



王祯,许怡娟,刘晨,等. 基于宏基因组学技术的发酵陕西烟叶混合菌开发[J]. 轻工学报,2025,40(6): 87-97.

WANG Z,XU Y J,LIU C,et al. Development of a mixed bacterial strain for fermentation of Shaanxi tobacco leaves based on metagenomic technology[J]. Journal of Light Industry,2025,40(6):87-97.

DOI:10.12187/2025.06.009

基于宏基因组学技术的发酵陕西烟叶混合菌开发

王祯¹,许怡娟²,刘晨¹,宋凯¹,魏进彬¹,臧志鹏¹,胡威²,毛多斌²

1. 甘肃烟草工业有限责任公司 技术中心,甘肃 兰州 730050;

2. 郑州轻工业大学 烟草科学与工程学院,河南 郑州 450001

摘要:【目的】提高陕西省产烟叶感官品质和可用性。【方法】利用宏基因组学技术分析苏云金芽孢杆菌 116 (*Bacillus thuringiensis* 116) 发酵期间烟丝表面微生物的动态变化,探究优势菌株在烟丝发酵中的作用及其与烟丝香气成分的关联性,并据此筛选最优混菌发酵配方。【结果】苏云金芽孢杆菌 116 发酵烟丝 SXZL 过程中,烟丝表面微生物的优势菌属为鞘氨醇单胞菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、科萨克氏菌属、泛菌属和甲基杆菌属,芽孢杆菌属、土地芽孢杆菌属、肠杆菌属和科萨克氏菌属的相对丰度与 3-氧代- α -紫罗兰醇、巨豆三烯酮、大马酮等香气成分含量均呈正相关,芽孢杆菌属与土地芽孢杆菌属、肠杆菌属、科萨克氏菌属等的相对丰度均呈正相关;相较于单菌发酵,经苏云金芽孢杆菌 116 与芽孢杆菌 Y7 混合发酵后,烟丝烟气浓度及状态提升,透发性更好,甜感增加,余味舒适性有所改善,大马酮、东莨菪内酯和 3-氧代- α -紫罗兰醇的含量分别增加了 140.10%、133.51%和 104.51%,3-氧代- α -紫罗兰醇、4-羟基- β -二氢大马酮、姜黄酮和贝壳杉醛的含量变化率明显升高。【结论】采用混合菌发酵烟丝,能显著增加烟丝的香气成分含量,提高卷烟的感官质量。

关键词:宏基因组学;陕西烟叶;混合菌发酵;香气成分;苏云金芽孢杆菌

中图分类号:TS41⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2025)06-0087-11

0 引言

微生物发酵是改善烟叶品质、缩短醇化周期的重要手段之一^[1-2]。研究发现,芽孢杆菌、小球菌等细菌^[3],以及镰刀菌、酵母菌等真菌^[4]对烟叶具有增香提质的效果。郑坚强等^[5]利用酵母菌液(*Schwanniomyces occidentalis*)发酵烟叶时,其香气

质、香气量及烟叶品质均得到提升。目前,利用单菌株改善烟叶吸食品质的研究已有大量报道^[6-9],但对于某些烟叶,单菌株发酵往往达不到理想的效果。研究发现,混合菌株发酵后,烟叶香味成分含量有所增加^[10],烟叶表面与大分子物质降解相关的酶的活性升高^[11],卷烟的吸食品质得到显著提高^[12]。然而,混合菌株发酵存在工作量大、菌株类

收稿日期:2024-07-01;修回日期:2024-10-17;出版日期:2025-12-15

基金项目:中国烟草总公司重点研发项目(110202202006);甘肃烟草工业有限责任公司重点科技项目(2021620000370249)

作者简介:王祯(1991—),女,甘肃省天水市人,甘肃烟草工业有限责任公司工程师,主要研究方向为烟草微生物及香精香料。

E-mail:wangzhen@gslycf.com

通信作者:毛多斌(1962—),男,河南省南阳市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为烟草化学与烟草生物技术。

E-mail:duobinmao@126.com

型、数量和比例难以量化等问题。截至目前,混合菌株发酵原则和依据尚不清楚,发酵机制尚不明确,这限制了混合菌株在烟叶发酵中的应用。

芽孢杆菌属是烟叶表面优势菌属之一^[13-14]。研究发现,经蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[15]、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)^[16-17]、西姆芽孢杆菌(*B. siamensis*)^[18]等芽孢杆菌属发酵后,能明显提高烟叶的香气量和吸食品质。然而,芽孢杆菌属对陕西烟叶品质的影响尚不清楚。为解决陕西省产烟叶普遍存在的香气质差、青杂气较重等问题^[19-20],本研究拟采用宏基因组学技术分析苏云金芽孢杆菌 116(*B. thuringiensis* 116)发酵期间陕西烟叶表面微生物群落和功能变化,通过探究不同细菌类群之间及细菌类群与烟叶香气成分的相关性,开发对烟叶品质具有显著改善效果的混合菌株配方,以期对烟用混合菌株的开发及烟叶品质的提升提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

1)实验材料:蛋白胨、酵母粉,赛默飞世尔科技公司;氯化钠,天津市风船化学试剂科技有限公司;琼脂,北京索莱宝科技有限公司;甘油,BBI 生命科学有限公司;二氯甲烷,山东禹王和天下新材料有限公司;无水硫酸钠、盐酸、氢氧化钠,烟台市双双化工有限公司;磷酸,安徽六国化工股份有限公司;二水合磷酸二氢钠,天津市科密欧化学试剂有限公司;乙腈(色谱级),天津市四友卓越科技有限公司);烟叶制成的烟丝 SXZL,陕西中烟工业有限责任公司技术中心;苏云金芽孢杆菌 116,来自郑州轻工业大学烟草科学与工程学院烟草源菌种资源库,已经前期实验验证可用于提升烟丝 SXZL 的吸食品质。

2)酸性缓冲液:6 mg/mL 磷酸,0.1 g/mL 二水合磷酸二氢钠。

3)培养基:LB 液体培养基为 1%蛋白胨、1%氯化钠和 0.5%酵母粉;LB 固体培养基为 1%蛋白胨、1%氯化钠、0.5%酵母粉和 2%琼脂。均需进行高压蒸汽灭菌。

