯并呋喃	0.253	0.268				

注:—表示未检测到。

**2.2.3 卷烟感官评吸结果** 卷烟感官评吸结果如表5所示。由表5可知,与对照组相比,经菌株发酵后的烟叶香气提高,香气饱满度增加,刺激性和杂

气减少,烟气细腻柔和度得到改善,卷烟余味舒适度提高,评吸分数达到44.6分,比对照组增加1.0分,在一定程度上改善了烟叶的吸食品质。

表 5 卷烟感官评吸结果

Table 5 Cigarette sensory evaluation results 分

样品	香气质	香气量	浓度	刺激性	杂气	劲头	余味	总分
对照组	7.0	6.2	6.0	6.6	5.8	6.2	5.8	43.6
实验组	7.2	6.4	6.0	6.8	6.0	6.2	6.0	44.6

### 3 结论

本研究以广西河池地区 C4F 烟叶为研究对象,利用芽孢杆菌 ZZ-8 对其进行固态发酵处理,通过单因素试验和响应面试验获得最优发酵条件为:接种量为 3 mL、发酵温度为 28 ℃、发酵时间为 36 h、相对湿度为 60%。在该条件下发酵,烟叶的石油醚提取物质量分数最高,烟叶总糖质量分数由 23.10% 降低至 22.20%,还原糖质量分数由 22.19% 提高至 22.40%,糖碱比由 10.23 降低至 9.45,产生了苯甲醛和  $\beta$ -环柠檬醛 2 种新物质,致香成分总含量由 170.444  $\mu\text{g/g}$  提高到 186.267  $\mu\text{g/g}$ 。经感官评吸发现,发酵后烟叶香气质有所增加,刺激性和杂气均降低,烟气细腻柔和,余味更舒适。本文建立的芽孢杆菌固态发酵新技术,可以较好地解决广西河池 C4F 烟叶存在的杂气重、吸味差等问题,提升其利用率。同时在研究中发现发酵后烟叶大马酮、茄酮、巨豆三烯酮、二氢大马酮、香叶基丙酮和二氢猕猴桃内酯等香味物质含量有一定程度的提高,推测芽孢杆菌 ZZ-8 发酵烟叶时能够产生类胡萝卜素代谢酶类以降解  $\beta$ -胡萝卜素和叶黄素,相关降解酶基因克隆和降解机理将是进一步的研究方向。本文的研究成果对阐明烟叶固态发酵过程中重要香味物质动态变化规律和致香机理具有一定的参考价值。

### 参考文献:

- [1] 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]. 咸阳:西北农林科技大学,2012.
- [2] 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):52-58.
- [3] 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.
- [4] DI GIACOMO M, PAOLINO M, SILVESTRO D, et al. Microbial community structure and dynamics of dark fire-cured tobacco fermentation[J]. Applied Environmental Microbiology, 2007, 73(3):825-837.
- [5] 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.
- [6] 郑小嘎. 利用真菌处理烟叶诱香增质的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2003.
- [7] 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):200-204.
- [8] 黄静文,段焰青,者为,等. 短小芽孢杆菌改善烟叶品质的研究[J]. 烟草科技,2010(8):61-64.
- [9] 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):862-866.
- [10] 余玉莎,孙媛,李祖红,等. 米根霉发酵对烟叶常规成分及主要致香成分的影响[J]. 云南农业大学学报(自然科学),2017,32(2):379-385.
- [11] 陈兴,张天栋,党立志,等. 利用西姆芽孢杆菌改善烟叶品质的研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学),2016,31(2):322-327.
- [12] 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):200-204.
- [13] 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):52-58.
- [14] 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]. 中国烟草科学,2010, 31(1):41-43.
- [15] 祁林,陈伟,王政,等. 浓香型烟叶不同分切区位石油醚提取物的含量[J]. 烟草科技,2014(1):53-55,76.

- [16] GUO J, WEI J, HUANG F Y, et al. Optimization of microcystin biodegradation by bacterial community YFMCD4 using response surface method [J]. *Chemosphere*, 2021, 274: 129897.
- [17] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 总植物碱的测定 连续流动法: YC/T 160—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 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.
- [19] 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—2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [20] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 淀粉的测定 连续流动法: YC/T 216—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 感官评价方法: YC/T 138—1998[S]. 北京: 中国标准出版社, 1998.
- [24] 代丽, 黄永成, 宫长荣, 等. 密集式烘烤条件下不同变黄湿度对烤后烟叶致香物质的影响 [J]. *华北农业学报*, 2008, 23(6): 148-152.
- [25] 嵩洪欣, 许园园, 刘冬, 等. 降解类胡萝卜素产香细菌的筛选及鉴定 [J]. *食品科学*, 2014, 35(9): 152-156.

## Study on improving the quality of Hechi C4F tobacco leaves in Guangxi by using the solid-state fermentation technology with *Bacillus* sp.

XUE Yun<sup>1</sup>, NING Zhenxing<sup>1</sup>, SU Zan<sup>1</sup>, LIU Qibin<sup>1</sup>, WANG Min<sup>2</sup>, MAO Duobin<sup>2</sup>, LONG Zhangde<sup>1</sup>, WEI Tao<sup>2</sup>

1. Technology Center, China Tobacco Guangxi Industrial Co., Ltd., Nanning 530004, China;

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

**Abstract:** C4F tobacco leaves in Hechi area, Guangxi were treated by solid-state fermentation with *Bacillus* sp. ZZ-8. Single factor test and response surface methodology experiment were used to obtain the best processing conditions of Guangxi tobacco leaves treated by *Bacillus* sp. ZZ-8. The smoking quality of treated tobacco leaves was evaluated by analyzing the content changes of conventional chemical components and important aroma components, combined with sensory evaluation technology. Research results demonstrated that the optimum extracting condition was as follow: inoculum 3 mL, fermentation temperature 28 °C, fermentation time 36 h, and tobacco leaf relative humidity 60%. Under this condition, the highest content of petroleum ether extract was 9.01%. The total sugar content of tobacco leaves decreased from 23.10% to 22.20%, the reducing sugar content increased from 22.19% to 22.40%, and the sugar alkali ratio decreased from 10.23 to 9.45. Benzaldehyde and  $\beta$ -cyclocitral were produced in tobacco leaves after fermentation, the overall content of aroma components in C4F tobacco increased from 170.444  $\mu\text{g/g}$  to 186.267  $\mu\text{g/g}$  in which the content of aroma substances such as damascene, solanone, megastigmatrienone, dihydrodamascone, geranyl acetone and dihydroactinidide changed greatly. After sensory evaluation, the aroma quality of treated tobacco leaves increased, the irritation and miscellaneous gas decreased, the flue gas was fine and soft, the aftertaste was comfortable, and the smoking quality was improved.

**Key words:** C4F tobacco leaves; *Bacillus* sp. ZZ-8; conventional chemical components; aroma components; solid-state fermentation