



张志平,雷梦,许博利,等. 霍氏肠杆菌 YT-3 发酵烟草浸提液香味成分及其转录水平分析[J]. 轻工学报, 2025,40(6):67-76.
ZHANG Z P, LEI M, XU B L, et al. Aroma components and transcriptome analysis of tobacco extracts fermented by *Enterobacter hormaechei* YT-3[J]. Journal of Light Industry, 2025, 40(6): 67-76.
DOI: 10. 12187/2025. 06. 007

霍氏肠杆菌 YT-3 发酵烟草浸提液香味成分及其转录水平分析

张志平¹, 雷梦², 许博利¹, 芦昶彤³, 赵嘉鸣³, 张骁¹, 魏涛¹

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;
2. 郑州轻工业大学 烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001;
3. 河南中烟工业有限责任公司 技术中心, 河南 郑州 450016

摘要:【目的】提升霍氏肠杆菌 YT-3(*Enterobacter hormaechei* YT-3) 发酵改善烟草浸提液香味成分能力, 揭示其转化机制。【方法】采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对发酵烟草浸提液香气组分进行定性、定量分析, 利用转录组学探索 YT-3 发酵烟草浸提液潜在香气产生机制。【结果】经发酵处理后, 烟草浸提液香气质和香气量均显著提高, 苯乙醇、乙偶姻、3-羟基- β -紫罗兰酮和巨豆三烯酮的质量浓度分别提升了 55.62%、50.15%、17.81% 和 39.93%。转录组测序共获得 1552 个显著差异表达基因(DEGs), 其中上调基因 746 个, 下调基因 806 个; DEGs 在氨基酸代谢、丁酸代谢、类胡萝卜素降解产物合成等途径上显著富集, 芳醇脱氢酶(ADH)、苯乙醛脱氢酶(*feaB*)、 α -乙酰乳酸合酶(*ilv*)、乙偶姻形成双乙酰还原酶(*budC*)、6-磷酸- β -葡萄糖苷酶(*bglA*)等基因与烟草浸提液中关键香味成分的生物合成密切相关。【结论】霍氏肠杆菌 YT-3 能够利用烟草浸提液部分底物高效合成香味成分, 为进一步改善其香气品质提供了一种新方法。

关键词: 霍氏肠杆菌 YT-3; 烟草浸提液; 香味成分; 气相色谱-质谱联用技术; 转录组分析

中图分类号: TS49 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2025)06-0067-10

0 引言

在卷烟生产过程中, 烟叶碎片、烟末可直接回收利用, 低次烟叶因其内在品质和物理指标不达标, 可通过浸提制备高值烟用香料^[1]。然而, 浸提烟用香料在提高卷烟香气量、减少杂气、降低刺激性等方面仍需进一步提升。生物酶催化、微生物发酵等生物技术可有效改善浸提液品质^[2-4]。其中,

微生物发酵技术因其操作简便、成本低廉而受到烟草企业青睐。在适宜的环境下, 部分微生物能够利用烟草浸提液中的大分子物质作为生长所需的代谢底物, 并将其转化为有助于提升感官品质的小分子化合物。

烟草浸提物主要来源于烟草本身, 同根同源, 具有易获取、低成本、烟草本香等优点, 合理使用不仅可以提供烟草本香, 增加烟气丰满度, 还能改善

收稿日期: 2024-11-16; 修回日期: 2025-01-11; 出版日期: 2025-12-15

基金项目: 河南中烟工业有限责任公司科技项目(AW2024007); 河南省重点研发专项项目(231111111700)

作者简介: 张志平(1981—), 男, 河南省安阳市人, 郑州轻工业大学副教授, 博士, 主要研究方向为生物基化学品。E-mail: zzp@zzuli.edu.cn

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。E-mail: weit8008@zzuli.edu.cn

粗糙杂气,增加厚实感,已成为烟用香精香料中不可或缺的部分^[5-7]。香气是衡量烟草提取物品质的关键指标之一,因此,从烟叶中萃取天然香味成分前体物,通过微生物发酵使之转化为衍生香味成分,是当前烟草香料研究领域的热点。薛磊等^[8]利用一株能降解类胡萝卜素的芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)发酵烟叶后,提高了 3-氧代- α -紫罗兰醇的含量。X. Y. Wu 等^[9]研究了科赫芽孢杆菌(*Bacillus kochii*)和巨大线黑粉菌(*Filobasidium magnum*)的共培养系统,前者能促进低次烤烟中蛋白质和淀粉的降解,后者能促进氨基酸和还原糖的形成,二者共同加速了美拉德反应产物的累积,丰富了烤烟风味物质。黄申等^[10]筛选出可有效降解西柏烯生成茄酮和金合欢醛的新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium sp.*),该菌能改善烟叶浓缩液的整体风味和感官特性。叶建斌等^[11]研究发现,利用红茶菌发酵烟草浸提液可产生大量酸性香味物质,用于制备特色酸香型浸膏,可有效改善卷烟的吸食品质。本课题组前期从不同品种的新鲜烟叶中筛选获得 1 株霍氏肠杆菌 YT-3(*Enterobacter hormaechei* YT-3),该菌株具有催化降解烟叶中大分子香料前体底物的能力,将其菌制剂施加于烟叶后,可明显改善卷烟的吸食品质^[12],但该菌在发酵烟草浸提液提质增香方面有待进一步研究。

目前,关于烟叶成分及烟叶香韵主体物合成途径的关键基因与分子机制的研究已取得显著进展^[13-15],但霍氏肠杆菌 YT-3 在烟用香料提质增香过程中的内在分子机制,尤其是与香味成分合成有关的基因及表达情况尚需深入研究。基于此,本文拟通过分析霍氏肠杆菌 YT-3 发酵烟草浸提液后的香味成分变化,结合转录组学分析,挖掘主要香味成分合成途径的关键差异基因,解析该菌对烟草浸提液品质改善的分子机制,以期利用该菌改良低次烟叶浸提液香味品质的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂与仪器

