



赵巧玥,李欣燕,王刘胜,等. 柠檬罗勒产香细菌发酵条件优化及卷烟加香应用[J]. 轻工学报, 2026, 41(1):111-126.
ZHAO Q Y, LI X Y, WANG L S, et al. Optimization of fermentation conditions of aroma-producing endophytic bacteria in *Ocimum × citriodorum* and its application in cigarette flavoring[J]. Journal of Light Industry, 2026, 41(1):111-126. DOI:10.12187/2026.01.011

柠檬罗勒产香细菌发酵条件优化及卷烟加香应用

赵巧玥¹, 李欣燕¹, 王刘胜², 刘伟², 马戎², 冯文宁², 李媛媛¹, 赵铭钦¹

1. 河南农业大学 烟草学院,河南 郑州 450046;
2. 河北中烟工业有限责任公司,河北 石家庄 050051

摘要:【目的】挖掘柠檬罗勒(*Ocimum × citriodorum*)内生细菌的产香潜力。【方法】采用传统分离培养结合形态学与分子生物学方法,从柠檬罗勒根、茎、叶中筛选鉴定优势产香菌株,通过单因素试验与响应面法优化发酵条件,利用同时蒸馏萃取(SDE)法提取挥发油并进行卷烟加香评价。【结果】共分离获得38株内生细菌,感官评价确定菌株J-3-6的产香品质最佳,经鉴定为菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*),呈现清甜茉莉花香气,主要产香物质为吲哚,最优发酵条件为乳糖质量浓度10.2 g/L、酵母浸粉质量浓度50.7 g/L、装液量259 mL、接种量7%、初始pH值7、发酵温度26 °C、摇床转速180 r/min和发酵时间48 h,在此条件下,吲哚产量是初始产量的5.53倍,其发酵体系鉴定出45种挥发性有机化合物,以醇类、酯类和杂环类为主,香气特征在清新果香的基础上融合了复杂花香与木质香调,卷烟加香评价表明最适宜添加量为4 μg/支。【结论】菠萝泛菌J-3-6经响应面法发酵条件优化可显著提升吲哚产量,其代谢产物挥发油可醇和烟香,降低卷烟杂气与刺激性。

关键词:柠檬罗勒;菠萝泛菌;发酵条件优化;生物产香;卷烟加香

中图分类号:TS264.3;TQ656+.5 **文献标识码:**A **文章编号:**2096-1553(2026)01-0111-16

0 引言

柠檬罗勒(*Ocimum × citriodorum*)是唇形科罗勒属的天然杂交种质,原产于法国及中东地区,为甜罗勒(*O. basilicum*)与非洲罗勒(*O. africanum*)的杂交品种。在我国河南地区,柠檬罗勒兼具重要的药用与食用价值,干燥全草入药可解热消炎、开胃消食,鲜叶因富含特征性柠檬薄荷香气被广泛用于地

方特色膳食,其香气成分主要由醇类、烯烃类、酮类、杂环类、烷烃类、芳烃类及胺类化合物构成^[1-3]。近年来,植物-微生物互作机制的研究为解析罗勒属植物功能成分的形成路径提供了新的研究视角。研究表明,罗勒植物与特定微生物互作对香气成分的形成具有显著影响。H. F. Al-harthi等^[4]研究发现,沙特阿拉伯地区的罗勒植物中,链格孢属微生物占比高达41.50%,其产生的吲哚乙酸(IAA)产量

收稿日期:2025-04-07;修回日期:2025-08-04;出版日期:2026-02-15

基金项目:河北中烟工业有限责任公司重点科技项目(HBZY2024A018);中国烟草总公司重大科技项目(110202201036)

作者简介:赵巧玥(2001—),女,湖北省孝感市人,河南农业大学硕士研究生,主要研究方向为烟草化学与香精香料。E-mail:zhaqiaoyue1025@163.com

通信作者:赵铭钦(1964—),男,河南省新密市人,河南农业大学教授,博士生导师,主要研究方向为烟草化学与香精香料。E-mail:zhaomingqin@126.com

达 71.56 μg/mL, 通过调控植物激素信号通路可影响萜类化合物的合成。此外, 芽孢杆菌属等特定内生细菌可通过靶向代谢重编程显著提升甜罗勒中 γ-生育酚含量, 揭示了微生物对植物次生代谢物的特异性调控作用^[5]。

在罗勒属植物的香气成分中, 吲哚作为一种重要的杂环化合物, 因其独特的苯并吡咯结构(分子式 C₈H₇N)而备受关注。作为植物生长素吲哚乙酸(IAA)的前体, 吲哚广泛应用于植物生长调节剂及香料、染料等领域, 具有重要的工业价值^[6]。传统的吲哚制备主要依赖邻氨基乙苯脱氢法, 该方法存在副产物残留高、香气化学感强、工艺复杂等缺陷, 难以满足现代食品香精对天然性和安全性的要求^[7]。相比之下, 微生物可通过定向模拟天然代谢途径, 高效、安全地合成吲哚类化合物, 其产物已被欧美食品法规界定为天然产物, 该方法具有底物可再生性强、产物结构多样性高等优势, 在食品风味改良与绿色制造中展现出广阔的应用前景^[8-9]。

基于此, 本研究拟以河南产柠檬罗勒为实验材料, 采用传统培养分离、形态学观察、分子生物学等方法对柠檬罗勒中的产香菌株进行筛选、鉴定并对其发酵条件进行优化, 通过顶空-固相微萃取-气相色谱-质谱联用(HS-SPME-GC-MS)技术对其香味成分进行分析鉴定, 评价其挥发油在卷烟加香中的应用效果, 以期为天然绿色香料的开发及生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂与培养基

新鲜大叶荆芥(学名为柠檬罗勒), 产自河南省周口市; 硝酸钠、硫酸铵、硫酸镁、硫酸亚铁、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠、柠檬酸、无水硫酸钠、次氯酸钠、联苯, 国药集团化学试剂有限公司; 牛肉膏、果糖、胰蛋白胨, 北京奥博星生物技术有限责任公司; 精氨酸、葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、琼脂粉, 北京 Solarbio 科技有限公司; 酵母浸粉, 赛默飞世尔科技有限公司; 2.5% 戊二醛固定液、无水乙醇、溴甲酚紫、溴百里酚蓝, 上海麦克林生化科技有限公司; Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂

盒, 生工生物工程(上海)股份有限责任公司。除特别标注外, 其余试剂均为分析纯。

LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10.0 g/L, 酵母浸粉 5.0 g/L, 氯化钠 10.0 g/L, pH 值调至 7.0~7.2, 在此基础上添加 20.0 g/L 琼脂, 即得 LB 固体培养基。

蛋白胨培养基: 蛋白胨 10.0 g/L, 氯化钠 5.0 g/L, 果糖 5.0 g/L, 蔗糖 5.0 g/L, 溴甲酚紫 0.02 g/L。

精氨酸脱羧酶培养基: 蛋白胨 5.0 g/L, 牛肉浸膏 3.0 g/L, 葡萄糖 1.0 g/L, 精氨酸 10.0 g/L, 溴甲酚紫 0.02 g/L。

柠檬酸盐培养基: 柠檬酸钠 5.0 g/L, 磷酸二氢钠 2.0 g/L, 磷酸氢二钠 2.0 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 硫酸亚铁 0.01 g/L, 溴百里酚蓝 0.08 g/L, 琼脂 15 g/L。

发酵培养基: 乳糖 10.2 g/L、酵母浸粉 50.7 g/L、氯化钠 5.0 g/L, pH 值 7.0。

柠檬罗勒浆培养基: 将新鲜柠檬罗勒茎叶组织经无菌水清洗后, 打碎获得浆液, 柠檬罗勒浆液与发酵培养基的体积比为 3:2。

上述培养基均于 121 °C 高压蒸汽条件下灭菌 20 min。

1.2 主要仪器与设备

UV-1800PC 型紫外-可见分光光度计, 上海菁华科技仪器有限公司; G180 型立式自动压力蒸汽灭菌锅, 致微仪器有限公司; SW-CJ-2FD 型超净工作台, 苏州净化设备有限责任公司; 4-HWS-P400C 型恒温恒湿培养箱, 合肥达斯卡特生物科技有限公司; PHS-3C 型精密 pH 酸度计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; K850 型临界点干燥仪, 英国 Quorom 公司; MC1000 型离子溅射仪、Regulus8100 型扫描电子显微镜(SEM), 日本 Hitachi 公司; 7890A-5975C 型 GC-MS 仪, 安捷伦科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 产香菌株的分离与纯化 用纯水冲洗掉柠檬罗勒表面的泥沙和杂质, 再用滤纸擦干表面水分后送入超净工作台内; 将柠檬罗勒的根茎叶分别切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 根茎依次用 75% 乙醇溶液(乙醇溶液的百分数均指体积分数)消毒 1 min, 质量分数 2.5% 的次氯酸钠溶液消毒 5 min, 75% 乙醇溶液消毒 0.5 min; 叶依次用 75% 乙醇溶液消毒

1 min, 质量分数 2.5% 的次氯酸钠溶液消毒 3 min, 75% 乙醇溶液消毒 0.5 min, 每次操作后用无菌水冲洗 3 次, 吸取 100 μL 最后冲洗的无菌水涂布在 LB 固体培养基上, 于 28 °C 下培养 2~3 d, 无任何菌落生长, 则表明消毒完全。挑取不同形态的单菌落, 采用平板划线法分离纯化菌株, 并编号保存。

1.3.2 摆瓶发酵筛选 取纯化后的单菌落接种至 LB 液体培养基中, 28 °C、160 r/min 振荡培养 2~3 d, 用紫外-可见分光光度计测 600 nm 处吸光度, 绘制生长曲线。于超净工作台中, 通过感官评价结合挥发性代谢产物分析, 筛选具有显著特征性香气的菌株进行发酵。评价指标包括菌株香气度、差异度、留香时间、刺激性, 各维度满分分别为 20 分、10 分、10 分、10 分、10 分, 参考张鹏等^[10-11]的方法, 筛选发酵后无异味、气味清凉甘甜的产香菌株。

