



宋丽丽, 苏飘, 章钰璟, 等. 产香酵母的分离、鉴定及其在低次烟叶发酵中的应用[J]. 轻工学报, 2025, 40(4): 77-85.
SONG L L, SU P, ZHANG Y J, et al. Isolation and identification of an aroma-producing yeast strain and its application in fermentation of low-grade tobacco leaves[J]. Journal of Light Industry, 2025, 40(4): 77-85.
DOI: 10.12187/2025.04.009

产香酵母的分离、鉴定及其在低次烟叶发酵中的应用

宋丽丽, 苏飘, 章钰璟, 魏涛

郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001

摘要: 从高温大曲中筛选产香微生物, 对其进行形态学及分子生物学鉴定, 并研究其生长特性; 再以低次烟叶为发酵对象, 研究发酵前后香气成分的变化, 并进行卷烟加香评价。结果表明: 从高温大曲中筛选到一株产香能力强的菌株 JQ-3, 经鉴定为杰丁塞伯林德纳氏酵母 (*Cyberlindnera jadinii*), 在培养温度为 30 ℃, 初始 pH 值为 5, 摇床转速为 180 r/min 的条件下进行培养, 菌体数量最多。以低次烟叶为底物发酵 24 h 后, 香气成分的种类由 26 种增加至 43 种, 以醇类、酮类和酯类为主, 分别是对照组的 12.75 倍、2.25 倍和 4.29 倍, 其中苯乙醇、茄酮、巨豆三烯酮、二氢猕猴桃内酯等香气成分的含量显著提升。与对照组相比, 添加低次烟叶发酵液提取物后, 卷烟香气质、香气量均有所提高, 香气更饱满且协调性增强, 吸食品质提升。

关键词: 产香酵母; 鉴定; 低次烟叶; 香气成分; 发酵

中图分类号: TS41 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2025)04-0077-09

0 引言

烟草风味主要由挥发性和半挥发性的中性香气成分决定, 包括醛类、酮类、醇类、酯类(内酯类)和烯炔^[1-2]。微生物发酵是改善烟草风味的重要途径之一, 具有安全、有效、环保等特点^[3], 不仅可以调节烟草内部的化学成分, 促进蛋白质、淀粉、纤维素等大分子物质降解, 增加醇类、酮类、酯类等芳香物质含量^[4], 还可以降解烟草中的生物碱、木质素等物质, 改善烟草质量, 显著降低卷烟的杂气和刺激性^[5]。此外, 蛋白质降解产生的氨基酸及淀粉、纤维素等降解产生的小分子碳水化合物在烟草发

酵过程中会发生美拉德反应, 而该反应是烟草增香的重要环节, 对烟草的质量和风味均有显著影响^[6]。利用低次烟叶、烟末制备再造烟叶是实现烟草工业原料高效利用的重要途径。为顺应国家烟草专卖局大力发展“中式卷烟”的要求, 基于“定制化烟草原料加工”理念^[7], 利用产香微生物发酵提升低次烟叶工业可用性, 是实现烟草原料高质量发展的重要途径。

酵母菌是一种典型的产香产酯发酵微生物, 在食品发酵及工业生产中得到了广泛的应用。酿酒酵母^[8]、毕赤酵母^[9-10]、汉逊酵母^[11]等酵母菌具有产酶活力高、繁殖能力强、增殖速度快、耐高温等特

收稿日期: 2024-10-31; 修回日期: 2024-11-17; 出版日期: 2025-08-15

基金项目: 河南省重点研发专项项目(241111110400); 河南省科技攻关项目(242102110118); 中国烟草总公司科技项目(110202202026)

作者简介: 宋丽丽(1987—), 河南省信阳市人, 郑州轻工业大学讲师, 博士, 主要研究方向为烟草生物技术。E-mail: sl@zzuli.edu.cn

点,是性能稳定的重要模式微生物^[12-13]。白酒高温大曲中含有种类众多的微生物,且产香类型丰富,是产香菌株的优势来源。近年来,关于利用酵母菌提高烟草品质的研究越来越多^[14-15]。马琛瑜等^[16]利用有机酸协同酿酒酵母发酵上部烟叶后,烟叶的烟碱含量降低,挥发性香气成分含量增加,烟叶品质显著改善。巩效伟等^[8]利用酿酒酵母 KMLY1-2 发酵杨梅汁和葡萄汁后的发酵液制备电子烟香料,可显著提升电子烟果香,降低杂气,提升抽吸品质。

我国是世界上烟草种植面积和产量均较大的国家,在烟草种植和加工生产过程中会产生大量低次烟叶,而低次烟叶存在香气质差、香气量不足、杂气重、刺激性强等特点,难以应用于卷烟配方或仅能用于低档卷烟中。刘洪坤等^[17]以复合生物发酵制剂发酵低次烟叶,可显著提升烟叶中致香成分的含量,显著改善烟叶品质。李萌等^[18]以寇冠散囊菌 GT-1 固态发酵低次烟叶,可增加烟叶香气物质种类和含量,有效提升低次烟叶品质。利用产香微生物发酵低次烟叶,可以实现低次烟叶的高附加值利用。

