



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.
DOI: 10. 12187/2023. 01. 012

基于宏基因组学的不同陈化时间烟草源功能微生物筛选

李石头¹, 潘凡达¹, 黄晓玉², 闫茗熠³, 田雨农¹, 廖付¹, 王辉¹, 吴继忠¹

1. 浙江中烟工业有限责任公司 技术中心, 浙江 杭州 310024;
2. 湖南中烟工业有限责任公司 常德卷烟厂, 湖南 常德 415006;
3. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001

摘要: 利用宏基因组学解析云南烟叶在不同陈化时间表面微生物群落结构及功能基因演替, 跟踪烟叶陈化过程中的中性香味成分动态变化, 分析微生物、酶基因与中性香味成分的相关性, 并指导筛选烟草源功能微生物。结果表明: 在烟叶陈化第 3、6、9 和 12 个月时, 其表面优势菌属分别为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*); 陈化过程中烟叶的中性香味成分如苯甲醇、苯乙醛、2-乙酰基吡咯、茄酮、大马酮、巨豆三烯酮等总体呈增长趋势, 糠醛和 β -环柠檬醛则呈现先增加后降低的趋势, 烃类化合物含量呈下降趋势; 克雷伯菌属(*Klebsiella*)与 β -大马酮、巨豆三烯酮和茄酮等呈显著正相关, 不动杆菌属(*Acinetobacter*)与 2-乙酰基呋喃、芳樟醇、巨豆三烯酮呈显著正相关, 大部分碳水化合物活性酶与苯乙醛、苯甲醛、糠醇和西柏烯等成分呈负相关, 多数糖苷酶与中性香味成分呈正相关; 在烟叶陈化过程中共筛选得到 75 株微生物, 微生物种类及其功能与宏基因组分析结果基本吻合, 说明宏基因组分析结果可以指导微生物筛选工作, 增强筛选目的性, 提高筛选效率。

关键词: 宏基因组; 烟草源; 功能微生物; 陈化时间; 筛选

中图分类号: TS414 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2023)01-0012-09

0 引言

宏基因组测序技术可监测分析特定生态环境下微生物的群落结构和基因信息^[1]。通过宏基因组学还能够分析特定环境中微生物与环境、微生物与宿主之间的关系, 挖掘具有特定功能的基因^[2]。目

前, 已有研究^[3-4]利用宏基因组分析揭示了环境中微生物的物种多样性和遗传多样性, 挖掘具有应用价值的基因资源。F. Wang 等^[5]借助宏基因组测序技术对陈化烤烟表面的细菌多样性进行研究, 发现陈化烤烟表面的优势菌可分为 48 属、36 科、7 门, 细菌群落具有广泛的参与香味物质合成及尼古丁、亚

收稿日期: 2022-10-08

基金项目: 中国烟草总公司重点研发项目(中烟办(2020)66号, 中烟办(2022)111号)

作者简介: 李石头(1986—), 男, 河南省叶县人, 浙江中烟工业有限责任公司工程师, 主要研究方向为烟草化学与卷烟产品研发。E-mail: lishitou@zjtobacco.com

通信作者: 吴继忠(1981—), 男, 江苏省南京市人, 浙江中烟工业有限责任公司高级工程师, 主要研究方向为卷烟产品开发及工艺研究。E-mail: wujizhong@zjtobacco.com

硝酸盐等有害化合物降解的功能特征。R. E. Tyx 等^[6]利用宏基因组测序技术研究无烟烟草制品中细菌群落的多样性和分类,发现无烟烟草制品主要包含放线菌门和厚壁菌门。常安然等^[7]借助宏基因组测序技术对现蕾期烟草根际土壤细菌群落的组成和结构进行研究,检测到 25 个门的 76 类菌属,其中鞘氨醇单胞菌属、*Flavisolibacter* 等是烟草根际土壤细菌的优势菌属。

在烟叶陈化过程^[8-9]中,微生物对烟叶品质具有至关重要的影响^[10-11]。借助微生物分离驯化技术筛选源于不同烟草化学环境的微生物^[12],可获得催化降解烟草生物大分子^[13]、催化转化烟草香味前体物^[14-15]及可降低烟叶刺激性、去除杂气^[16]的功能微生物。功能微生物的筛选一般分为初筛和复筛,传统的筛选方法一般是借助稀释涂布法和平板划线法,选择特定的培养基对功能微生物进行产物或者风味筛选。然而,烟叶表面可培养微生物占比约为 1%,高达 99% 的微生物物种及其功能尚属未知,因此深入挖掘烟叶表面微生物和基因资源,针对烟草行业对产品的特殊需求(例如风味、香气等)筛选功能菌株^[17-19],可为后续微生物发酵处理烟叶提供更丰富的菌株。

基于此,本文拟使用宏基因组学方法,结合传统微生物技术、气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术,研究云南烟叶不同陈化时间表面微生物群落和功能基因变化,探究其与烟叶中性香味成分的关联,并基于宏基因组分析结果指导烟草源功能微生物筛选,以期筛选到更多能增香提质、改善烟叶吸味品质的烟草源功能微生物。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

主要试剂:二氯甲烷,山东禹王宏和天下新材料有限公司产;无水硫酸钠,天津市天达净化材料精细化工厂产;盐酸,永清县永飞化学试剂有限公司产;氢氧化钠,北科化学(天津)有限责任公司产;琼脂,北京索莱宝科技有限公司产,酵母粉、蛋白胨,赛默飞世尔科技公司产;氯化钠,天津市风船化学试剂科技有限公司产;无水乙醇,天津市富宇精细化工有限

公司产;甘油,BBI Life Sciences 公司产;果胶(纯度 $\geq 74\%$)、酪蛋白、可溶性淀粉、 β -胡萝卜素(纯度 $\geq 96\%$),上海麦克林生化科技有限公司产;叶黄素(纯度 $\geq 80\%$),上海源叶生物科技有限公司产;西柏烯(2,7,11-西柏三烯-4,6-二醇)(纯度 $\geq 98\%$),郑州轻工业大学烟草行业生物技术重点实验室自制。