主要材料:低次烟叶碎片,由广西中烟工业有限责任公司技术中心提供;霍氏肠杆菌 YT-3,由郑

州轻工业大学烟草科学与工程学院烟草生物技术实验室筛选保藏。

主要试剂:胰蛋白胨、酵母提取物、NaCl、琼脂粉,赛默飞世尔科技公司;二氯甲烷,科隆化学品有限公司;2, 6-二氯甲苯,百灵威科技有限公司。

LB 液体培养基(1 L):10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g NaCl,调 pH 值至 5.5~6.0,121 ℃ 灭菌 20 min。

主要仪器:UV-1500 型紫外-分光光度计,上海美析仪器有限公司;ZDHW 型调温电热套,北京中兴伟业仪器有限公司;同时蒸馏萃取装置,郑州赛克斯玻璃仪器有限公司;5810R 型超高速冷冻离心机,德国艾本德有限公司;Agilent 6890A/5975C 型气相色谱-质谱(GC-MS)联用仪,美国 Agilent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 烟草浸提液制备 将低次烟叶碎片按照固液比 1:10(g/mL)在 55 ℃ 下浸提 2 h,静置冷却至室温,用 8 层纱布过滤,得到烟草浸提液,将其 pH 值调至 5.5,并在 121 ℃ 条件下灭菌 20 min。

1.2.2 烟草浸提液发酵样品制备 采用 LB 培养基制备霍氏肠杆菌 YT-3 种子液,菌种活化、梯度稀释、涂布分离单菌落及摇瓶培养参照王文婷等^[16]的方法。培养液以 5000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用无菌生理盐水悬浮菌体获得种子液,将种子液按照 3%(体积分数)的接种量接入 100 mL 烟草浸提液中。空白对照组的烟草浸提液加入等量无菌生理盐水,于 33 ℃、150 r/min 的摇床中培养 3 d。

1.2.3 香味成分测定 分别量取 100 mL 烟草浸提液发酵样品和空白对照组样品于 1 L 圆底烧瓶中,加入 400 mL 蒸馏水及适量玻璃珠,量取 100 mL 二氯甲烷于 250 mL 梨形瓶中,同时蒸馏萃取 2.5 h 后,在梨形瓶中加入 50 μ L 质量浓度为 0.943 mg/mL 的内标物 2, 6-二氯甲苯,混合均匀后,加入适量无水硫酸钠,静置除水 1 d。将溶液常压蒸馏浓缩至 1 mL,待测。

GC-MS 条件:色谱柱选用 Agilent 122-5562 DB-5 MS 毛细管柱(60 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m),进口温度为 280 ℃;载气为 He,流速为 1.0 mL/min;分流比为 5:1,进样量为 1.0 μ L。离子源为 XTR-EI 源,电

子能量为 70 eV;溶剂延迟时间为 8 min;扫描质量范围为 25~650 amu。通过 NIST20 谱库对数据进行检索,并结合标准质谱峰面积及相关文献资料确定致香成分,依据内标法计算各致香成分的质量浓度。

1.2.4 卷烟加香感官评价 以经霍氏肠杆菌 YT-3 发酵的烟草浸提液发酵样品为实验组,未经霍氏肠杆菌 YT-3 发酵的烟草浸提液作为对照组。用微量注射器将 5 μ L 烟草浸提液注射到空白卷烟中,注射后的卷烟样品置于温度 (22 \pm 2) $^{\circ}$ C、相对湿度 (60 \pm 5)% 的恒温恒湿箱中平衡 48 h 后进行感官评吸。由 7 名专业评吸人员按照文献[17]中的方法对加香效果进行感官评价。

1.2.5 转录组样品制备 为研究霍氏肠杆菌 YT-3 发酵烟草浸提液的基因表达情况,于 72 h 时取 1 mL 发酵培养液于 1.5 mL 无酶管中,在 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 条件下离心 2 min,弃上清液,将菌体沉淀置于液氮中冷冻 15 min 后,储存于-80 $^{\circ}$ C 的冰箱内,待测。每组设 3 个生物学重复。转录组的建库及测序工作委托南京派森诺基因科技有限公司完成。

1.2.6 转录组数据处理 获取原始数据后,筛除平均质量分数低于 Q30 的 Reads,获得质控序列。将过滤后的 Reads 进行参考基因组比对,获取基因注释信息。统计每个基因上读段计数值,作为基因的原始表达量数据。采用 FPKM 方法对基因表达量进行标准化处理。设定筛选条件为 $|\log_2(\text{倍数变化})|>1$ 且 $P<0.05$,识别实验组 (YT3) 与对照组 (CK) 之间的差异表达基因 (DEGs)。采用 topGO 工具进行 GO 功能富集分析,通过超几何分布方法计算 P 值,将 $P<0.05$ 设定为获得差异基因显著富集的 GO term 的标准。利用 clusterProfiler (4.6.0) 软件进行 KEGG 通路富集分析,以揭示差异表达基因在特定代谢或信号传导通路中的潜在作用及其基因功能。

2 结果与讨论

2.1 发酵前后烟草浸提液香味成分分析

烟草浸提液发酵前后香味成分质量浓度变化结果见表 1。由表 1 可知,经霍氏肠杆菌 YT-3 发酵

后,共检测出 28 种香味成分,新增 6 种香味成分。香味成分的总质量浓度从 1 212.56 μ g/mL 增加到了 1 676.94 μ g/mL。

经发酵后,烟草浸提液的挥发性香味物质质量浓度有所增加。苯乙醇是一种带有愉悦玫瑰香味的芳香醇,能够提升烟气的细腻度,其质量浓度增加了 55.62%;2,3-丁二醇和 3-羟基-2-丁酮 (乙偶姻) 具有黄油香气^[18],其质量浓度分别增加了 47.91% 和 50.15%;霍氏肠杆菌可降解类胡萝卜素^[19],在发酵浸提液中也检测到了类胡萝卜素降解产物,其中,巨豆三烯酮具有甜润的甘草香和干果香气,类似可可和白肋烟的宜人香味^[20],其 4 种同分异构体的质量浓度平均增加了 39.93%;二氢猕猴桃内酯具有弱凉香,似杏子果香^[21],其质量浓度增加了 15.91%;3-羟基- β -紫罗兰酮和 β -大马酮质量浓度分别提升了 17.81% 和 43.70%,二者能带来令人愉悦的甜味香气,并赋予烟气清新的花香韵。另外,还新增了醇类、酮类和酯类香味成分,如异长叶醇、异匙叶桉油烯醇和去氢白菖烯,具有轻柔的草木香。