鉴于高温大曲制作与烟草烘烤环境相似,本研究拟从高温大曲中筛选产香菌株,对其进行形态学、分子生物学鉴定;将该菌株用于发酵低次烟叶,分析发酵前后香气成分变化,并进行卷烟加香评价,以期产香微生物发酵低次烟叶制备烟用香料提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

低次烟叶,河南中烟工业有限责任公司;高温大曲,河南仰韶酒业有限公司。蛋白胨、葡萄糖、酵母浸粉、二氯甲烷、无水乙醇等,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;酵母 DNA 提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;乙酸苯乙酯(色谱级),美国 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 主要仪器与设备

V-5800 型紫外-可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;SW-CJ-1F 型超净工作台,苏州安泰空

气技术有限公司;Agilent 6890A/5975C 型气相色谱-质谱联用(GC-MS)仪,美国安捷伦公司;5810R 型超高速冷冻离心机,德国艾本德有限公司;JSM-7001F 型扫描电子显微镜(SEM),日本 JEOL 有限公司;QYC-2012C 型恒温摇床,上海福玛实验设备有限公司;LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;YS100 型光学显微镜,华粤行仪器有限公司;Regulus-8100 型冷场发射电子显微镜,日立科学仪器有限公司;LHS-50CH 型恒温恒湿箱,上海一恒科学仪器有限公司。

1.3 培养基和缓冲液

YEPA 液体培养基:20 g/L 蛋白胨、20 g/L 葡萄糖、10 g/L 酵母浸粉,121 °C 灭菌 20 min。

YEPA 固体培养基:20 g/L 蛋白胨、20 g/L 葡萄糖、10 g/L 酵母浸粉、20 g/L 琼脂粉,121 °C 灭菌 20 min。

发酵培养基:低次烟叶 50 °C 烘干,粉碎,过 60 目筛,即得烟末。10 g 烟末,蒸馏水 100 mL,121 °C 灭菌 20 min。

PBS 缓冲液(0.01 mol/L):8 g/L NaCl、0.2 g/L KCl、1.44 g/L Na₂HPO₄、0.24 g/L KH₂PO₄,调节 pH 值至 7.4,121 °C 灭菌 20 min。

1.4 实验方法

1.4.1 产香菌株筛选 称取 5 g 高温大曲粉末,加入装有 95 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中,充分振荡摇匀。取适量菌悬液梯度稀释至 10⁻⁴~10⁻⁶,取各梯度稀释液 100 μL,均匀涂布于 YPD 固体培养基平板上,30 °C 培养 24 h。待菌落长出后,挑取单菌落进行划线分离,至无杂菌出现,通过嗅闻选出有明显香气的菌株并编号。

将初筛的产香菌株接入 YPD 液体培养基中,30 °C 培养 24 h 后,接种至发酵培养基中,空白组接入等体积的无菌水,30 °C 培养 48 h 后进行嗅香评价,筛选出产香效果最佳的菌株。

1.4.2 产香菌株鉴定 1) 形态学鉴定。用接种环蘸取一环产香菌液,在 YPD 固体培养基平板上划线后,30 °C 培养 48 h,观察并记录菌落形态,在光学显微镜及电子显微镜下分别观察其细胞形态。

2) 分子生物学鉴定。使用酵母 DNA 提取试剂

盒提取产香菌株 DNA,采用通用引物 NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') 扩增 26S rDNA D1/D2 区域。PCR 扩增条件:95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,57 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,共设置 30 个循环,72 ℃ 最终延伸 10 min,4 ℃ 终止反应。将 PCR 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果在 NCBI(美国国家生物技术信息中心)网站上进行同源序列比对;下载同源性较高的序列,在 MEGA11 软件上采用 neighbor-joining 法构建系统发育树。

1.4.3 产香菌株生长特性测定 将产香菌株接种于 YPD 液体培养基中,30 ℃、150 r/min 条件下培养 12 h,获得种子液,备用。以 1% 的接种量将种子液接种于 YPD 液体培养基中,28 ℃、150 r/min 条件下培养,每隔 2 h 取样测定 OD_{600} ,绘制该菌株生长曲线。

分别设置培养温度(24 ℃、26 ℃、28 ℃、30 ℃、32 ℃、34 ℃、36 ℃和 40 ℃)、初始 pH 值(2、3、4、5、6、7、8 和 9)和摇床转速(120 r/min、140 r/min、160 r/min、180 r/min、200 r/min、220 r/min 和 240 r/min) 为自变量,培养 24 h,以 OD_{600} 为评价指标,分别考查 3 个自变量对产香菌株生长的影响。

1.4.4 发酵液香气成分测定 将产香菌株种子液以 10% 接种量接种于发酵培养基中,对照组接入等体积的无菌水,于 30 ℃、180 r/min 的摇床中振荡培养 2~3 d。取 100 mL 发酵液加入 1000 mL 圆底烧瓶中,再加入 25 g NaCl 和 400 mL 蒸馏水,装置另一边的茄形瓶中加入 60 mL 二氯甲烷,同时蒸馏萃取 2.5 h。向萃取液中加入 50 μ L 乙酸苯乙酯(内标,0.68 mg/mL),再加入适量无水硫酸钠,于 4 ℃ 冰箱除水过夜。将除水后的萃取液置于浓缩瓶中,于 60 ℃ 水浴锅中常压浓缩至 1 mL,过滤膜于色谱瓶中,待测。