主要仪器:HH-S2 型数显恒温水浴锅,江苏金怡仪器科技有限公司产;LDZX-50 KBS 型高压蒸汽灭菌锅,郑州利研仪器设备有限公司产;IS-RSDA 型恒温摇床,上海博迅实业有限公司产;J6-MI 型冷冻高速离心机,郑州利研仪器设备有限公司产;2500Y 型高速多功能粉碎机,永康市铂欧五金制品有限公司产;Agilent 8890 型 GC-MS 联用仪,美国 Agilent 公司产。

烟叶样品:云南曲靖 B3F 烟叶样品(2020 年云烟 87, B3F 级,未经复烤),陈化时间分别为 3 个月、6 个月、9 个月、12 个月,对应样品编号为 A1~A4,保存在恒温恒湿库房,储存环境温度 26℃,空气相对湿度 60%,烟叶水分含量为 14%~15%,由浙江中烟工业有限责任公司技术中心提供(烟叶用自封袋密封,冷链运输)。烟叶浓缩液 TS-006,由河南卷烟工业烟草薄片有限公司提供。

LB 液体培养基:蛋白胨 10 g/L, NaCl 20 g/L, 酵母粉 5 g/L。LB 固体培养基:LB 液体培养基,琼脂粉 20 g/L。无机盐培养基:Na₂HPO₄ 4 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.03 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, NaCl 1 g/L, NH₄NO₃ 1 g/L, CaCl₂ 0.02 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.003 7 g/L, CoCl₂·6H₂O 0.002 5 g/L, H₃BO₃ 0.057 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.04 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.043 g/L, MnSO₄·5H₂O 0.043 g/L。蛋白质降解菌筛选培养基:无机盐培养基,琼脂粉 20 g/L,酪蛋白 2 g/L。淀粉降解菌筛选培养基:无机盐培养基,琼脂粉 20 g/L,淀粉 2 g/L。果胶降解菌筛选培养基:无机盐培养基,琼脂粉 20 g/L,果胶 2 g/L。西柏烯降解菌筛选培养基:无机盐培养基,琼脂粉 20 g/L,西柏烯 1 g/L。 β -胡萝卜素降解菌筛选培养基:无机盐培养基, β -胡萝卜素 1 g/L。叶黄素降解菌筛选培养基:无机盐培养基,叶黄素 1 g/L。

1.2 实验方法

1.2.1 烟叶微生物宏基因组分析 称取 40 g 烟叶,剪碎后置于 500 mL PBS 溶液(0.1 mol/L、pH 值为 7.0)中,在 37 °C、200 r/min 条件下振荡 30 min,然后于超净工作台中,用双层纱布过滤两次。将所得滤液在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 10 min,收集沉淀即为烟叶表面微生物,-80 °C 冷冻保存。微生物基因组提取、PCR 扩增、文库构建、上机测序及数据常规分析由上海生工生物工程股份有限公司完成。基于测序所得数据进行不同陈化时间烟叶表面微生物的宏基因组分析。

1.2.2 烟叶中性香味成分的提取与分析 采用同时蒸馏萃取法进行样品前处理,将烟叶样品粉碎,过 40 目筛,同时蒸馏萃取装置一端接盛有 400 mL 蒸馏水、30 g 烟末的 1000 mL 圆底烧瓶,另一端接盛有 80 mL 二氯甲烷的 250 mL 烧瓶,于 60 °C 恒温水浴条件下加热 2.5 h。收集有机相,加入无水硫酸钠进行干燥直至溶液澄清,参考黄申等^[20]的方法提取萃取液中的中性香味成分进行 GC-MS 分析。每个样品重复实验 3 次。

GC-MS 分析条件:色谱柱为 HP-5 MS 毛细管柱(60 m×250 μm×0.25 μm);进样口温度 240 °C;载气 He,流速 1.0 mL/min,不分流进样,进样量为 1.0 μL。升温程序为 50 °C 保持 4 min,3 °C/min 升温至 70 °C 保持 5 min,2 °C/min 升温至 100 °C 保持 17 min 后,继续升温至 120 °C 保持 10 min,再以 6 °C/min 升温至 280 °C。质谱条件为电子轰击(EI)电离方式,电子能量 70 eV;溶剂延迟 10 min;全扫描检测,扫描质量范围为 35~500 amu。

1.2.3 功能微生物的筛选与鉴定 功能微生物的筛选。称取 5 g 烟叶样品于 100 mL 无菌水中,于 30 °C、120 r/min 条件下摇床培养 3 h。将悬液以 1%接种量接种至 LB 液体培养基,于 30 °C、120 r/min 条件下摇床培养 10 h,得到菌源。将菌源进行梯度稀释(10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6} ,分别加水至原来体积的 10^2 、 10^4 、 10^6 倍,下同),以 1%接种量转接至不同体积分数(5%、10%、20%)的烟叶浓缩液 TS-006(已灭菌)中,于 30 °C、150 r/min 条件下摇床培养 10 h。将所得浓缩液培养液进行梯度稀释(10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6})后

涂布 LB 固体培养基平板,于恒温培养箱中 30 °C 培养 2~3 d。挑取单菌落于 LB 液体培养基中,于 30 °C、150 r/min 条件下摇床培养 10 h。再次进行梯度稀释(10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6})后涂布 LB 固体培养基平板,于恒温培养箱中培养过夜。经过多次 LB 液体及固体培养基的筛选培养,分离得到单菌落。将分离出的单菌落,以 1%接种量接种于 LB 液体培养基,将其置于 30 °C、120 r/min 的摇床中培养 10 h。将菌液进行梯度稀释(10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-6})后分别涂布于淀粉、果胶、酪蛋白、叶黄素、β-胡萝卜素、西柏烯筛选培养基平板,于 30 °C 恒温培养箱中培养 2~3 d。挑选最大的单菌落,经 LB 液体培养基培养后,将菌种置于甘油管中,于-80 °C 冰箱中保存。