2.2 感官评价结果分析

卷烟感官评价结果见表 2。由表 2 可知,实验组卷烟香韵丰富性增加,香气饱满,烟气柔顺度明显提升,喉部灼热感减少,且回甜感增强。此外,发酵处理还有效降低了舌面残留及颗粒感,使烟气余味更加清新宜人,说明烟草浸提液品质得到一定程度的改善。

2.3 增香分子机制分析

2.3.1 RNA-Seq 测序结果分析 转录组数据 Reads 质量统计结果见表 3。由表 3 可知,所有样本的 Q30 均超过 95%,而高质量序列碱基数与参考基因组碱基数的比值高达 98% 以上,说明测序数据的质量适用于进一步分析。

2.3.2 测序结果统计学分析 基因统计学分析结果如图 1 所示。由图 1a) 可知,第一主成分对样品差异的贡献值为 98.6%,表明经主成分分析 (PCA) 降维变换后的数据可表征原始数据的绝大部分信息,实验组和对照组样品的点分离程度高、趋势明显,即样品之间的基因表达水平表现出明显差异。

表 1 烟草浸提液发酵前后致香成分质量浓度变化结果

Table 1 Mass concentration changes of aroma components in tobacco extract pre- and post-fermentation

类别	化合物名称	发酵前		发酵后		变化率/ %	RSD/ %
		质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RSD/%		
醇类	糠醇	56.145 5	17.712 2	50.633 2	18.853 7	-9.82	1.300 8
	2,3-丁二醇	46.256 4	24.511 4	68.415 8	41.931 0	47.91	1.662 2
	苯乙醇	110.236 9	44.392 2	171.550 9	34.249 3	55.62	0.709 1
	异长叶醇	—	/	7.916 4	19.709 5	/	/
	异匙叶桉油烯醇	—	/	7.642 6	32.203 2	/	/
	4-丙基紫丁香醇	—	/	11.262 1	27.065 6	/	/
醛类	苯乙醛	98.256 8	13.825 8	86.257 7	14.687 3	-12.21	1.952 7
	糠醛	18.496 6	17.658 7	20.884 5	8.282 4	12.91	5.025 0
酮类	3-羟基-2-丁酮	51.587 9	44.018 6	77.458 7	26.173 9	50.15	1.784 1
	5,6-二氢-6-戊基-2H-吡喃-2-酮	—	/	7.021 6	14.511 8	/	/
	β -大马酮	18.062 5	12.225 3	25.956 5	17.385 9	43.70	1.455 9
	3-羟基- β -紫罗兰酮	12.898 6	10.760 2	15.195 6	25.260 2	17.81	12.967 5
	巨豆三烯酮 a	119.765 8	26.606 2	159.798 1	33.454 7	33.43	1.477 1
	巨豆三烯酮 b	208.832 3	52.666 3	299.817 2	12.928 4	43.57	0.967 1
	巨豆三烯酮 c	99.509 2	35.709 1	123.425 1	4.586 6	24.03	1.937 9
	3-羟基- β -二氢大马酮	9.864 2	21.157 1	12.962 2	24.358 5	31.41	12.494 0
	3-羟基- β -大马酮	9.189 4	10.796 4	10.068 8	28.461 2	9.57	34.716 5
	巨豆三烯酮 d	223.796 6	32.541 9	355.164 0	63.970 7	58.70	0.155 9
	9-羟基-4,7-巨豆二烯-3-酮	13.701 6	20.359 2	15.421 7	9.361 4	12.55	14.822 4
	2-十五烷酮	2.854 1	11.108 3	3.423 1	8.256 8	19.94	25.618 0
酯类	1,2-脱氢- α -环戊酮	1.141 0	4.932 3	0.939 1	1.373 0	-17.70	15.056 9
	二氢猕猴桃内酯	36.502 2	23.855 4	42.310 3	28.859 7	15.91	7.012 8
	去氢白菖烯	—	/	5.906 4	20.503 3	/	/
	环十五内酯	28.907 9	8.288 1	35.322 4	15.196 9	22.19	1.147 8
	土木香内酯	—	/	16.589 6	32.415 5	/	/
酸类	肉豆蔻酸	8.093 7	22.417 9	9.099 7	37.623 4	12.43	12.752 5
	3-羟基月桂酸	0.188 6	0.305 1	0.215 7	0.834 0	14.36	25.674 1
	棕榈酸	38.267 3	8.273 7	36.276 6	2.256 1	-5.20	4.937 8

注：—表示未检出,/表示无法计算。

表 2 卷烟感官评价结果

Table 2 Sensory evaluation results of cigarettes

样品	香气	烟气	杂气	刺激性	余味
对照组	香气粗糙,香气量低	烟气量中等,稍干燥	有轻杂气	喉部有灼热感	舌面有残留,略有涩感、颗粒感
实验组	香韵丰富性增加,香气饱满,香气量中等	烟气量中等,柔顺度增加	有轻杂气	喉部灼热感降低	回甜感增加,舌面残留及颗粒感下降,余味变好

同类样品之间均有效聚拢,说明样品之间的相似度高、重复性好,符合后续研究要求,可进一步进行 DEGs 分析。

由图 1b)可知,每组 3 个生物学重复样品均聚集成紧密的一簇,表明具有良好的生物学重复性和较高的可靠性。另外,DEGs 大致分为两大组、八大

类,表明不同培养基组成对霍氏肠杆菌 YT-3 的基因表达谱系产生了显著影响。

2.3.3 DEGs 分析 DEGs 火山图如图 2 所示。由图 2 可知,从实验组和对照组中共筛选到 1552 个显著 DEGs,其中上调基因 746 个,下调基因 806 个,分别占总 DEGs 数目的 48.07%和 51.93%。说明经霍