GC 条件:Agilent DB-5 MS 毛细管柱(60 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m);载气为 He;流速为 1.0 mL/min;进样量为 1.0 μ L。升温程序为初始温度 40 ℃,以 3 $^{\circ}$ C/min 的升温速度升至 170 ℃,保持 20 min;以 1 $^{\circ}$ C/min 的升温速度升至 200 ℃,保持 10 min;以

4 $^{\circ}$ C/min 的升温速度升至 280 ℃,结束。进样口温度为 280 ℃;分流比为 5:1。

MS 条件:采用 SCAN 模式,离子源为 XTR-EI 源;离子源温度为 230 ℃;传输线温度为 280 ℃;四极杆温度为 150 ℃;电子能量为 70 eV;扫描质量范围(m/z)为 25~650 amu;溶剂延迟时间为 10 min。

利用 NIST 20 标准谱库进行检索,采用内标半定量法进行定量分析,每组样品各 3 个平行,结果取平均值。

1.4.5 感官评价 取适量发酵液,加入等体积的无水乙醇,涡旋混匀后,在-20 ℃ 冰箱放置 48 h,即为低次烟叶发酵液提取物。取 5 μ L 提取物注射于空白卷烟中,以未发酵低次烟叶提取物为对照;将加香卷烟置于 22 ℃、相对湿度 60% 的恒温恒湿箱中平衡 48 h。以空白卷烟为基准,由 9 名专业人员按照《烟草在制品 感官评价方法》(YC/T 415—2011)^[19]对卷烟进行感官评价并打分。

1.5 数据处理

所有实验均重复 3 次,数据结果表示为(平均值 \pm 标准差),通过 Excel 2019 进行数据整理,利用 Origin 2025 作图。

2 结果与讨论

2.1 产香菌株筛选结果分析

从高温大曲中筛选到 11 株菌株,初步嗅闻筛选出 5 株具有明显香气的菌株,再采用嗅香的方式,分别从差异度、香气强弱、留香时间、刺激性 4 个方面进行感官评价并赋分^[26],结果见表 1。由表 1 可知,菌株 JQ-3 和 JQ-8 产香能力均较强,其中菌株 JQ-3 刺激性少,具有明显果香味,香气持久,杂气较轻,综合评分最高。因此,选择菌株 JQ-3 进行后续研究。

表 1 产香菌株的嗅香评价结果
Table 1 Olfactory evaluation results of aroma-producing strains

菌株	差异度	香气	留香时间	刺激性	总分
JQ-1	7	13	8	8	36
JQ-3	10	18	9	7	44
JQ-5	8	12	8	6	34
JQ-8	9	16	9	7	41
JQ-9	9	17	5	7	38

2.2 菌株鉴定结果分析

2.2.1 形态学鉴定 菌株 JQ-3 的菌落及细胞形态如图 1 所示。由图 1 可知,菌落颜色为乳白色,不透明,表面湿润,边缘整齐(见图 1a));光学显微镜下单个菌体为卵圆形,单端出芽繁殖(见图 1b));SEM 下菌体形态均一,单个菌体大小约为 $4\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$ (见图 1c))。菌株 JQ-3 的菌落及细胞形态均符合酵母菌的典型形态特征。

2.2.2 分子生物学鉴定 菌株 JQ-3 的扩增电泳

图及系统发育树如图 2 所示。由图 2a)可知,菌株 JQ-3 26S rDNA 序列 PCR 产物的电泳条带清晰,序列长度约为 600 bp,符合酵母菌 26S rDNA D1/D2 区域大小^[21]。基于菌株 JQ-3 的 26S rDNA 序列,利用 NCBI 网站进行同源序列比对,发现该菌株与塞伯林德纳氏酵母属(*Cyberlindnera*) 同源性在 90% 以上;采用邻接法进行碱基序列比对后,在 MEGA11.0 中进行进化分析并构建系统发育树^[22],如图 2b)所示。由图 2b)可知,菌株 JQ-3 与杰丁塞伯林德纳氏