1.3.3 产香菌株鉴定 1) 形态学鉴定。参照《常见细菌系统鉴定手册》^[12] 和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[13] 对产香菌株 J-3-6 的形态特征和生理生化特征进行观察和测定, 包括革兰氏染色、糖发酵实验、精氨酸水解实验等。

革兰氏染色: 制作涂片, 结晶紫初染 1 min, 无菌水冲洗, 吸干, 碘液媒染 1 min, 无菌水冲洗, 吸干, 95% 乙醇溶液脱色 30 s, 无菌水冲洗; 番红复染 2 min, 无菌水冲洗, 吸干, 在光学显微镜下观察。

糖发酵实验: 挑取待测菌株接种于含果糖、蔗糖的蛋白胨培养基(内含杜氏小管)中, 同时设置阴性对照(不接种菌株), 于 37 °C 恒温培养 24~48 h, 观察培养基颜色变化及是否产气。

精氨酸水解实验: 穿刺接种精氨酸脱羧酶培养基并覆盖石蜡油, 37 °C 培养后, 观察培养基颜色变化。

V-P 实验: 菌液在葡萄糖蛋白胨中培养 48 h, 加入 Barritt 试剂, 振荡后静置 10~15 min, 观察颜色变化。

柠檬酸盐实验: 将菌株接种至柠檬酸盐培养基, 37 °C 培养 48 h, 观察颜色变化。

SEM 分析: 将收集的细菌沉淀置于装有 2.5% 戊二醛的离心管中, 放入 4 °C 冰箱中固定 12~24 h。倒掉固定液, 用磷酸缓冲液漂洗样品 3 次, 每次

15 min。用梯度(30%、50%、70%、80%、90% 和 95%)乙醇溶液对样品进行脱水处理, 每种浓度处理 15 min, 再用无水乙醇处理 20 min, 最后将样品放于无水乙醇中。在临界点干燥仪中干燥后, 利用导电碳胶将样品固定于 SEM 样品台上, 离子型溅射仪喷 Pt 120 s 左右, 观察细菌形态并采集图像。

2) 分子水平鉴定。参照张玥等^[14] 的方法, 采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取菌株的总 DNA, 以细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTGATCM-TGGCTCAG-3') 和 1492R(5'-GGTTACCTGTTACGA CTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环, 72 °C 终延伸 7 min。反应完成后, 取 3 μL PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将产物送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序, 测序结果与 NCBI 16S 数据库中的序列进行比对, 构建系统发育树, 确定菌株的种属。

1.3.4 发酵液挥发性成分测定 取 5 mL 液态发酵产物于 15 mL 萃取瓶中, 加入 2 g NaCl 和搅拌磁子, 再加入 50 μL 内标溶液(内标物为 10 mg/mL 联苯), 然后快速密封。将 SPME 萃取纤维头在 GC-MS 进样口于 250 °C 条件下老化至无杂峰。将样品瓶置于固相微萃取装置上, 温度为 60 °C, 搅拌速度为 1000 r/min, 预热 15 min。

GC 条件: HP-INNOWAX 色谱柱 (60.0 m × 250 $\mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$), 载气为 He, 恒定流速为 1.0 mL/min; 起始温度 40 °C 保持 3 min, 以 5 °C/min 的速度升至 70 °C 并保持 2 min, 以 5 °C/min 的速度升至 150 °C 并保持 2 min, 以 8 °C/min 的速度升至 230 °C 并保持 5 min; 以 12 °C/min 升温至 270 °C 并保持 8 min, 结束。

MS 条件: 电子电离源(EI 源); 电子能量为 70 eV; 离子源温度为 230 °C; 四极杆温度为 150 °C; 扫描模式为 Scan; 扫描质量范围为 35~800 amu。

定性及定量分析: 对检测出的化学成分采用 MS 数据库 NIST20、保留时间进行定性, 选取匹配度大于 80% 的化合物进行分析, 以联苯作为内标物进行定量分析, 计算发酵液中化学成分的相对含量。

1.3.5 单因素试验 取 OD_{600} 为 0.2 的菌液进行

发酵,初步发酵培养基由 LB 液体培养基改良而成,以吲哚产量为指标。首先确定接种量(1%、3%、5%、7%、9%)、pH 值(7、8、9)、碳源种类(牛肉膏、蔗糖、乳糖、麦芽糖、果糖)和氮源种类(蛋白胨、酵母浸粉、胰蛋白胨、硝酸钠、硫酸铵),然后进一步优化乳糖质量浓度(6 g/L、8 g/L、10 g/L、12 g/L、14 g/L)、酵母浸粉质量浓度(30 g/L、40 g/L、50 g/L、60 g/L、70 g/L)、发酵温度(24 °C、26 °C、28 °C、30 °C、32 °C)、装液量(100 mL、150 mL、200 mL、250 mL、300 mL)、摇床转速(160 r/min、170 r/min、180 r/min、190 r/min、200 r/min)和发酵时间(12 h、24 h、36 h、48 h、60 h)。

1.3.6 Plackett-Burman 试验 根据单因素试验结果,以吲哚产量为响应值(Y),对乳糖质量浓度(A)、酵母浸粉质量浓度(B)、装液量(C)、发酵温度(D)、摇床转速(E)和发酵时间(F)6 个因素进行 N 为 6 的 Plackett-Burman 试验设计,因素及水平见表 1。

1.3.7 最陡爬坡试验 在 Plackett-Burman 试验得到的 3 个显著性因素的基础上,根据回归系数和 3 个因素的效应值大小,确定最陡爬坡试验的爬坡方向和步长,以及包含最优值的因素范围,寻找后续响应面设计需要的中心点。

1.3.8 响应面优化试验 在最陡爬坡试验结果的基础上,分别选取乳糖质量浓度(A)、酵母浸粉质量浓度(B)、装液量(C)3 个因素作为考查对象,以吲哚产量(Y)为响应值,利用 Design-Expert 13.0 设计响应面试验,确定最佳发酵培养基成分及培养条件。

1.3.9 最优结果应用设计 根据响应面优化试验结果重复发酵 3 次,与优化前发酵液对比,以验证优化效果。将最优条件发酵液按 7% 接种量接种至柠檬罗勒浆培养基中,于 26 °C、180 r/min 条件下振荡培养 48 h,接种等量蒸馏水作为空白对照组,对收集的发酵样品进行 HS-SPME-GC/MS 联用分析,采用

同时蒸馏萃取法提取发酵液挥发油,准确量取 300 mL 发酵液放入同时蒸馏萃取装置一端的 1000 mL 烧瓶中,用电热套加热,装置的另一端为盛有 50 mL 二氯甲烷的 100 mL 浓缩瓶,60 °C 下水浴加热,同时蒸馏萃取 6 h,在常温和常压下浓缩旋干,即得挥发油。

1.3.10 卷烟加香与感官评价 称取 0.05 g 挥发油,用无水乙醇溶解后定容至 50 mL,配制 1.0 g/L 母液。分别量取 2 mL、4 mL、6 mL 母液梯度稀释至 10 mL,制得 0.2 g/L、0.4 g/L、0.6 g/L 工作液。采用微量注射器将各梯度工作液以 10 μL/支注入卷烟,制得添加量分别为 2 μg/支、4 μg/支、6 μg/支的试样,将其置于恒温(22±2) °C 和恒湿(60±2)% 条件下平衡 48 h。设置等体积乙醇溶剂作为空白对照(CK1),等量蒸馏水发酵的挥发油为对照组(CK2),委托河北中烟工业有限责任公司评吸小组进行感官质量评价,分别依照光泽(满分 5 分)、香气(满分 32 分)、谐调(满分 6 分)、杂气(满分 12 分)、刺激性(满分 20 分)和余味(满分 25 分)这 6 项指标进行定性描述,记录整个抽吸过程中的感官感受,比较抽吸前后的差异。

1.4 数据处理

采用 Excel 2019、Mega 11.0、Origin 2024 等软件进行数据处理及绘图,使用 Design Expert 13.0 进行模型拟合和方差分析。

2 结果与讨论

2.1 产香菌株鉴定结果分析

2.1.1 嗅香鉴定结果 从柠檬罗勒的根茎叶中共分离得到 38 株菌,经超净台初步嗅闻结合摇瓶发酵二次嗅闻,获得 9 株具有特征香气的菌株,对其菌液的挥发香气进行感官评价,结果见表 2。除风味较差的 G-3-1、T-2-1、T-2-6、T-3-8、T-3-17、WXDY-2 这 6 株菌之外,对剩下的 3 株香味较怡人的菌株进行对比分析,其中 J-3-6 的清甜花香气味最为突出,T-3-14 和 T-3-21 有微弱的清甜感,因此选择香气较愉悦的菌株 J-3-6 进行后续实验。

2.1.2 形态学鉴定结果 菌株 J-3-6 的单菌落形态和菌体形态见图 1,生理生化特征指标见表 3。由图

表 1 Plackett-Burman 试验因素及水平

Table 1 Plackett-Burman test factors and levels

| 水平 | 因素 | | | | | |
|----|----------------------|----------------------|--------|--------|------------------------|-------|
| | $A/(g \cdot L^{-1})$ | $B/(g \cdot L^{-1})$ | C/mL | $D/°C$ | $E/(r \cdot min^{-1})$ | F/h |
| -1 | 8 | 40 | 200 | 24 | 170 | 36 |
| 1 | 12 | 60 | 300 | 28 | 190 | 60 |

1可知,菌株 J-3-6 在 LB 固体培养基上的菌落呈圆形,边缘规整,表面光滑而湿润,质地柔软而黏稠,易挑起,不透明,有光泽,颜色为黄色或淡黄色。SEM 下菌株 J-3-6 为杆状,菌株形态或直或弯,有 1~3 根极端鞭毛,表面呈褶皱状。由表 3 可知,革兰氏染色和精氨酸水解实验结果呈阴性,V-P 实验结果呈阳性,能够利用蔗糖、果糖、柠檬酸盐,初步判断菌株 J-3-6 为泛菌属。