表 3 转录组数据 Reads 质量统计结果
Table 3 Quality statistics of transcriptome Reads

样品编号	过滤后 序列/条	过滤后序列 占比/%	Q30/%	GC/%	高质量 Reads 碱 基数/gb	高质量序列碱基数与 参考基因组碱基数比值/%
CK_1	18 133 016	98.95	96.88	52.00	2.73	98.76
CK_2	25 664 362	98.77	97.01	52.14	3.87	98.77
CK_3	16 330 162	98.60	96.66	51.96	2.46	98.60
YT3_1	23 978 372	98.69	96.77	51.81	3.61	98.69
YT3_2	26 202 016	98.80	96.87	51.98	3.95	98.80
YT3_3	25 562 532	98.87	97.05	51.99	3.85	98.87

注:Q30 表示碱基识别准确率在 99.9% 以上的碱基占比。

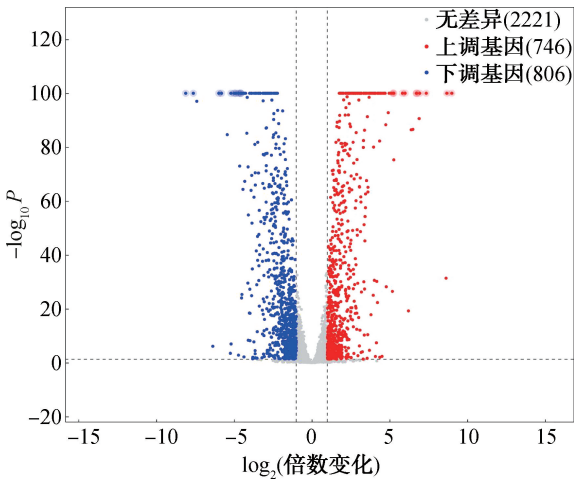
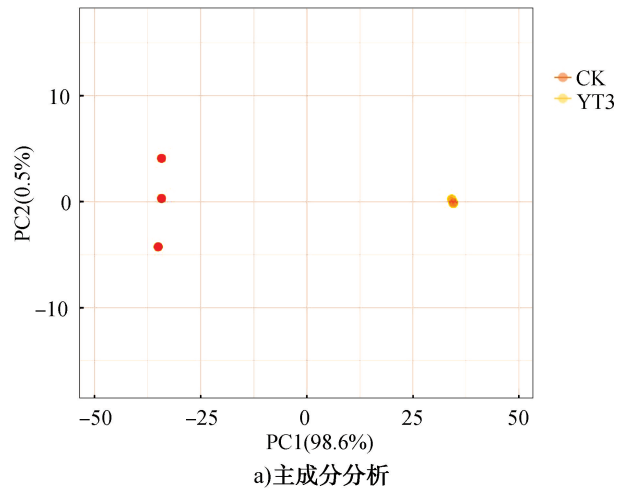


Fig. 2 Volcanic plot of DEGs

注释,DEGs 功能可划分为三大类:生物学过程、细胞组分和分子功能,分别富集了 1027 个、134 个和 822 个 DEGs。每个类别富集最显著 ($P \leq 0.05$) 的 10 个功能条目中,分子功能主要包括氧化还原酶活性、转酮醇酶或转醛缩酶活性等,细胞组分主要包括细胞组成复合蛋白等,这些功能条目对烟草浸提液品质改善的影响较小;生物学过程中最显著的二级分类为有机酸分解代谢(包含 33 个 DEGs)、羧酸分解代谢(包含 33 个 DEGs)、细胞代谢(包含 451 个 DEGs)等,这些功能条目与烟草浸提液品质改善相关性较高。

2.3.5 KEGG 通路富集分析 对筛选到的 DEGs 进行 KEGG 富集分析,共有 671 个 DEGs 富集到了 126 条 KEGG 通路中。根据 $P \leq 0.05$ 的标准,筛选出前 20 条显著富集的通路,结果如图 4 所示。结合已报道关于香味成分合成代谢的文献^[22-24],选择 2 条重要的香味成分合成途径进行深入研究:苯丙氨酸代谢 ($-\log_{10}(P_{Adj}) \approx 5.00$)和丁酸代谢 ($-\log_{10}(P_{Adj}) \approx 1.50$)。