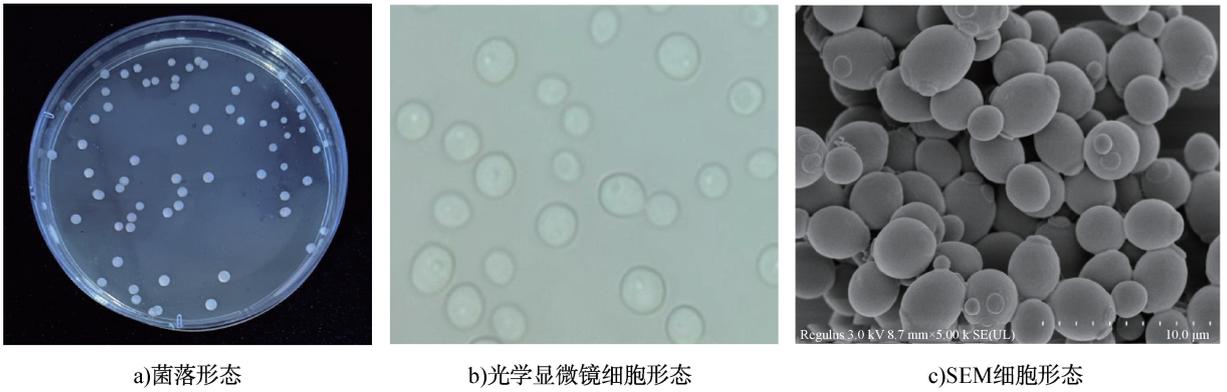


图 1 菌株 JQ-3 的菌落及细胞形态
Fig. 1 Colony and cellular morphology of strain JQ-3

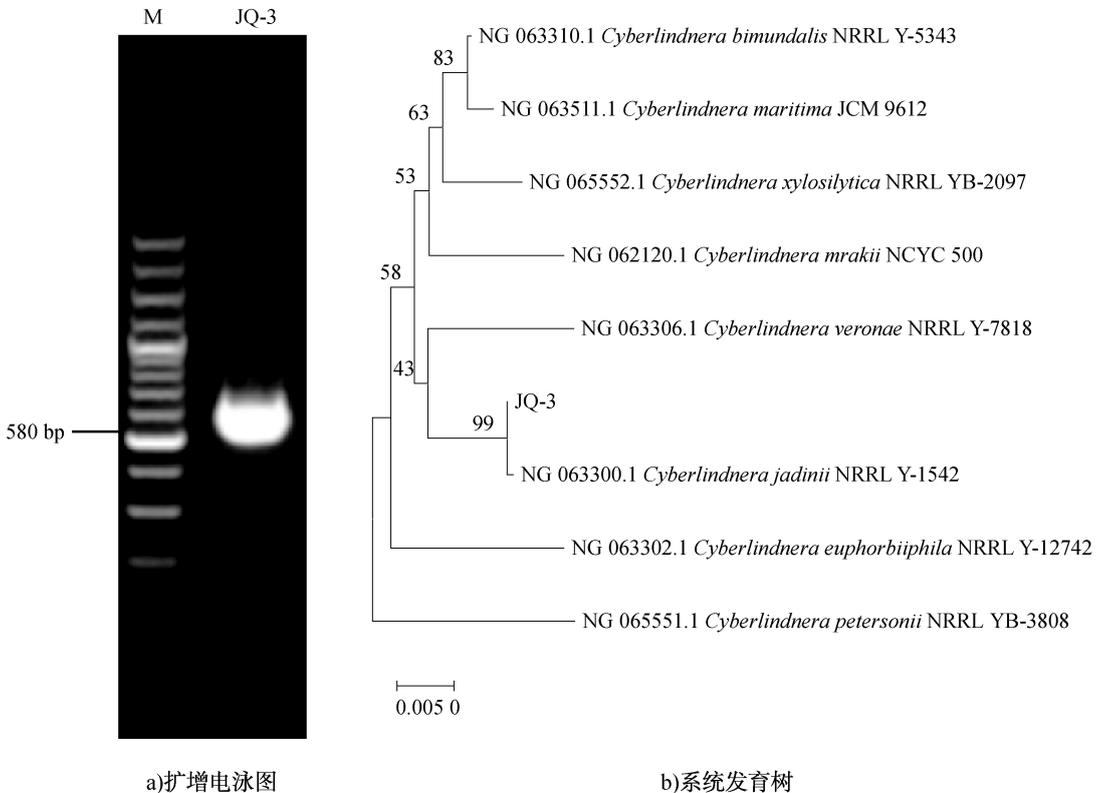


图 2 菌株 JQ-3 的扩增电泳图及系统发育树

Fig. 2 Amplified electrophoretic profile and phylogenetic tree of strain JQ-3

酵母(*Cyberlindnera jadinii*)位于进化树的同一支,亲缘关系最近,因此将菌株 JQ-3 鉴定为杰丁塞伯林德纳氏酵母。该酵母作为 Crabtree-negative 酵母菌株,被美国食品和药品管理局认证为安全菌株,在有氧环境下只会代谢单糖,而不会产生乙醇^[23]。由于其呼吸作用较强,在非乙醇化合物的生物合成中表现出显著不同的转录谱和强大的胞内蛋白质合成能力^[24],常用于生产氨基酸、谷胱甘肽、单细胞蛋白和多种酶类^[25-27]。

2.3 产香菌株生长特性分析

菌株 JQ-3 的生长特性如图 3 所示。由图 3a)可知,菌株 JQ-3 在培养 6 h 后快速增长,进入对数生长期,16 h 后进入稳定期,表明该菌株生长速度较快。由图 3b)可知,当培养温度为 28~32 °C 时,菌体数量较多,最适培养温度为 30 °C,与大多数酵母菌的最适生长温度相一致,且由于该菌株筛选自高温大曲,对高温耐受性较好,40 °C 下依然长势良