功能微生物的鉴定。用细菌基因组抽提试剂盒提取筛选菌株基因组 DNA,PCR 反应引物为 27F 和 1492R,PCR 反应体系:Taq 酶(5 U/μL)0.2 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL、10× Buffer(10 μmol/L)2.5 μL、DNA 模板(50 ng/μL)0.5 μL、dNTP(10 μmol/L)1 μL、dH₂O 19.8 μL。委托上海生工生物工程股份有限公司进行宏基因组测序。将测序结果依次在 NCBI 网站(www.ncbi.nlm.nih.gov)进行在线 BLAST 序列比对,依据同源序列相似性对筛选的菌株进行菌种鉴定。

2 结果与讨论

2.1 不同陈化时间烟叶样品表面微生物宏基因组分析

对测序所得原始数据进行过滤,过滤后数据占样本所有数据比例超过 98%,碱基质量在 Q20 以上的比例超过 96%,碱基质量在 Q30 以上的比例超过 91%,说明数据可靠,可用于后续分析。以相似度 97%对不同陈化时间烟叶样品进行 OTU(Operational Taxonomic Unit)聚类分析,结果如图 1 所示。由图 1 可知,A4 样品表面微生物丰富度最高,A1 和 A4 样品表面微生物相似性最高。

2.1.1 表面细菌群落结构分析 将基因集蛋白序列与 NR 数据库进行对比分析,可得到功能注释和同源物种信息。本研究选取门水平和属水平,对不同陈化时间烟叶样品表面微生物进行分析,分布情

况如图2所示。由图2可知,4个样品的优势菌门都为变形菌门(Proteobacteria),但优势菌属不同,分别为鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)。陈化初期,烟叶表面微生物菌群组成较为丰富,随着陈化时间的延长,烟叶表面微生物群落的数量和相对丰度均呈逐渐降低的趋势。

2.1.2 微生物代谢功能变化 将宏基因组测序结果与KEGG数据库进行对比注释,其结果用于分析不同陈化时间烟叶样品微生物代谢功能的变化。图3为不同陈化时间烟叶样品表面微生物群落初级代谢和次级代谢中基因分布情况。由图3a)可知,在

微生物群落初级代谢中,新陈代谢为优势代谢功能。由图3b)可知,在微生物群落次级代谢中,碳水化合物代谢和氨基酸代谢旺盛,这两种代谢功能可为烟叶陈化阶段挥发性成分的变化提供有利条件。在初级代谢水平上,微生物群落基因数量和相对丰度的变化基本遵循微生物群落的变化趋势;在次级代谢水平上,基因相对丰度的变化则更为复杂。

2.1.3 碳水化合物活性酶注释 在烟叶陈化过程中,烟叶生物大分子和潜香物质的生物催化和转化都与碳水化合物活性酶相关。不同陈化时间烟叶样品关键酶的分布如图4所示。由图4可知,在陈化过程中,烟叶表面存在 α -淀粉酶、过氧化物酶、氧化还原酶、果胶裂解酶、 α -糖苷酶、 β -糖苷酶等,且酶的数量峰值均出现在A2样品中。与类胡萝卜素类、西柏烯类物质降解有关的过氧化物酶、单加氧酶、氧化还原酶在A1和A2样品中数量最多,因此在陈化前6个月,更容易筛选到降解 β -胡萝卜素、叶黄素和西柏烯类物质的功能菌株。 α -淀粉酶在A2样品中数量最多,因此在该陈化时间更容易筛选到降解淀粉的功能菌株。与果胶降解相关的酶在A2和A3样品中数量较多,因此陈化3~6个月更容易筛选到降解果胶的功能菌株。

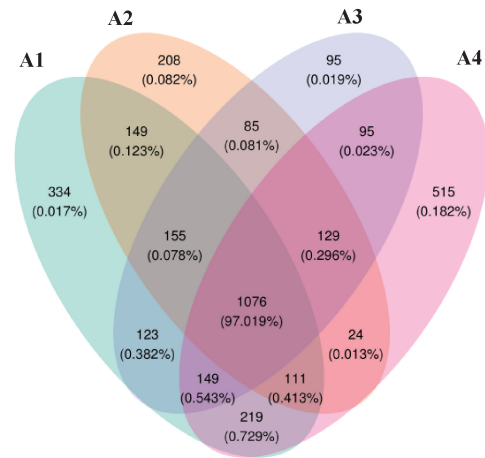
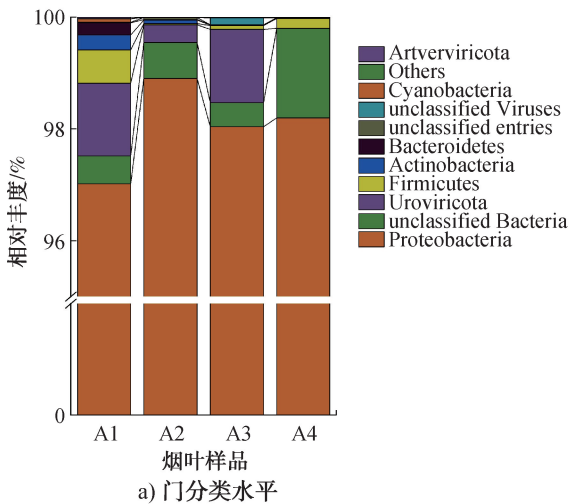


图1 不同陈化时间烟叶样品表面微生物操作分类单元(OTU) Venn图

Fig.1 Venn diagram of surface microbial operational taxonomic unit (OTU) for different aging periods of Yunnan tobacco leaves