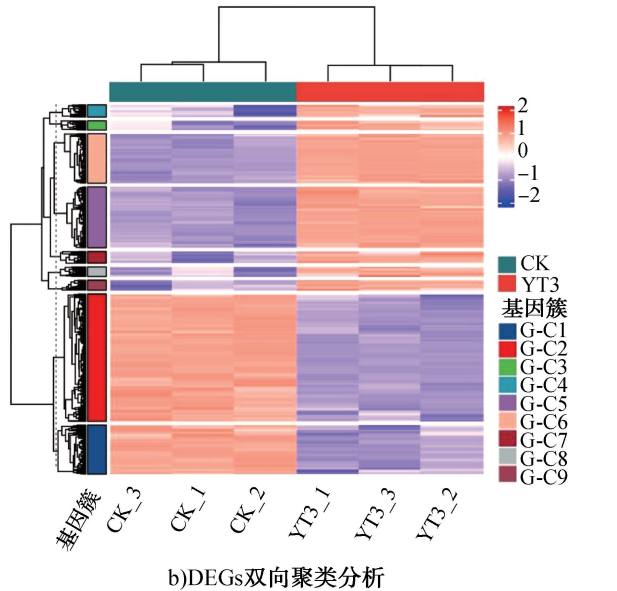


图 1 基因统计学分析结果

Fig. 1 Statistical analysis of gene expression

氏肠杆菌 YT-3 发酵后,大量基因的差异表达为烟草浸提液品质的改善提供了功能产物保障。

2.3.4 GO 功能富集分析 DEGs 的 GO 功能注释结果如图 3 所示。由图 3 可知,根据 GO 数据库的

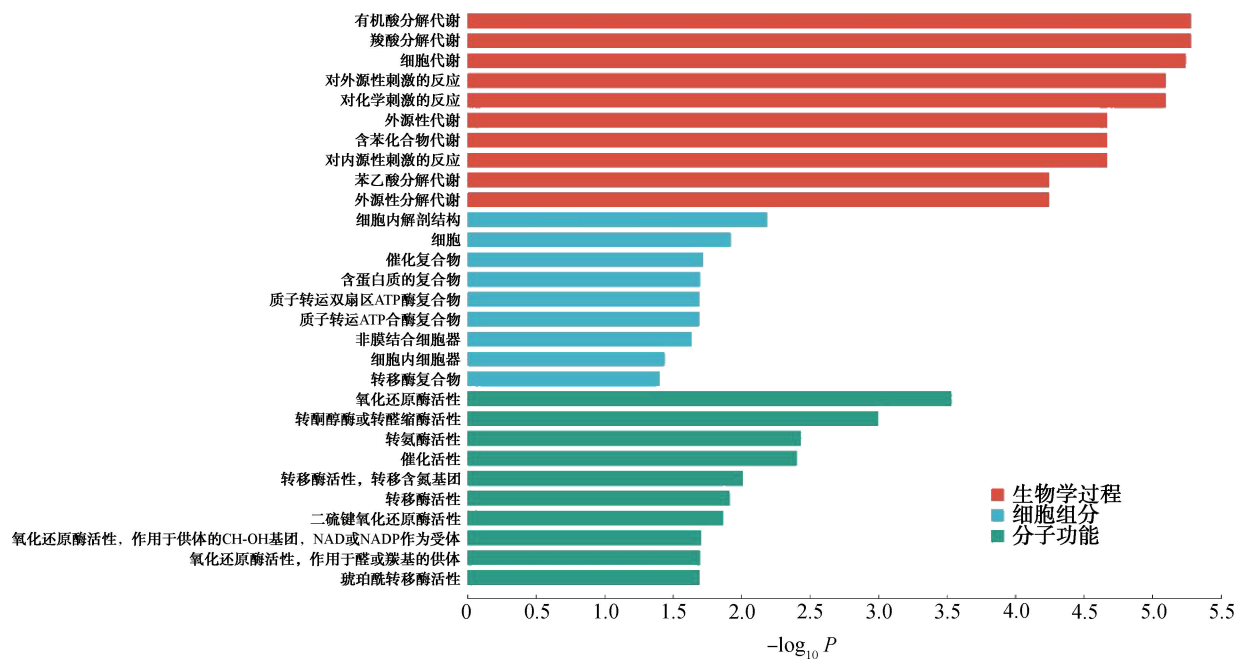


图 3 DEGs 的 GO 功能注释结果

Fig. 3 GO functional annotation results of DEGs

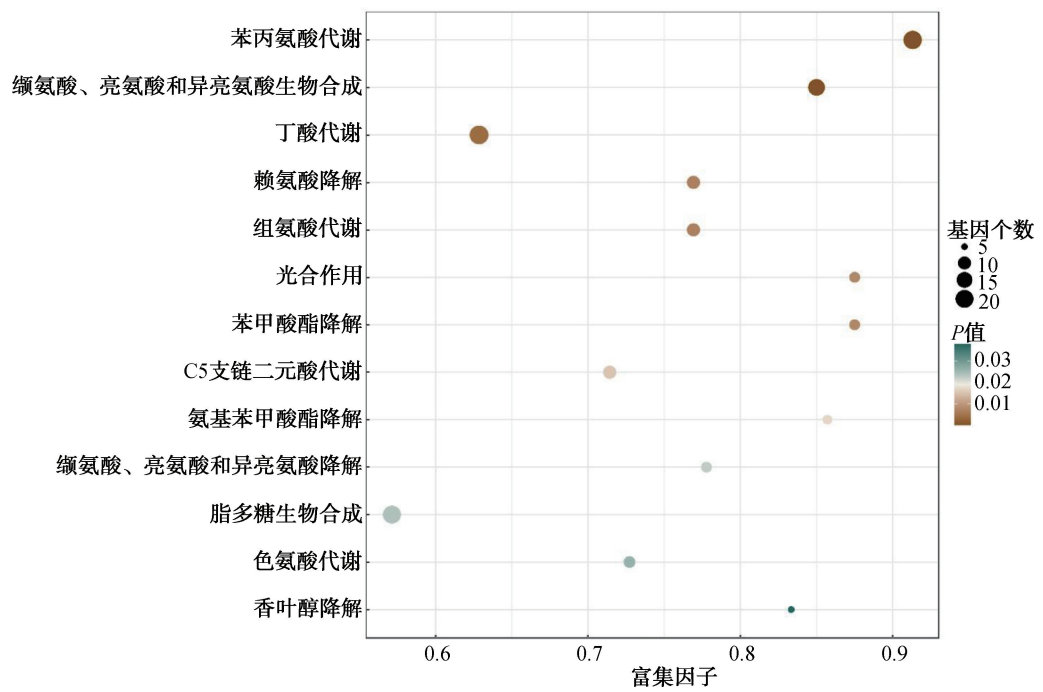


图 4 DEGs 的 KEGG 富集通路

Fig. 4 KEGG enrichment pathways of DEGs

2.3.6 香味成分合成途径关键基因分析 在霍氏肠杆菌 YT-3 发酵烟草浸提液的香味成分中,醇类和酮类物质质量浓度变化较大,主要包括苯乙醇、2,3-丁二醇、乙偶姻等,这些醇类和酮类物质都会影响烟草香气的品质。苯乙醇和苯乙酸的合成与 L-

苯丙氨酸代谢途径相关^[22-23]。关键香味成分相关合成途径及 DEGs 表达量热图如图 5 所示。由图 5a) 可知,在苯丙氨酸代谢途径中,用于分解苯丙氨酸生成苯乙醛、苯乙酸和苯乙醇的 5 个基因在烟草浸提液中均实现高表达,其中,芳醇脱氢酶基因

(*ADH*) 和苯乙醛脱氢酶基因(*feaB*)在实验组中的表达量显著高于对照组,有效提高了烟草浸提液中苯乙醇的含量,为改善烟气细腻度提供了物质基础。

丁酸代谢途径富集了大量 DEGs 调控 2, 3-丁二醇和乙偶姻的生物合成。乙偶姻因具有愉悦的酸奶香味和奶油味,被广泛应用于食品添加剂、化妆品、农业生产、化工合成等领域^[24]。霍氏肠杆菌

