



李天笑,张大元,王跃,等.产奶香枯草芽孢杆菌的筛选及其在雪茄烟叶中的应用[J].轻工学报,2025,40(2):90-99.
LI T X,ZHANG D Y,WANG Y,et al. Milky flavor-producing *Bacillus subtilis* and its application in cigar tobacco leaves[J]. Journal of Light Industry,2025,40(2):90-99. DOI:10.12187/2025.02.010

产奶香枯草芽孢杆菌的筛选及其在雪茄烟叶中的应用

李天笑¹,张大元¹,王跃^{2,3},雷金山^{2,3},曹源¹,许春平¹,张倩颖^{2,3},李东亮^{2,3}

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;
2. 四川中烟工业有限责任公司 技术中心,四川 成都 610100;
3. 烟草行业雪茄发酵工艺重点实验室,四川 成都 610100

摘要:为解决国产雪茄烟叶原料香气量不足、刺激感较强等问题,通过嗅香评价筛选烟草源特色产奶香菌株,利用显微特征和 16S rDNA 测序进行菌株鉴定,结合机制雪茄加香感官评价得分和菌液 OD_{600} 确定最优菌株培养条件,利用 GC-MS 分析确定发酵上清液中的关键香味成分,并进行国产雪茄烟叶原料发酵增香应用研究。结果表明:筛选到 1 株产奶香细菌(F2A),经鉴定其为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);该菌株适宜的培养时间为 24 h、培养温度为 32 ℃,培养基中碳源和无机盐为葡萄糖和氯化钙;菌株发酵上清液的主要奶香和甜香成分为 2-羟基-3-甲基-2-环戊烯酮,且含量较高(7.58 $\mu\text{g/mL}$);经枯草芽孢杆菌 F2A 发酵处理后的楚雪 14 中,香兰素、香豆素、6-乙基-5,6-二氢吡喃-2-酮、2-羟基-3-甲基-2-环戊烯酮等奶香和甜香成分含量均显著增加,奶香香韵及甜感提升明显,巨豆三烯酮、3-羟基- β -大马士革酮、新植二烯等成分含量增加,清香和花香气息增强;由发酵后的楚雪 14 制成的雪茄中,奶香和甜香香韵显著提升,刺激感降低。该研究首次发现枯草芽孢杆菌 F2A 能产生 2-羟基-3-甲基-2-环戊烯酮等奶甜香香韵成分,可为国产雪茄烟叶品质提升提供新的途径和理论支持。

关键词:枯草芽孢杆菌;奶香香韵;雪茄烟叶;2-羟基-3-甲基-2-环戊烯酮

中图分类号: TS41⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1553(2025)02-0090-10

0 引言

雪茄是由雪茄烟叶卷制而成的烟草制品,与卷烟相比,雪茄的原料对产品影响更大。当前,优质的雪茄烟叶原料多产自古巴、多米尼加、尼加拉瓜等地,相比之下,国产雪茄烟叶原料则部分存在香

气量不足、刺激感较强等问题,这成为制约中式雪茄发展的重要因素之一^[1-4]。因此,加强国产雪茄烟叶原料开发与应用是中式雪茄创新发展的重要方向。发酵是提升雪茄烟叶品质的重要途径,发酵过程中雪茄烟叶的理化性质会发生明显变化,感官品质也得以提高。产香微生物是指在生长过程中

收稿日期:2024-05-10;修回日期:2024-06-29;出版日期:2025-04-15

基金项目:烟草行业雪茄发酵工艺重点实验室开放基金资助项目(20202305BC530);河南省科技攻关项目(242102311257)

作者简介:李天笑(1990—),男,河南省漯河市人,郑州轻工业大学讲师,博士,主要研究方向为烟草工程。E-mail: litianxiao1012@163.com

通信作者:张倩颖(1988—),女,四川省成都市人,四川中烟工业有限责任公司高级工程师,博士,主要研究方向为烟草和雪茄生物技术。E-mail:519350440@qq.com

可发酵代谢产生香味物质的原核及真核微生物菌种。已有研究^[5-8]表明,将芽孢杆菌、产香酵母、不动杆菌等产香微生物菌种应用于烟叶发酵,可产生令人愉悦的香气成分,明显改善烟叶的香气和吃味。因此,通过产香微生物辅助雪茄烟叶发酵,可有效改善发酵效果,大幅提升烟叶品质。

部分国外雪茄烟叶(如古巴烟叶等)因其奶香香韵突出,获得了市场好评。奶香风味成分能丰富烟香、增加甜感、降低烟气刺激感,并能带来醇雅气息,其对雪茄烟叶品质的提升较为关键^[9-10]。目前,烟草行业关于奶香风味成分解析、奶香香基模块开发的研究较多^[11-12],但产奶香特色微生物筛选鉴定及通过微生物发酵提升雪茄烟叶奶香香韵的相关研究尚未见报道。鉴于此,本研究拟从烟草源微生物中筛选产奶香微生物菌种,明确其发酵液奶香香韵关键成分,并研究其辅助发酵国产雪茄烟叶时对原料品质的提升作用,以期改善雪茄烟叶发酵效果,为国产雪茄烟叶原料的品质提升与应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

进口巴西烤烟烟叶、国产雪茄烟叶(楚雪 14,茄芯烟叶)、迷你原味空白机制雪茄烟,由四川中烟工业有限责任公司提供;二氯甲烷,色谱纯,山东禹王和天下新材料有限公司;盐酸,分析纯,洛阳市化学试剂厂;氢氧化钠,分析纯,天津市凯通化学试剂有限公司;蛋白胨、酵母浸粉,均为分析纯,英国 OXOID 有限公司;琼脂粉,分析纯,上海生工生物工程股份有限公司;大豆蛋白胨,生物试剂级,青岛海博生物科技有限公司;大豆蛋白粉,生物试剂级,安阳天祥瑞食品科技有限公司;葡萄糖,生物试剂级,上海源叶生物科技有限公司。