2.2 不同陈化时间烟叶样品中的中性香味成分分析

不同陈化时间烟叶样品中性香味成分相对含量如表1所示。由表1可知,共检测到挥发性物质49

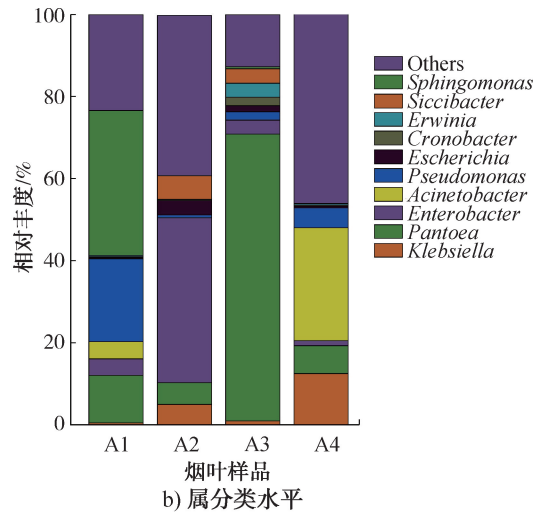


图2 不同陈化时间烟叶样品表面微生物门水平和属水平分布情况

Fig.2 Distribution at the taxonomic level and genus level of surface microbial phyla at different fermentation stages of Yunnan tobacco leaves

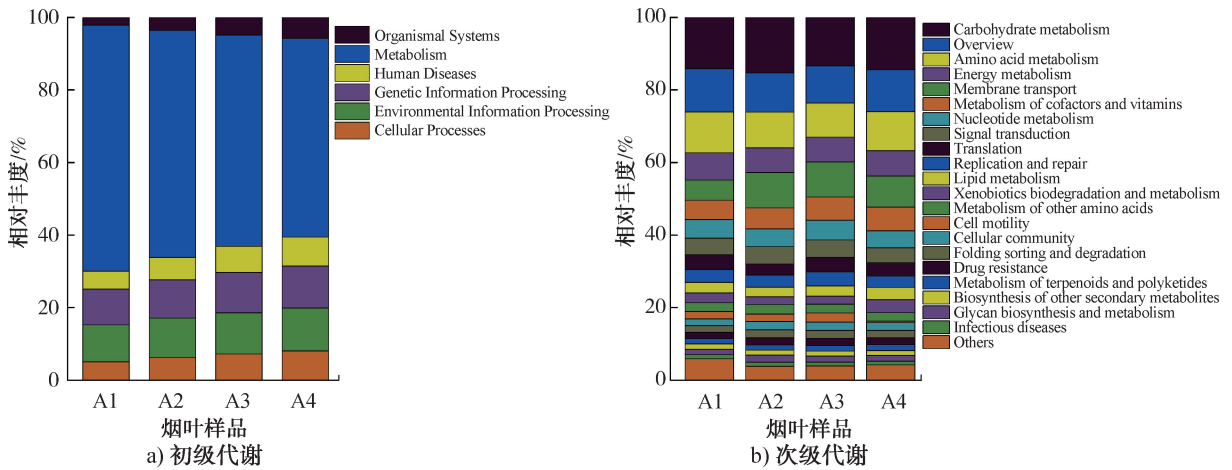


图3 不同陈化时间烟叶样品表面微生物群落初级代谢和次级代谢中基因分布情况

Fig. 3 Gene distribution in primary and secondary metabolism of surface microbial communities in Yunnan tobacco leaves at different fermentation stages

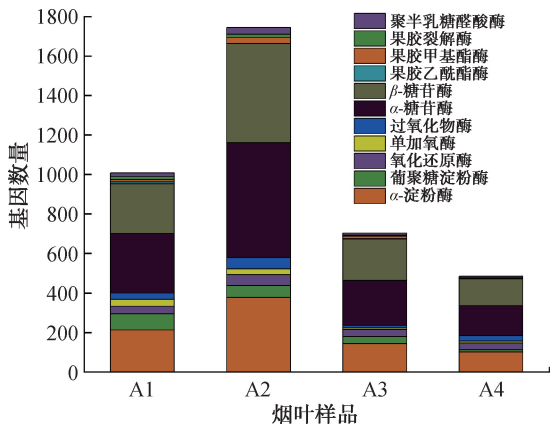


图4 不同陈化时间烟叶样品关键酶的分布情况
Fig. 4 Distribution of key enzymes in different aging periods of Yunnan tobacco leaves

种,其中酮类 19 种,醛类 11 种,烃类 8 种,醇类 6 种,杂环类 3 种,内酯类 2 种。A₁—A₃ 样品中均检测到 49 种中性香味成分,A₄ 样品中检测到 44 种中性香味成分,4 个样品中中性香味成分总相对含量分别是 2 413.77 μg/mL、2 950.33 μg/mL、2 482.66 μg/mL、4 070.06 μg/mL。随着陈化时间的延长,烟叶样品中一些典型的中性香味成分如苯甲醇、苯乙醛、2-乙酰基吡咯、芳樟醇、苯乙醇、茄酮、大马酮、巨豆三烯酮等总体呈增长趋势;茄酮、大马酮、巨豆三烯酮等在 A₄ 样品中相对含量增加较为明显;醛类物质中糠醛、β-环柠檬醛在陈化期间呈先增加后降低的趋势;而烃类物质相对含量呈下降趋势。中性香味成分的变化可能与烟叶中生物大分子、潜香类物质的降解及微生物和酶的作用有关。苯甲醇、2-乙酰基吡咯等相对含量的增加可能与苯丙氨酸的代谢

有关。茄酮是西柏烯类化合物的降解产物,因此在陈化进程中西柏烯类化合物的相对含量不断减少,茄酮相对含量逐渐增加。叶黄素的降解可以产生巨豆三烯酮类香味成分,新叶黄素降解可产生 β-大马酮等香味成分,因此随着陈化时间的延长,巨豆三烯酮、β-大马酮等香味成分含量呈增长趋势。