2.1.3 分子生物学鉴定结果 基于 16S rDNA 基因序列构建的菌株 J-3-6 系统发育树见图 2。由图 2 可知,菌株 J-3-6 与菠萝泛菌 LrBB16 (*Pantoea ananatis* strain LrBB16) 聚在同一个分支,亲缘关系最近,鉴定其为泛菌属菠萝泛菌,Genbank 序列号为 PV759446,已于 2025 年 3 月 3 日在中国典型培养物保藏中心登记保藏,保藏号为 CCTCC NO: M 2025339。根据国际菌种保藏中心 ATCC (<https://www.atcc.org/>) 及中国普通微生物保藏管理中心 CGMCC (<https://cgmcc.net/>) 记载,菠萝泛菌属于生

物安全等级 1 级 BSL1(四类非致病性)微生物,其分离自柠檬罗勒且未见人畜致病报道。

2.2 单因素试验结果分析

2.2.1 接种量、pH 值 不同接种量和 pH 值对菌株 J-3-6 增殖的影响见图 3。由图 3a) 可知,接种量过低,初始菌体浓度不足,导致增殖启动缓慢;当菌株 J-3-6 接种量提升至 7% 时,菌体增殖速率最快,OD₆₀₀ 峰值最高(2.402)且稳定性强;接种量过高,营养竞争加剧,后期菌体生长受抑制^[15]。因此,确定适宜接种量为 7%。

由图 3b) 可知,随着 pH 值的升高,菌株 OD₆₀₀ 先升后降,当 pH 值为 7,摇床培养 22 h 时达到最大,为 2.086 g/L。赵丽雯等^[16]研究发现,中性环境可维持胞内酶活性及代谢通量平衡,当 pH 值为 7 时,菌体代谢通量和酶活性处于最佳平衡状态,且维持色氨酸酶活性的最适 pH 值为 6.5~7.5,本研究结果与之较一致。酸性环境易引发乙酸等代谢副产物蓄积,使关键脱氢酶活性降低,而碱性环境

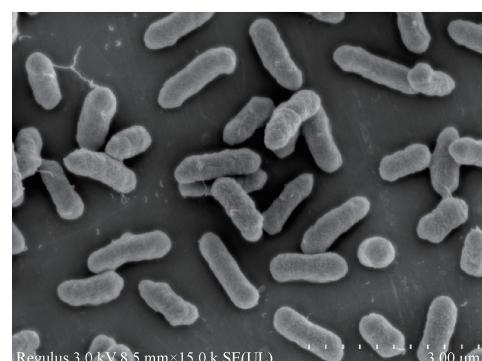
表 2 柠檬罗勒内生细菌产香能力初筛结果

Table 2 Preliminary screening results of aroma-producing ability of endophytic bacteria in *O. × citriodorum* 分

| 菌株编号 | 香气描述 | 香气度 | 差异度 | 留香时间 | 刺激性 | 总分 |
|--------|----------------|-----|-----|------|-----|----|
| G-3-1 | 强烈的乳脂,伴有醋酸气息 | 15 | 6 | 5 | 3 | 29 |
| J-3-6 | 清甜花香,伴有沉重的茉莉香气 | 16 | 5 | 6 | 7 | 34 |
| T-2-1 | 氨味 | 13 | 6 | 4 | 2 | 25 |
| T-2-6 | 刺激性酸败气味 | 15 | 6 | 4 | 2 | 25 |
| T-3-8 | 类似皮蛋的硫化氢气味 | 13 | 7 | 6 | 3 | 29 |
| T-3-14 | 青草味、植物茎甜感 | 12 | 8 | 4 | 6 | 30 |
| T-3-17 | 烤甜香 | 13 | 6 | 4 | 2 | 25 |
| T-3-21 | 青草气味 | 10 | 5 | 3 | 6 | 24 |
| WXDY-2 | 鱼腥味 | 14 | 8 | 5 | 4 | 31 |



a)单菌落形态



b)菌体形态

图 1 菌株 J-3-6 的单菌落形态和菌体形态

Fig. 1 Single colony morphology and cell morphology of strain J-3-6

易导致碱性磷酸酶异常激活,促使ATP无效消耗率增加^[17],因此,确定适宜pH值为7。

表3 菌株J-3-6生理生化特征指标

Table 3 Physiological and biochemical characteristic indices of strain J-3-6

| 生理生化特征 | 实验结果 |
|--------|------|
| 革兰氏染色 | - |
| 果糖发酵 | + |
| 蔗糖发酵 | + |
| 精氨酸水解 | - |
| V-P实验 | + |
| 柠檬酸盐利用 | + |

注:+表示实验结果呈阳性;-表示实验结果呈阴性。

2.2.2 碳源种类及质量浓度 碳源种类及质量浓度对菌株J-3-6增殖和吲哚产量的影响见图4,其中不同小写字母表示在0.05水平下差异显著,下同。由图4a)可知,在供试的5种碳源中,乳糖和麦芽糖对菌株J-3-6生长的促进作用较为显著,但进入稳定期后,麦芽糖组的菌体密度显著低于乳糖组,这可能是因为乳糖作为诱导型碳源,能够通过碳分解代谢物抑制(Carbon Catabolite Repression,CCR)机制,有效减轻葡萄糖效应对色氨酸酶的抑制作用,同时借助环腺苷酸受体蛋白(cAMP Receptor Protein,CRP)调控系统,增强次级代谢产物吲哚的合成^[18]。因

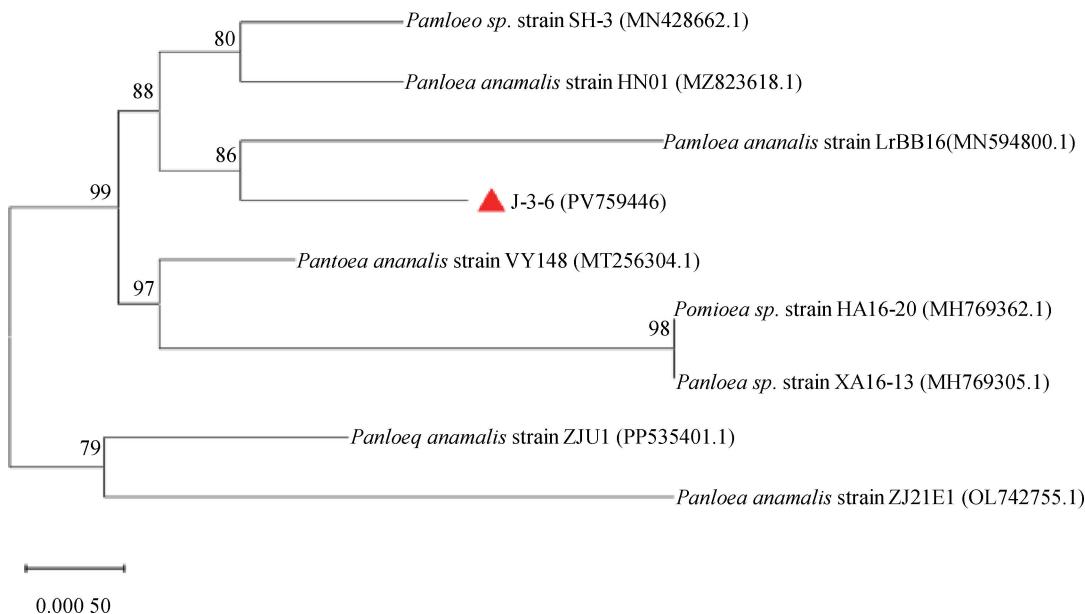


图2 基于16S rDNA序列构建的菌株J-3-6系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain J-3-6 constructed based on 16S rDNA sequence

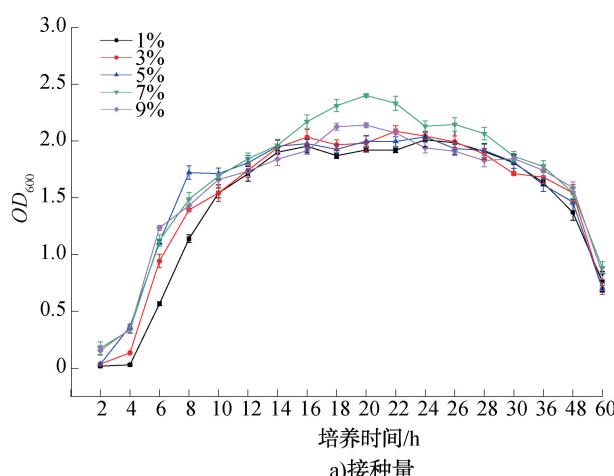
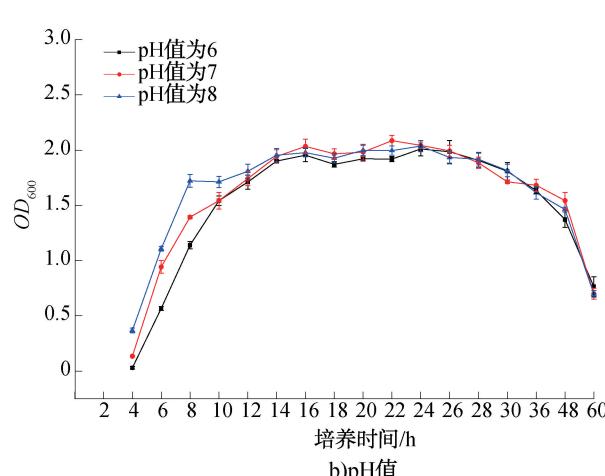


图3 不同接种量对菌株J-3-6增殖的影响

Fig. 3 Effects of different inoculation amounts and pH values on the proliferation of strain J-3-6



此,确定适宜碳源为乳糖。

由图 4b)可知,当乳糖质量浓度为 10 g/L 时,吲哚产量达最高值 2.39 g/L,这可能是因为乳糖此时所提供的碳骨架和能量供给与菌株 J-3-6 的代谢需求达到了最佳匹配状态。当乳糖质量浓度为 6 g/L 时,碳源不足限制了菌体生长及次级代谢启动,而当增加至 14 g/L 时,碳源过量可能会通过反馈抑制干扰代谢通路。因此,确定乳糖适宜质量浓度为 10 g/L。