好。由图 3c)可知,菌株 JQ-3 适合偏酸性条件,在初始 pH 值为 4~7 时,生长状况较好。然而,当初始 pH 值低于 4 或高于 7 时,菌株 JQ-3 的生长会受到抑制。pH 值作为影响微生物生长的关键因素之一,过低或过高都不利于其生长,因此菌株 JQ-3 的最适初始 pH 值为 5。酵母菌作为兼性厌氧菌,氧气对其生长至关重要。由图 3d)可知,当摇床转速为 180 r/min 时,菌体数量最多;转速过低,溶氧量减少,不利于菌体生长;当摇床转速高于 200 r/min 时,剪切力过大,菌体生长会受到一定程度的抑制。因此选择 180 r/min 为最佳摇床转速。综上,对于菌株 JQ-3,0~6 h 为生长迟滞期,6~16 h 为对数生长期,16 h 后为稳定期;当培养温度为 30 °C,初始 pH 值为 5,摇床转速为 180 r/min 时,菌株 JQ-3 的菌体数量最多。

2.4 低次烟叶发酵产香分析

以低次烟叶为原料,菌株 JQ-3 发酵液中的香气成分见表 2。由表 2 可知,发酵组和对照组共

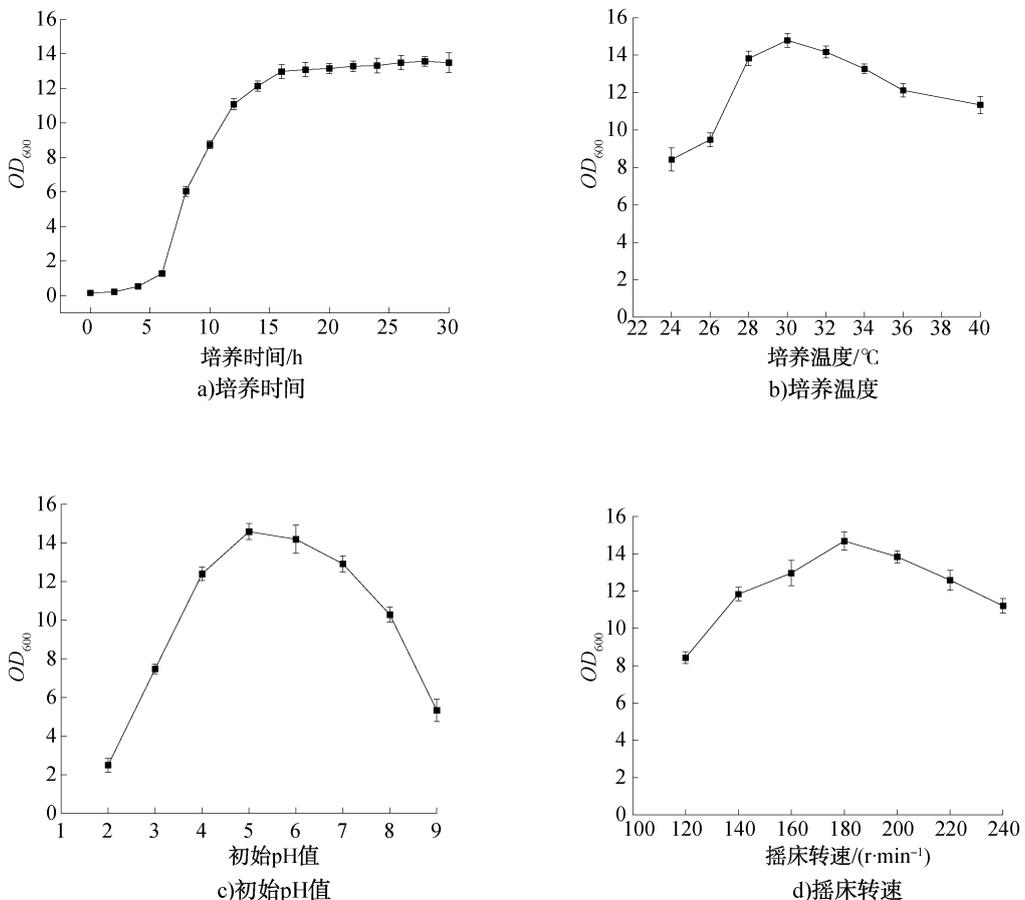


图 3 菌株 JQ-3 的生长特性

Fig. 3 Growth characteristics of strain JQ-3

表2 菌株 JQ-3 发酵液中的香气成分
Table 2 Aroma components in the culture broth of strain JQ-3