YT-3 利用糖类作为初始底物,通过糖酵解途径(*EMP*)生成丙酮酸,随后进入 2, 3-丁二醇合成途径(见图 5c)。参与该途径的主要基因包括 α -乙酰乳酸合酶基因(*ilv*、*alsS*)、乙偶姻形成双乙酰还原酶基因(*budC*)及 SDR 家族氧化还原酶基因(*butA*)。在实验组中有 7 个基因片段编码了乙酰乳酸合酶,并正向调控了丙酮酸向支链代谢物(*S*)-乙偶姻、

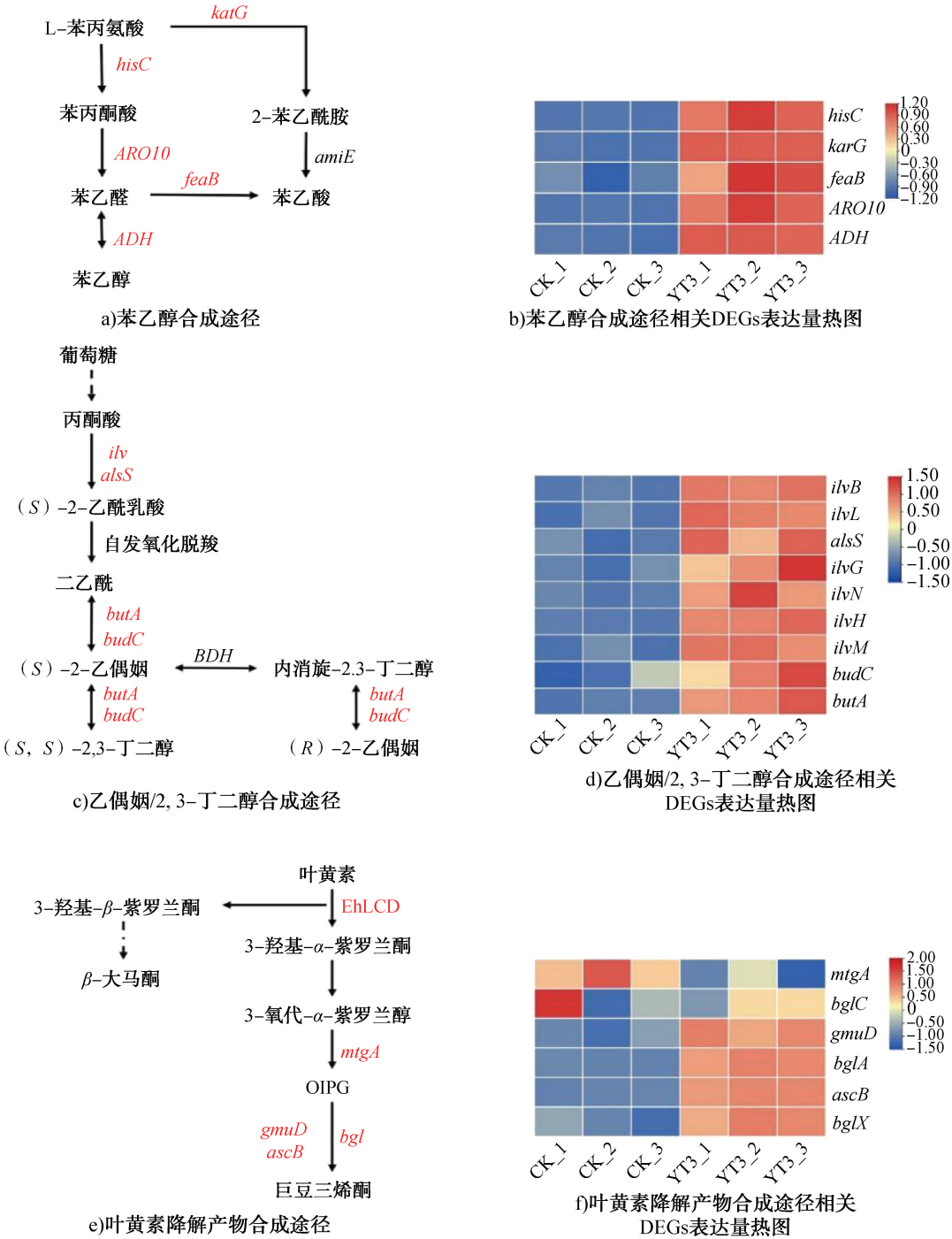


图 5 关键香味成分相关合成途径及 DEGs 表达量 heatmap

Fig. 5 Heatmap of synthesis pathways and DEGs gene expression related to key aroma components

(*R*)-乙偶姻和 2, 3-丁二醇的生物合成。参与这一合成代谢途径的相关酶的编码基因表达水平均显著上调($P < 0.05$), 上述酶基因的共同作用促进了(*S*)-乙偶姻和 2, 3-丁二醇的生物合成, 丰富了烟草浸提液内的香味成分。

叶黄素是烟草中重要的萜烯类化合物之一, 其降解产物包括巨豆三烯酮、 β -大马酮、3-羟基- β -紫罗兰酮等, 均是烟草中的关键香味成分^[25]。Z. D. Long 等^[26]从霍氏肠杆菌 YT-3 中纯化并表征了一种新型叶黄素裂解双加氧酶 EhLCD, 在该酶的作用下, 叶黄素在 9~10 位置上发生碳链断裂, 在有氧环境下生成 3-羟基- β -紫罗兰酮, 还可进一步转化为 β -大马酮^[27]; 同时, 叶黄素经氧化还原后生成 3-氧代- α -紫罗兰醇, 并通过糖基转移酶基因(*mtgA*)的糖基化过程合成巨豆三烯酮的重要前体物 3-氧代- α -紫罗兰醇- β -D-吡喃葡萄糖苷(OIPG), 而 OIPG 可在 6-磷酸- β -葡萄糖苷酶基因(*bglA*、*ascB*、*gmuD*、*bglX*)的作用下水解生成巨豆三烯酮^[28-29]。本研究中, 参与上述香味成分合成代谢的相关酶的基因表达水平发生了不同程度的变化(见图 5f)), 共同促进了体系中 3-羟基- β -紫罗兰酮、 β -大马酮和巨豆三烯酮质量浓度的升高, 印证了用霍氏肠杆菌 YT-3 发酵烟草浸提液可有效改善其品质这一结论。