2.3 烟叶样品表面微生物及基因与中性香味成分的关联分析

将烟叶样品的表面微生物及其糖苷酶基因相对丰度变化与中性香味成分进行关联分析,绘制热图如图 5、图 6 所示。

由图 5 可知,克雷伯菌属 (*Klebsiella*)、不动杆菌属微生物分别与 23 种中性香味成分呈正相关,其中克雷伯菌属微生物与 β-大马酮、巨豆三烯酮、茄酮、苯乙醇等呈显著正相关;不动杆菌属微生物与 4-环戊烯-1,3-二酮呈极显著正相关,与圆柚酮、2-乙酰基呋喃、芳樟醇、巨豆三烯酮等呈显著正相关;假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、埃希菌属 (*Escherichia*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 及甲基杆菌属 (*Methylobacterium*) 微生物与大约一半的中性香味成分呈正相关,其中埃希菌与二十四烷呈极显著正相关;考萨考氏菌属 (*Kosakonia*) 及肠杆菌属微生物与多数 (约占总数三分之一) 的中性香味成分呈正相关;柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*)、克罗诺杆菌属 (*Cronobacter*) 和泛菌属 (*Pantoea*) 微生物与大部分中性香味成分呈负相关,克罗诺杆菌属和泛菌属微生物与香叶基丙酮呈显著负相关,泛菌属与壬醛呈极显著负相关。

表1 不同陈化时间烟叶样品中中性香味成分相对含量

Table 1 Relative content of neutral components in tobacco leaves at different aging periods

序号	保留时间/min	中性香味成分	相对含量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				序号	保留时间/min	中性香味成分	相对含量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			
			A1	A2	A3	A4				A1	A2	A3	A4
1	9.73	2-甲基四氢呋喃-3-酮	4.22	2.59	6.57	18.10	26	34.92	大马酮	172.42	246.58	212.13	398.48
2	10.48	糠醛	68.64	94.55	84.44	62.27	27	35.32	十四烷	7.81	16.62	0.86	—
3	11.10	糠醇	14.89	10.14	11.88	12.77	28	36.32	β -大马酮	40.08	84.10	39.07	78.09
4	12.13	4-环戊烯-1,3-二酮	5.86	4.91	3.91	12.47	29	37.84	香叶基丙酮	46.43	54.98	20.41	49.86
5	12.97	2-乙酰基呋喃	6.95	5.10	3.89	11.70	30	39.35	β -紫罗兰酮	18.17	22.06	28.55	46.19
6	14.64	苯甲醛	17.44	9.49	11.46	21.78	31	39.67	正十五烷	12.19	4.33	1.32	—
7	15.35	甲基庚烯酮	18.41	15.81	15.55	13.39	32	39.85	巴伦西亚橘烯	6.05	6.56	3.13	6.61
8	15.51	2-正戊基呋喃	11.43	9.20	6.55	10.48	33	41.35	二氢猕猴桃内酯	28.79	40.36	57.89	73.84
9	16.15	反式-2,4-庚二烯醛	20.83	25.33	13.54	10.84	34	42.37	巨豆三烯酮 a	45.96	40.43	56.93	114.05
10	16.95	苯甲醇	271.54	405.99	364.57	354.76	35	43.05	巨豆三烯酮 b	166.23	182.22	238.48	503.66
11	17.32	苯乙醛	96.23	76.94	84.45	111.33	36	43.43	十六烷	17.66	21.36	9.75	6.00
12	17.66	γ -己内酯	1.85	2.66	5.21	—	37	44.01	肉豆蔻醛	20.40	20.95	10.29	—
13	17.79	2-乙酰基吡咯	14.81	9.33	22.47	32.65	38	44.43	巨豆三烯酮 c	52.06	42.40	57.05	73.73
14	19.15	芳樟醇	16.58	14.60	12.68	22.06	39	44.95	巨豆三烯酮 d	122.36	132.42	182.23	370.89
15	19.30	壬醛	13.60	15.43	10.83	15.57	40	47.74	十七烷	21.04	22.06	6.73	—
16	19.84	苯乙醇	97.09	116.21	121.73	185.62	41	48.57	圆柚酮	102.20	85.46	61.33	162.60
17	20.21	异佛尔酮	1.07	1.30	2.96	1.12	42	48.60	正十五碳醛	243.14	272.66	33.83	58.46
18	21.10	4-氧代异佛尔酮	4.95	5.03	4.21	7.17	43	54.44	α -香附酮	51.45	57.65	61.63	79.65
19	21.40	反式-2,6-壬二醛	9.07	9.23	13.11	14.13	44	57.19	植酮	66.77	100.93	39.20	43.90
20	21.67	反式-2-壬醛	5.49	4.97	6.30	10.56	45	58.11	植醇	42.88	42.58	12.84	38.60
21	23.46	α -松油醇	2.12	3.33	2.74	1.62	46	62.37	法尼基丙酮	126.66	182.90	113.14	210.43
22	23.98	癸醛	8.39	8.09	6.63	10.08	47	63.97	西柏烯	13.25	9.84	7.09	6.06
23	25.27	β -环柠檬醛	6.80	7.70	8.17	10.98	48	108.89	二十四烷	12.78	9.25	4.63	6.11
24	32.33	大马酮	5.28	5.31	6.45	9.56	49	116.98	二十六烷	27.57	21.00	9.85	28.72
25	33.83	茄酮	225.88	367.39	384.00	753.12							