类别	成分名称	CAS 号	含量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	
			发酵组	对照组
醇类	苯甲醇	000100-51-6	0.61±0.04	—
	苯乙醇	000060-12-8	31.52±1.43	—
	2,5-呋喃二甲醇	001883-75-6	0.45±0.02	—
	芳樟醇	000078-70-6	52.31±2.47	—
	高香草醇	002380-78-1	1.65±0.11	—
	3-羟基-7,8-二氢- β -紫罗兰醇	172705-13-4	4.30±0.03	—
	1-三十七烷醇	105794-58-9	4.03±0.11	2.93±0.10
	(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	007220-78-2	3.74±0.09	4.70±0.16
	对羟基苯乙醇	000501-94-0	0.22±0.01	—
	植物醇	000150-86-7	0.40±0.02	—
	十四醇	000112-72-1	—	0.15±0.01
	总量		99.23±3.52	7.78±0.48
酮类	呋喃酮	003658-77-3	1.92±0.16	—
	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮	028564-83-2	2.83±0.19	—
	茄尼酮	054868-48-3	2.47±0.30	0.65±0.08
	巨豆三烯酮	013215-88-8	1.35±0.10	0.81±0.05
	3-羟基- β -二氢大马酮	102488-09-5	6.13±0.58	5.72±0.43
	9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮	034318-21-3	8.57±0.83	5.26±0.15
	4-(3-羟基丁基)-3,5,5-三甲基环己-2-烯-1-酮	036151-02-7	2.11±0.16	1.04±0.11
	2-羟基-5-异丙基-2,4,6-环庚三烯-1-酮	000672-76-4	5.03±0.63	—
	大马土酮	023726-93-4	—	0.11±0.01
	2-羟基-5-甲基苯乙酮	001450-72-2	0.72±0.03	—
	3,5-二羟基-2-甲基-4H-吡喃-4-酮	001073-96-7	0.90±0.08	—
	法尼基丙酮	001117-52-8	—	0.63±0.04
	总量		32.03±2.79	14.22±1.25
酚类	2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚	000128-37-0	2.73±0.18	0.65±0.04
	2,4-二叔丁基苯酚	000096-76-4	3.12±0.21	3.14±0.19
	2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)	000119-47-1	0.95±0.04	0.40±0.02
	五甲基苯酚	002819-86-5	0.91±0.07	—
	萸荝亭	000092-61-5	2.83±0.19	—
	总量		10.54±0.11	4.19±0.14
酸类	异戊酸	000503-74-2	0.61±0.04	—
	3-甲基戊酸	000105-43-1	0.47±0.03	—
	硬脂酸	000057-11-4	2.30±0.19	1.41±0.12
	苯乙酸	000103-82-2	1.61±0.17	0.94±0.07
	油酸	000112-80-1	3.50±0.24	—
	癸酸	000334-48-5	—	0.41±0.06
	α -亚麻酸	000463-40-1	—	1.80±0.25
	亚油酸	000060-33-3	—	3.93±0.53
	棕榈酸	000057-10-3	2.10±0.16	1.34±0.12
	总量		10.59±0.82	9.83±0.53
酯类	二氢猕猴桃内酯	017092-92-1	1.93±0.18	0.83±0.05
	植醇乙酸酯	010236-16-5	7.40±0.53	4.00±0.46
	己二酸二辛酯	000103-23-1	5.81±0.48	—
	乙酸十八酯	000822-23-1	6.52±0.49	—
	棕榈酸甲酯	000112-39-0	0.41±0.02	0.32±0.03
	总量		22.07±1.98	5.15±0.49

表2(续)

类别	成分名称	CAS号	含量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	
			发酵组	对照组
醛类	3,4-二甲基苯甲醛	005973-71-7	0.52±0.03	0.62±0.05
	5-(1-哌啶)-2-呋喃甲醛	022868-60-6	12.60±1.84	9.70±1.24
	16-十八醛	056554-87-1	0.13±0.01	—
	14-十六烯醛	330207-53-9	0.25±0.01	—
	5-羟甲基糠醛	000067-47-0	—	0.83±0.07
	总量		13.50±1.35	11.15±1.04
其他	2,3'-联吡啶	000581-50-0	3.31±0.15	—
	芥酸酰胺	000112-84-5	4.73±0.35	1.27±0.13
	2-乙酰基吡咯	001072-83-9	0.24±0.01	—
	总量		8.28±0.75	1.27±0.13

注:—表示未检测到。

检测到50种香气成分,包括醇类、酮类、酚类、酸类、酯类、醛类等。与对照组相比,发酵组香气成分的种类由26种增加至43种,以醇类、酮类和酯类为主,含量分别是对照组的12.75倍、2.25倍和4.29倍,而酸类和醛类物质变化不明显。醇类香气成分中,苯乙醇作为一种具有淡玫瑰香味的脂肪醇,可赋予烟草花香味^[28];芳樟醇具有铃兰香气,发酵组中这2种物质含量分别为31.52 $\mu\text{g}/\text{g}$ 和52.31 $\mu\text{g}/\text{g}$,而对照组中无这2种物质,表明菌株JQ-3发酵可有效增加低次烟叶香气成分的种类和含量,这与巩效伟等^[8]和武士杰等^[9]的研究结果较一致。另外,发酵组中新生成的苯甲醇和植物醇也具有不同的香气特征。

酮类物质中的大马士酮、茄尼酮、巨豆三烯酮等是烟草中的重要香气成分,其含量决定了卷烟的吃味和口感。茄尼酮作为西柏烷类降解产物,具有类似胡萝卜的香味及甘草、茶样芳香^[29],与烟香协调,发酵组中的含量是对照组的3.80倍。发酵组中新增的呋喃酮具有浓郁的水果香味及果酱味,能显著提升烟气的丰富度和层次感。巨豆三烯酮具有烟草香、干果香和辛香底韵,其香气与烟草协调一致,有增强烟香、改善吸味、调和烟气、减少刺激性的作用^[30],可有效改善烟气,其在发酵组中的含量