1.2 主要仪器与设备

DHP-9162 型恒温恒湿培养箱,太仓市科教器械厂;TH2-C 型恒温摇床,太仓市试验设备厂;UV-1500 型紫外分光光度计,上海美析仪器有限公司;5810R 型超高速冷冻离心机,德国艾本德有限公司;7890B-5973N 型气相色谱-质谱(GC-MS)联用仪,美国安捷伦科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 烟丝发酵 取出保存于-80℃环境的苏云金芽孢杆菌 116,梯度复活后,以 1%接种量接种于 15 mL LB 液体培养基中,在 150 r/min、30℃条件下培养 6~8 h,得到活化液;取 100 μL 活化液涂布于 LB 固体培养基平板上,在 30℃条件下培养 10~12 h;挑取单菌落于 15 mL LB 液体培养基中,在 150 r/min、30℃条件下培养 6~8 h,再以 1%的接种量接种于 30 mL LB 液体培养基中,以相同条件培养至 OD_{600} 为 0.8~1.0;在 4℃、8000 r/min 条件下离心 10 min,将菌体沉淀用等体积无菌水复溶后,以相同条件离心,再用 2 倍体积无菌水对菌体沉淀复溶,得到发酵液;用烟丝 SXZL 质量 15%的发酵液均匀喷施烟丝 SXZL 后,于 35℃条件下发酵 36 h,再用烘丝机在 160℃条件下烘干至含水率为 12%左右。

1.3.2 感官评吸 将发酵好的烟丝 SXZL 用手动卷烟器卷制成卷烟,于 22℃、相对湿度 60%的恒温恒湿培养箱中平衡 48 h 后,组织 9 人评吸小组,以烟气浓度、烟气状态、香气质、香气量、透发性、甜感、杂气、刺激性、余味舒适性和浸润感为指标进行评吸打分,结果取平均分。

1.3.3 香气成分提取及测定 将发酵后的烟丝 SXZL 烘干并粉碎,取 2 g 烟末与 10 mL 酸性缓冲液涡旋振荡 3 min,加入 10 mL 乙腈和 50 μL 2,6-二氯甲苯(内标),于 2500 r/min 条件下涡旋振荡 20 min;再加入 1.5 g 氯化钠和 6 g 无水硫酸镁,迅速振荡盐析;最后加入 5 mL 二氯甲烷,于 2500 r/min 条件下涡旋振荡 10 min,再于 4℃、8000 r/min 条件下离心 3 min,取上清液,加入无水硫酸钠过夜后,取 1 mL 过 0.22 μm 有机滤膜,备用。

GC 条件:122-5562DB-5 毛细管柱(60 m×250 μm×0.25 μm);进样口温度为 280 ℃;载气为 99.999%高纯氦气,流速为 1.0 mL/min;分流模式为不分流进样,进样量为 1.0 μL。升温程序为初始温度 40 ℃,保持 10 min,以 2.5 ℃/min 升温至 190 ℃,保持 25 min,以 1.5 ℃/min 升温至 270 ℃,实验结束。

MS 条件:采用 SCAN 模式,传输线温度为 280 ℃;离子源温度为 230 ℃;四极杆温度为 150 ℃;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(*z/m*)为 35~550 amu。

采用 NIST17 谱库结合内标-半定量法进行香气成分定量分析。

1.3.4 宏基因组测序 将经苏云金芽孢杆菌 116 发酵 0 h、12 h、24 h 和 36 h 的烟丝 SXZL(实验组)及未发酵的烟丝 SXZL(对照组)保存在-80 ℃条件下。将实验组和对照组烟丝送至上海派森诺生物科技股份有限公司,提取全部微生物的 DNA,构建宏基因组文库,并基于 Illumina NovaSeq 高通量测序平台进行测序分析。

运用 fastp 分析软件对测序下机的原始数据进行筛查和过滤后,使用 MEGAHIT 进行拼接。完成拼接后,使用 Prodigal 软件(<https://github.com/hyattprodigal/>)识别其中的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF),并预测其中的编码区域,从而获得对应的基因序列文件。使用基于 MMSeq2 在属分类等级的物种注释信息用于后续物种分析。基于 Spearman 相关性分析优势菌株之间、优势菌株与代表性香气成分之间的相关性。

1.3.5 混合菌株发酵 将苏云金芽孢杆菌 116 与其他具有协同作用的菌株活化后进行复配,再喷施于烟丝表面,通过感官评吸筛选出最优混菌发酵配方。

2 结果与分析

2.1 不同发酵时间下烟丝 SXZL 感官评吸结果分析

苏云金芽孢杆菌 116 发酵前后烟丝 SXZL 的感官评吸结果如图 1 所示。由图 1 可知,与对照组相比,24 h 是苏云金芽孢杆菌 116 发酵烟丝的最优发

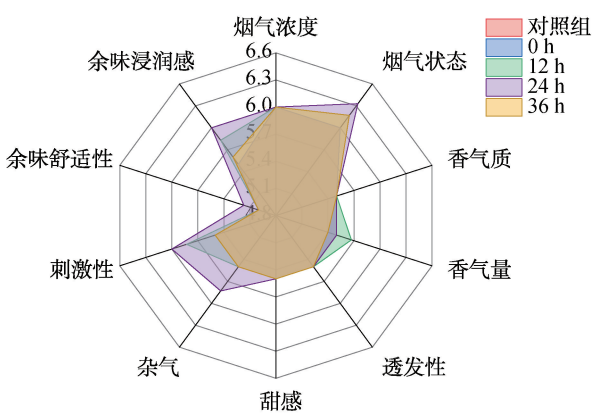


图 1 苏云金芽孢杆菌 116 发酵前后烟丝 SXZL 的感官评吸结果

Fig. 1 Sensory evaluation results of SXZL tobacco shreds pre- and post-fermentation by *B. thuringiensis* 116

酵时间,发酵后烟丝的感官评吸总分提高了 1.33 分,杂气和刺激性明显降低,香气质、余味舒适性和浸润感提高,烟丝 SXZL 的吸食品质提升。因此,选择最优发酵时间为 24 h。

2.2 不同发酵时间下烟丝 SXZL 香气成分分析

不同发酵时间下烟丝 SXZL 香气成分分析结果见表 1。由表 1 可知,共检测到 18 种香气成分。相比 0 h,发酵 24 h 后烟丝的香气成分变化明显,有 11 种化合物含量增加,有 7 种化合物含量降低。部分香气成分含量增加较明显,如大马酮增加了 162.84%,茄酮增加了 65.83%,2,3-二氢-2-甲基苯并呋喃增加了 58.48%,4-(3-羟基丁基)-3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮增加了 38.21%,法尼基丙酮增加了 34.54%,3-丁基吡啶增加了 24.68%。其中,大马酮具有类似玫瑰的清甜香气,茄酮具有新鲜萝卜样香味^[21]。这些香气成分有利于提升烟丝 SXZL 的吸食品质^[7],与感官评吸结果一致。

2.3 发酵烟丝表面微生物群落组成及差异分析

为了探究发酵前后烟丝表面微生物的群落变化,使用维恩(Venn)图对细菌物种数量(种水平)进行统计分析,结果如图 2 所示。由图 2 可知,对照组、0 h、12 h、24 h 和 36 h 发酵烟丝中,共有细菌物种 1849 个。对照组中有 390 个特有物种,0 h、12 h、24 h 和 36 h 发酵烟丝中特有物种分别为 89 个、80 个、41 个和 31 个,随着发酵时间的增加呈逐渐递减的变化趋势。为进一步探究不同发酵时间烟丝