1.2 主要培养基

LB 液体培养基:蛋白胨 5 g、酵母浸粉 5 g、氯化钠 10 g,加蒸馏水至 1000 mL,调整 pH 值至 7.0~7.2,密封后于 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

LB 固体培养基:在前述 LB 液体培养基中加入 18 g/L 的琼脂粉,密封后于 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.3 主要仪器与设备

Agilent 6890A-5975C 型气相色谱-质谱联用(GC-MS)仪,美国 Agilent 仪器有限公司;LDZX-50KBS 型立体压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;TH2-C 型恒温摇床,太仓市实验设备厂;DHP-9162 型恒温培养箱,太仓市科教器械厂;SW-CJ-1F 型超净工作台,苏州净化设备有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 菌株分离 将巴西烤烟烟叶切成边长 0.5 cm 的正方形小片,取 10 个小片置于试管中,加入 20 mL 无菌水,涡旋振荡 30 s。取 1 mL 烟片水洗液于无菌试管中,10 倍稀释 3 个梯度后,各吸取 200 μL 涂布于 LB 固体培养基上,置于 32 ℃ 恒温培养箱中静置培养 48 h,记录菌落数量和种类,挑选不同形态的菌落,在 LB 固体培养基上进一步划线分离纯化。

1.4.2 产奶香菌株筛选及鉴定 将分离得到的菌株于 32 ℃ 恒温摇床中振荡培养 24 h 后,对发酵上清液进行嗅香评价。以奶香和甜香香韵为关键筛选指标,分别从(香气满分 20 分,其中奶香和甜香香韵各 10 分)、留香时间(满分 10 分)及刺激性(满分 10 分)^[13]3 个方面进行打分。分数越高,发酵上清液整体品质越高,由此筛选出产奶香微生物菌株。

挑取嗅香评价得分最高的菌株,在 LB 固体培养基上培养 24 h 后,挑取适量菌株涂布到载玻片上,于显微镜下进行形态观察。提取菌株 16S rDNA,对目标 DNA 进行 PCR 扩增纯化,送至上海生工生物工程股份有限公司进行菌株测序鉴定,通过生物学软件对所得序列进行分析并构建系统发育树。

1.4.3 菌株培养条件优化 1)培养时间优化。用接种环将产香菌株接种到 100 mL LB 液体培养基中,在 32 ℃、180 r/min 条件下摇瓶培养 12 h、24 h、36 h、48 h 和 60 h,并测定菌液 OD₆₀₀,获得菌株在 0~60 h 的生长曲线。取 1 mL 菌液离心、过微孔滤膜后,将 10.0 μL 发酵上清液注入迷你原味空白机制雪茄中,于相对湿度 60%、22 ℃ 条件下平衡水分后进行感官评价^[14]。根据感官评价得分和 OD₆₀₀

确定较优发酵时间。

由 7 名具有感官评吸资质的评委组成评吸小组,参考徐波等^[14-15]的方法,微调后进行香韵风格特征感官评价。具体方法为,选取奶香、豆香、烘烤香、清甜香、蜜甜香、花香、果香和坚果香 8 个主要香韵指标,采用 0~5 分等距标度评分法对雪茄烟香韵进行量化评价。计算每组评价得分的平均值,并作香韵雷达图。

2) 培养温度优化。用接种环将产香菌株接种到 100 mL LB 液体培养基中,分别在 26 ℃、28 ℃、30 ℃、32 ℃ 和 34 ℃ 条件下,于 180 r/min 转速下摇瓶培养 24 h,测定菌液 OD_{600} 。取 1 mL 菌液离心、过微孔滤膜后,将 10.0 μ L 发酵上清液注入迷你原味空白机制雪茄中,平衡水分后进行感官评价,通过感官评价得分和 OD_{600} 确定较优发酵温度。

3) 培养基碳源优化。以葡萄糖、果糖、淀粉和蔗糖为碳源配制不同的 LB 液体培养基,以初始 LB 液体培养基为对照。用接种环将产香菌株接种到各培养基中,在 32 ℃、180 r/min 条件下摇瓶培养 24 h 后,测定菌液 OD_{600} 。取 1 mL 菌液离心、过微孔滤膜后,将 10.0 μ L 发酵上清液注入迷你原味空白机制雪茄中,平衡水分后进行感官评价,通过感官评价得分和 OD_{600} 确定较优碳源。

4) 培养基无机盐优化。以碳源优化后的培养基为基础,在 10 g/L 氯化钠的基础上分别添加 1 g/L 的氯化钾、硫酸镁、磷酸二氢钾和氯化钙,配制不同无机盐的优化培养基,以只添加氯化钠的培养基为对照。用接种环将产香菌株接种到各培养基中,在 32 ℃、180 r/min 条件下摇瓶培养 24 h 后,测定菌液 OD_{600} 。取 1 mL 菌液离心、过微孔滤膜后,将 10.0 μ L 发酵上清液注入迷你原味空白机制雪茄中,平衡水分后进行感官评价,通过感官评价得分和 OD_{600} 确定较优无机盐。

1.4.4 菌株发酵上清液香味成分测定 使用最优配方培养基并在最优条件下培养产香菌株,获得菌株发酵上清液,取上清液倒入分液漏斗中,分别加入等体积 CH_2Cl_2 萃取 2 次,将有机相于 48 ℃ 条件下旋蒸浓缩至 0.9 mL,然后加入少量无水硫酸钠脱水。以最优配方培养基为对照,在处理后的发酵上

清液中加入 0.1 mL 质量浓度为 0.871 1 mg/mL 的乙酸苯乙酯作为内标物,过滤膜后进行 GC-MS 分析。

GC 条件: Agilent HP-5 MS 色谱柱 (30 m $\times$ 250 μ m $\times$ 0.25 μ m); 进样口温度 280 ℃; 载气为高纯 He (99.999%), 流速为 1.0 mL/min; 程序升温为初始温度 50 ℃, 保持 4 min, 然后以 2 ℃/min 的升温速度升至 240 ℃ 结束; 不分流, 进样量为 1.0 μ L。