2.2.3 氮源种类及质量浓度 氮源种类及质量浓度对 J-3-6 增殖和吲哚产量的影响见图 5。由图 5a)可知,当氮源为酵母浸粉时,菌株 J-3-6 在生长期与稳定期的 OD_{600} 均显著高于其他氮源,且在发酵后期仍呈现持续增长趋势, OD_{600} 最高可达 3.24,表明酵母浸粉的氮源释放速率与菌体需求匹配度更高。酵母浸粉中富含色氨酸,能显著提升发酵底物浓度,而色氨酸是吲哚合成的重要前体。硝酸钠、硫酸铵等无机氮源则较差,可能是因为无机氮源需要依赖菌体的主动吸收和转化,这增加了菌体的代谢负荷,间接导致菌体的增殖效率低下。因此,确定适宜氮源为酵母浸粉。

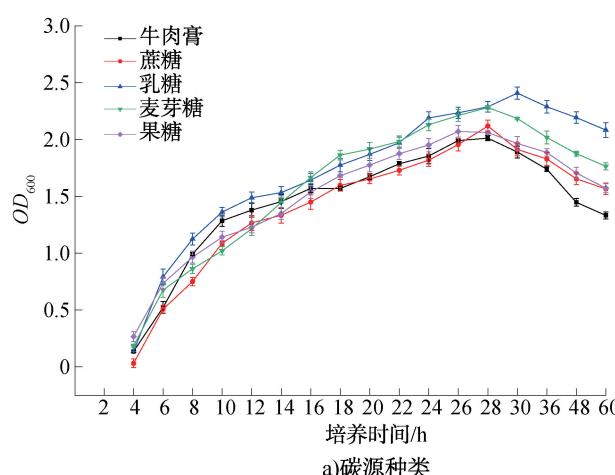
由图 5b)可知,当酵母浸粉质量浓度为 30 g/L 时,氮源供应不足,导致菌体增殖受到限制,抑制了次级代谢产物合成。当酵母浸粉质量浓度为 70 g/L 时,氮源过量,可能会通过反馈抑制机制干扰色氨

酸代谢通路,影响 ATP 的分配效率,同样不利于吲哚的合成。因此,确定酵母浸粉适宜质量浓度为 50 g/L。

2.2.4 装液量 不同装液量、发酵温度、摇床转速和发酵时间对吲哚产量的影响见图 6。由图 6a)可知,当装液量为 250 mL 时,吲哚产量达最大值 3.52 g/L。装液量直接决定发酵体系的 O_2 供应,装液量越低,摇瓶内 O_2 越充足,反之则 O_2 供应受限。菠萝泛菌作为兼性厌氧菌,其代谢方式完全依赖 O_2 供应状态。在 250 mL 装液量下, O_2 供应水平恰好适配其需求,既能通过有氧呼吸高效获取能量,支撑菌株生长与吲哚合成,又不会因 O_2 过量或不足干扰代谢平衡^[19]。因此,确定适宜装液量为 250 mL。

2.2.5 发酵温度 微生物的许多生化反应都是由酶催化的,而酶的活性会受温度影响。由图 6b)可知,当发酵温度为 24~26 °C 时,吲哚产量逐渐增加,酶促反应速率降低,次级代谢启动延迟;当发酵温度为 26 °C 时,吲哚产量达最大值 2.06 g/L,此温度条件下色氨酸酶活性最高,代谢通路连续性最强,且处于菠萝泛菌最适生长温度 25~30 °C 范围内,这与叶梓等^[20]的研究结果基本一致。当发酵温度为 26~32 °C 时,高温导致酶结构破坏或失活,代谢途径中断,吲哚产量下降。因此,确定适宜发酵温度为 26 °C。

2.2.6 摆床转速 通过增加摇床转速提高发酵液中的传质和传热效率,有利于菌株对营养物质的



a) 碳源种类

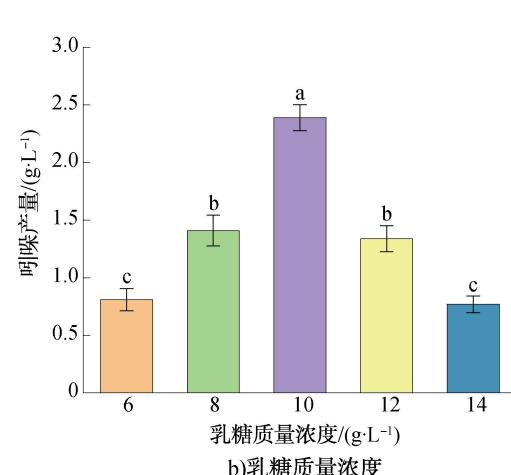


图 4 碳源种类及质量浓度对菌株 J-3-6 增殖和吲哚产量的影响

Fig. 4 Effects of carbon source types and mass concentration on the proliferation and indole production of strain J-3-6

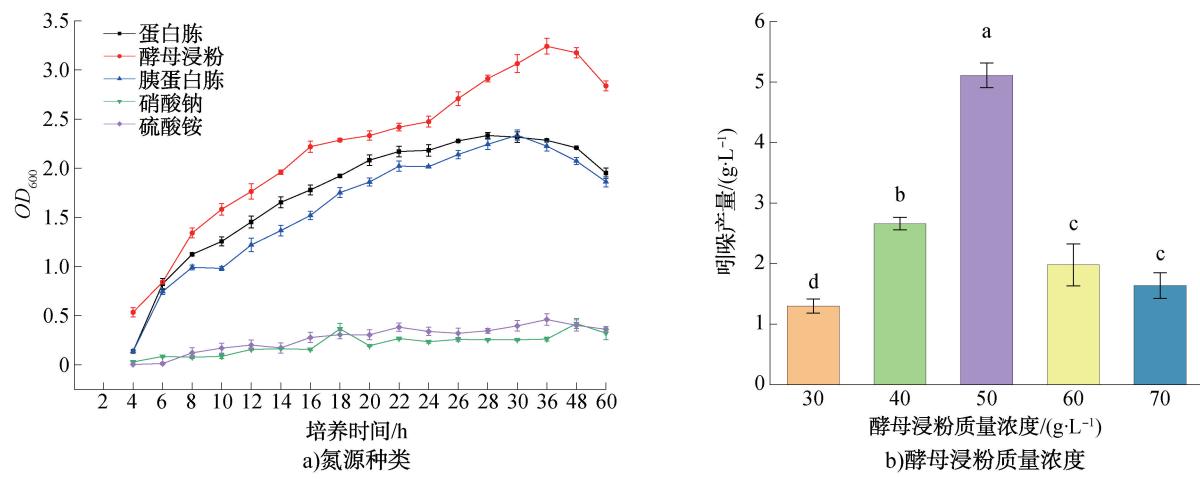


图 5 氮源种类及质量浓度对菌株 J-3-6 增殖和吲哚产量的影响

Fig. 5 Effects of nitrogen source types and mass concentrations on the proliferation and indole production of strain J-3-6

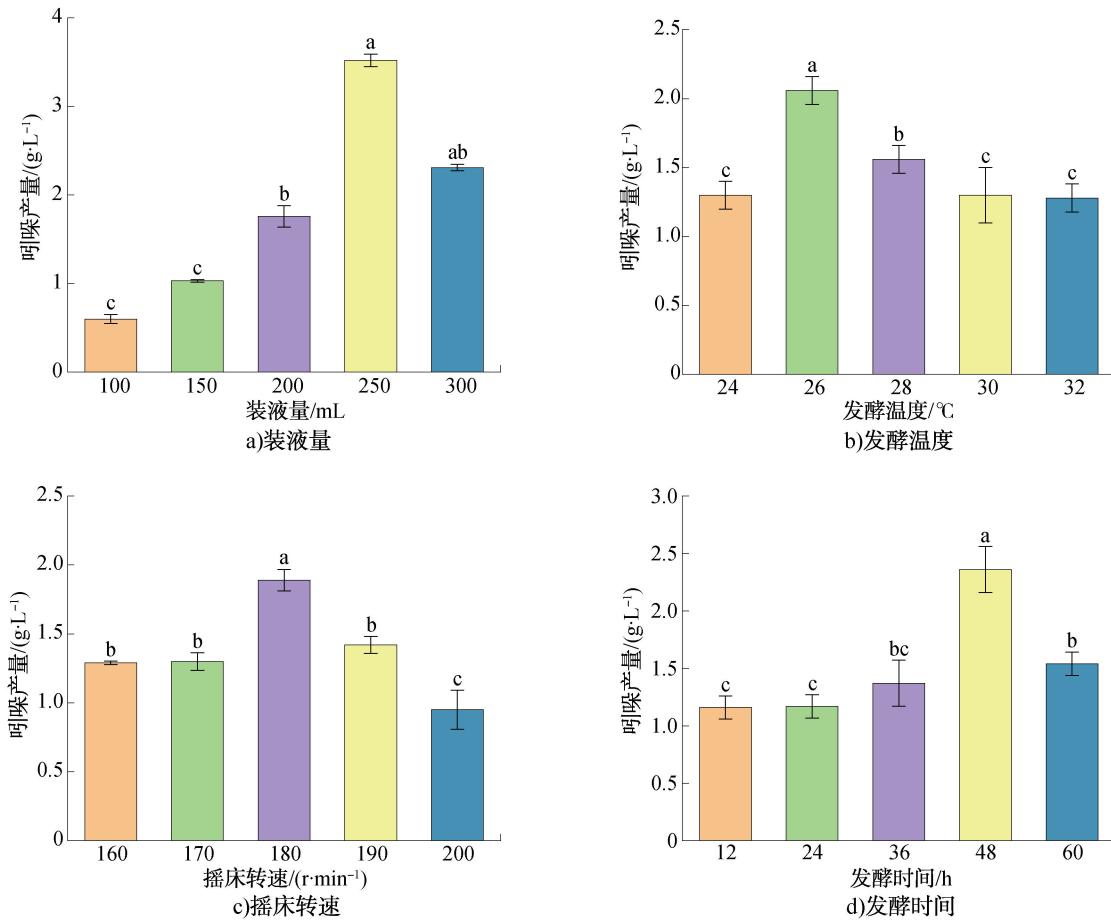


图 6 不同装液量、发酵温度、摇床转速和发酵时间对吲哚产量的影响

Fig. 6 Effects of different liquid volumes, fermentation temperatures, shaker rotation speeds, and fermentation times on the yield of indole