表 1 不同发酵时间下烟丝 SXZL 香气成分分析结果

Table 1 Analysis of aroma components in SXZL tobacco shreds at different fermentation time points

化合物名称	0 h	12 h		24 h		36 h	
	含量/ (mg · g ⁻¹)	含量/ (mg · g ⁻¹)	变化率/ %	含量/ (mg · g ⁻¹)	变化率/ %	含量/ (mg · g ⁻¹)	变化率/ %
茄酮	7.989	7.747	-3.02	13.248	65.83	8.750	9.53
大马酮	0.183	0.446	144.16	0.481	162.84	0.475	160.23
对羟基苯乙醇	0.983	1.707	73.61	1.154	17.39	0.631	-35.81
2,3-二氢-2-甲基苯并呋喃	1.869	2.489	33.21	2.962	58.48	2.444	30.80
3-羟基-5,6-环氧-β-紫罗兰醇	3.587	3.978	10.92	3.912	9.08	3.793	5.75
二氢猕猴桃内酯	0.443	0.467	5.57	0.416	-6.08	0.438	-1.05
巨豆三烯酮	6.457	6.765	4.78	5.780	-10.48	7.269	12.58
4-羟基-β-二氢大马酮	4.400	4.440	0.91	4.510	2.50	3.666	-16.70
3-羟基-7,8-二氢-β-紫罗兰醇	0.227	0.202	-11.33	0.202	-11.17	0.362	58.96
3-氧代-α-紫罗兰醇	8.773	9.214	5.03	8.729	-0.50	11.738	33.80
4-(3-羟基丁基)-3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮	1.484	1.462	-1.45	2.051	38.21	1.785	20.33
6-羟基-4,4,7a-三甲基-5,6,7,7a-四氢苯并呋喃-2(4H)酮	0.797	0.470	-41.08	0.710	-10.96	0.897	12.57
3-丁基吡啶	1.086	1.137	4.69	1.354	24.68	1.287	18.53
愈创木酚	0.717	0.702	-2.09	0.868	21.04	0.771	7.56
姜黄酮	2.352	0.738	-68.60	2.493	6.01	3.107	32.13
法尼基丙酮	0.663	0.788	18.86	0.892	34.54	0.599	-9.62
贝壳杉醛	3.230	3.792	17.41	2.949	-8.71	3.224	-0.19
西柏三烯二醇	156.872	157.069	0.13	151.339	-3.53	163.600	4.29

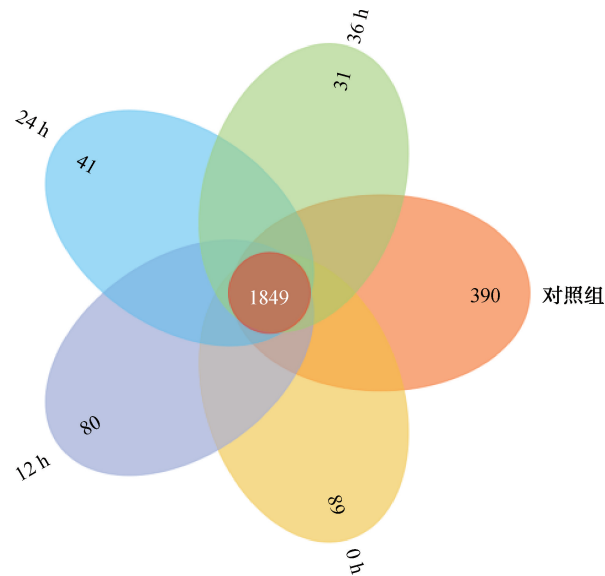


图 2 苏云金芽孢杆菌 116 发酵前后烟丝 SXZL 表面细菌物种组成 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of surface microbial species composition in SXZL tobacco shreds pre- and post-fermentation by *B. thuringiensis* 116

SXZL 表面微生物的群落组成及相对丰度变化,在属水平上进行了统计分析,结果如图 3 所示。由图 3 可知,烟丝 SXZL 表面微生物的优势菌属为鞘氨醇

单胞菌属(*Sphingomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、科萨克氏菌属(*Kosakonia*)、泛菌属(*Pantoea*)和甲基杆菌属(*Methylobacterium*),与已有研究^[25]结果相似。在对照组中,烟丝 SXZL 表面微生物的优势菌属为假单胞菌属(24.54%),其次是鞘氨醇单胞菌属(20.64%);用苏云金芽孢杆菌 116 发酵后,烟丝 SXZL 表面微生物的优势菌属为鞘氨醇单胞菌属,其次是假单胞菌属和肠杆菌属。苏云金芽孢杆菌 116 发酵前后烟丝 SXZL 在属水平上的物种聚类热图如图 4 所示,由图 4 可知,发酵过程中,0 h、12 h、24 h、36 h 发酵烟丝中微生物的相对丰度出现了不同的变化趋势,如鞘氨醇单胞菌和假单胞菌的相对丰度随着发酵时间延长而逐渐升高;肠杆菌和芽孢杆菌的相对丰度先升高再降低,在 24 h 时相对丰度达到最大值。这表明苏云金芽孢杆菌 116 发酵可以明显改变烟丝 SXZL 表面微生物的多样性,与前期研究结果^[7]较一致。

2.4 烟丝表面微生物的 α 多样性分析

为了进一步探究苏云金芽孢杆菌 116 对烟丝 SXZL 表面微生物 α 多样性的影响,本研究采用

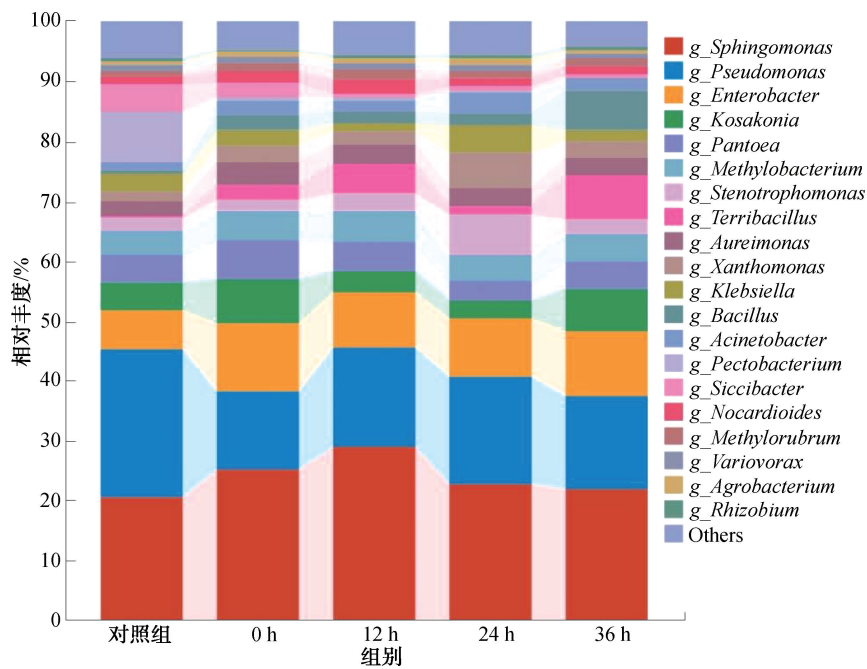


图3 苏云金芽孢杆菌 116 发酵前后烟丝 SXZL 在属水平上的物种丰度图
Fig. 3 Genus-level species abundance profile of SXZL tobacco shreds pre- and post-fermentation by *B. thuringiensis* 116