3 结论

本研究利用霍氏肠杆菌 YT-3 发酵烟草浸提液, 显著提升了其感官品质, 具体表现为香气增强、刺激性和杂气减少, 余味改善。香味成分分析发现, 苯乙醇、乙偶姻、2, 3-丁二醇及类胡萝卜素降解产物等香味成分的质量浓度较发酵前有较显著增加。转录组测序结果显示, 苯乙醇与苯丙氨酸代谢通路中 *ADH* 和 *feaB* 基因高表达相关, 乙偶姻和 2, 3-丁二醇与丁酸代谢通路中的 *ilv*、*budC* 等基因表达相关。此外, 霍氏肠杆菌叶黄素裂解双加氧酶(EhLCD)和 *mtgA*、*bgl*、*gmuD*、*ascB* 等上调基因强化了叶黄素降解, 生成烟草中重要的香味成分 3-羟基- β -紫罗兰酮、 β -大马酮、巨豆三烯酮等。综上所述, 通过探索霍氏肠杆菌 YT-3 发酵烟草浸提液后的

香味成分合成情况, 结合转录组学的分子水平分析, 获得了使烟草浸提液品质改善的关键底物和基因, 可为霍氏肠杆菌 YT-3 发酵烟草浸提液的应用提供参考。

参考文献:

- [1] 程世鸿, 邵璐. 卷烟调香技术研究进展[J]. 广东化工, 2024, 51(18): 107-109.
CHENG S H, SHAO L. Review of cigarette flavoring technology[J]. Guangdong Chemical Industry, 2024, 51(18): 107-109.
- [2] 吴曜廷, 刘丹然, 李润杰, 等. 微生物酶制剂对上部烟叶醇化品质的影响[J]. 安徽农业科学, 2024, 52(18): 166-170.
WU Y T, LIU D R, LI R J, et al. Effects of microbial enzyme preparations on the aging quality of upper tobacco leaves[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2024, 52(18): 166-170.
- [3] 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.
LIU H K, MAO W L, YOU M, et al. Optimization of biological fermentation for improving the quality of discarded tobacco leaves[J]. Chinese Tobacco Science, 2024, 45(2): 99-107.
- [4] 朱大恒, 陈锐, 陈再根, 等. 烤烟自然醇化与人工发酵过程中微生物变化及其与酶活性关系的研究[J]. 中国烟草学报, 2001, 7(2): 26-30.
ZHU D H, CHEN R, CHEN Z G, et al. The relationship between microorganisms and enzyme activities in flue-cured tobacco during aging and fermentation[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2001, 7(2): 26-30.
- [5] 郝捷, 季嫻, 李力群, 等. 生物酶和微生物技术改善烟叶香气的研究进展[J]. 生物技术进展, 2022, 12(6): 817-824.
HAO J, JI Q, LI L Q, et al. Research progress on improving aroma of tobacco leaf with bio-enzymes and microorganism technology[J]. Current Biotechnology, 2022, 12(6): 817-824.
- [6] 茅中一, 洪祖灿, 刘加增, 等. 基于香气活性值的福建尤溪烟叶提取物香气特征成分分析[J]. 烟草科技, 2020, 53(10): 56-65.
MAO Z Y, HONG Z C, LIU J Z, et al. Characteristic aroma components in tobacco extracts from Youxi based on odor activity value[J]. Tobacco Science & Technology, 2020, 53(10): 56-65.
- [7] 宁勇, 王晶, 陈小敏, 等. 福建烟叶提取物的制备及其在卷烟中的应用[J]. 香料香精化妆品, 2019(5): 21-25.