较对照组提高了66.67%。

酯类物质中的二氢猕猴桃内酯具有猕猴桃样的青香果香,赋予卷烟烟气清甜味,其在发酵组中的含量较对照组增加了132.53%,这可能与类胡萝卜素的降解有关。李萌等^[31]采用混菌发酵的方法发酵烟叶,使二氢猕猴桃内酯含量比对照组增加了147.67%。植醇乙酸酯具有温和果香,其在发酵组中的含量较对照组提升了85.00%,是烟草发酵液水果香味的来源之一。

油酸和棕榈酸具有烟草特有的蜡脂气味,二者在发酵组酸类物质中的占比分别为33.05%和19.83%。其他香气成分中,2-乙酰基吡咯为新增香气成分,它是由美拉德反应产生,具有面包香气,能够降低杂气和刺激性,改善烟草品质^[32-33]。综上,经菌株JQ-3发酵后,烟叶发酵液中的特征香气成分含量明显增加,对丰富烟叶香气具有重要作用,有利于提升低次烟叶整体感官及吸味品质。

2.5 感官评价结果分析

按1.4.5方法,分别从香气质、香气量、浓度、杂气、劲头、余味、刺激性7个方面对卷烟进行感官评价,空白卷烟以6分为基准,感官评价结果见表3。由表3可知,对照组的香气质和香气量不足,与空白卷

表3 感官评价结果

Table 3 Cigarette sensory evaluation results

样品	香气质	香气量	劲头	余味	杂气	刺激性	浓度	总分
空白卷烟	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	42.00
对照组	6.00	6.10	6.20	6.13	6.10	6.00	6.15	42.68
实验组	7.00	6.30	6.50	6.30	6.25	6.30	6.25	44.90

烟相比,总分提升效果不明显。实验组的香气提升,香气量增加,刺激性和杂气降低,余味尚干净,香气更饱满、协调,表明低次烟叶发酵液提取物能改善卷烟的香气成分,降低杂气,提升整体吸食品质。

3 结论

本研究从高温大曲中筛选到具有产香能力的菌株 JQ-3,通过形态学及分子生物学鉴定为杰丁塞伯林德纳氏酵母。该菌株的最适培养温度为 30 ℃、初始 pH 值为 5,摇床转速为 180 r/min,6~16 h 为对数生长期,16 h 后进入稳定期。以低次烟叶为原料,菌株 JQ-3 发酵液中香气成分含量及种类较对照组明显提升,主要的香气成分为苯乙醇、芳樟醇、茄尼酮、巨豆三烯酮、二氢猕猴桃内酯等。将发酵提取物添加于卷烟中能够有效增加卷烟的协调性、香气和香气量,提升卷烟的吸食品质。本研究丰富了生物发酵法对低次烟叶进行提香增质的研究,为提升低次烟叶应用价值提供了思路和方法。后续将对加香后烟叶产品的性能指标、卷烟存储过程中香气成分的实时监控等进行深入研究,以期在低次烟叶多维度开发利用、新型卷烟配方原料开发等方面取得创新性突破。

参考文献:

[1] XIAO G W, DING J Y, SHAO S Z, et al. Revealing alcoholization-related volatile compounds and determining alcoholization indices in tobacco using GC-IMS coupled with chemometrics[J]. *Heliyon*, 2024, 10(15): e35178.

[2] ZHANG L Y, MAI J, SHI J F, et al. Study on tobacco quality improvement and bacterial community succession during microbial co-fermentation[J]. *Industrial Crops and Products*, 2024, 208: 117889.

[3] FAN J H, KONG G H, YAO H, et al. Widely targeted metabolomic analysis reveals that volatile metabolites in cigar tobacco leaves dynamically change during fermentation[J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2023, 35: 101532.

[4] 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.

[5] 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 and Food Chemistry*, 2014, 62(52): 12701-12706.

[6] ARIHARA K, ZHOU L, OHATA M. Chapter five bioactive properties of Maillard reaction products generated from food protein-derived peptides[J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2017, 81: 161-185.

[7] 刘静, 阮谦, 魏勇, 等. 造纸法再造烟叶与天然烟叶部分理化指标的差异[J]. *中南农业科技*, 2024, 45(9): 47-54.

[8] 巩效伟, 刀娅, 赵伟, 等. 产香酵母菌筛选、条件优化及发酵产物在电子烟烟液中的应用[J]. *烟草科技*, 2020, 53(2): 62-71.

[9] 武士杰, 付秋娟, 信琪, 等. 白酒大曲中产香微生物筛选及提升再造烟叶品质研究[J]. *轻工学报*, 2024, 39(4): 89-96, 117.

[10] 闫洪洋, 黄启蒙, 蔡兴华, 等. 产香菌株的分离鉴定及其发酵产物在卷烟加香中的应用[J]. *轻工学报*, 2021, 36(6): 47-54.

[11] 郭林青, 朴永革, 朱春阳, 等. 烟草产香酵母 YG-4 的筛选鉴定及香气成分分析[J]. *轻工学报*, 2019, 34(5): 27-31.

[12] YANG B, LIU S J, ZANG H W, et al. Flavor profile and quality of strawberry wine are improved through sequential fermentation with indigenous non-*Saccharomyces* yeasts and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Food Bioscience*, 2024, 59: 104021.