吸收和利用,但过高的摇床转速可能会导致产物结构发生变化或产生副产物^[21]。由图 6c) 可知,当摇床转速为 180 r/min 时,吲哚产量达最高值 1.89 g/L,

此摇床转速平衡了溶氧供给与机械剪切力,促进了菌体代谢。因此,确定适宜摇床转速为 180 r/min。

2.2.7 发酵时间

由图 6 d) 可知,发酵过程可分为

3个阶段:12~23 h 为代谢准备阶段,以主代谢为主,累积乙酰辅酶 A、L-色氨酸等吲哚合成关键前体,未出现吲哚显著累积;36~48 h 进入吲哚合成高峰期,菌体代谢转向次级代谢,色氨酸裂解生成吲哚,产量持续增长至峰值 2.36 g/L,符合次级代谢产物合成规律^[22];48 h 后因色氨酸酶催化反应可逆,高质量浓度丙酮酸、吲哚及氨促使反应逆向生成 L-色氨酸,吲哚产量下降^[23]。因此,确定适宜发酵时间为 48 h。

2.3 Plackett-Burman 试验结果分析

Plackett-Burman 试验设计及结果见表 4。对表 4 中的实验结果进行多元回归方程拟合方差分析,得到回归方程为: $Y = 2.765 + 0.2700A + 0.3833B + 0.2567C + 0.2067D + 0.0983E - 0.0533F$ 。该方程的方差分析结果 F 值为 $6.58 > 2$, 表明该模型在 $\alpha = 0.05$ 水平显著; 相关系数 $R^2 = 0.8876$, 表明该方程拟合度较好。

Plackett-Burman 试验结果方差分析见表 5。由表 5 可知,在考查的 6 个因素中,乳糖质量浓度、酵母浸粉质量浓度和装液量均对吲哚产量呈正效应,发酵温度、摇床转速、发酵时间影响较小,在后续实验中固定发酵温度 26 °C、摇床转速 180 r/min、发酵时间 48 h 不变,对乳糖质量浓度、酵母浸粉质量浓度和装液量这 3 个因素进行进一步优化。

为了接近乳糖质量浓度(A)、酵母浸粉质量浓度(B)、装液量(C)的响应中心点,最陡爬坡试验设计及结果见表 6。由表 6 可知,在编号 3 的培养条件下,吲哚产量最高,为 4.25 g/L。因此选择乳糖质量浓度 10 g/L、酵母浸粉质量浓度 50 g/L、装液量 250 mL 作为响应面试验的中心点。

2.4 Box-Behnken 试验结果分析

在 Plackett-Burman 和最陡爬坡试验的基础上,以乳糖质量浓度(A)、酵母浸粉质量浓度(B)和装液量(C)为考查因素,以吲哚产量(Y)为评价指标进行 Box-Behnken 试验,结果见表 7,方差分析见表 8。线性拟合得到吲哚产量的二次多项式回归方程为: $Y = 10.79 + 0.45A + 0.72B + 1.39C - 1.14AB + 0.84AC + 0.04BC - 1.73A^2 - 1.96B^2 - 2.10C^2$ 。由 F 值可知,各因素对吲哚产量影响顺序为 $C > B > A$, 即装

液量>酵母浸粉质量浓度>乳糖质量浓度。

2.5 响应面结果分析

各因素交互作用对吲哚产量的响应曲面图和等高线图见图 7,当响应曲面曲率变化显著且等高

表 4 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 4 Plackett-Burman test design and results

| 编号 | A | B | C | D | E | F | 吲哚产量/ $(g \cdot L^{-1})$ |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------|
| 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 2.99 |
| 2 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1.69 |
| 3 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1.95 |
| 4 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 3.09 |
| 5 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 3.45 |
| 6 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 3.41 |
| 7 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 3.16 |
| 8 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1.98 |
| 9 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 2.86 |
| 10 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 3.38 |
| 11 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 3.13 |
| 12 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 2.09 |

表 5 Plackett-Burman 试验结果方差分析

Table 5 Analysis of variance (ANOVA) for Plackett-Burman test results

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|------|--------|-----|--------|-------|--------|-----|
| 模型 | 4.0900 | 6 | 0.6819 | 6.58 | 0.0283 | * |
| A | 0.8748 | 1 | 0.8748 | 8.44 | 0.0336 | * |
| B | 1.7600 | 1 | 1.7600 | 17.01 | 0.0091 | ** |
| C | 0.7905 | 1 | 0.7905 | 7.63 | 0.0398 | * |
| D | 0.5125 | 1 | 0.5125 | 4.94 | 0.0768 | |
| E | 0.1160 | 1 | 0.1160 | 1.12 | 0.3385 | |
| F | 0.0341 | 1 | 0.0341 | 0.33 | 0.5909 | |
| 纯误差 | 0.5183 | 5 | 0.1037 | | | |
| 总和 | 4.6100 | 11 | | | | |

注: * 表示统计学意义上差异显著($P < 0.05$), ** 表示统计学意义上差异极显著($P < 0.01$), 下同。

表 6 最陡爬坡试验设计及结果

Table 6 Experimental design and results of steepest climb test

| 编号 | $A/(g \cdot L^{-1})$ | $B/(g \cdot L^{-1})$ | C/mL | 吲哚产量/ $(g \cdot L^{-1})$ |
|----|----------------------|----------------------|--------|--------------------------|
| 1 | 8 | 40 | 200 | 3.75 |
| 2 | 9 | 45 | 225 | 3.98 |
| 3 | 10 | 50 | 250 | 4.25 |
| 4 | 11 | 55 | 275 | 4.03 |
| 5 | 12 | 60 | 300 | 4.18 |

表 7 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 7 Box-Behnken test experimental design and results

| 编号 | A/ (g·L ⁻¹) | B/ (g·L ⁻¹) | C/ mL | 吲哚产量/ (g·L ⁻¹) |
|----|----------------------------|----------------------------|----------|-------------------------------|
| 1 | 10 | 45 | 225 | 4.58 |
| 2 | 11 | 50 | 225 | 5.02 |
| 3 | 9 | 45 | 250 | 5.08 |
| 4 | 10 | 50 | 250 | 10.83 |
| 5 | 9 | 50 | 225 | 5.77 |
| 6 | 9 | 50 | 275 | 7.23 |
| 7 | 10 | 55 | 225 | 6.48 |
| 8 | 10 | 55 | 275 | 8.97 |
| 9 | 11 | 45 | 250 | 8.22 |
| 10 | 10 | 45 | 275 | 6.91 |
| 11 | 10 | 50 | 250 | 11.03 |
| 12 | 10 | 50 | 250 | 10.99 |
| 13 | 10 | 50 | 250 | 10.24 |
| 14 | 9 | 55 | 250 | 8.26 |
| 15 | 10 | 50 | 250 | 10.87 |
| 16 | 11 | 50 | 275 | 9.84 |
| 17 | 11 | 55 | 250 | 6.84 |

表 8 Box-Behnken 试验结果方差分析

Table 8 Analysis of variance (ANOVA) for Box-Behnken test results

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------------|-------|-----|-------|--------|----------|-----|
| 模型 | 82.00 | 9 | 9.11 | 50.61 | <0.000 1 | ** |
| A | 1.60 | 1 | 1.60 | 8.90 | 0.020 4 | * |
| B | 4.15 | 1 | 4.15 | 23.04 | 0.002 0 | ** |
| C | 15.40 | 1 | 15.40 | 85.55 | <0.000 1 | ** |
| AB | 5.20 | 1 | 5.20 | 28.88 | 0.001 0 | ** |
| AC | 2.82 | 1 | 2.82 | 15.68 | 0.005 5 | ** |
| BC | 0.01 | 1 | 0.01 | 0.036 | 0.855 8 | |
| A ² | 12.62 | 1 | 12.62 | 70.08 | <0.000 1 | ** |
| B ² | 16.19 | 1 | 16.19 | 89.94 | <0.000 1 | ** |
| C ² | 18.50 | 1 | 18.50 | 102.75 | <0.000 1 | ** |
| 残差 | 1.26 | 7 | 0.18 | | | |
| 失拟项 | 0.85 | 3 | 0.28 | 2.78 | 0.173 9 | |
| 纯误差 | 0.41 | 4 | 0.10 | | | |
| 总和 | 83.26 | 16 | | | | |

线呈明显椭圆形时,表明对应变量之间的交互作用对吲哚产量存在显著影响。由图 7 可知,由图 7a) 和 b) 可知,乳糖质量浓度与酵母浸粉质量浓度、乳糖质量浓度与装液量之间曲面陡峭,等高线呈椭圆形,表明交互作用显著($P<0.01$)。由图 7c) 可知,酵母浸粉质量浓度与装液量之间曲面较平缓,等高

线呈圆形,表明交互作用不明显($P>0.05$),与方差分析结果一致。

通过对响应面试验结果进行分析,得到最佳发酵条件为乳糖质量浓度 10.174 g/L、酵母浸粉质量浓度 50.7 g/L、装液量 259 mL。结合 Plackett-Burman、Box-Behnken 设计-响应面优化试验,并根据实际操作可行性,得到最佳条件为乳糖质量浓度 10.2 g/L、酵母浸粉质量浓度 50.7 g/L、装液量 259 mL、接种量 7%、摇床转速 180 r/min、发酵温度 26 °C、发酵时间 48 h、初始 pH 值 7,此时吲哚产量最高为 11.135 g/L。以上述条件进行了 3 次验证实验,发现该条件下吲哚实际产量为(12.050±0.438) g/L,接近于预测值 11.135 g/L,是初始条件下吲哚产量(2.180 g/L)的 5.53 倍。