注:—表示未检出。

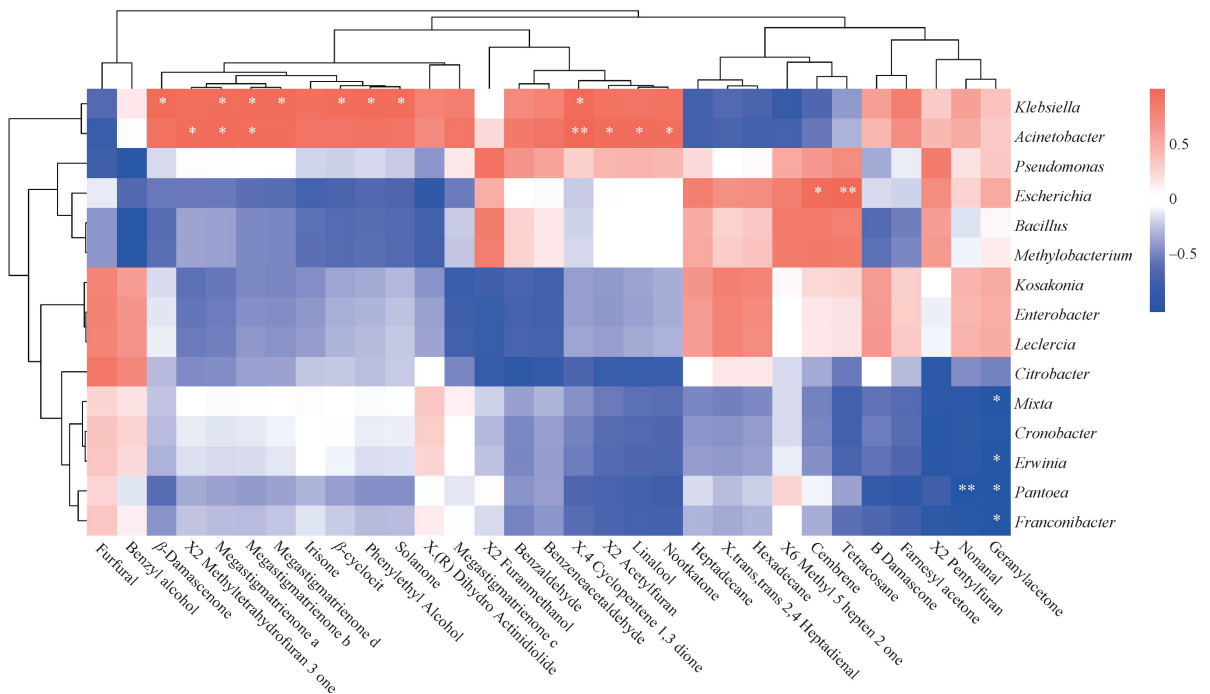


图5 烟叶样品表面微生物与中性香味成分关联分析

Fig. 5 Association analysis between microorganisms and neutral aroma components on the surface of Yunnan tobacco leaves at different aging periods

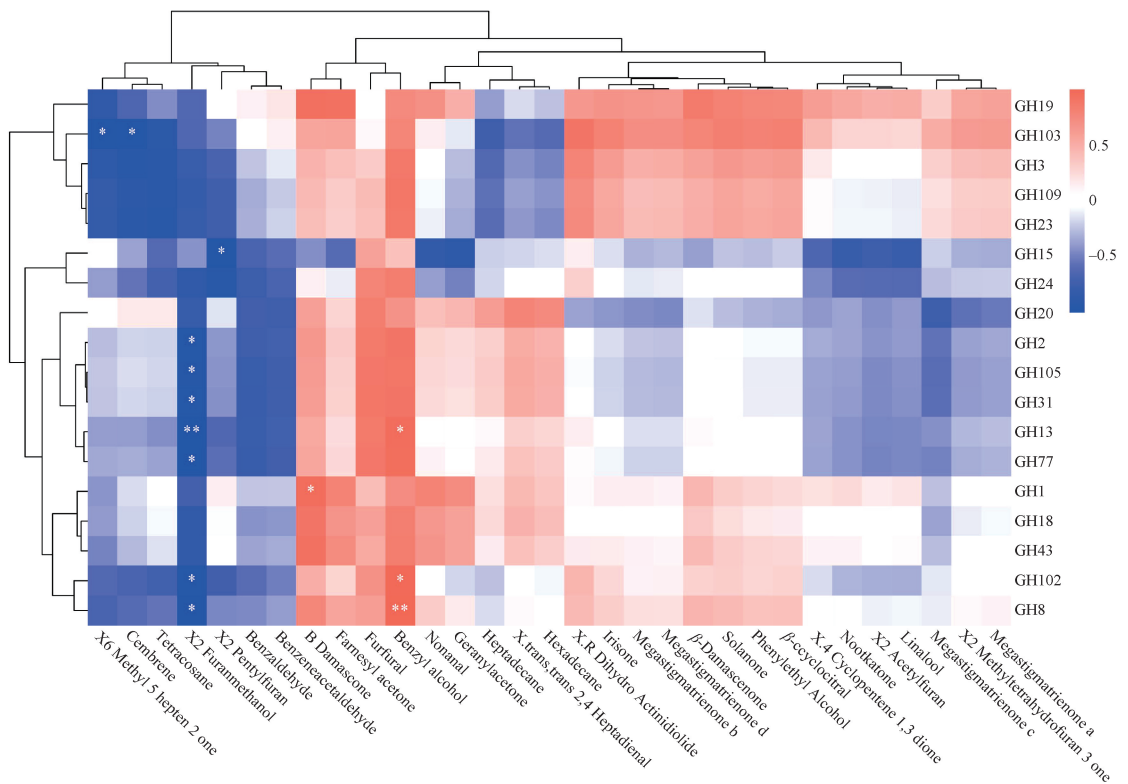


图6 烟叶样品表面微生物糖苷酶基因与中性香味成分关联分析

Fig. 6 Association analysis between microbial GHs genes and neutral aroma components on the surface of Yunnan tobacco leaves at different aging periods

由图6可知,苯乙醛、苯甲醛、糠醇、西柏烯等成分几乎与所有碳水化合物活性酶呈负相关,多数糖苷酶家族与中性香味成分呈正相关。GH103与甲基庚烯酮和西柏烯呈显著负相关, GH15与2-戊基呋喃呈显著负相关, GH13与糠醇呈显著负相关,苯乙醇与GH13和GH102呈显著正相关,与GH8呈极显著正相关。