MS 条件: 传输线温度 280 ℃, 离子源温度 230 ℃, 四级杆温度 150 ℃; 电离方式为电子轰击 (EI), 电子能量 70 eV; 溶剂延迟时间 7.0 min; 采用全扫模式, 扫描质量范围 (m/z) 35~550 amu。

定性定量分析: GC-MS 总离子流图经安捷伦质谱工作站 MSD Chemstation Data Analysis 处理后, 进行 NIST 20 谱库检索, 选取匹配度大于 85% 的质谱离子峰进行定性分析。结合正构烷烃 $\text{C}_6\text{—C}_{30}$ 的线性保留指数进行辅助定性, 并将化合物的保留时间带入保留指数计算公式, 计算化合物的保留指数。根据色谱保留指数, 利用文献检索比对^[16-19]与标准化合物验证相结合的方法进行化合物定性, 确定主要香味成分的化学结构。以乙酸苯乙酯为内标物, 采用内标工作曲线法进行定量分析。

1.4.5 菌株在雪茄烟叶发酵中的应用 将产香菌株接种于最优配方培养基中并在最优条件下培养 24 h 后, 取 1 mL 菌液于 6000 r/min 条件下离心 7 min, 弃上清液。菌体用 1 mL 无菌水重悬, 并用无菌水稀释 1000 倍, 喷施在楚雪 14 号雪茄烟叶表面, 喷施量为雪茄烟叶质量的 5%, 对照组均匀喷入等量无菌水。将发酵组和对照组雪茄烟叶在 32 ℃ 条件下密闭发酵 96 h。

取发酵组和对照组的烟叶各 5.0 g, 加入体积分数为 50% 的乙醇-水溶液 50 mL, 加热回流提取 1.0 h, 过滤后, 用体积分数为 50% 的乙醇溶液补足提取物溶液至 25.0 g, 由此获得烟叶提取物。取烟叶提取物 10 mL, 加入 15 mL 纯水, 再用 10 mL 二氯甲烷萃取两次, 合并二氯甲烷层并浓缩至 0.9 mL 后, 进行 GC-MS 香味成分分析, 分析方法同 1.4.4。

将发酵后的雪茄烟叶进行水分平衡, 然后卷制成直径为 2.9 cm、圆周长约为 9.1 cm 的雪茄烟支,

挑选质量一致的烟支进行感官评价,评价方法同 1.4.3。

2 结果与分析

2.1 产奶香菌株筛选结果分析

从巴西烤烟烟叶表面共分离出 20 株细菌,进行液体发酵和筛选后,发现 C1-3、C1-6、F2A、X-12、T-9 这 5 株细菌的产香能力较强,其嗅香评价得分结果见表 1。由表 1 可知,F2A 菌株的发酵上清液刺激性较小,香气留存时间较长,且奶香和甜香香韵丰富,可用性较高,故选用 F2A 菌株进行后续产香和雪茄烟叶应用研究。

2.2 菌株鉴定结果分析

F2A 菌株的菌落形态如图 1 所示。由图 1 可知,菌落颜色为不透明乳白色,菌落呈椭圆形或不规则形,边缘整齐,中间略有突起。F2A 菌株的系统发育树如图 2 所示。由图 2 可知,F2A 菌株与多株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 关系较近,且与 JX123316.1 和 MG833866.1 聚为单独的一支,由此确定 F2A 菌株为芽孢杆菌属枯草芽孢杆菌。该菌株已保藏至中国典型微生物保藏中心 (CCTCC),保藏编号为 CCTCC No. M20231273。

2.3 菌株培养条件优化结果分析

不同培养时间发酵上清液感官评价结果及菌

液 OD_{600} 如图 3 所示。由图 3a)可知,培养 24 h 时,注入发酵上清液的机制雪茄烟烟气中奶香显著,蜜甜香和烘烤香明显,花香稍明显,烟气浓郁,刺激性下降,整体感官评价得分最高。培养时间不足 24 h

表 1 产奶香菌株的嗅香评价得分结果

Table 1 Olfactory smell evaluation of milky flavor-producing strains

菌株	香气		刺激性	留香时间	总分
	奶香	甜香			
C1-3	8.8	8.8	7.8	7.6	33.0
C1-6	9.1	8.7	8.1	8.2	34.1
F2A	9.2	9.0	8.9	9.0	36.1
X-12	8.6	8.8	7.3	7.4	32.1
T-9	9.1	8.8	8.0	8.5	34.4



图 1 F2A 菌株的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of F2A strains

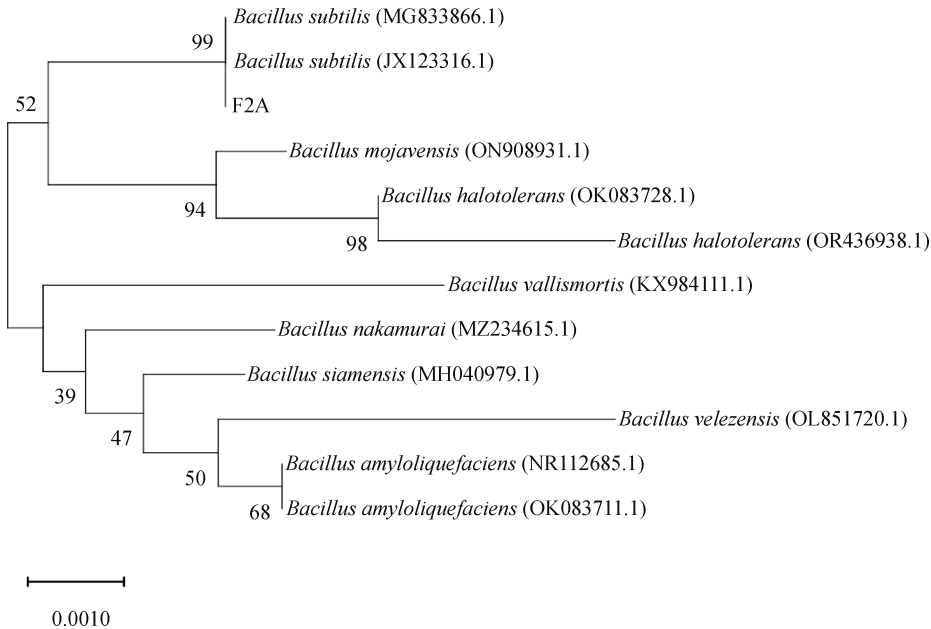
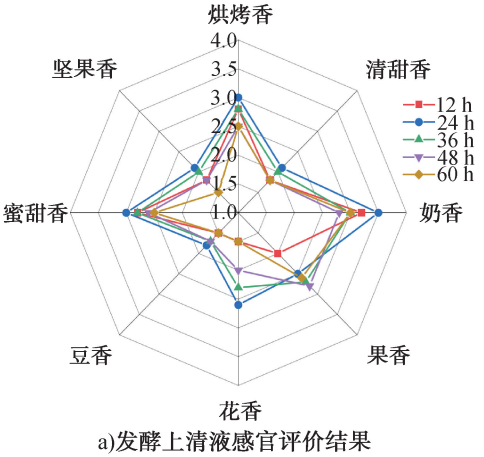