[13] TAPIA S M, PÉREZ-TORRADO R, ADAM A C, et al. Functional divergence in the proteins encoded by ARO80 from *S. uvarum*, *S. kudriavzevii* and *S. cerevisiae* explain differences in the aroma production during wine fermentation[J]. *Microbial Biotechnology*, 2022, 15(8): 2281-2291.

[14] QIAO L, LIU J, CHENG Y, et al. Microbial community change and quality improve via endophytic colonization of tobacco by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2024, 222: 119637.

[15] YE J, TIAN S, LV L, et al. Production and purification of 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* using tobacco waste extract as a substrate[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2021, 73(6): 800-806.

[16] 马琛瑜, 陈森林, 彭琛, 等. 添加有机酸协同酿酒酵母发酵改善上部烟叶品质研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2022, 37(4): 630-637.

[17] 刘洪坤, 毛文龙, 游敏, 等. 改善低次烟叶品质的生物发酵工艺优化[J]. *中国烟草科学*, 2024, 45(2): 99-107.

[18] 李萌, 曾婷婷, 杨金初, 等. 冠突散囊菌 GT-1 固态发酵对低次烟叶品质的影响[J]. *陕西科技大学学报*, 2024, 42(3): 38-45.

[19] 国家烟草专卖局. 烟草在制品 感官评价方法: YC/T 415—2011[S].

[20] 张鹏, 李炜, 师超, 等. 一株产果香型真菌的筛选、鉴定及在烟草增香中的应用[J]. *中国烟草科学*, 2021, 42

(5):95-101.

- [21] 玉云,尹团章,庞登红,等.茶用荔枝产香菌的筛选与鉴定[J].河南农业科学,2019,48(7):150-154.
- [22] 卢晨曦,张国治,王赵改,等.大蒜产香细菌的筛选及香气成分分析[J].保鲜与加工,2024,24(12):107-115.
- [23] KUNIGO M, BUERTH C, TIELKER D, et al. Heterologous protein secretion by *Candida utilis* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(16):7357-7368.
- [24] YAO Z, GUO Y F, WANG H, et al. A highly efficient transcriptome-based biosynthesis of non-ethanol chemicals in Crabtree negative *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 2023, 16(1):37.
- [25] 赵德辉,马翠柳,吴炎,等.杰丁塞伯林德纳氏酵母对育成期乌苏里貉养分利用及粪便真菌菌群结构的影响[J].中国畜牧兽医,2023,50(8):3123-3132.
- [26] 张荣鑫.多维度改造提升杰丁塞伯林德纳氏酵母蛋白合成与分泌能力[D].长春:长春工业大学,2024.
- [27] GU L S, ZHANG R X, FAN X Q, et al. Development of CRISPR/Cas9-based genome editing tools for polyploid yeast *Cyberlindnera jadinii* and its application in engineering heterologous steroid-producing strains [J]. ACS Synthetic Biology, 2023, 12(10):2947-2960.
- [28] YUN J, CUI C J, ZHANG S H, et al. Use of headspace GC/MS combined with chemometric analysis to identify the geographic origins of black tea [J]. Food Chemistry, 2021, 360:130033.
- [29] 丁静怡,余君,杨春雷,等.酵母发酵烟草花蕾提取物对雪茄烟叶发酵的影响[J].河南农业科学,2024,53(7):168-180.
- [30] 吴彦辉,薛立新,许自成,等.烤烟巨豆三烯酮研究现状与展望[J].中国农业科技导报,2013,15(3):150-156.
- [31] 李萌,王旭东,罗昭标,等.混菌固态发酵低次烟叶工艺优化及挥发性致香成分分析[J].河南农业科学,2022,51(9):171-180.
- [32] 闫铁军,丁宁,王剑,等.雪茄烟马杜罗茄衣化学品品质指数与中性香气物质的关系[J].南方农业学报,2022,53(6):1543-1551.
- [33] XU Q Q, LIU J B, SONG H L, et al. Formation mechanism of volatile and non-volatile compounds in peptide-xylose Maillard reaction [J]. Food Research International, 2013, 54(1):683-690.

Isolation and identification of an aroma-producing yeast strain and its application in fermentation of low-grade tobacco leaves

SONG Lili, SU Piao, ZHANG Yujing, WEI Tao

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

Abstract: Aroma-producing microorganisms were isolated from high-temperature Daqu, followed by morphological observation, molecular biological identification, and growth profile analysis. A highly aroma-producing strain JQ-3 was identified as *Cyberlindnera jadinii*. The optimal growth conditions were 30 °C, initial pH value 5, and shaking speed 180 r/min, under which the maximum cell density was achieved. After 24 h fermentation of low-grade tobacco leaves, the number of aroma components increased from 26 to 43, primarily alcohols, ketones, and esters, with concentrations 12.75-fold, 2.25-fold, and 4.29-fold higher than those in the control group. Key aroma components, including phenyl ethanol, solanone, megastigmatrienone, and dihydroactinidiolide, showed significant increases. Compared to the control group, cigarettes supplemented with extracts from fermented low-grade tobacco leaves exhibited improved aroma quality, increased aroma intensity, a fuller aroma profile, enhanced coordination, and elevated sensory quality.

Key words: aroma-producing yeast; identification; low-grade tobacco leaves; aroma component; fermentation

[责任编辑:杨晓娟 刘春奎]