2.4 宏基因组分析结果对功能菌株筛选的指导作用

通过上文烟叶宏基因组数据分析可知:陈化初期烟叶表面微生物群落数量和相对丰度均最高,随后逐渐减少,烟叶表面微生物初级和次级代谢逐渐减弱,显示在烟叶陈化中前期能筛选到更多的功能微生物;烟叶陈化过程中碳水化合物活性酶注释显示在陈化6个月时,糖苷酶和氧化还酶的数量和相对丰度占比最高,该时期是筛选降解烟草生物大分子和催化转化烟叶香味成分微生物的主要时期,同时,在陈化3个月时,淀粉酶、单加氧酶和氧化还原酶的占比较高,是筛选淀粉降解菌和香味前体物(类胡萝卜素和西柏烯)催化降解菌的较好时期;在

整个烟叶陈化过程均有氨基酸代谢关键酶的分布,在陈化12个月时该类酶的相对丰度达到最大,可在该时期重点筛选蛋白质降解菌;在烟叶陈化中前期,西柏烯的含量大幅度减少,所以筛选降解西柏烯微生物可在该时期进行。

本文采用特异性培养筛选方法筛选到的烟草源功能微生物如表2所示。由表2可知,4个样品共分离出75株微生物,A1、A2、A3、A4样品分别分离出17株、27株、16株、15株。其中,果胶降解菌9株,蛋白降解菌14株,淀粉降解菌32株,西柏烯降解菌4株, β -胡萝卜素降解菌9株,叶黄素降解菌7株。所得微生物数量、功能和所在陈化时间基本与宏基因组分析结果相吻合,例如,A2样品中筛选的微生物数量最多(27株),降解淀粉和果胶微生物数量也最多(14株),宏基因组分析显示,该发酵时间样品中糖苷酶含量最为丰富,淀粉酶、果胶酶等含量也较为丰富;相比A1样品,西柏烯含量在A2样品中下降了25.74%,而在A2样品中筛选到3株西柏烯降解菌株,占该类微生物的75%。该结果表明,宏基因组的分析结果可以指导微生物筛选工作,增

表2 烟草源功能微生物筛选结果
Table 2 Screening results of tobacco-derived functional microorganisms

微生物功能	A1	A2	A3	A4
降解蛋白质	<i>Klebsiella</i> :DB3-1; <i>Bacillus</i> :DB4	<i>Enterobacter</i> :DB6, DB7	<i>Bacillus</i> :DA5, DB5, DC5, DC7	<i>Acinetobacter</i> :DA1; <i>Enterobacter</i> :DA2-2, DB2, DC1; <i>Klebsiella</i> :DA3, DA4
降解淀粉	<i>Nosocomialis</i> :HB5, HB7, HB8, HB10, HH5, HH8; <i>Acinetobacter</i> :FA1, FA2	<i>Enterobacter</i> :FB1, FC1-1, FC2; <i>Bacillus</i> :FC3, FC4, FB4, FA4; <i>Klebsiella</i> :FA3, FB2, FB3; <i>Pantoea</i> :FA7	<i>Bacillus</i> :FC7, HA8, FC5, FA5, FA6, FB5, FB7	<i>Acinetobacter</i> :FC1-2, H6, H9, H11, HA10, HB6
降解果胶	<i>Bacillus</i> :GA4	<i>Bacillus</i> :GA6, GB4; <i>Klebsiella</i> :GB3	<i>Enterobacter</i> :GA1; <i>Klebsiella</i> :GA2, GB2	<i>Bacillus</i> :GA5-1, GA5-2
降解西柏烯	<i>Pantoea</i> :X1-1	<i>Bacillus</i> :X1-2; <i>Klebsiella</i> :X2, X3	—	—
降解β-胡萝卜素	<i>Cronobacter</i> :H1, H2; <i>Delftia tsuruhatensis</i> :H3	<i>Klebsiella</i> :L1, L2, L3; <i>Bacillus</i> :L4	<i>Bacillus</i> :L7	<i>Acinetobacter</i> :H4
降解叶黄素	<i>Klebsiella</i> :Y2; <i>Bacillus</i> :Y5	<i>Enterobacter</i> :Y1; <i>Cronobacter</i> :Y3, Y4; <i>Klebsiella</i> :Y6	<i>Bacillus</i> :Y7	—

注:—表示该样品没有筛选到微生物。

强筛选目的性,提高筛选效率。有关所筛选微生物与香味成分的关联分析,将在后续研究中进行。

3 结论

本文利用宏基因组技术分析云南曲靖烟叶 B3F 不同陈化时间表面微生物群落演替,结果表明,随着陈化时间的延长,烟叶表面微生物群落的种类和相对丰度都呈下降趋势,不同陈化时间烟叶的优势菌门都为变形菌门,但优势菌属不同,分别为鞘氨醇单胞菌属、肠杆菌属、泛菌属和不动杆菌属。分析烟叶中性香味成分后发现,随着烟叶陈化时间的延长,烟叶样品中苯甲醇、苯乙醛、2-乙酰基吡咯、芳樟醇、苯乙醇、茄酮、大马酮、巨豆三烯酮等中性香味成分相对含量总体呈增长趋势。关联烟叶陈化过程中微生物与中性香味成分后发现,克雷伯菌属和不动杆菌属微生物与大部分中性香味成分呈正相关;假单胞菌属微生物与大约一半的中性香味成分呈正相关。关联烟叶陈化过程中酶基因与中性香味成分后发现,苯乙醛、苯甲醛、戊基咪喃、咪喃甲醇、西柏烯等成分几乎与所有的碳水化合物活性酶呈负相关,多数糖苷酶家族与中性香味成分呈正相关。采用特异性培养筛选的方法从不同陈化时间烟叶样品中共分离烟草源功能微生物 75 株,微生物种类及其功能基本上与宏基因组分析结果相吻合,表明宏基因组的分析结果可以指导微生物筛选工作。