图 2 F2A 菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of F2A strains

时,烟气中奶香较平淡,甜感不明显。培养时间长于 24 h 时,烟气中酸味较重,杂气增加,刺激感提升。由图 3b)可知,菌株在 0~12 h 生长较慢, OD_{600} 缓慢增加。12~48 h 为对数生长期,此时菌体代谢非常活跃,产生香味成分较多。48 h 后生长趋于稳定期, OD_{600} 稳定在 4.5 左右。综上,枯草芽孢杆菌 F2A 的优选培养时间为 24 h。

不同培养温度发酵上清液感官评价结果及菌液 OD_{600} 如图 4 所示。由图 4a)可知,培养温度为 32 ℃ 时,注入发酵上清液的机制雪茄烟烟气中奶香、烘烤香和蜜甜香均有较明显的提升,烟气浓郁,刺激性降低。培养温度高于 32 ℃ 时,烟气中奶香降低,刺激性增加,余味略发涩,杂气增加。培养温度低于 32 ℃ 时,发酵上清液奶香不明显,香气量不足。



由图 4b)可知,培养温度为 32 ℃ 时,菌体生长量最大。综上,枯草芽孢杆菌 F2A 的优选培养温度为 32 ℃。

不同培养基碳源发酵上清液感官评价结果及菌液 OD_{600} 如图 5 所示。由图 5a)可知,碳源为葡萄糖时,注入发酵上清液的机制雪茄烟烟气中奶香明显,烘烤香较明显,烟气香气量提升,刺激性降低。当分别以淀粉和蔗糖为碳源时,烟气中奶香较淡,有一定杂气和刺激感,余味发涩。由图 5b)可知,以葡萄糖为碳源时,菌体长势较好,生长量最大。综上,枯草芽孢杆菌 F2A 的优选培养基碳源为葡萄糖。

不同培养基无机盐发酵上清液感官评价结果及菌液 OD_{600} 如图 6 所示。由图 6a)可知,培养基中

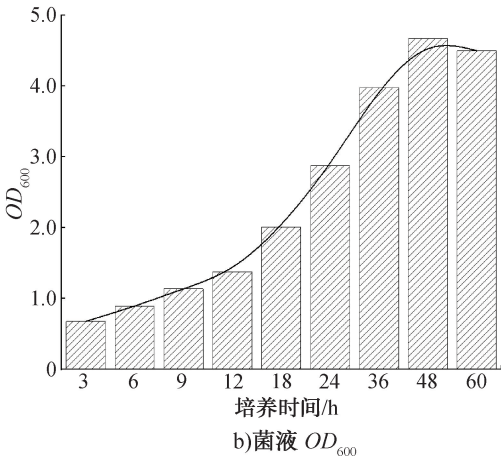


图 3 不同培养时间发酵上清液感官评价结果及菌液 OD_{600}
Fig. 3 Sensory evaluation and OD_{600} of fermentation broth at different culture time

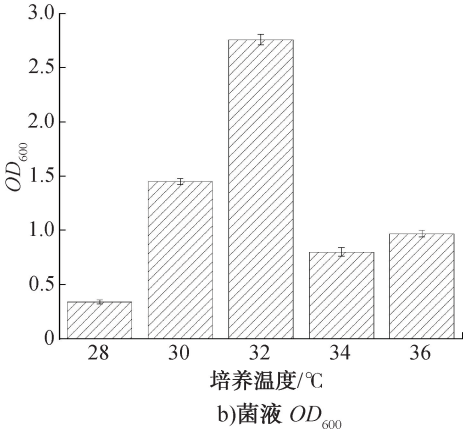
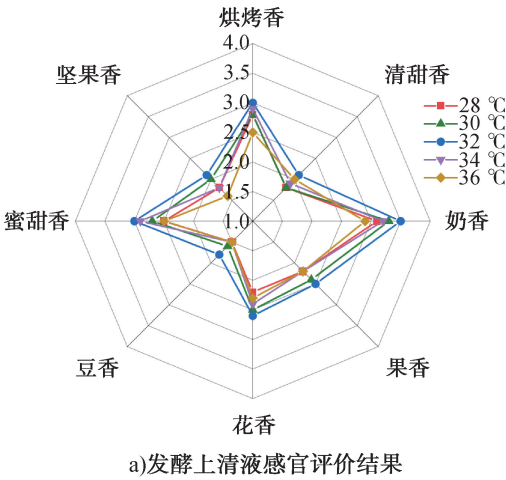


图 4 不同培养温度发酵上清液感官评价结果及菌液 OD_{600}
Fig. 4 Sensory evaluation and OD_{600} of fermentation broth at different culture temperature

加入氯化钙时,注入发酵上清液的机制雪茄烟气中奶香、烘烤香和蜜甜香明显,花香和果香均有所提升,烟气柔和,刺激性降低。培养基中分别加入硫酸镁、氯化钾和磷酸二氢钾时,烟气中奶香提升不明显,有一定的杂气和刺激性,余味发涩。由图 6b)可知,加入氯化钙时,菌体长势最好,生长量最大。综上,枯草芽孢杆菌 F2A 的优选培养基无机盐为氯化钙。