已有研究表明,菠萝泛菌具备产吲哚的潜力,如何新宇等^[24]通过分析该菌株的基因组发现,其携带能够编码色氨酸酶的 *tnaA* 基因簇,通过调控该基因簇表达能显著影响吲哚的产量。由此推测,菌株 J-3-6 合成吲哚主要依赖于色氨酸代谢通路,在 *ttaA* 基因编码的色氨酸酶催化下,色氨酸被分解为吲哚、丙酮酸和氨。与目前文献^[25-26]报道的细菌产吲哚水平(0.89~1.62 g/L)相比,菌株 J-3-6 的吲哚产量明显更高(12.050 g/L),展现出更强的工业应用潜力。

2.6 柠檬罗勒发酵液挥发性成分分析

采用 HS-SPME-GC-MS 技术对柠檬罗勒发酵液的挥发性成分进行系统分析,结果见表 9。由表 9 可知,共鉴定出 45 种挥发性有机化合物(VOCs),由醇类(43.20%,17 种)、杂环类(19.57%,3 种)和酯类(17.53%,9 种)构成主体框架。相较于空白组,接种菌株后新增 25 种 VOCs, 杂环类(487.56 μg/mL)、酯类(255.02 μg/mL)及醇类(152.68 μg/mL)贡献率达 89.3%,而萜类总量由 595.60 μg/mL 显著降至 93.38 μg/mL。

菠萝泛菌能够分泌萜类脱氢酶、氧化酶等,将大分子萜类化合物降解为小分子醇类,这可能导致原始萜类含量下降,而醇类和酯类化合物含量增加^[27]。 β -石竹烯、月桂烯、 α -律草烯等萜类化合物多具有草本、木质或辛香气味,而 3-苯丙酸乙酯、5-茚醇、苯乙醇等酯类和醇类化合物则多呈现果香、

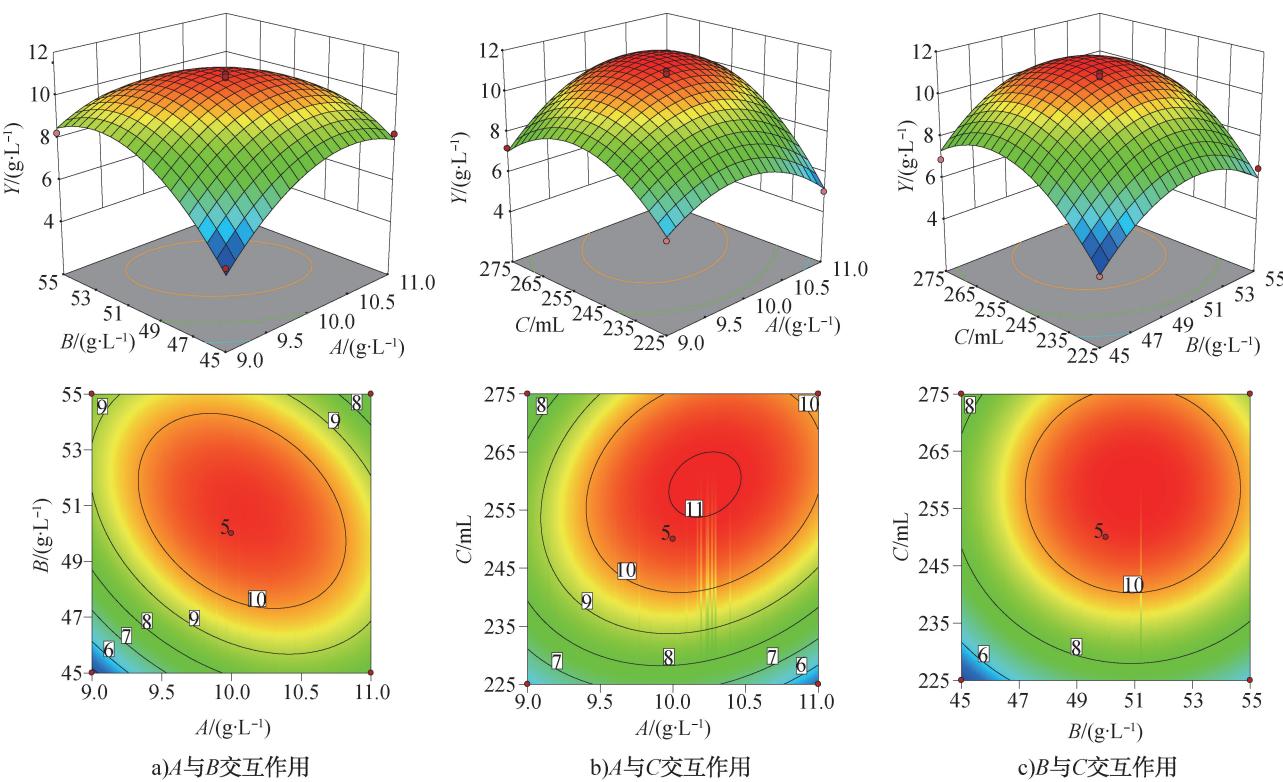


图 7 各因素交互作用对吲哚产量的响应曲面图和等高线图

Fig. 7 Response surface diagrams and contour maps of the interaction of various factors on the yield indole

表 9 柠檬罗勒发酵液的香气成分及含量

Table 9 Aroma components and contents of *O. ×citriodorum* fermentation broth

| 类别 | 化合物名称 | 保留时间/min | 气味特征 | 含量/(μg·mL⁻¹) | |
|----|------------|----------|---------------|--------------|--------|
| | | | | 发酵液 | 空白组 |
| 醇类 | 1,1-环丙二甲醇 | 1.028 | 甜味和花香气息 | 48.31 | — |
| | 异丁醇 | 9.987 | 葡萄酒和醚的气味 | 4.27 | — |
| | 2-甲基丁醇 | 14.655 | 苹果、香蕉水果的香气 | 26.84 | — |
| | 叶醇 | 20.801 | 青草香气 | — | 21.43 |
| | 2-己基-1-癸醇 | 24.665 | 脂蜡香和清新的果香调 | 6.65 | — |
| | 芳樟醇 | 25.357 | 玫瑰木香气 | 100.00 | 74.95 |
| | 异蒲勒醇 | 26.170 | 薄荷样气味 | 4.75 | — |
| | 葑醇 | 26.358 | 木质香调 | 36.35 | — |
| | 4-萜烯醇 | 26.922 | 柑橘类水果、木质香调 | 4.72 | — |
| | α-松油醇 | 29.444 | 紫丁香花香 | 59.99 | 71.13 |
| | L-紫苏醇 | 29.982 | 薄荷的清凉气息 | 3.26 | — |
| | 香芹醇 | 30.470 | 果香和花香 | 11.55 | — |
| | 香茅醇 | 31.042 | 柠檬、柑橘和香草气息 | 73.54 | 279.50 |
| | 橙花醇 | 31.897 | 果香和木香香调 | 9.08 | 205.53 |
| | 异香叶醇 | 32.145 | 花香和果香,青香气息 | 11.10 | 12.57 |
| | 香叶醇 | 32.880 | 柠檬和柑橘类的清香 | — | 981.70 |
| | 苯乙醇 | 34.359 | 玫瑰花、蜂蜜香气 | 77.60 | 46.12 |
| | 对孟-1-烯-9-醇 | 34.752 | 玫瑰和草本气息 | 5.98 | — |
| | 5-茚醇 | 40.711 | 紫丁香、铃兰香与玫瑰的花香 | 591.42 | 145.60 |

表9(续)

| 类别 | 化合物名称 | 保留时间/min | 气味特征 | 含量/(μg · mL⁻¹) | |
|-----|--|----------|----------------|----------------|---------|
| | | | | 发酵液 | 空白组 |
| 酯类 | 癸酸乙酯 | 27. 725 | 水果和花香, 蜡香和奶油香调 | 11. 35 | — |
| | 香叶酸甲酯 | 29. 367 | 香叶和柑橘香韵 | 4. 64 | — |
| | 乙酸苯乙酯 | 32. 444 | 水果香和蜂蜜香调 | 1. 60 | 28. 70 |
| | 对甲氧基肉桂酸辛酯 | 33. 709 | 香草味 | 36. 54 | — |
| | 3-苯丙酸乙酯 | 33. 846 | 花香、水果香和蜂蜜香 | 27. 42 | — |
| | 十四酸乙酯 | 36. 488 | 果香和油脂气息 | 17. 41 | — |
| | 肉桂酸甲酯 | 37. 300 | 樱桃香气, 具有可可香味 | 157. 66 | — |
| | 棕榈酸乙酯 | 39. 386 | 蜡香和奶油香气 | 29. 77 | 307. 27 |
| 酮类 | (E)-4-甲氧基肉桂酸甲酯 | 42. 352 | 肉桂辛香气息 | 150. 15 | 222. 81 |
| | 3,4-二氢-2-(1-吡咯烷基甲基)-1(2H)-萘酮 | 33. 316 | 花香和果香, 麝香气息 | 7. 39 | — |
| 醚类 | 二肉豆蔻醚 | 24. 674 | 轻微的蜡状或油腻气息 | — | 19. 84 |
| | 二乙二醇乙醚 | 27. 392 | 甜味 | 6. 83 | — |
| 酚类 | 草蒿脑 | 28. 803 | 丁香酚的香气 | 220. 29 | 111. 80 |
| | 愈创木酚 | 33. 436 | 辛香、烟熏气息的特征 | — | 10. 92 |
| | 邻丁香酚 | 38. 445 | 木质香气 | — | 66. 58 |
| | (E)-2-甲氧基-4-(1-丙烯基苯酚) | 41. 027 | 辛香及木质的香调 | — | 40. 47 |
| 杂环类 | 2-(氮杂环丙烷-1-基)乙胺 | 0. 789 | 刺激性氨味 | 36. 35 | — |
| | 苯并噻唑 | 35. 436 | 霉味和坚果香调 | 3. 59 | — |
| | 吲哚 | 42. 677 | 茉莉、橙花香气息 | 447. 62 | — |
| 萜类 | 月桂烯 | 12. 928 | 柑橘类、花香和松木香调 | — | 19. 24 |
| | α-律草烯 | 26. 178 | 松木的清香气息 | — | 11. 85 |
| | A-香柠檬烯 | 26. 358 | 柑橘气味, 花香和松木调 | — | 50. 74 |
| | β-石竹烯 | 26. 768 | 辛香、木香、樟脑香 | 38. 94 | 214. 43 |
| | (E)-β-金合欢烯 | 28. 409 | 柑橘调、木质调 | 7. 83 | 35. 22 |
| | (1R,6R)-3-甲基-6-(1-甲基乙烯基)-2-环己烯-1-醇 | 29. 281 | 薄荷的清凉气息 | 14. 15 | — |
| | 冰片 | 29. 546 | 樟脑的气息 | 6. 45 | — |
| | (4aS-顺式)-3,5,5-三甲基-9-亚甲基-2,4a,5,6,7,8,9,9a-八氢-1H-苯并环庚烯 | 30. 145 | 柑橘和花香 | — | 11. 57 |
| | Δ-杜松烯 | 30. 940 | 温暖的木质香 | — | 8. 52 |
| | α-红没药烯 | 31. 273 | 松节油的脂香气息 | 22. 12 | 110. 43 |
| 其他类 | 对孟-1,5-二烯-8-醇 | 31. 606 | 草本和木质的香气特征 | 3. 90 | — |
| | 5,9-二甲基-11-氧杂双环[8.2.1]十三碳-4,7,13-三烯-6,12-二酮 | 38. 334 | 龙涎香的香气 | — | 43. 26 |
| | (E)-3,7-二甲基-2,6-辛二烯酸 | 40. 557 | 花香气息、清新草本香 | — | 90. 34 |
| | 十四烷 | 21. 237 | — | — | 39. 34 |
| | 正十六烷 | 22. 699 | — | 46. 78 | 29. 86 |
| | 2,6,11,15-四甲基十六烷 | 22. 699 | — | 14. 6 | 111. 21 |
| | 植烷 | 27. 811 | — | 20. 4 | 27. 38 |
| 其他类 | 2-甲基萘 | 33. 504 | 甜美花香木香 | 32. 80 | 100. 00 |
| | 2-苯基甲苯 | 34. 564 | 芳香气味 | 9. 93 | 27. 13 |
| | 1-乙基萘 | 35. 188 | 刺鼻的芳香气味 | 27. 04 | 63. 66 |
| | 1,6-二甲基萘 | 35. 564 | 刺激性气味 | 11. 89 | — |
| | 1,8-二甲基萘 | 35. 565 | 樟脑味 | — | 36. 97 |