本文研究结果可为烟草源功能微生物的筛选提供理论和应用基础,但是对功能微生物菌株的作用机制还需深入探索,研究发酵后烟叶表面微生物组、代谢组、转录组和蛋白组学将是进一步研究的方向。

参考文献:

- [1] 赵勇,黄劲松,宋新蕊,等.宏基因组的生物信息分析[J].生物信息学,2013(4):282-286.
- [2] CHEN K, PACTHER L. Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities [J]. PLoS Computational Biology, 2005, 1(2): 106-112.
- [3] RUZA A, DENISE T, ANNIKA L, et al. Comparison of targeted next-generation sequencing and Sanger sequencing for the detection of PIK3CA mutations in breast cancer [J]. BMC Clinical Pathology, 2015(15): 1-9.
- [4] DIEHL G E, LONGMAN R S, ZHANG J X, et al. Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX(3)CR1(hi) cells [J]. Nature, 2013, 494(7435): 116-120.
- [5] WANG F, ZHAO H W, XIANG H Y, et al. Species diversity and functional prediction of surface bacterial communities on aging flue-cured tobaccos [J]. Current Microbiology, 2018, 75(10): 1306-1315.
- [6] TYX R E, STANFILL S B, KEONG L M, et al. Characterization of bacterial communities in selected smokeless tobacco products using 16S rDNA analysis [J]. PLoS ONE, 2016, 11(1): e0146939.
- [7] 常安然,李佳,张耸,等.基于宏基因组学 16S rDNA 测序对烟草根际土壤细菌群落组成分析[J].中国农业科技导报,2017,19(2):43-50.

- [8] 赵铭钦,刘云,李芳芳,等. 陈化烤烟叶面优势菌的筛选鉴定与其增香效应[J]. 微生物学报,2009,49(5): 625-631.
- [9] 王卫峰,章友爱,陈子枫,等. 自然醇化对烟叶化学组分及致香物质的影响[J]. 广西农学报,2016,31(2): 8-13.
- [10] 刘洋. 烟叶增香提质微生物的筛选及其应用[D]. 武汉:华中农业大学,2011.
- [11] 李秀妮,李猛,万德建,等. 烟叶微生物及其在烟叶发酵和醇化中的作用研究进展[J]. 微生物学通报,2019,46(6):1520-9.
- [12] 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.
- [13] 马英. 烟叶表面高效降解蛋白质的芽孢杆菌的分离筛选及其鉴定[J]. 喀什师范学院学报,2012,18(1): 101-104.
- [14] HOLGER Z, SABINE L, MANUELA S, et al. A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β , β -carotene to flavor compounds[J]. *Biological Chemistry*, 2003, 384(7): 1049-1056.
- [15] 李秀红,李冰,李仙,等. 一株产香微生物的筛选[C]//中国烟草学会. 中国烟草学会工业专业委员会烟草化学学术研讨会论文集. 海口:[出版社不详], 2005: 420-430.
- [16] 陈竹亭. 陈化进程中烟叶表面细菌组成的变化以及果胶降解菌群的分离[D]. 南京:南京大学,2012.
- [17] 孙政. 降低烟草亚硝胺目的菌的筛选及应用研究[D]. 武汉:华中农业大学,2017.
- [18] 杨应美,卢灿华,罗朝旺,等. 烟草黑胫病生防菌筛选及对根际土壤微生物群落的影响[J]. 西南农业学报,2022,35(4):790-796.
- [19] 贺兆伟,奚家勤,邓宾玲,等. 烟叶中高产果胶酶菌株的筛选及酶学性质[J]. 烟草科技,2013(5):72-76.
- [20] 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.

Screening of tobacco-derived functional microorganisms with different aging time based on metagenomics

LI Shitou¹, PAN Fanda¹, HUANG Xiaoyu², YAN Mingyi³, TIAN Yunong¹, LIAO Fu¹,
WANG Hui¹, WU Jizhong¹

1. Technology Center, China Tobacco Zhejiang Industrial Co., Ltd., Hangzhou 310024, China;

2. Changde Cigarette Factory of Hunan Tobacco Industry Co., Ltd., Changde 415006, China;

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

Abstract: The community structure and functional gene succession of surface microorganisms in Yunnan tobacco leaves at different aging stages were analyzed based on metagenomics. The changes of neutral aroma components during the aging of tobacco leaves were traced. The correlation between microorganisms, enzyme gene and neutral aroma components was explored, and a screening method for tobacco-derived functional microorganisms was established. The results showed at the 3rd, 6th, 9th and 12th month of aging, the dominant genera were *Sphingomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, and *Acinetobacter*, respectively. The neutral aroma components in tobacco leaves such as benzyl alcohol, phenylacetaldehyde, 2-acetylpyrrole, solanone, damascenone and megastigmatrienone had an increasing trend. Furfural and β -cyclocitral had a first increase and then decrease trend. The content of hydrocarbons decreased. *Klebsiella* had a significant positive correlation with β -damascenone, megastrienone and solanone. *Acinetobacter* had a significant positive correlation with 2-acetylpyrrole, linalool and megastrienone. Phenylethylaldehyde, benzaldehyde, furfuryl alcohol and cypressene were negatively correlated with almost all carbohydrate synthase, and most glycosidase families were positively correlated with neutral aroma components. A total of 75 strains of microorganisms were screened during tobacco leaf aging, and the microbial types and functions were basically consistent with the results of metagenome analysis, indicating that the analysis results of metagenome could guide microbial screening, enhance the purpose of screening, and improve screening efficiency.

Key words: metagenomics; tobacco-derived; functional microorganisms; aging time; screening

(责任编辑:吴晓亭)