2.4 枯草芽孢杆菌 F2A 发酵上清液香味成分分析

枯草芽孢杆菌 F2A 发酵上清液主要香味成分 GC-MS 分析结果见表 2。由表 2 可知,空白培养基中香味成分较少,主要含有中长链脂肪酸辛酸和癸酸,以及少量烷烃类成分。枯草芽孢杆菌 F2A 发酵上清液中的 2-羟基-3-甲基-2-环戊烯酮含量高达

7.58 μg/mL,这是首次发现枯草芽孢杆菌能产生该物质,其具有奶甜香、焦糖样香气及坚果香韵^[20],可赋予样品较浓厚的奶香香韵。此外,枯草芽孢杆菌 F2A 发酵上清液中还含有微量的乙酸苏合香酯^[21]和 3,5-二羟基-4,4-二甲基-环己烯酮,这些成分能给样品带来一定的花香和甜香。

2.5 枯草芽孢杆菌 F2A 在雪茄烟叶发酵中的应用效果分析

2.5.1 发酵前后雪茄烟叶香味成分分析 楚雪 14 发酵组和对照组主要香味成分含量见表 3。由表 3 可知,两组烟叶提取物中共鉴定出 71 种挥发性成分,其中对照组鉴定出香味成分 36 种,发酵组鉴定出香味成分 49 种。楚雪 14 烟叶经发酵后,香兰素、

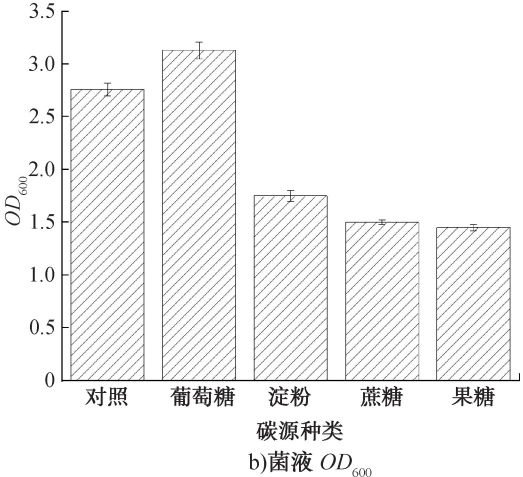
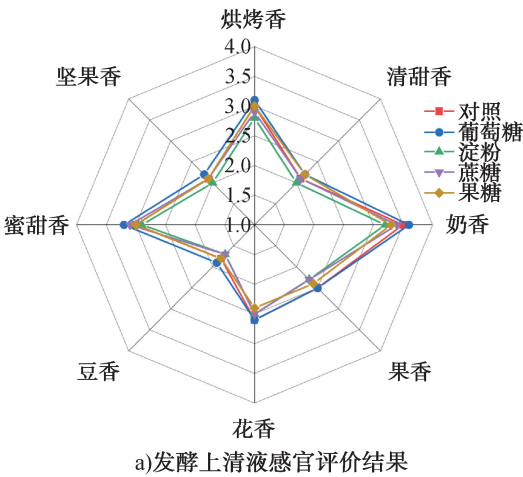


图 5 不同培养基碳源发酵上清液感官评价结果及菌液 OD₆₀₀

Fig. 5 Sensory evaluation and OD₆₀₀ of fermentation broth with different carbon sources for culture media

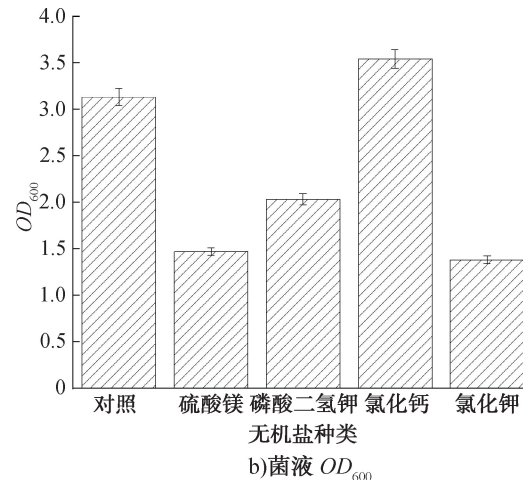
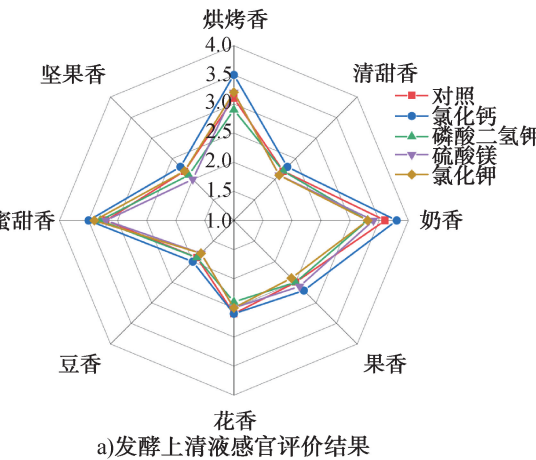


图 6 不同培养基无机盐发酵上清液感官评价结果及菌液 OD₆₀₀

Fig. 6 Sensory evaluation and OD₆₀₀ of fermentation broth with different salts for culture media