注: 气味特征通过上海交通大学食品风味创新团队的风味数据库 <https://mffl.sjtu.edu.cn/database> 查询, —表示未检测到或未查询到。

花香或清甜气息,表明接种菌株后可使香气更加柔和、复杂,更接近葡萄酒、果酒等发酵食品或香精的风味特征^[28]。

空白组中原有棕榈酸乙酯含量下降,酯类化合物新增6种,包括癸酸乙酯、肉桂酸甲酯等。这可能是因为菌株在代谢过程中通过酯酶或脂肪酶催化脂肪酸与醇类的酯化反应,生成具有果香或花香特征的酯类化合物^[29-30],而酯类化合物相较于萜类化合物具有更高的热稳定性和抗氧化性,因此接种菌株有助于提升香气成分在加工和储存过程中的稳定性^[31]。

新增吲哚、苯并噻唑等杂环类化合物占比达19.57%,这可能一方面是因为加入吲哚分泌型菌株;另一方面一些氨基酸或含氮化合物在微生物代谢作用下发生美拉德反应或斯特雷克降解反应,生成噻唑、呋喃等杂环类化合物^[32],这些化合物通常具有较强的香气特征,是食品与香料工业中重要的风味成分。

菠萝泛菌在厌氧或微氧条件下,能通过发酵作用将糖类或萜类中间体转化为乙醇、异戊醇等醇类化合物,从而提升醇类化合物的含量。芳樟醇含量的略微提升,与Y. Hoshino等^[33]以菠萝泛菌为宿主细胞实现芳樟醇高效合成的结果基本相符。而 α -松油醇、香茅醇、橙花醇等的含量降低,可能是因为单萜经氧化还原作用生成异丁醇、2-甲基丁醇、2-己基-1-癸醇等短链醇或酯类化合物。

发酵液中高含量的芳樟醇(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和苯乙醇(77.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$),分别赋予其突出的玫瑰木香与蜂蜜果香特征,而吲哚(447.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的超量富集进一步强化了茉莉、橙花等复杂花香调,说明能通过特定微生物代谢途径强化发酵液的花香特征。同时,菌株对酯类物质的调控能力也十分显著,如肉桂酸甲酯(157.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、癸酸乙酯(11.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$)等酯类化合物提升了香气的圆润感和层次感,而萜类与酚类的自然协同则构建了兼具清新、甜美的复合香调。

2.7 卷烟加香感官评价结果分析

卷烟加香评吸结果见表10。由表10可知,CK2的刺激性较大,香味较单一,这可能是因为未经菌

表10 卷烟加香评吸结果
Table 10 Cigarette flavoring sensory smoking evaluation results

| 组别 | 光泽 | 香气 | 协调 | 杂气 | 刺激性 | 余味 | 总分 |
|--------------------------|-----|------|-----|-----|------|------|------|
| CK1 | 5.0 | 26.1 | 4.0 | 8.6 | 16.0 | 20.1 | 79.8 |
| CK2 | 5.0 | 26.5 | 4.0 | 8.4 | 16.0 | 20.0 | 79.9 |
| 2 $\mu\text{g}/\text{支}$ | 5.0 | 26.5 | 4.3 | 9.0 | 16.2 | 20.2 | 81.2 |
| 4 $\mu\text{g}/\text{支}$ | 5.0 | 27.5 | 4.5 | 9.2 | 16.8 | 20.5 | 83.5 |
| 6 $\mu\text{g}/\text{支}$ | 5.0 | 27.3 | 4.2 | 8.8 | 16.5 | 20.4 | 82.2 |

液发酵的柠檬罗勒浆培养基中香叶醇含量过高,导致香气过于突出,甚至掩盖烟草本身的自然香味,引发不协调的杂气。与CK1相比,加入挥发油后,单料烟的吸食品质有所提升,杂气和刺激性均有不同程度的减轻。当添加量为4 $\mu\text{g}/\text{支}$ 时,感官评吸效果最好,卷烟刺激性明显减轻,烟气更加柔和,回味具有清甜感,香气质、香气量同时提升。

3 结论

本研究从新鲜柠檬罗勒根茎叶中筛选到38株内生细菌,其中菌株J-3-6的风味强度较大且香气较愉悦,具有清甜水果香和茉莉花香气,经鉴定为菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*),其最优发酵产香条件为乳糖质量浓度10.2 g/L、酵母浸粉质量浓度50.7 g/L、装液量259 mL、接种量7%、摇床转速180 r/min、发酵温度26 °C、发酵时间48 h、初始pH值7,优化后吲哚实际产量可达(12.050±0.438) g/L;在应用验证中,菌株优化后可使柠檬罗勒发酵产物的茉莉花香组分(吲哚)占比显著提升,其他刺激性物质降低。本文首次建立菠萝泛菌-柠檬罗勒共发酵体系,开发出具有茉莉花-柠檬薄荷香韵特征的天然香料制备工艺,优化后的香气体系能有效赋予卷烟清凉甘甜滋味,协调烟香及改善杂气。后续工作将开展菌株全基因组测序与功能基因组学研究,进一步揭示其关键代谢路径及增香相关基因,为无毒无害香料香精的生产提供参考。

参考文献:

- [1] 董明新,陈小斐,季帅,等.罗勒属植物化学成分及药理作用研究进展[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2023,44(3):323-338.