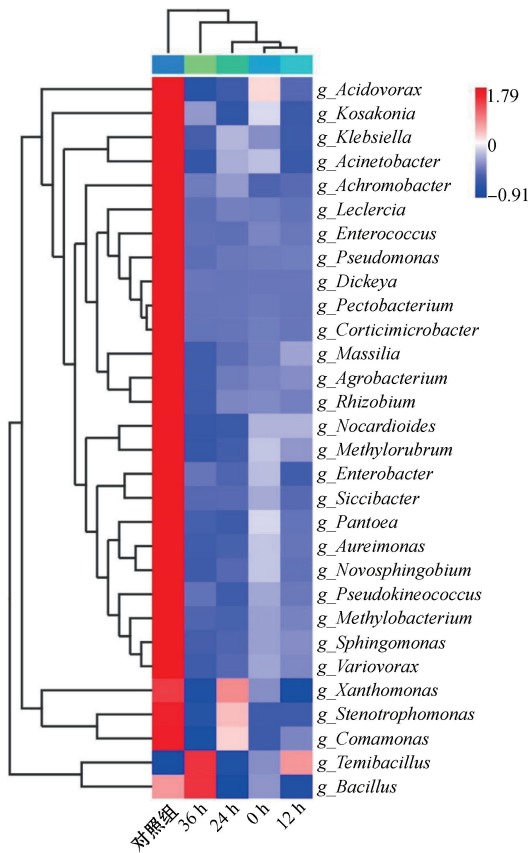


图4 苏云金芽孢杆菌 116 发酵前后烟丝 SXZL 在属水平上的物种聚类热图
Fig. 4 Hierarchical clustering heatmap of genus-level species abundance in SXZL tobacco shreds pre- and post-fermentation by *B. thuringiensis* 116

ACE、Chao1、Simpson 和 Shannon 指数来衡量样品中微生物的多样性。烟丝 SXZL 表面微生物 α 多样性指数箱线图如图 5 所示。由图 5 可知, Simpson 和 Shannon 指数在发酵后呈增高趋势, ACE 和 Chao1 指数在发酵后呈减小趋势。这表明苏云金芽孢杆菌 116 能够增加烟丝 SXZL 表面微生物的多样性, 降低微生物的丰富度。先前的研究也有类似报道, 如地衣芽孢杆菌能够增加雪茄烟叶表面微生物的多样性^[23]。

2.5 优势菌株之间的关联性分析

烟丝 SXZL 表面优势菌株之间的关联性如图 6 所示, 其中颜色偏向黄色为正相关, 偏向蓝色为负相关, 颜色越深相关性越强; *** 表示在 $P<0.001$ 水平下极显著相关, ** 表示在 $P<0.01$ 水平下显著相关, * 表示在 $P<0.05$ 水平下显著相关, 下同。由图 6 可知, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 与土地芽孢杆菌属 (*Terribacillus*) 的相对丰度呈显著正相关, 肠杆菌属 (*Enterobacter*) 与科萨克氏菌属 (*Kosakonia*) 的相对丰度呈正相关。这表明它们之间具有互利共生关系, 能共同促进烟草发酵。先前的研究也有类似报道, 如李石头等^[24] 基于宏基因组对云南烟叶表面微生物进行分析发现, 芽孢杆菌与甲基杆菌、大肠

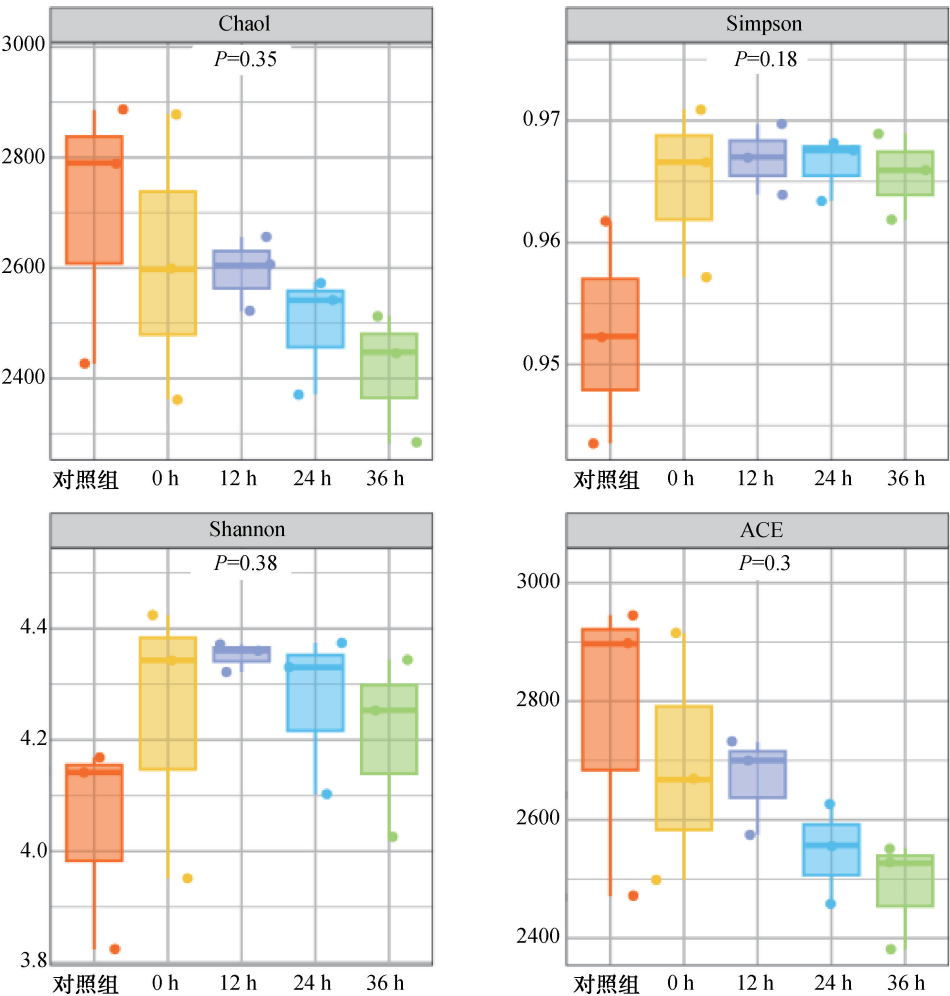


图 5 烟丝 SXZL 表面微生物 α 多样性指数箱线图

Fig. 5 Boxplots of surface microbial α-diversity indices in SXZL tobacco shreds

杆菌和假单胞菌的相对丰度呈正相关。王文婷等^[21]利用宏基因组学技术分析霍氏肠杆菌 F8-1 (*E. hormaechei* F8-1) 发酵期间烟叶表面微生物的动态变化,发现肠杆菌与芽孢杆菌、土地芽孢杆菌的相对丰度分别呈负相关关系。本研究结果与其相反,可能是由烟叶表面优势微生物类群的差异造成的。