表 2 枯草芽孢杆菌 F2A 发酵上清液主要香味成分 GC-MS 分析结果

Table 2 The results of GC-MS analysis of main aroma components in fermentation broth of <i>B. subtilis</i> F2A					
t_{R}/min	$RI/$ (cal./ref.)	定性指标	香味成分	含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
				空白 培养基	发酵 上清液
10.90	865/867	RI、MS、S	2-羟基-3-甲基-2-环戊烯酮	—	7.58
13.24	1000/1000	RI、MS、S	癸烷	—	0.08
15.69	1180/11850	RI、MS、S	辛酸	0.29	—
15.81	1192/1194	RI、MS、S	乙酸苏合香酯	—	0.03
16.40	1195/1197	RI、MS、S	4-甲氧基苯酚	—	0.06
17.10	1200/1200	RI、MS、S	正十二烷	0.18	0.12
18.60	1269/1270	RI、MS	4-甲基-5-(β -羟乙基)噻唑	—	0.51
20.71	1380/1381	RI、MS、S	癸酸	2.42	—
21.88	1400/1400	RI、MS、S	十四烷	0.08	—
24.10	1471/1472	RI、MS、S	3,5-二甲氧基苯酚	—	0.10
25.19	1500/1500	RI、MS、S	环十五烷	0.11	—
25.60	1511/1512	RI、MS、S	N-(2-苯乙基)乙酰胺	—	0.02
26.30	1514/1513	RI、MS、S	2,4-二叔丁基苯酚	0.03	0.05
28.60	—	MS	六氢-3-甲基吡咯并[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮	—	1.14
30.88	—	MS	3-甲基-6-(1-甲基丙基)-2,5-哌嗪二酮	—	0.18
31.94	1749/1750	RI、MS、S	3-吡啶乙醇	—	0.35
33.50	1796/1795	RI、MS、S	六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮	—	1.91
34.60	1803	RI、MS、S	环(L-脯-L-缬)二肽	1.18	2.53
36.40	—	MS	3,5-二羟基-4,4-二甲基-环己烯酮	—	0.37
36.80	1850	MS	六氢-3-(1-甲基丙基)吡咯[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮	—	2.30
43.60	1907/1908	RI、MS、S	环(脯氨酸-亮氨酸)二肽	2.55	5.93
45.40	1934/1935	RI、MS、S	六氢-3-(苯基甲基)吡咯并[1,2-a]吡嗪-1,4-二酮	—	0.27
45.71	1964/1963	RI、MS、S	棕榈酸	0.17	—
47.00	2398/2399	RI、MS、S	2,2'-亚甲基双-(4-甲基-6-叔丁基苯酚)	—	1.32
49.50	2549/2550	RI、MS、S	邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯	5.88	5.38

注:—表示未检出,下同。

香豆素、8-甲氧基香豆素、6-乙基-5,6-二氢吡喃-2-酮、2-羟基-3-甲基-2-环戊烯酮、5,6-二氢-2H-吡喃-2-酮等奶香和甜香成分含量明显增加,这些成分能提升烟叶的奶香香韵及甜感^[12]。巨豆三烯酮、3-羟基- β -大马士革酮、新植二烯等成分含量明显增加,表明雪茄烟叶前香成分被降解。这些成分能增加雪茄烟叶的香味丰富性,并带来清香、花香和甜香气息^[6]。烟碱含量降低,且苯乙酸、己酸等酸类成分增加,可减轻雪茄烟叶的刺激感^[22]。

2.5.2 发酵前后雪茄烟叶感官评价结果分析 楚雪 14 发酵组和对照组感官评价香韵雷达图如图 7 所示。由图 7 可知,楚雪 14 对照组雪茄香气量尚丰富,奶香香韵不明显,劲头较大,刺激感较强,有一

定的杂气。使用枯草芽孢杆菌 F2A 发酵楚雪 14 雪茄烟叶后,烟气中奶香、烘烤香和蜜甜香香韵明显,坚果香、豆香等香韵有所提升,香气量提升、香气质变好,刺激感和杂气明显降低。

3 结论

本研究通过嗅香评价等方法,从烟草源微生物中筛选出 1 株产奶香香味成分的细菌,经 16S rDNA 测序,鉴定为枯草芽孢杆菌 F2A (*B. subtilis* F2A)。通过培养条件优化可知,该菌适宜的培养时间为 24 h、培养温度为 32 ℃,培养基中碳源和无机盐为葡萄糖和氯化钙。通过 GC-MS 分析,首次发现该菌能产生 2-羟基 3-甲基-2-环戊烯酮等奶甜香香韵成分。枯草芽孢杆菌 F2A 发酵楚雪 14 雪茄烟叶后,可明显提升雪茄烟叶奶香和甜香香韵,使香兰

表 3 楚雪 14 发酵组 and 对照组主要香味成分含量
Table 3 Main aroma components of Chuxue 14 cigar fermentation group and control group