- NING Y, WANG J, CHEN X M, et al. Preparation of Fujian tobacco leaf extract and its application in cigarettes [J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2019(5): 21-25.
- [8] 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): 60-67.
- XUE L, ZHENG Z H, GUO Z G, et al. Screening and application of aroma-enhancing bacteria for tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2019, 40(5): 60-67.
- [9] WU X Y, CAI W, ZHU P C, et al. Function-driven design of *Bacillus kochii* and *Filobasidium magnum* co-culture to improve quality of flue-cured tobacco [J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 13: 1024005.
- [10] 黄申, 霍梦杰, 钱玉梅, 等. 西柏三烯-4, 6-二醇降解菌的筛选鉴定及其在再造烟叶中的应用[J]. 河南农业科学, 2018, 47(10): 137-142, 148.
- HUANG S, HUO M J, QIAN Y M, et al. Screening and identification of a cembratriene-4, 6-diol degrading strain and its application in reconstituted tobacco [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2018, 47(10): 137-142, 148.
- [11] 叶建斌, 齐晓娜, 张婷婷, 等. 红茶菌发酵制备特色酸香型烟草浸膏[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(10): 104-111.
- YE J B, QI X N, ZHANG T T, et al. Production of characteristic acid fragrance tobacco extract by fermentation using microbe from kombucha[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(10): 104-111.
- [12] 龙章德, 王敏, 薛云, 等. 烟叶中 β -胡萝卜素高效降解菌株的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 轻工学报, 2022, 37(4): 86-93.
- LONG Z D, WANG M, XUE Y, et al. Screening and identifying of β -carotene degrading strains from tobacco leaves and its optimization of fermentation conditions[J]. Journal of Light Industry, 2022, 37(4): 86-93.
- [13] 黄申, 闫茗熠, 陈梦月, 等. 基于转录组测序和 RT-qPCR 技术的烟草糖酯合成基因挖掘[J]. 轻工学报, 2023, 38(6): 78-84, 117.
- HUANG S, YAN M Y, CHEN M Y, et al. Excavating tobacco sugar ester synthesis genes based on transcriptome sequencing and RT-qPCR[J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(6): 78-84, 117.
- [14] 貂志杰. 中烟特香 301 油分属性相关的物质成分解析与基因初步挖掘[D]. 北京: 中国农业科学院, 2022.
- MAO Z J. Analysis of substances and preliminary mining of genes related to oil attribute in zhongyan texiang 301 [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2022.
- [15] 晁江涛, 曹建敏, 吴新儒, 等. 烤烟特征香韵品系 8 号清甜香韵的形成机制研究[J]. 中国烟草科学, 2022, 43(6): 82-87.
- CHAO J T, CAO J M, WU X R, et al. Study on the formation of fresh-sweet flavor in tobacco mutant T8 [J]. Chinese Tobacco Science, 2022, 43(6): 82-87.
- [16] 王文婷, 宋凯, 杨晨, 等. 基于宏基因组学的霍氏肠杆菌发酵解析及其烟叶品质提升机制研究[J]. 轻工学报, 2023, 38(1): 79-89.
- WANG W T, SONG K, YANG C, et al. Macro-genomics-based investigation of the mechanism underlying tobacco fermentation by *Enterobacter hormaechei* [J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(1): 79-89.
- [17] 武怡, 廖头根, 王明锋, 等. 中式卷烟消费体验感官评价方法的建立与应用[J]. 烟草科技, 2015, 48(5): 5-13.
- WU Y, LIAO T G, WANG M F, et al. Development and application of consumer experience sensory evaluation method for Chinese-style cigarette [J]. Tobacco Science & Technology, 2015, 48(5): 5-13.
- [18] SZUDERA-KOŃCZAL K, MYSZKA K, KUBIAK P, et al. The combined effect of lactic acid bacteria and *Galactomyces geotrichum* fermentation on the aroma composition of sour whey [J]. Molecules, 2023, 28(11): 4308.
- [19] 汪芳芳. 霍氏肠杆菌降解叶黄素的研究[D]. 郑州: 郑州轻工业学院, 2017.
- WANG F F. Study on degradation of lutein by *Enterobacter* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University of Light Industry, 2017.
- [20] 谢剑平. 烟草香原料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- XIE J P. Tobacco flavor raw materials [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009.
- [21] 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.
- GUO L Q, PIAO Y G, ZHU C Y, et al. Screening and identification of aroma-producing yeast YG-4 and analysis of its aroma components [J]. Journal of Light Industry, 2019, 34(5): 27-31.
- [22] 陆军. 微生物转化 L-苯丙氨酸生成 2-苯乙醇的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- LU J. Biotransformation of L-phenylalanine to 2-phenylethanol by microorganism [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008.
- [23] 庄以彬, 吴凤礼, 殷华, 等. 芳香族香料化合物生物合成研究进展[J]. 生物工程学报, 2021, 37(6): 1998-2009.
- ZHUANG Y B, WU F L, YIN H, et al. Advances in the microbial synthesis of aromatic fragrance molecules [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(6): 1998-2009.
- [24] 武云杰. 烟草类胡萝卜素降解的生理和调控机理研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2016.
- WU Y J. Research of cleavage of tobacco carotenoid about physiology and adjusting mechanism [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2016.
- [25] XIAO Z J, LU J R. Strategies for enhancing fermentative production of acetoin: A review [J]. Biotechnology

Advances, 2014, 32(2): 492–503.

[26] LONG Z D, DUAN N X, XUE Y, et al. Characterization of a novel lutein cleavage dioxygenase, EhLCD, from *Enterobacter hormaechei* YT-3 for the enzymatic synthesis of 3-hydroxy- β -ionone from lutein[J]. Catalysts, 2021, 11(11): 1257.

[27] 杨雪鹏, 叶建斌, 毛多斌, 等. 基于微生物转化合成 3-羟基- β -紫罗兰酮和 β -紫罗兰酮的方法; CN 201510466265.5 [P]. 2015–12–16.

YANG X P, YE J B, MAO D B, et al. Method for the synthesis of 3-hydroxy- β -ionone and β -ionone based on microbial transformation; CN 201510466265.5 [P]. 2015–12–16.

[28] LIANG Z J, FANG Z X, PAI A, et al. Glycosidically bound aroma precursors in fruits; a comprehensive review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(1): 215–243.

[29] HUANG S, ZHU L, WANG K, et al. Unravel the supremacy of *Klebsiella variicola* over native microbial strains for aroma-enhancing compound production in reconstituted tobacco concentrate through metagenomic analysis [J]. Metabolites, 2024, 14(3): 158.

Aroma components and transcriptome analysis of tobacco extracts fermented by *Enterobacter hormaechei* YT-3

ZHANG Zhiping¹, LEI Meng², XU Boli¹, LU Changtong³, ZHAO Jiaming³, ZHANG Xiao¹, WEI Tao¹

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

2. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

3. Technology Center, China Tobacco He'nan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou 450016, China

Abstract: **[Objective]** To enhance the aroma-improving capacity of *Enterobacter hormaechei* YT-3 fermentation on tobacco extracts and elucidate its conversion mechanism. **[Methods]** GC-MS was employed for qualitative and quantitative analysis of aroma components in fermented tobacco extracts. Transcriptomics was utilized to investigate the molecular mechanism underlying aroma production during YT-3 fermentation. **[Results]** Post-fermentation, both aroma quality and quantity of fermented tobacco extracts were significantly enhanced. The concentrations of phenylethanol, acetoin, 3-hydroxy- β -ionone, and megastigmatrienone increased by 55.62%, 50.15%, 17.81%, and 39.93%, respectively. Transcriptomic analysis identified 1552 differentially expressed genes (DEGs), comprising 746 upregulated and 806 downregulated genes. DEGs showed significant enrichment in pathways including amino acid metabolism, butyric acid metabolism, and carotenoid degradation product synthesis. Genes such as aryl alcohol dehydrogenase (*ADH*), phenylacetaldehyde dehydrogenase (*feaB*), α -acetyl lactate synthase (*ilv*), acetoin-forming diacetyl reductase (*budC*), and 6-phosphate- β -glucosidase (*bglA*) are critically involved in the biosynthesis of key aroma components in fermented tobacco extracts. **[Conclusion]** *E. hormaechei* YT-3 efficiently synthesizes aroma components using substrates in tobacco extracts, providing a novel approach to further enhance aroma quality.

Key words: *Enterobacter hormaechei* YT-3; tobacco extract; aroma components; gas chromatography-mass spectrometry; transcriptome analysis

[责任编辑: 王晓波 刘春奎]