- DONG M X, CHEN X F, JI S, et al. Research advances in chemical constituents and pharmacological activities of *Ocimum* plants [J]. Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition), 2023, 44(3): 323–338.
- [2] 薛立娟. 罗勒的化学成分与生物活性研究[D]. 宜春: 宜春学院, 2023.
- XUE L J. Chemical constituents from *Ocimum basilicum* L. and their bioactivities [D]. Yichun: Yichun University, 2023.
- [3] 王娟, 李晋华, 王婷婷, 等. 河南栽培罗勒和丁香罗勒的香气成分差异分析[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(19): 3650–3653, 3679.
- WANG J, LI J H, WANG T T, et al. Differential analysis of the aroma components of *Ocimum basilicum* and *Ocimum gratissimum* in Henan [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(19): 3650–3653, 3679.
- [4] AL-HARTHI H F, ELGORGAN A M, AHMED B, et al. Identification, molecular characterization, and plant growth promoting activities of endophytic fungi of *Jasminum sambac*, *Camellia sinensis*, and *Ocimum basilicum* [J]. Journal of King Saud University-Science, 2023, 35(3): 102558.
- [5] CAMPOS ESPINOSA G Y, DÖRR DE QUADROS P, FULTHORPE R R, et al. Vitamin contents and antioxidant capacity of hydroponic grown sweet basil inoculated with endophytic bacteria [J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2022, 6: 954956.
- [6] YANG Y X, LI D X, WANG R Y, et al. Recent advances and multiple strategies for the synthesis of terpenoid fragrances and flavors in model microorganisms [J]. Biotechnology Advances, 2025, 83: 108646.
- [7] 曹怀宝. 吲哚及其衍生物合成方法研究进展[J]. 化工设计通讯, 2023, 49(12): 86–88.
- CAO H B. Research progress on the synthesis methods of indole and its derivatives [J]. Chemical Engineering Design Communications, 2023, 49(12): 86–88.
- [8] ZHANG Y, LUAN H N, QIU W H, et al. Advances in vanillin synthesis: Focusing on microbial synthesis pathways and prospects [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2025, 41(4): 111.
- [9] 李媚媛, 刘安琪, 唐道墉, 等. 产香气化合物微生物的研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(19): 259–269.
- LI M Y, LIU A Q, TANG D P, et al. Research progress on aroma-producing microorganisms [J]. Food Science, 2023, 44(19): 259–269.
- [10] 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.
- ZHANG P, LI W, SHI C, et al. Screening and identification of a fungus with a sweet fruit aroma and its application in flavoured tobacco [J]. Chinese Tobacco Science, 2021, 42(5): 95–101.
- [11] 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.
- GONG X W, DAO Y, ZHAO W, et al. Aroma-producing yeasts: Screening, optimization and application in e-liquids [J]. Tobacco Science & Technology, 2020, 53(2): 62–71.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- DONG X Z, CAI M Y, et al. Handbook for identification of common bacterial systems [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [13] R E 布坎南, N E 吉本斯, 等. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
- BUCHANAN R E, GIBBONS N E, et al. Translation Group of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984.
- [14] 张玥, 赵联芳, 田坤, 等. 一株 1,4-二噁烷降解菌的分离及其降解性能解析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3722–3749.
- ZHANG Y, ZHAO L F, TIAN K, et al. Isolation and degradation characterization of a 1,4-dioxane-degrading bacterial strain [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3722–3749.
- [15] 王启慧, 张婧靖, 李晓晓, 等. 基于响应面法优化库德毕赤酵母 Y1 酿造高黄酮山楂酒工艺[J]. 中国酿造, 2024, 43(7): 184–189.
- WANG Q H, ZHANG J J, LI X X, et al. Optimization of fermentation process of high flavonoid hawthorn wine brewed by *Pichia kudriavzevii* Y1 based on response surface method [J]. China Brewing, 2024, 43(7): 184–189.
- [16] 赵丽雯, 王天奥, 周镔, 等. 结合色氨酸途径改造和卤化酶分子改造提高全细胞催化 7-氯-色氨酸合成能力[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(11): 23–29.
- ZHAO L W, WANG T A, ZHOU B, et al. Combination of tryptophan pathway engineering and molecular engineering of halogenase to improve whole-cell catalysis of 7-chloride-tryptophan synthesis [J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(11): 23–29.
- [17] 尚余平, 王一唯, 王冠, 等. 转录组揭示禾谷镰刀菌酸碱胁迫条件下的基因表达模式[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4271–4289.
- SHANG Y P, WANG Y W, WANG G, et al. Transcriptomics reveals gene expression patterns of *Fusarium graminearum* under pH stress [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4271–4289.
- [18] YOUN H, CARRANZA M. cAMP activation of the cAMP

- receptor protein, a model bacterial transcription factor [J]. *Journal of Microbiology*, 2023, 61(3):277–287.
- [19] CHEN H Y, ZHONG S C, LIU Z J, et al. Microbiome-metabolomic insights into the systemic regulation in Fangxian Huangjiu fermentation [J]. *Food Chemistry*, 2025, 481:143980.
- [20] 叶梓,谢雨璐,张国芳,等.草莓茎基腐病病原菌鉴定、致病力分析及防治药剂筛选[J].核农学报,2024,38(5):822–832.
- YE Z, XIE Y L, ZHANG G F, et al. Identification, pathogenicity analysis, and effective bactericides screening of the pathogen responsible for strawberry stem rot [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2024, 38 (5): 822–832.
- [21] 林嘉祺,庄岩,刘晓,等.一株海洋红法夫酵母 *Phaffia rhodozyma* RP-306 产虾青素的发酵条件优化[J].海洋科学,2024,48(2):69–78.
- LIN J Q, ZHUANG Y, LIU X, et al. Optimization of fermentation conditions for astaxanthin production by marine *Phaffia rhodozyma* RP-306 [J]. *Marine Sciences*, 2024, 48 (2): 69–78.
- [22] USUDA Y, NISHIO Y, NONAKA G, et al. Microbial production potential of *Pantoea ananatis*: From amino acids to secondary metabolites[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(6):1133.
- [23] GUO L, DING S, LIU Y D, et al. Enhancing tryptophan production by balancing precursors in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119 (3): 983–993.
- [24] 何新宇,郑京,刘琪,等.水稻内生菠萝泛菌 YJ76 呢唑产量上调突变株的鉴定及生理性状[J].微生物学报,2020,60(2):285–293.
- HE X Y, ZHENG J, LIU Q, et al. Identification and characterization of an indole production-upregulated mutant of rice endophytic *Pantoea ananatis* YJ76 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(2):285–293.
- [25] 于大禹,孙磊,陶福平.一种色氨酸酶突变体及其在生产呢唑中的应用:202411728747.9[P]. 2025-07-25.
- YU D Y, SUN L, TAO F P. A tryptophanase mutant and its application in indole production: 202411728747.9 [P]. 2025-07-25.
- [26] 廖振林,陈俊杰,李倩滢,等.一株高产香气物质的扣囊复膜酵母 ex-3 菌株及其应用:202111365158.5[P]. 2022-11-15.
- LIAO Z L, CHEN J J, LI Q Y, et al. A high aroma-producing strain of *Saccharomyces fibuligera* ex-3 and its application:202111365158.5[P]. 2022-11-15.
- [27] MORENO R, ROJO F. The importance of understanding the regulation of bacterial metabolism [J]. *Environmental Microbiology*, 2023, 25 (1):54–58.
- [28] ABBAS F, ZHOU Y W, ROTHENBERG D O, et al. Aroma components in horticultural crops: Chemical diversity and usage of metabolic engineering for industrial applications [J]. *Plants*, 2023, 12(9):1748.
- [29] ZHOU H J, YU Z F, YE Z W, et al. Multiplex analyses of the changes of aromatic compounds during the development of peach fruit using GC-MS and iTRAQ proteomic techniques [J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 236:96–105.
- [30] FAN P X, FEI Y T, LIANG M H, et al. Modulation of microbial communities and flavor metabolism in rice-flavor Baijiu fermentation by Huazhou Exocarpium Citri Rubrum [J]. *Food Bioscience*, 2025, 69:106876.
- [31] ALI A, KUMAR R R, VINUTHA T, et al. Grain phenolics: Critical role in quality, storage stability and effects of processing in major grain crops: A concise review [J]. *European Food Research and Technology*, 2022, 248 (8): 2197–2213.
- [32] ZHANG W C, ZHAO F F, ZHAO F J, et al. Solid-state fermentation of palm kernels by *Yarrowia lipolytica* modulates the aroma of palm kernel oil [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9:2538.
- [33] HOSHINO Y, MORIYA M, MATSUDAIRA A, et al. Stereospecific linalool production utilizing two-phase cultivation system in *Pantoea ananatis* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2020, 324:21–27.

Optimization of fermentation conditions of aroma-producing endophytic bacteria in *Ocimum × citriodorum* and its application in cigarette flavoring

ZHAO Qiaoyue¹, LI Xinyan¹, WANG Liusheng², LIU Wei², MA Rong², FENG Wenning²,
LI Yuanyuan¹, ZHAO Mingqin¹

1. College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China;

2. China Tobacco Hebei Industrial Co., Ltd., Shijiazhuang 050051, China

Abstract: **[Objective]** This study aims to explore the aroma-producing potential of endophytic bacteria in *Ocimum × citriodorum*. **[Methods]** Traditional isolation and culture method combined with morphological and molecular

biological method were used to screen and identify the dominant aroma-producing strains from its roots, stems and leaves; then, the fermentation conditions were optimized by the single factor test and response surface method; and volatile oil was extracted by simultaneous distillation extraction (SDE) and subjected to cigarette flavoring evaluation. **[Results]** A total of 38 strains of endophytic bacteria were isolated. Sensory evaluation confirmed that strain J-3-6 had the best aroma quality, which was identified as *Pantoea ananatis* exhibiting a sweet jasmine aroma with indole as the main aroma-producing substance. The optimal fermentation conditions were as follows: lactose mass concentration of 10.2 g/L, yeast extract powder mass concentration of 50.7 g/L, liquid volume of 259 mL, inoculation amount of 7%, initial pH value of 7, fermentation temperature of 26 °C, shaker rotation speed of 180 r/min, and fermentation time of 48 h. Under these conditions, the indole yield was 5.53 times the initial yield. A total of 45 volatile organic compounds were identified in the fermentation system, mainly composed of alcohols, esters and heterocyclic compounds. The aroma characteristics were based on a fresh fruity aroma, integrated with complex floral and woody notes. Cigarette flavoring evaluation showed that the most suitable addition level was 4 µg/cigarette. **[Conclusion]** Optimization of the fermentation conditions for *Pantoea ananatis* J-3-6 by the response surface method significantly enhances indole production, and its metabolites extracted as volatile oils can effectively harmonize tobacco aroma and reduce the offensive odor and irritation of cigarettes.

Key words: *Ocimum × citriodorum*; *Pantoea ananatis*; optimisation of fermentation conditions; microbial aroma production; cigarette flavouring

[责任编辑:王晓波 刘春奎]

(上接第 89 页)

primarily composed of galactose (44.6%), rhamnose (25.8%) and galacturonic acid (15.6%), with abundant hydroxyl functional groups. After the application of OPs, the tobacco cut surface became fuller, with a significant increase in the proportion of bound water under low-humidity conditions (temperature (22±1) °C, relative humidity (32±2)%). The equilibrium moisture content of OPs-treated tobacco under the high-humidity environment (temperature (22±1) °C, relative humidity (84±2)%) and low-humidity conditions was 41.93% and 6.98%, respectively. The drying rate constant ($k = 0.684\text{ }5$) decreased by 7.5% compared to the blank control group, indicating that its humectant performance was superior to propylene glycol and close to that of glycerol. Pyrolysis analysis revealed that OPs could generate various aromatic substances, including 5-hydroxymethylfurfural, furfuryl alcohol, 2,5-dimethylpyrazine, and guaiacol, helping to enhance the richness of cigarette aroma and improve sensory comfort. **[Conclusion]** OPs possess dual functions of efficient humectant property and pyrolysis-induced aroma enhancement, demonstrating potential to replace traditional polyol-based humectants, thus providing a reference for the development of natural functional tobacco additives.

Key words: okra polysaccharide; humectant performance; pyrolysis; aroma enhancement

[责任编辑:杨晓娟 贾学伟]