成分类型	<i>t_R</i> /min	香味成分	含量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)		成分类型	<i>t_R</i> /min	香味成分	含量/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	
			对照组	发酵组				对照组	发酵组
酸类	9.52	己酸	—	0.38		50.76	(1 <i>R</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>S</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-4-异丙基-1,7,11-三甲基-2,7,11-环十四烷并三烯-1-醇	13.22	—
	9.56	3-甲基戊酸	2.41	0.31			2-(4 <i>aS</i> ,8 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)-4 <i>a</i> ,8-二甲基-3,4,4 <i>a</i> ,5,6,7,8,8 <i>a</i> -八氢萘-2-基)丙-2-醇	—	17.79
	24.49	苯甲酸	0.36	0.53				—	—
	28.30	苯乙酸	—	1.68		50.87	植醇	6.58	—
	28.91	烟酸	—	4.37				21.54	21.61
	61.17	(<i>E</i>)-3-(1 <i>H</i> -吡咯-3-基)丙-2-烯酸	—	0.78				—	—
		小计	2.77	8.05	烯炔类	59.08	小计	6.58	—
酮类	10.90	2-羟基-3-甲基-2-环戊烯酮	—	0.04		54.12	1,1,5,6,6,9-庚甲基-10-亚甲基-螺并[2.7]癸-4-烯	2.40	—
	18.89	5,6-二氢-2 <i>H</i> -吡喃-2-酮	—	7.94		54.95	长叶烯醛	2.87	—
	20.99	6-乙基-5,6-二氢-2 <i>H</i> -吡喃-2-酮	3.15	4.35		55.20	2,5-二乙基-7,7-二甲基-1,3,5-环庚三烯	—	1.38
	30.89	4-(3-吡啶基四氢呋喃)-2-酮	1.16	—		57.07	日齐素	—	2.33
	31.94	(<i>E</i>)-8-甲基-5-异丙基-6,8-壬二烯-2-酮	—	5.28		57.16	香树烯	—	4.31
	36.96	环庚三烯酮	—	0.58		57.40	长叶烯	—	1.14
	43.95	(<i>E</i>)-3,6-二甲基-3-异丙基-4,6-庚二烯-2-酮	—	0.51		58.42	新植二烯	2.77	9.22
	44.28	4-(5,5-二甲基-1-氧杂螺[2.5]辛-4-基)-3-丁烯-2-酮	0.29	—		59.14	二氢新丁香烯	4.64	—
	45.59	4-(3-吡啶基-四氢呋喃-2-酮)	—	1.72		59.40	9,10-脱氢环异长叶烯	—	2.27
	46.35	3-羟基- β -大马士革酮	0.93	1.42		59.84	4,5-二氢异长叶烯	—	4.40
	46.67	巨豆三烯酮	—	0.49		63.62	δ -愈创木烯	1.23	—
	51.77	顺式-2-苜蓿基-6-甲基环己酮	—	0.01			小计	13.91	25.05
	58.68	法尼基丙酮	4.51	—	烷烃类	36.27	4-亚甲基-1-甲基-2-(2-甲基-1-丙烯-1-基)-1-乙烯基环庚烷	3.51	—
	59.88	4-叔丁基苯丙酮	14.69	—			2-乙基双环[4.4.0]癸烷	—	0.54
	61.32	菖蒲酮	2.43	—		53.18	1,7,7-三甲基三环[2.2.1.0(2,6)]庚烷	4.37	—
		小计	27.16	22.34		55.21	2,2-二甲基-1-氧螺并[2.4]庚烷	—	4.89
醇类	39.16	5-异丙基-6-甲基-3,5-庚二烯-2-醇	—	2.21		58.69	正十二烷	0.77	—
	46.35	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,7 <i>Z</i> ,9 <i>E</i>)-5,6-环氧-7-巨豆烯-3,9-二醇	1.74	—		62.67	2,4 <i>a</i> ,8,8-四甲基十氢环丙烷[d]萘	3.17	—
	49.27	6-(3-羟基-1-丁烯基)-1,5,5-三甲基-7-氧杂双环[4.1.0]庚烷-3-醇	—	1.61		66.05	小计	11.82	5.43
					酯类	35.37	香豆素	7.25	10.37
						37.03	邻苯二甲酸二甲酯	—	1.68

表 3(续)

成分类型	t_{R}/min	香味成分	含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$		成分类型	t_{R}/min	香味成分	含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	
			对照组	发酵组				对照组	发酵组
生物碱及胺类	39.81	8-甲氧基香豆素	—	2.15	苯及酚类	50.77	可替宁	17.18	18.11
	56.42	己二酸二(2-乙基己)酯	2.35	—		54.47	3',4'-二氢-2'H-螺(环戊烷-1,1'-吡咯并[1,2-a]吡嗪)	—	61.36
	59.38	邻苯二甲酸庚-4-基辛酯	1.93	—		56.75	N-乙酰基去甲基尼古丁	12.06	14.31
	64.30	小白菊内酯	2.50	—		57.40	十八碳-9-烯酰胺	0.32	—
		小计	14.03	14.20		58.19	N-甲基-4-吡啶甲酰胺	0.30	—
	9.47	甲酰肼	—	0.47		58.91	N,N-(2-吡啶基)-(4-吡啶甲基)胺	—	0.34
	27.62	吡嗪	0.8	0.67		76.68	芥酸酰胺	8.52	0.31
	30.53	烟碱	683.25	637.53			小计	764.57	799.53
	34.67	麦司明	14.31	17.68		36.54	香兰素	—	2.63
	36.25	N-甲基烟酰胺	—	1.05		44.17	1,4-二甲基-2,5-二(丙-2-基)苯	—	0.60
	36.87	降烟碱	—	1.71		55.70	3,5-二羟基甲苯	—	1.47
	38.53	二烯烟碱	1.55	2.68		55.72	3-甲基邻苯二酚	—	1.71
	40.62	新烟草碱	—	6.94			小计	—	6.41
	41.58	2,3'-联吡啶	25.79	36.37			合计	855.8	902.62
	43.94	3',4'-二氢-2'-吡咯并(环戊烷-1,1'-吡咯并[1,2-a]吡嗪)	0.49	—					

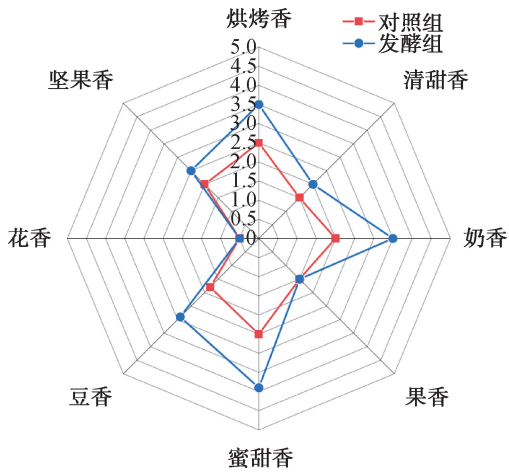


图 7 楚雪 14 发酵组和对照组感官评价香韵雷达图
Fig. 7 Charm radar map of Chuxue 14 cigar fermentation group and control group

素、香豆素、6-乙基-5,6-二氢吡喃-2-酮、2-羟基-3-甲基-2-环戊烯酮等奶香和甜香成分含量明显增加,且能增加烟叶中巨豆三烯酮、3-羟基- β -大马士革酮、新植二烯、苯乙酸等成分。发酵后烟叶制成的雪茄烟香气丰富性提升、刺激感降低。枯草芽孢杆菌 F2A 可应用于国产雪茄烟叶品质提升,下一步将开展该菌的烟叶原料适用性和混菌协同发酵研究。

参考文献:

[1] 周婷,范静苑,邢蕾,等. 国产雪茄烟叶原料应用研究的探索和思考[J]. 现代工业经济和信息化,2021,11(7):140-142,148.