2.6 优势菌株与香气成分之间的关联性分析

烟丝 SXZL 表面优势菌株与香气成分之间的关联性如图 7 所示。由图 7 可知,芽孢杆菌属的相对丰度与 3-氧代-α-紫罗兰醇含量呈显著正相关,与巨豆三烯酮、大马酮、姜黄酮、贝壳杉醛、愈创木酚和二氢猕猴桃内酯含量均呈正相关,与 4-羟基-β-二氢大马酮含量呈显著负相关,与法尼基丙酮、对羟基苯乙醇和 3-羟基-7,8-二氢-β-紫罗兰醇含量均呈负相关。挥发性风味物质的变化主要是由微

生物代谢引起的^[12]。先前的研究^[8]发现,经芽孢杆菌属发酵后,烟叶的吸食品质均有明显提升。芽孢杆菌属与香气成分含量之间的关联性同土地芽孢杆菌属 (*Terribacillus*) 相似,间接表明这些菌株在微生物代谢方面具有协同作用,可共同影响烟草香气成分含量的变化。

2.7 混合菌株发酵结果分析

基于上述研究结果,本研究选择烟草源菌种资源库中的芽孢杆菌属、土地芽孢杆菌属和肠杆菌属菌株与苏云金芽孢杆菌 116 复配,并进行烟丝发酵和感官评吸。

2.7.1 感官评吸结果 不同混菌发酵烟丝的感官评吸结果见表 2,混菌发酵后烟丝的感官评吸雷达图如图 8 所示。由表 2 可知,苏云金芽孢杆菌 116 与芽孢杆菌 Y7 混合发酵对烟丝 SXZL 的提质效果最好。由图 8 可知,经苏云金芽孢杆菌 116 与芽孢

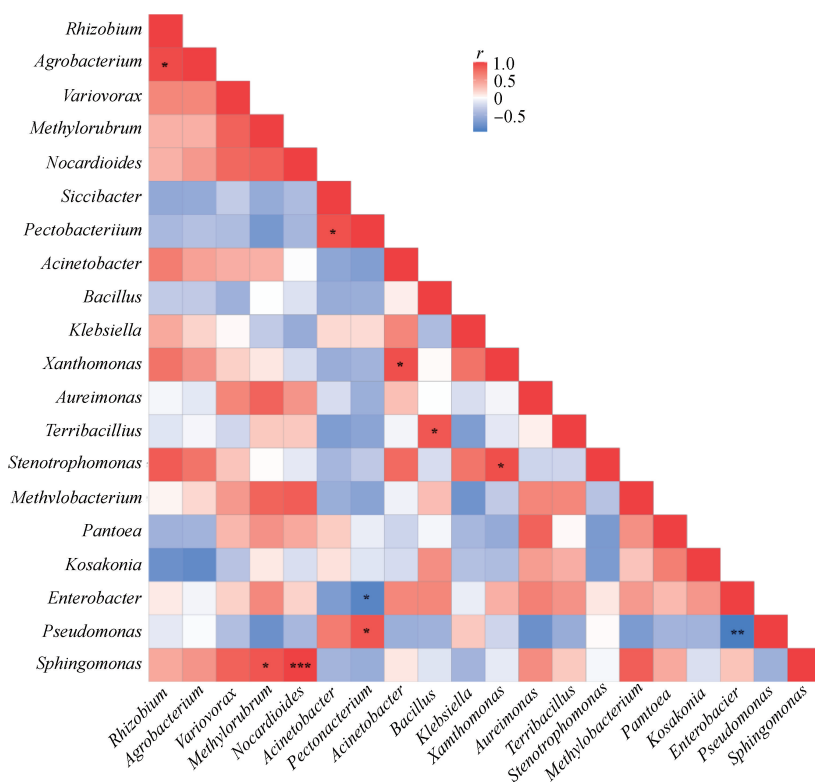


图 6 烟丝 SXZL 表面优势菌株之间的关联性

Fig. 6 Correlation network of dominant surface strains in SXZL tobacco shreds

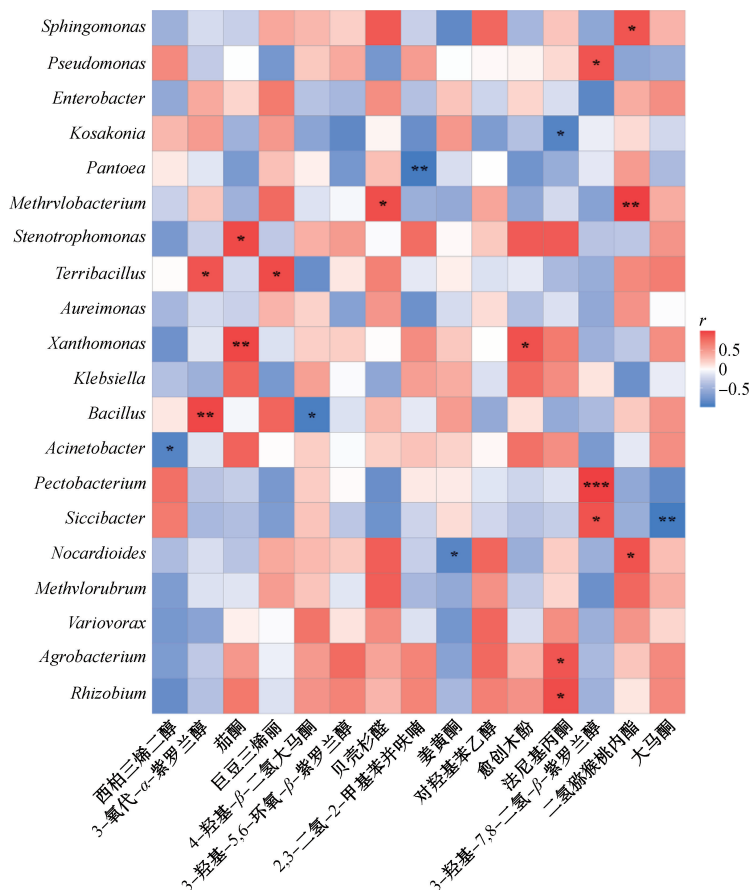


图7 烟丝 SXZL 表面优势菌株与香气成分之间的关联性

Fig. 7 Correlation between surface dominant strains and aroma components in SXZL tobacco shreds

表 2 不同混菌发酵烟丝的感官评吸结果
Table 2 Sensory evaluation results of different tobacco shreds under different mixed fermentation treatments

混菌配方	施菌比例	评吸总分/分
对照组	—	55.5
苏云金芽孢杆菌 116	—	56.5
苏云金芽孢杆菌 116+蜡状芽孢杆菌 GB4	2 : 1	56.0
苏云金芽孢杆菌 116+肠杆菌 GA3	2 : 1	56.2
苏云金芽孢杆菌 116+芽孢杆菌 GA6	2 : 1	53.9
苏云金芽孢杆菌 116+苏云金芽孢杆菌 Y5	2 : 1	52.5
苏云金芽孢杆菌 116+芽孢杆菌 Y7	2 : 1	57.0
苏云金芽孢杆菌 116+蜡状芽孢杆菌 L4	2 : 1	55.0
苏云金芽孢杆菌 116+霍氏肠杆菌 Y1	2 : 1	55.0
苏云金芽孢杆菌 116+霍氏肠杆菌 F12	2 : 1	56.0
苏云金芽孢杆菌 116+霍氏肠杆菌 F1	2 : 1	53.7
苏云金芽孢杆菌 116+肠杆菌 DB7	2 : 1	56.1

注：—表示发酵菌株为单菌，没有施菌比例；菌株 GB4、GA3、GA6 和 DB7 筛选自 2018 年曲靖产云烟 87 C3F；菌株 Y5、Y7 和 L4 筛选自 2019 年三门峡产红花大金元 B2F；菌株 Y1、F12 和 F1 筛选自 2019 年许昌产中烟 100 C3F。

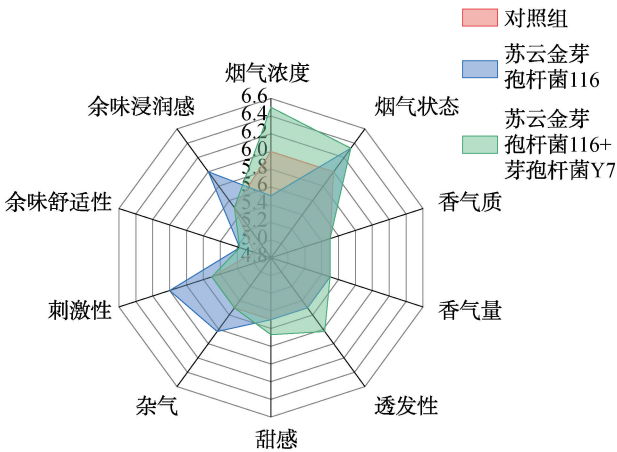


图 8 混菌发酵后烟丝的感官评吸雷达图
Fig. 8 Radar chart of sensory profiles for tobacco shreds post-mixed fermentation

杆菌 Y7 混合发酵后，烟丝 SXZL 的吸食品质提升明显，总分提高了 1.5 分，烟气浓度及状态提升，透发性更好，甜感增加，余味舒适性有所改善。这表明苏云金芽孢杆菌 116 与芽孢杆菌 Y7 混合发酵能明显改善烟丝 SXZL 的吸食品质。先前的研究中也类似报道，如黄申等^[12]采用肠杆菌 F8-2 (*E. cloacae* F8-2) 与不动杆菌 7S-2 (*Acinetobacter nosocomialis* 7S-2) 混合发酵后，山东烟叶香气增加，杂气降低明显。李萌等^[11]采用有孢汉逊酵母属 YJX 与毕赤酵母属 MG 混合发酵，可增加烟叶香气量、香气质，明显改善烟叶品质。

2.7.2 香气成分分析结果 苏云金芽孢杆菌 116 与芽孢杆菌 Y7 混合发酵烟丝的部分香气成分分析结果见表 3。由表 3 可知，经混合菌株发酵后，大马酮、东莨菪内酯、3-氧代- α -紫罗兰醇、姜黄酮、棕榈酸甲酯、贝壳杉醛、4-羟基- β -二氢大马酮、3-羟基-5,6-环氧- β -紫罗兰醇、2,3-二氢-2-甲基苯并呋喃等香气成分含量均升高，其中大马酮、东莨菪内酯和 3-氧代- α -紫罗兰醇含量均增长较高，分别较空白对照增加了 140.29%、133.50% 和 104.53%。混菌发酵与单菌发酵烟丝的部分香气成分变化率直方图如图 9 所示。由图 9 可知，与单菌发酵相比，混菌发酵后大部分香气成分含量变化率明显升高，3-氧代- α -紫罗兰醇、4-羟基- β -二氢大马酮、姜黄酮和贝壳杉醛的含量变化率明显优于单菌发酵。这些香味成分的增加可以显著增强烟香，改善吸味，调和烟气，并减少刺激感。这在先前的研究^[10]中也有类似报道。

3 结论

本文利用苏云金芽孢杆菌 116 发酵陕西省产烟丝，基于宏基因组分析烟丝表面微生物的群落变化，根据宏基因组数据分析结果，筛选混合菌株再次发酵，得到如下结论：经苏云金芽孢杆菌 116 发酵 24 h 后，烟丝 SXZL 感官品质得到明显提升，杂气和刺激性明显降低，香气质、余味舒适性和浸润感提高。大马酮、茄酮、2,3-二氢-2-甲基苯并呋喃、4-(3-羟基丁基)-3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮和法尼基丙酮和 3-丁基吡啶啉的含量较发酵前分别提高了 162.84%、65.83%、58.48%、38.21%、34.54% 和 24.68%。不同发酵时间烟丝表面微生物的优势菌属为鞘氨醇单胞菌属、假单胞菌属、肠杆菌属、科萨克氏菌属、泛菌属和甲基杆菌属，芽孢杆菌属与土地芽孢杆菌属、肠杆菌属与科萨克氏菌属的相对丰度均呈正相关，它们具有协同提高 3-氧代- α -紫罗兰醇、巨豆三烯酮、大马酮等香气成分含量的作用。经苏云金芽孢杆菌 116 与芽孢杆菌 Y7 混合发酵后，烟丝吸食品质明显提高，烟气浓度及状态提升，透发性更好，甜感增加，余味舒适性有所改善；多数香气成分含量升高，其中大马酮、东莨菪内酯、3-氧代- α -紫罗兰醇的含量分别较空白对照增加了

表3 苏云金芽孢杆菌 116 与芽孢杆菌 Y7 混合发酵烟丝的部分香气成分分析结果

Table 3 Analysis results of partial flavor components of fermented tobacco shreds by *B. thuringiensis* 116 and *Bacillus* Y7

保留时间/min	CAS 号	化合物名称	空白对照/ (mg · g ⁻¹)	混合发酵烟丝/ (mg · g ⁻¹)	变化率/%
33.45	5989-27-5	(+)-柠檬烯	2.487	1.975	-20.61
34.70	122-78-1	苯乙醛	0.152	—	—
52.97	54-11-5	烟碱	15.302	11.058	-27.73
53.35	20307-84-0	δ-榄香烯	68.381	61.666	-9.82
54.60	23696-85-7	大马酮	0.192	0.461	140.10
57.61	501-94-0	对羟基苯乙醇	0.996	0.840	-15.58
58.83	1746-11-8	2,3-二氢-2-甲基苯并呋喃	3.294	3.552	7.82
61.08	14901-07-6	β-紫罗兰酮	1.221	1.193	-2.24
61.35	156747-45-4	4,5,9,10-脱氢-异长叶烯	0.300	0.313	4.27
61.50	172705-14-5	3-羟基-5,6-环氧-β-紫罗兰醇	3.756	4.110	9.40
62.54	17092-92-1	二氢猕猴桃内酯	0.759	0.589	-22.37
63.75	28343-22-8	菜籽多酚	1.017	—	—
63.75	4055-72-5	6-羟基丁香酚	0.940	0.969	3.09
64.64	38818-55-2	巨豆三烯酮	5.609	4.927	-12.16
66.20	102488-09-5	4-羟基-β-二氢大马酮	2.487	3.195	28.47
67.62	34318-21-3	3-氧代-α-紫罗兰醇	4.913	10.048	104.51
67.94	22868-60-6	5-(1-哌啶)-2-呋喃甲醛	2.607	1.972	-24.38
70.31	36151-02-7	4-(3-羟基丁基)-3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮	2.358	1.832	-22.30
77.04	504-96-1	新植二烯	100.548	79.979	-20.46
78.22	502-69-2	植酮	—	0.635	—
79.74	68-26-8	视黄醇	2.852	2.521	-11.60
80.59	100347-96-4	姜黄酮	2.704	4.426	63.72
82.31	762-29-8	金合欢基丙酮	3.251	—	—
82.31	1113-21-9	香叶基芳樟醇	1.855	1.810	-2.40
83.45	112-39-0	棕榈酸甲酯	3.561	4.597	29.10
83.70	1898-13-1	西松烯	9.037	0.386	-95.73
86.49	92-61-5	东莨菪内酯	1.865	4.355	133.51
86.90	57-10-3	十六烷酸	52.273	50.628	-3.15
96.54	7220-78-2	西柏三烯二醇	209.691	162.284	-22.61
103.56	14046-84-5	贝壳杉醛	5.313	6.846	28.86

注:—表示未检测出。

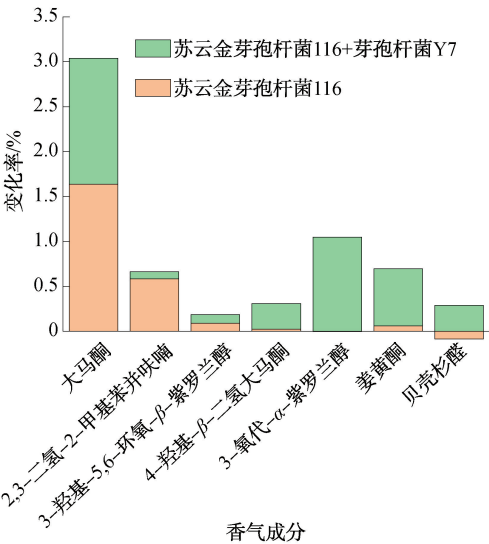


图9 混菌发酵与单菌发酵烟丝的部分香气成分变化率直方图

Fig. 9 Histogram of the change rate of some aroma components in mixed-bacteria fermentation and single-bacteria fermentation tobacco shreds

140.10%、133.51%和104.51%;与单菌发酵相比,混菌发酵后3-氧代-α-紫罗兰醇、4-羟基-β-二氢大马酮、姜黄酮和贝壳杉醛的含量变化率明显升高。本文为混合菌株发酵的研发提供了参考,为微生物发酵烟叶的提质技术提供了新视角。后续研究可基于菌株协同作用关系进行3菌株及以上混菌发酵剂的开发。

参考文献:

[1] 曾晓鹰,杨金奎,段焰青,等.烟叶生物酶活性与其等级和醇化时间的相关性[J].烟草科技,2009,42(5):48-51.

ZENG X Y, YANG J K, DUAN Y Q, et al. Enzyme activities in flue-cured tobacco and their correlations with tobacco grades and aging duration[J]. Tobacco Science & Technology, 2009, 42(5): 48-51.

- [2] HU W, YUAN J X, FEI J X, et al. Shaping the future of tobacco through microbial insights: A review of advances and applications [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2025, 13: 1548323.
- [3] 王祯, 刘晨, 王文婷, 等. 醇化烟叶表面细菌筛选及增香效应研究[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(22): 151-156.
WANG Z, LIU C, WANG W T, et al. Screening and application of aroma-enhancing bacteria on the surface of aging tobacco leaf [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(22): 151-156.
- [4] 朱东来, 谢俊秋, 胡巍耀, 等. 产香真菌分离代谢及其在烟叶醇化中的应用[J]. *食品工业*, 2013, 34(3): 154-159.
ZHU D L, XIE J Q, HU W Y, et al. Screening and metabolism of flavor producing fungus and its application in tobacco leaf aging [J]. *The Food Industry*, 2013, 34(3): 154-159.
- [5] 郑坚强, 田数, 帖金鑫, 等. 西方许旺酵母菌及其双加氧酶在烟草增香中的应用[J]. *湖北农业科学*, 2016, 55(21): 5612-5617.
ZHENG J Q, TIAN S, TIE J X, et al. Experiments on enhancement of the aroma of tobacco from *Schwanniomyces occidentalis* and dioxygenase [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2016, 55(21): 5612-5617.
- [6] 范坚强, 周彬, 宋纪真, 等. 片烟黑曲霉菌株产纤维素酶的条件优化及酶的分离纯化[J]. *浙江农业学报*, 2012, 24(6): 1122-1128.
FAN J Q, ZHOU B, SONG J Z, et al. Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* separated from tobacco and its separation and purification [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2012, 24(6): 1122-1128.
- [7] 毛多斌, 黄晓玉, 周利峰, 等. 枯草芽孢杆菌分离鉴定及其对烟叶化学成分和吸味品质的影响[J]. *烟草科技*, 2022, 55(8): 10-19.
MAO D B, HUANG X Y, ZHOU L F, et al. Isolation and identification of a *Bacillus subtilis* strain and its effects on chemical composition and sensory quality of tobacco leaves [J]. *Tobacco Science & Technology*, 2022, 55(8): 10-19.
- [8] 陈德鑫, 许家来, 马志远, 等. 一株新的具有高效降低烟碱含量的短小芽孢杆菌 MK21 的分离筛选及作用研究[J]. *中国烟草学报*, 2013, 19(1): 60-64.
CHEN D X, XU J L, MA Z Y, et al. Isolation and screening of a new *Brevibacillus brevis* strain MK21 with high nicotine degradation effect [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2013, 19(1): 60-64.
- [9] 林智慧, 邓新发, 王雪仁, 等. 一株高效烟碱降解内生菌的分离及降解特征研究[J]. *中国烟草科学*, 2021, 42(1): 79-85.
LIN Z H, DENG X F, WANG X R, et al. Isolation and degradation characteristics of an entophytic nicotine-degrading bacterial strain in tobacco [J]. *Chinese Tobacco Science*, 2021, 42(1): 79-85.
- [10] 毛亚浩, 张彤彤, 余君, 等. 混菌发酵对雪茄烟叶化学成分及香气品质的影响[J]. *湖北农业科学*, 2023, 62(4): 140-145.
MAO Y H, ZHANG T T, YU J, et al. Effects of mixed fermentation on chemical components and aroma quality of cigar tobacco leaves [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2023, 62(4): 140-145.
- [11] FANG H, ZHAO C, LI Y C, et al. Multi-omics study on the mixed culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* with improved lignocellulase production [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2024, 190: 107374.
- [12] 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.
- [13] ZHAO M Q, WANG B X, LI F X, et al. Analysis of bacterial communities on aging flue-cured tobacco leaves by 16S rDNA PCR-DGGE technology [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 73(6): 1435-1440.
- [14] DI GIACOMO M, PAOLINO M, SILVESTRO D, et al. Microbial community structure and dynamics of dark fire-cured tobacco fermentation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 825-837.
- [15] 梁开朝, 辛玉华, 张鸽, 等. 产香细菌的筛选及香气成分分析[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2019, 34(2): 271-276.
LIANG K C, XIN Y H, ZHANG G, et al. Screening of the aroma-producing strain and its key aroma compounds analysis [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2019, 34(2): 271-276.
- [16] 瞿娇娇, 邹晓, 张晓敏, 等. 枯草芽孢杆菌对烟叶主要致香物质的影响[J]. *贵州农业科学*, 2014, 42(6): 150-153.
QU J J, ZOU X, ZHANG X M, et al. Effects of *Bacillus subtilis* on main aroma substances in tobacco leaves [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2014, 42(6): 150-153.
- [17] 王芳, 欧明毅, 杨超, 等. 茅台酒致香微生物对烟叶致香成分影响[J]. *贵州农业科学*, 2018, 46(6): 89-93, 97.
WANG F, OU M Y, YANG C, et al. Effect of different aroma microbes extracted from Moutai distiller's yeast on aroma components in tobacco [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2018, 46(6): 89-93, 97.
- [18] 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.
CHEN X, ZHANG T D, DANG L Z, et al. Study on improving tobacco quality by using *Bacillus siamensis* [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2016, 31(2): 322-327.

[19] 刘海轮,马超,胡颖梅,等. 陕西烟叶品质特性研究[J]. 陕西农业科学,2022,68(9):74-80.
LIU H L, MA C, HU Y M, et al. Study on quality of flue-cured tobacco cultivars in Shaanxi[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2022, 68(9):74-80.

[20] 王健强,刘云,孙渭. 陕西环秦岭烟叶生态与质量特色评价与定位研究[J]. 现代农业科技,2016(18):9-10,13.
WANG J Q, LIU Y, SUN W. Research on evaluation and orientation of ecological and quality characteristics of flue-cured tobacco around Qinling Mountains in Shaanxi[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2016(18):9-10, 13.

[21] 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. Macrogenomics-based investigation of the mechanism underlying tobacco fermentation by *Enterobacter hormaechei*[J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(1):79-89.

[22] 吴鑫颖. 烟叶醇化过程的动态解析及功能微生物研究[D]. 无锡:江南大学,2022.
WU Y. Dynamic analysis of flue-cured tobacco in aging process and study of functional microorganisms[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.

[22] 宋雯,陈曦,余君,等. 地衣芽孢杆菌对雪茄烟叶发酵产香及菌群演替的影响[J]. 湖南农业科学,2023(8):69-75.
SONG W, CHEN X, YU J, et al. Effect of *Bacillus licheniformis* on the fermentation and flavor production of cigar tobacco and flora succession[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2023(8):69-75.

[24] 李石头,潘凡达,黄晓玉,等. 基于宏基因组学的不同陈化时间烟草源功能微生物筛选[J]. 轻工学报,2023,38(1):101-109.
LI S T, PAN F D, HUANG X Y, et al. Screening of tobacco-derived functional microorganisms with different aging time based on metagenomics[J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(1):101-109.

Development of a mixed bacterial strain for fermentation of Shaanxi tobacco leaves based on metagenomic technology

WANG Zhen¹, XU Yijuan², LIU Chen¹, SONG Kai¹, WEI Jinbin¹, ZANG Zhipeng¹, HU Wei², MAO Duobin²

1. Technology Center, China Tobacco Gansu Industrial Co., Ltd., Lanzhou 730050, China;

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

Abstract: **[Objective]** To enhance the sensory quality and industrial usability of Shaanxi-origin tobacco leaves. **[Methods]** Metagenomic sequencing was employed to characterize the dynamic shifts in surface microbiota of tobacco filaments during *Bacillus thuringiensis* 116 fermentation. This approach aimed to elucidate the functional roles of dominant strains and their correlations with aroma compound profiles, facilitating the identification of optimal mixed-strain fermentation formulations. **[Results]** During *B. thuringiensis* 116 fermentation of SXZL tobacco filaments, the dominant bacterial genera included *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Pantoea*, and *Methylobacterium*. Positive correlations were observed between the relative abundances of *Bacillus*, *B. terrae*, *Enterobacter*, and *Kosakonia* and the concentrations of 3-oxo- α -ionol, megastigmatrienone, and damascenone. *Bacillus* abundance also showed positive correlations with *B. terrae*, *Enterobacter*, and *Kosakonia*. Compared to single-strain fermentation, co-fermentation with *B. thuringiensis* 116 and *Bacillus* Y7 improved smoke intensity and quality, enhanced aroma volatility, increased sweetness, and refined aftertaste comfort. The concentrations of damascenone, scopoletin, and 3-oxo- α -ionol increased by 140.10%, 133.51%, and 104.51%, respectively. Significant elevations were also noted in the relative changes of 3-oxo- α -ionol, 4-hydroxy- β -dihydrodamascone, curcumin, and kauraldehyde. **[Conclusion]** Mixed-strain fermentation significantly increases aroma compound concentrations in tobacco filaments and improves the sensory quality of cigarettes.

Key words: metagenomics; Shaanxi tobacco leaves; mixed fermentation; fragrance component; *Bacillus thuringiensis*

[责任编辑:杨晓娟 刘春奎]