[2] 章征程,柴志顺,辛永康,等. 微生物在国产雪茄烟叶原料生产过程中的应用研究进展[J]. 轻工学报,2024,39(1):64-72.

[3] 蔡斌,耿召良,高华军,等. 国产雪茄原料生产技术研究现状[J]. 中国烟草学报,2019,25(6):110-119.

[4] 李爱军,范静苑,秦艳青,等. 海南与印尼茄衣烟叶质量差异分析[J]. 中国烟草学报,2013,19(4):60-63.

[5] 叶建斌,王璐,杨峰,等. 类芽孢杆菌发酵原料浸提液提升再造烟叶品质[J]. 中国烟草学报,2019,25(1):33-38.

[6] 王颖,马玲玲,吕欣,等. 单一和复配微生物固态发酵对卷烟叶组主要化学成分的影响[J]. 烟草科技,2015,48(11):47-52.

[7] YAO L, HUANG C Y, DING J Y, et al. Application of yeast in plant-derived aroma formation from cigar filler leaves[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022,10:1093755.

[8] ZHENG T F, ZHANG Q Y, WU Q Y, et al. Effects of inoculation with *Acinetobacter* on fermentation of cigar tobacco leaves [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13:911791.

[9] WANG X J, GUO M Y, SONG H L, et al. Characterization of key aroma compounds in traditional Chinese soy sauce

through the molecular sensory science technique [J]. LWT-Food Science and Technology,2020,128:109413.

[10] 张倩颖,杨双红,蔡文,等.冬虫夏草菌株发酵槐花香料的制备及其卷烟加香应用研究[J].轻工学报,2024,39(3):46-53.

[11] LI H H, QIN D, WU Z Y, et al. Characterization of key aroma compounds in Chinese Guojing sesame-flavor Baijiu by means of molecular sensory science [J]. Food Chemistry,2019,284:100-107.

[12] 胡安福,范武,夏倩,等.卷烟主流烟气焦甜、奶香和豆香特征成分组群的分布特征和感官贡献[J].烟草科技,2020,53(12):27-36.

[13] 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.

[14] 徐波,张博,王剑,等.国产雪茄烟感官质量评价方法的建立[J].烟草科技,2024,57(2):54-60.

[15] 四川中烟长城雪茄烟厂.中式雪茄烟“醇甜香”风格特征及品质感官评价方法:QJ/08. J. 6005—2020A[S]. 2020-03-10.

[16] 李勇,林茜,逢涛,等.气相色谱-质谱法定性定量分析烟叶挥发性香气成分[J].分析科学学报,2015,31(3):372-378.

[17] 芦楠,聂聪,谢剑平,等.烟草挥发性成分的谱图检索结合保留指数和准确质量定性[J].烟草科技,2010,43(3):26-31,50.

[18] 毕荣宇,王国江,卢君,等.GC-MS结合自动解卷积技术分析谷壳中挥发性风味成分[J].中国酿造,2024,43(2):243-252.

[19] 陈艳.肉豆蔻精油挥发性组分色谱保留指数的预测[J].食品科学,2011,32(12):274-277.

[20] 李云霞,李琼,沈鹏,等.2-羟基-3-甲基-2-环戊烯-1-酮的合成研究[J].香料香精化妆品,2008(4):9-11.

[21] 于奇.浅析苏合香酯系列香料在食品领域中的应用[J].食品安全导刊,2021(12):181-182.

[22] 李天笑,李品鹤,蒋忠荣,等.雪茄烟末复合焦甜香料的制备及机制雪茄的应用研究[J].中国烟草学报,2022,28(4):114-124.

Milky flavor-producing *Bacillus subtilis* and its application in cigar tobacco leaves

LI Tianxiao¹,ZHANG Dayuan¹,WANG Yue^{2,3},LEI Jinshan^{2,3},CAO Yuan¹,
XU Chunping¹,ZHANG Qianying^{2,3},LI Dongliang^{2,3}

1. College of Food and Biological Engineering,Zhengzhou University of Light Industry,Zhengzhou 450001,China;
2. Technology Center,China Tobacco Sichuan Industrial Co.,Ltd.,Chengdu 610100,China;
3. Cigar Fermentation Technology Key Laboratory of Tobacco Industry,Chengdu 610100,China

Abstract: In order to solve the problems of poor aroma and strong irritation of Sino-cigar tobacco leaves, milky flavor-producing microbial strain isolated from tobacco leaves was screened through smell evaluation in this study. The bacterium was identified by microscopic characteristics and 16S rDNA sequence analysis. The liquid fermentation conditions were optimized by sensory evaluation of flavoring in machine-made cigar and *OD*₆₀₀ of bacterial turbidity. The key aroma components of the fermentation broth were determined by GC-MS analysis. Flavoring effects of the *Bacillus* strain on the sensory quality of cigar tobacco leaves were also studied. The results showed that one bacterium strain F2A was screened out, which was identified as *B. subtilis*. The preferred conditions for liquid fermentation were temperature of 32 ℃, time of 24 h, carbon sources of glucose, and inorganic salts of CaCl₂. The main milky and sweet aroma component in the fermentation broth was identified as 2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopentenone with a high content of 7.58 μg/mL. After fermentation by *B. subtilis* F2A, the contents of milky and sweet flavor components such as vanillin, coumarin, 6-ethyl-5,6-dihydropyran-2-one, and 2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopentenone in fermented Chexue 14 cigar tobacco leaves were significantly increased, which significantly enhanced milky and sweet aromas. And the enhancement of tabanone, 3-hydroxy-β-damascone, and neophytadiene could improve freshness and floral smell. After fermentation, the milky and sweet aromas of cigars produced by Chexue 14 tobacco leaves were significantly improved, and the irritation was reduced. This study suggested *B. subtilis* F2A could produce 2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopentenone and other flavor compounds, which provides a new way and theoretical support for the quality improvement of cigar tobacco leaves.

Key words: *Bacillus subtilis*; milky aroma; cigar tobacco leaf; 2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopentenone