



菌酶协同发酵前后低次烟叶香气差异性分析

苏赞¹,曹源²,孙建生¹,胡志忠¹,邹克兴¹,刘鸿¹,龙章德¹,许春平²

1. 广西中烟工业有限责任公司 技术中心,广西 南宁 530001;

2. 郑州轻工业大学 烟草科学与工程学院,河南 郑州 450001

摘要:为探究菌酶协同处理前后的烟叶香气成分的差异,使用从云烟 87 烟叶表面筛选到的一株贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) YUNM-4 和 3 种生物酶(纤维素酶、脂肪酶和中性蛋白酶)制成复合生物酶制剂,对上部低次烟叶进行协同发酵处理,分别利用连续流动仪和气相色谱-质谱联用(GC-MS)仪测定处理后烟叶的常规化学成分和香气成分,采用正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)和独立 t 检验($P<0.05$)筛选出烟叶发酵前后含量具有显著性差异的成分,并通过相对气味活性值(ROAV)分析发酵前后烟叶中香气成分的贡献度差异。结果表明:1)与对照组相比,发酵后烟叶的常规化学成分总钾、烟碱、总糖、还原糖和钾氯比显著降低,糖碱比显著增加。2)发酵后烟叶的挥发性香味成分总含量明显提高,达到 498.09 $\mu\text{g/g}$,提高了 53.7%,主要以醇类、酮类、烃类、有机酸类、呋喃类和酚类化合物为主;构建的 OPLS-DA 模型具有良好的实验重复性且不存在过拟合现象,通过该模型筛选出 32 种含量具有显著性差异的成分,能较好地地区分发酵前后烟叶香味成分的差异;3)发酵后烟叶中有 12 种挥发性香气成分的 ROAV 高于发酵前烟叶,其中苯甲醇、苯乙醇、大马士酮、 β -紫罗兰酮、苯乙酮、二氢猕猴桃内酯等 11 种挥发性香气成分的 ROAV >1 ,是发酵后烟叶的关键香气成分,可以明显提升卷烟的感官品质。

关键词:菌酶协同;烟叶发酵;低次烟叶;香气分析

中图分类号:TS41 **文献标识码:**A

0 引言

近年来,我国工业生产中低次烟叶存量逐年增加。低次烟叶存在香气量不足、杂气重、刺激性强等缺点,极大地制约了卷烟行业的发展。因此,如何在产业存量下提高低次烟叶的品质是当前烟草产业研究的热点^[1]。越来越多的研究人员致力于

采用生物技术手段来改善烟叶品质,包括微生物发酵和酶法发酵。微生物和生物酶作用于烟叶的机制不同,微生物主要通过生长代谢过程中一系列酶的复杂反应将烟叶中化学成分转化为其他物质,使烟叶品质得到改善。生物酶则通过催化烟叶化学成分发生特定的酶促反应,进而提升烟叶品质^[2]。已有研究^[6-7]表明,蛋白酶和纤维素酶可将烟叶中

收稿日期:2024-11-08;修回日期:2024-12-25

基金项目:中国烟草总公司重大科技项目(110202201005(JY-05));河南省重大科技专项(231100310200)

作者简介:苏赞(1980—),男,广西壮族自治区梧州市人,广西中烟工业有限责任公司高级农艺师,主要研究方向为卷烟原料。

E-mail:17883720@qq.com

通信作者:许春平(1977—),男,河南省焦作市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为烟草工程和烟草微生物学。

E-mail:xuchunping05@163.com

的蛋白质、纤维素(主要为细胞壁物质)等大分子物质降解成低聚糖、半乳糖醛酸、还原糖、短肽和氨基酸等,脂肪酶可将脂肪化合物降解成有机酸类物质,从而减少烟草原料的刺激性和杂气,改善卷烟的吸食品质。目前,关于菌酶协同发酵低次烟叶改善烟叶品质的研究已有一些报道,如刘洪坤等^[3]选用3种酶系、菌系配制成复合生物酶制剂,优化了低次烟叶的发酵工艺,结果表明,在最优发酵条件下,烟叶的香气物质总量增加了15.4%,发酵后醛类、酮类、醇类、酸类、酯类等物质含量均有明显提升。马林^[4]用微生物和生物酶共同处理低等级烟叶,发现该处理方法可有效降低烟叶中对香气和吸味品质不利的成分,处理后烟叶的刺激性和杂气降低,香气改善,余味干净。赵铭钦等^[5]利用2种增香菌和3种微生物酶配制而成的烟草发酵增质剂对在线配方烟叶进行处理,结果表明,该发酵增质剂明显提高了卷烟的整体香吃味品质。然而,目前有关菌酶协调处理发酵前后低次烟叶香味成分的变化及关键香味成分的确定方面鲜有报道。

鉴于此,本研究拟将贝莱斯芽孢杆菌分别与纤维素酶、中性蛋白酶和脂肪酶这3种复合酶混合后,对低次烟叶进行菌酶协同发酵,对比分析发酵前后烟叶中常规化学成分和挥发性香味成分的变化,采用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)模型筛选烟叶发酵前后含量具有显著性差异的挥发性香味成分,并利用相对气味活度值(ROAV)分析发酵前后烟叶中挥发性香味成分贡献度的差异,明确发酵后烟叶的关键香味成分,为改善低次烟叶香气量不足、杂气重等问题提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

贝莱斯芽孢杆菌 YUNM-4 (*Bacillus velezensis* YUNM-4),由郑州轻工业大学实验室分离筛选得到;纤维素酶、果胶酶和脂肪酶,广西中烟工业有限责任公司;烟叶,云烟87,等级为B3F,产地为云南省文山壮族苗族自治州丘北县双龙营镇普者黑村,由广西中烟工业有限责任公司提供;二氯甲烷(分析纯),天津市富宇精细化工有限公司;无水硫

酸钠(分析纯),天津市光复科技发展有限公司;乙酸苯乙酯标准品(分析纯),北京百灵威科技有限公司。

1.2 主要仪器与设备

SANPLUS 8505 型连续流动仪,荷兰 SKALAR 公司;6890 GC/5973 MS 型气质联用(GC-MS)仪,美国 Agilent 公司;DHG-9143B5-Ⅲ型电热恒温鼓风干燥箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;YB-150 型高速多功能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;DLSB-5L/10 型低温冷却液循环泵,巩义市予华仪器有限责任公司;SHZ-D(Ⅲ)型循环水式多用真空泵,河南省予华仪器有限公司。

1.3 主要培养基

LB 液体培养基:蛋白胨 10 g,酵母浸粉 5 g,氯化钠 10 g,蒸馏水 1000 mL,pH 值调节至 7.0~7.2,密封后于 121 ℃ 高压蒸汽条件下灭菌 20 min。

1.4 实验方法

1.4.1 菌酶协同生物制剂制备 用接种环从固体培养基中挑取菌株,接种 2 环到 100 mL LB 液体培养基中,在 32 ℃ 条件下摇床培养 36 h;将种子液于 6000 r/min 条件下离心 7 min,弃去上清液,用无菌去离子水重悬湿菌体;使用分光光度计确定菌液稀释倍数,至 OD_{600} 为 1.45,确保菌体浓度稳定在 10^8 CFU/mL,作为菌悬液备用。取 10 mL 菌悬液,根据预实验结果,加入 0.05 g 纤维素酶、0.2 g 脂肪酶和 0.4 g 中性蛋白酶,配制成复合酶活性为 20 000 U/mL、菌体浓度为 10^8 CFU/mL 的菌酶协同生物制剂。

1.4.2 烟叶发酵 准确称取 30 g 烟叶,将 4.5 mL 菌酶协同生物制剂均匀喷洒至烟叶表面,再用无菌水调整烟叶含水率为 30%,置于密封袋中,于 32 ℃ 条件下发酵 3 d,将所得烟叶作为发酵组,记为 FJ;将喷施等量无菌水的烟叶作为空白对照组,记为 CK,每组设置 3 个重复实验。

1.4.3 烟叶含水率测定 参考《烟草及烟草制品试样的制备和水分测定 烘箱法》(YC/T 31—1996)的方法测定烟叶含水率^[8]。

1.4.4 烟叶常规化学成分测定 参考《烟草及烟草制品 总植物碱的测定 连续流动法》(YC/T

160—2002)^[9]、《烟草及烟草制品 氯的测定 连续流动法》(YC/T 162—2011)^[10]和《烟草及烟草制品 钾的测定 连续流动法》(YC/T 217—2007)^[11]的方法测定烟草中烟碱、氯和钾含量;采用《烟草及烟草制品 水溶性糖的测定 连续流动法》(YC/T 159—2019)^[12]的方法测定烟草中总糖和还原糖含量;采用《烟草及烟草制品 总氮的测定 连续流动法》(YC/T 161—2002)^[13]的方法测定烟草中总氮含量。

1.4.5 烟叶挥发性香味成分测定 1)烟叶挥发性香味成分的提取。称取 25 g 处理后的样品并粉碎,过 40 目筛后,同时蒸馏萃取 2.5 h;待萃取液冷却至室温后,加入 50 μL 0.871 mg/mL 的乙酸苯乙酯内标物,再加入一定量的无水硫酸钠,静置一晚,置于 50 ℃水浴锅中浓缩至 1 mL,过有机滤膜,最后置于色谱瓶中进行 GC/MS 检测。

2)GC-MS 分析条件。GC 条件:HP-5MS 色谱柱(60 m×0.25 mm×0.25 μm);载气为高纯 He;进样量为 1 μL;进样口温度为 230 ℃;流速为 1.0 mL/min;分流比为 10:1;溶剂延迟 10 min;升温程序为起始温度 50 ℃,以 4 ℃/min 升温至 280 ℃,保持 10 min。

MS 条件:接口温度为 270 ℃;离子源温度为 230 ℃;四极杆温度为 150 ℃;离子化方式为 EI;电子能量为 70eV;质量扫描范围为 35~550 aum。

基于 NIST2020 数据库,对烟叶的香气成分进行 MS 定性,采用内标法进行定量,香气成分含量/(μg·g⁻¹)计算公式如下:

香气成分含量 =
$$\frac{\text{香气成分峰面积} \times \text{内标物含量}}{\text{内标物峰面积}}$$

1.5 数据处理

将空白对照组和发酵组鉴定出来的共有香气成分利用 SIMCA (version14.1, Umetries, Sweden) 进

行主成分分析(PCA)和 OPLS-DA,利用投影变量重要性(VIP)>1 和独立 t 检验中 P<0.05 筛选出烟叶发酵前后差异显著的关键成分。通过各关键成分的香气风格及其类型,进而筛选出烟叶发酵前后差异显著的关键香气成分。通过查阅相关文献或资料,结合文献报道阈值,利用《感官分析 方法学 采用三点选配法(3-AFC)测定嗅觉、味觉和风味觉察阈值的一般导则》(GB/T 22366—2022)^[14]确定关键香气成分的嗅觉阈值。

相对气味活度值(ROAV)是一种结合阈值计算不同挥发性物质风味贡献程度的指标,可将具有主观特征的气味量化^[15]。利用 ROAV 来确定各关键香气成分对发酵后烟叶的贡献度。一般认为,当 ROAV≥1 时,认为挥发性物质对卷烟香气风格有直接影响,是卷烟主要及关键挥发性物质;当 0.1≤ROAV<1 时,认为挥发性物质对卷烟香气风格具有重要的修饰作用,可辅助和增强部分风味物质的呈味特性;当 ROAV<0.1 时,认为挥发性物质对卷烟香气风格贡献很小^[16-17]。

2 结果与分析

2.1 烟叶常规化学成分分析

发酵前后烟叶常规化学成分测定结果见表 1。由表 1 可知,与空白对照组相比,发酵组的钾含量、烟碱含量、总糖含量、还原糖含量、糖碱比和钾氯比均有显著性变化(P<0.05),其中钾含量、烟碱含量和钾氯比均显著降低,总糖含量、还原糖含量和糖碱比均显著增加。研究^[18]发现,烤烟中总糖及还原糖含量越高,则烟气中香气质和香气量越好,杂气越轻,烟叶品质提升越明显。一般认为,烤烟的糖碱比控制在 6~10 的范围内较为合适,这一比例常被用于评价烟质的劲头和舒适程度。发酵组的糖碱比明显高于空白对照组。

表 1 发酵前后烟叶常规化学成分测定结果
Table 1 Determination results of conventional chemical composition of tobacco leaves prior to and after fermentation

组别	总氮含量/%	钾含量/%	氯含量/%	烟碱含量/%	总糖含量/%	还原糖含量/%	糖碱比	钾氯比
CK	5.13±0.08 ^a	1.29±0.02 ^a	1.02±0.02 ^a	3.79±0.06 ^a	19.82±0.11 ^b	17.11±0.12 ^b	5.23±0.06 ^b	1.26±0.02 ^a
FJ	5.41±0.27 ^a	1.20±0.03 ^b	1.04±0.02 ^a	3.27±0.06 ^b	29.56±0.09 ^a	21.65±0.23 ^a	9.05±0.18 ^a	1.15±0.04 ^b

注:同列不同肩标小写字母表示有显著性差异(P<0.05)。

表 2 发酵前后烟叶挥发性香气成分 GC-MS 分析结果
Table 2 GC-MS analysis of volatile aroma components in tobacco leaves prior to and after fermentation

类别	香气成分	含量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)		类别	香气成分	含量($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	
		CK	FJ			CK	FJ
醇类	苯甲醇	2. 58±0. 05 ^b	4. 01±0. 19 ^a	烃类	1,7,7-三甲基-三环[2.2.1.0(2,6)]庚烷	17. 90±0. 50 ^a	18. 21±0. 63 ^a
	芳樟醇	0. 39±0. 03 ^a	0. 41±0. 03 ^a		正十四烷	0. 05±0. 01 ^b	0. 12±0. 01 ^a
	苯乙醇	2. 18±0. 05 ^b	6. 83±0. 14 ^a		二十烷	0. 44±0. 02 ^b	0. 56±0. 05 ^a
	小计	5. 15±0. 13 ^b	11. 25±0. 36 ^a		二十四烷	0. 82±0. 04 ^b	1. 87±0. 11 ^a
酮类	4-环戊烯-1,3-二酮	1. 34±0. 05 ^b	4. 72±0. 05 ^a		二十五烷	0. 28±0. 02 ^b	0. 40±0. 03 ^a
	甲基庚烯酮	0. 11±0. 01 ^a	0. 08±0. 02 ^a		罗汉柏烯	1. 17±0. 07 ^a	0. 84±0. 06 ^b
	2,6,6-三甲基-2-环己烯-1,4-二酮	0. 20±0. 02 ^b	0. 27±0. 03 ^a		新植二烯	188. 74±5. 39 ^b	268. 36±10. 52 ^a
	大马士酮	7. 36±0. 23 ^b	10. 79±0. 17 ^a		反式-(-)-5-甲基-3-(1-甲基乙烯基)-环己烯	17. 48±0. 37 ^b	22. 18±0. 43 ^a
	甲基环戊烯醇酮	0. 72±0. 04 ^b	2. 16±0. 12 ^a		无花果烯	—	0. 53±0. 01 ^a
	香叶基丙酮	2. 21±0. 10 ^a	2. 20±0. 11 ^a		小计	226. 96±6. 43 ^b	313. 2±11. 86 ^a
	4-(2,6,6-三甲基-1,3-环己二烯-1-基)-3-丁烯-2-酮	0. 35±0. 04 ^a	0. 35±0. 02 ^a	有机酸类	肉豆蔻酸	0. 85±0. 03 ^b	1. 17±0. 04 ^a
	β -紫罗兰酮	1. 27±0. 05 ^b	2. 35±0. 05 ^a		正十五酸	0. 41±0. 01 ^a	0. 40±0. 04 ^a
	巨豆三烯酮	25. 07±1. 42 ^b	30. 44±1. 30 ^a		棕榈酸	11. 18±0. 19 ^b	20. 47±0. 74 ^a
	2,3,6-三甲基-1,4-萘二酮	0. 30±0. 02 ^b	0. 64±0. 03 ^a		小计	12. 44±0. 23 ^b	22. 04±0. 82 ^a
	植酮	1. 54±0. 07 ^a	0. 83±0. 04 ^b	呋喃类	糠醇	0. 97±0. 02 ^b	2. 97±0. 07 ^a
	苯乙酮	—	0. 78±0. 02 ^a		2-乙酰基呋喃	0. 23±0. 01 ^a	0. 20±0. 02 ^a
	小计	40. 47±2. 05 ^b	55. 61±1. 96 ^a		5-甲基呋喃醛	0. 39±0. 05 ^b	0. 72±0. 09 ^a
醛类	苯甲醛	0. 43±0. 01 ^a	0. 37±0. 03 ^a		2-正丁基呋喃	0. 07±0. 04 ^a	0. 10±0. 01 ^a
	苯乙醛	3. 55±0. 07 ^a	3. 63±0. 13 ^a		3-(4,8,12-三甲基十三烷基)呋喃	0. 81±0. 05 ^a	0. 30±0. 02 ^b
	2,3-二氢-2,2,6-三甲基苯甲醛	0. 28±0. 03 ^a	0. 21±0. 02 ^a		小计	2. 47±0. 17 ^b	4. 29±0. 21 ^a
	小计	4. 26±0. 11 ^a	4. 21±0. 18 ^a	含氮杂环类	2-乙酰基吡咯	0. 21±0. 04 ^a	0. 27±0. 06 ^a
酯类	7,10,13-十六碳三烯酸甲酯	0. 70±0. 02 ^a	0. 46±0. 04 ^b		小计	0. 21±0. 04 ^a	0. 27±0. 06 ^a
	棕榈酸甲酯	9. 78±0. 20 ^a	2. 94±0. 20 ^b	酚类	4-乙烯基-2-甲氧基苯酚	2. 41±0. 08 ^a	2. 35±0. 03 ^a
	亚麻酸甲酯	12. 64±0. 30 ^b	22. 25±0. 38 ^a		2,4-二叔丁基苯酚	—	0. 19±0. 02 ^a
	邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯	3. 48±0. 17 ^b	4. 27±0. 26 ^a		4-甲氧基-3-甲基-1-萘酚	1. 84±0. 04 ^b	2. 98±0. 24 ^a
	二氢猕猴桃内酯	0. 87±0. 07 ^b	1. 42±0. 07 ^a		对甲酚	0. 47±0. 02 ^a	0. 36±0. 04 ^b
	小计	27. 47±0. 76 ^b	31. 34±0. 95 ^a		小计	4. 72±0. 14 ^b	5. 88±0. 33 ^a
烃类	十二烷	0. 08±0. 01 ^b	0. 13±0. 01 ^a	总量		324. 15±10. 18	498. 09±16. 73

注:—表示未检测到,下同。

2.2 发酵前后烟叶挥发性香气成分分析

发酵前后烟叶挥发性香气成分 GC-MS 分析结果见表 2。由表 2 可知,发酵前后烟叶中共鉴定出 46 种挥发性香气成分,其中空白对照组中挥发性成分总量约为 324. 15 $\mu\text{g/g}$,发酵组中挥发性成分总量约为 498. 09 $\mu\text{g/g}$,因此,发酵组中挥发性成分种类更为丰富。根据官能团的不同将其分为 9 类,分别为醇类、酮类、醛类、酯类、烃类、有机酸类、呋喃类、含氮杂环类和酚类物质。与空白对照组比,发酵组

中醇类、酮类、酯类、烃类、有机酸类、呋喃类、含氮杂环类和酚类含量均有明显提升,分别提升了 118. 44%、43. 95%、37. 41%、14. 09%、38. 00%、77. 17%、73. 68%、28. 57%和 24. 58%。其中,醇类物质苯乙醇和苯甲醇是芳香族氨基酸裂解产物,可增加烟叶的花香香韵^[19-20]。酮类物质 β -紫罗兰酮、大马士酮和巨豆三烯酮为类胡萝卜素降解产物,前两者为卷烟贡献了花香香韵,巨豆三烯酮具有类似于干草样甜香,可使烟气和顺^[21-23],而 4-环戊烯-1,3-二酮

和甲基环戊烯醇酮具有甜香和烤甜香香韵。醛类物质中只有苯乙醛含量稍有升高,为苯丙氨酸和木质素类代谢产物,具有花香香韵,增加了烟草中的玫瑰香^[24]。烟叶中的酯类物质对挥发性香气成分贡献程度很大,其通常具有特征果香香韵^[21],其中二氢猕猴桃内酯是重要的类胡萝卜素降解产物,对消除烟气刺激性具有重要作用,可赋予卷烟柔和的木香和果香香韵^[25-26]。烃类物质新植二烯是具有20个碳原子的聚类异戊二烯类香味物质,也是烟叶中重要的致香物质。作为捕集烟叶气溶胶内香气物质的载体,新植二烯具有携带烟叶中挥发性香气成分和致香成分进入烟气的能力,也是烟叶的重要增香剂^[27]。呋喃类物质糠醇和5-甲基呋喃醛具有焦甜香特征香韵^[28]。

2.3 发酵前后烟叶中挥发性成分 OPLS-DA 模型分析

OPLS-DA 可准确找出挥发性成分分类之间的差异,如卢绍浩等^[29]利用 OPLS-DA 模型筛选出了8种雪茄烟叶差异香气物质,可用于不同雪茄品种的区别。邵淑贤等^[30]基于 OPLS-DA 模型筛选出17种黄观音乌龙茶差异香气物质,可区分黄观音乌龙茶产地。烟叶发酵前后挥发性香气成分的 OPLS-DA 见图1。由图1可知,发酵前后烟叶均有较为明显的聚集趋势,且能较好地分离。其中,空白对照组样品主要分布在横轴的负半轴,而发酵组样品主要分布在横轴的正半轴,表明通过第1主成分便可有效区分两组样品。整体来看,发酵前后烟叶发酵试验重复性良好,发酵后烟叶中挥发性香气成分含量更高。

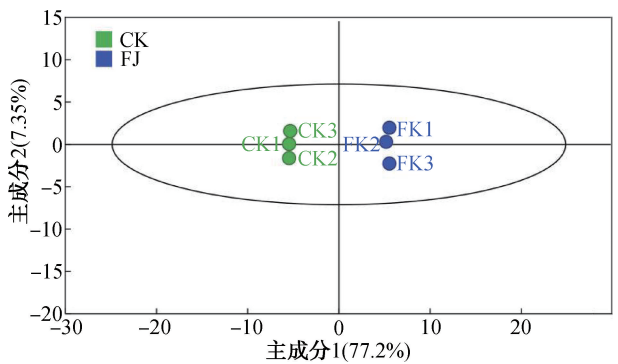


图1 烟叶发酵前后挥发性香气成分的 OPLS-DA
Fig. 1 OPLS-DA of volatile aroma components prior to and after fermentation of tobacco leaves

本文所建立 OPLS-DA 模型的自变量拟合指数 (R^2_x) 为 0.837,因变量拟合指数 (R^2_y) 为 0.999,模型预测指数 (Q^2) 为 0.996, R^2 和 Q^2 均超过 0.5,表示该模型拟合结果可信^[31]。对该模型进行 200 次置换检验,结果见图2。由图2可知, Q^2 回归线与纵轴的相交点小于0,说明该模型不存在过拟合现象,模型验证有效,可用于烟叶发酵前后挥发性香气成分的鉴别分析。

2.4 烟叶发酵前后差异性关键成分筛选结果分析

OPLS-DA 模型的载荷图见图3,该图表示两个主成分中各香气成分与发酵前后烟叶样品的相关性。 VIP 通常用于解释变量对分类模型分类结果的贡献程度, $VIP>1$ 的变量被认为是对分类判别有重要贡献的变量^[29]。烟叶发酵前后的香气成分非常复杂,这些成分大多没有气味或者有微弱气味,对烟叶香气形成有微弱作用,因此筛选关键香气化合

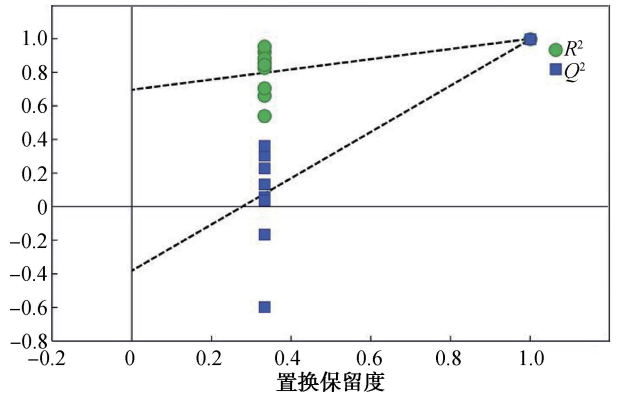


图2 OPLS-DA 模型的置换验证结果
Fig. 2 Results of OPLS-DA model replacement verification

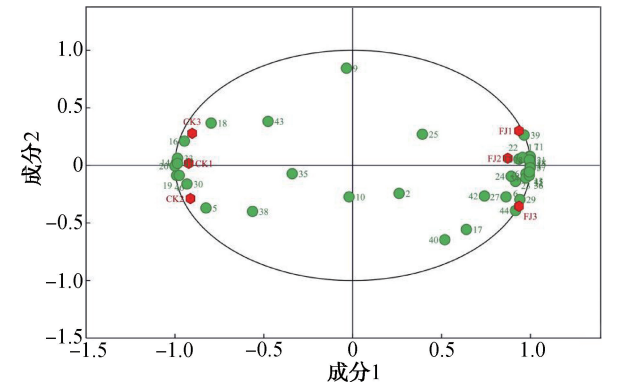


图3 OPLS-DA 模型的载荷图
Fig. 3 Loading diagram of OPLS-DA model

物对发酵前后烟叶香气的形成起着重要作用。由图 3 可知,发酵后的烟叶中苯乙醇、大马士酮、二氢猕猴桃内酯等成分含量显著增加,与发酵后样品的相关性较强。植酮、棕榈酸甲酯、无花果烯等成分在对照组样品中的含量相对较高,与对照组样品的相关性较强。挥发性香气成分的 *VIP* 见图 4。由图 4 可知,共有 32 种香气成分的 *VIP*>1。以 *VIP*>1 和 *P*<0.05 为基准筛选出烟叶发酵前后差异性关键成分,结果见表 3。由表 3 可知,共筛选出 32 种差异性成分,其中,有 27 种成分含量显著提升,包括醇类 2 种,酮类 9 种,酯类 2 种,烃类 8 种,有机酸类 2 种,呋喃类 2 种和酚类 2 种。结合图 3 可知,植酮(14)、棕榈酸甲酯(20)、罗汉柏烯(30)和无花果烯(33)

等成分与空白对照组样品距离较近,主要分布在主成分 1 的负半轴,表明其与空白对照组样品的相关性较强; β -紫罗兰酮(11)、糠醇(37)、5-甲基呋喃醛(39)、二氢猕猴桃内酯(23)和苯乙醇(3)等成分与发酵组样品距离较近,主要分布在主成分 1 的正半轴,表明其与发酵组样品的相关性较强。

2.5 烟叶发酵前后香气成分的香气贡献度分析

发酵前后烟叶特征香气成分的 *ROAV* 见表 4。由表 4 可知,实验组中具有花香、果香的苯甲醇、苯乙醇、大马士酮、 β -紫罗兰酮、苯乙酮和 2-正丁基呋喃的 *ROAV* 大于空白对照组,且前 5 种物质的 *ROAV*

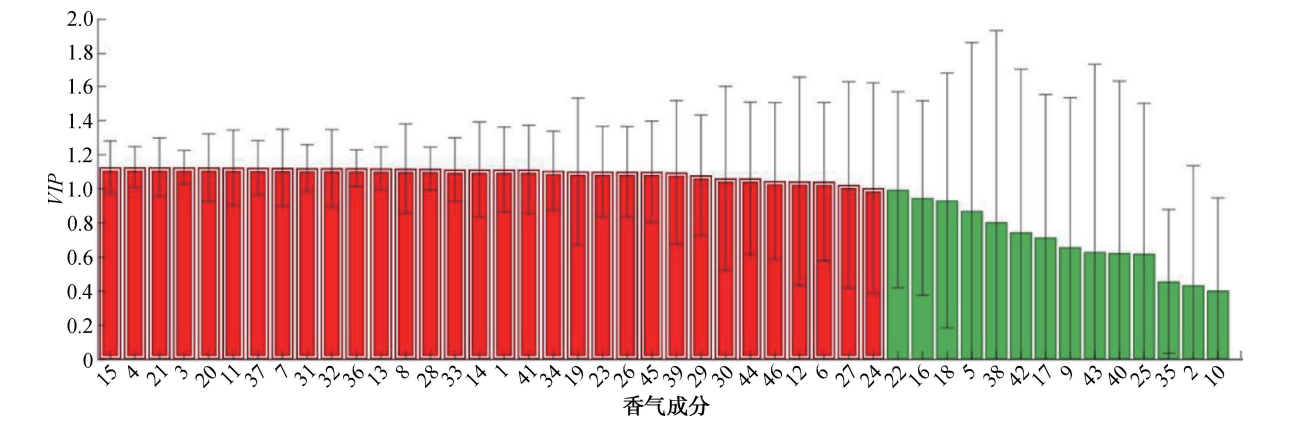


图 4 挥发性香气成分的 *VIP*
Fig. 4 *VIP* of volatile aroma components

表 3 发酵后烟叶差异性致香成分筛选结果

Table 3 Screening results of differential aroma components in tobacco leaves after fermentation					
香气成分			香气成分		
<i>VIP</i>	<i>P</i> 值		<i>VIP</i>	<i>P</i> 值	
1.115 04	0	苯乙酮	1.106 67	0.001	苯甲醇
1.114 74	0	植酮	1.103 44	0	3-(4,8,12-三甲基十三烷基)呋喃
1.114 24	0	亚麻酸甲酯	1.101 07	0.001	肉豆蔻酸
1.114 02	0	苯乙醇	1.100 45	0.002	7,10,13-十六碳三烯酸甲酯
1.113 89	0	棕榈酸甲酯	1.092 58	0.001	二氢猕猴桃内酯
1.113 52	0	β -紫罗酮	1.091 78	0.002	正十四烷
1.112 93	0	糠醇	1.090 52	0.003	4-甲氧基-3-甲基-1-萘酚
1.112 70	0	大马士酮	1.086 75	0.002	5-甲基呋喃醛
1.112 46	0	新植二烯	1.086 75	0.005	二十五烷
1.110 40	0	反式-(-)-5-甲基-3-(1-甲基乙烯基)-环己烯	1.071 63	0.007	罗汉柏烯
1.110 24	0	棕榈酸	1.068 83	0.008	2,4-二叔丁基苯酚
1.109 55	0	2,3,6-三甲基-1,4-萘二酮	1.067 47	0.013	对甲酚
1.109 33	0	甲基环戊烯醇酮	1.065 66	0.017	巨豆三烯酮
1.108 82	0	二十四烷	1.047 08	0.010	2,6,6-三甲基-2-环己烯-1,4-二酮
1.107 14	0	无花果烯	1.046 48	0.029	二十烷
1.106 70	0.023	邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯	1.028 68	0.016	十二烷

表 4 发酵前后烟叶特征香气成分的 ROAV

Table 4 ROAV of characteristic aroma components in tobacco leaves prior to and after fermentation

香味物质名称	嗅觉阈值/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	香气特征	ROAV	
			CK	FJ
苯甲醇	10	花香	10.29	13.17
芳樟醇	0.037	花香	1.56	1.35
苯乙醇	31	玫瑰花香	8.70	22.44
甲基庚烯酮	0.05	果香	0.44	0.26
大马士酮	50	果香、花香	29.36	35.45
甲基环戊烯醇酮	1.27	焦甜香	2.87	7.10
香叶基丙酮	0.06	花香	8.82	7.23
β -紫罗兰酮	7	紫罗兰、花香	5.07	7.72
巨豆三烯酮	2.05	干草香	100.00	100.00
苯乙酮	0.065	水果香、花香	—	2.56
苯甲醛	0.99	杏仁味	1.72	1.22
苯乙醛	0.005	花果香	14.16	11.93
二氢猕猴桃内酯	176.78	甜干草香	3.47	4.66
肉豆蔻酸	0.4	椰子香	3.39	3.84
棕榈酸	5	脂肪香气	44.60	67.25
糠醇	54	焦甜香	3.87	9.76
2-乙酰基呋喃	58.5	焦糖味	0.92	0.66
5-甲基呋喃醛	1.11	焦甜香、烘烤香	1.56	2.37
2-正丁基呋喃	0.005	果香	0.28	0.33
2-乙酰基吡咯	0.1	坚果味香气	0.84	0.89
对甲酚	0.167	烟熏香	1.87	1.18

均大于1,这使得实验组的花香、果香更为显著,且苯乙酮为发酵后烟叶中特有的香气成分;实验组中具有干草香的二氢猕猴桃内酯的 ROAV 大于空白对照组,且 ROAV>1,这使得实验组的干草香更为突出;实验组中具有焦甜香的甲基环戊烯醇酮、糠醇和5-甲基呋喃醛的 ROAV 大于空白对照组,且 ROAV>1,这使得实验组的焦甜香更为突出;此外,实验组中分别具有椰子、脂肪和坚果香气的棕榈酸、肉豆蔻酸和2-乙酰基吡咯的 ROAV 大于空白对照组,且前两者的 ROAV>1。因此,上述物质对发酵后烟叶苯甲醇、苯乙醇、大马士酮、 β -紫罗兰酮、苯乙酮、二氢猕猴桃内酯、甲基环戊烯醇酮、糠醇、5-甲基呋喃醛、棕榈酸和肉豆蔻酸的香气贡献增大,且除2-正丁基呋喃外,其余物质的 ROAV 均大于1,是烟叶发酵后的关键香气成分。同时发现,它们也属于发酵后烟叶中含量差异显著的成分。有研究也

报道了类似结果,如杨志晓等^[32]研究表明,苯乙酮和二氢猕猴桃内酯可提升烟叶的香气质,改善卷烟感官品质;贾学伟等^[33]研究表明,肉豆蔻酸、棕榈酸是提升卷烟感官品质的关键成分。

3 结论

本研究选用贝莱斯芽孢杆菌 YUNM-3 和纤维素酶、脂肪酶和中性蛋白酶这3种生物酶制成复合生物酶制剂,用其对上部低次烟叶进行发酵处理,分析发酵前后烟叶中常规化学成分和挥发性香气成分,并通过 ROAV 分析香气成分贡献度的差异。结果表明:1)发酵后烟叶的钾含量、烟碱含量、还原糖含量、总糖含量、糖碱比和钾氯比均有显著性变化($P<0.05$),其中糖碱比显著增加,其他指标显著降低。2)发酵后烟叶中挥发性香味成分种类无明显差异,主要以醇类、酮类、烃类、有机酸类、呋喃类和酚类物质为主,但其总含量明显提升,与空白对照组相比提升了53.7%,达到498.09 $\mu\text{g/g}$;构建的 OPLS-DA 模型平行实验重复性良好,且不存在过拟合现象;该模型从46种挥发性香味成分中筛选出32种含量具有显著性差异的成分。3)发酵后烟叶中苯甲醇、苯乙醇、大马士酮、 β -紫罗兰酮、苯乙酮、二氢猕猴桃内酯、甲基环戊烯醇酮、糖醇、5-甲基呋喃醛、2-正丁基呋喃、棕榈酸和肉豆蔻酸的 ROAV 均高于发酵前烟叶,表明其对烟叶香气贡献增大,且除2-正丁基呋喃外,其他物质的 ROAV 均大于1,是发酵后烟叶的关键香气成分,同时也是发酵后烟叶中含量显著差异的成分。因此,利用本文制备的复合生物酶制剂对低次烟叶进行菌酶协同发酵处理,可以明显提升卷烟的感官品质。

参考文献:

[1] 邵灯寅,李雨芮,邹恩凯,等.黑曲霉和酒糟二次发酵提升低次烟叶品质的研究[J].安徽农业科学,2023,51(16):178-181.

[2] 郝捷,季婧,李力群,等.生物酶和微生物技术改善烟叶香气的研究进展[J].生物技术进展,2022,12(6):817-824.

[3] 刘洪坤,毛文龙,游敏,等.改善低次烟叶品质的生物发酵工艺优化[J].中国烟草科学,2024,45(2):99-107.



- [4] 马林. 利用生物技术改变烟叶化学组分提高其吸食品质和安全性的研究[J]. 郑州工程学院学报, 2001(3): 40-42, 45.
- [5] 赵铭钦, 岳雪梅, 邱立友, 等. 微生物发酵增质剂对卷烟酸性组分含量及品质效应的影响[J]. 中国烟草科学, 2000(1): 13-16.
- [6] 黄申, 芦尧, 刘强, 等. 生物酶在烟草工业中的应用研究进展[J]. 轻工学报, 2023, 38(5): 112-118.
- [7] 代丽, 黄永成, 官长荣, 等. 密集式烘烤条件下不同变黄温湿度对烤后烟叶致香物质的影响[J]. 华北农学报, 2008, 23(6): 148-152.
- [8] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 试样的制备和水分测定 烘箱法: YC/T 31—1996[S].
- [9] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 总植物碱的测定 连续流动法: YC/T 160—2002[S].
- [10] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 氯的测定 连续流动法: YC/T 162—2011[S].
- [11] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 钾的测定 连续流动法: YC/T 217—2007[S].
- [12] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 水溶性糖的测定 连续流动法: YC/T 159—2019[S].
- [13] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 总氮的测定 连续流动法: YC/T 161—2002[S].
- [14] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 感官分析 方法学 采用三点强迫选择法(3-AFC)测定嗅觉、味觉和风味觉察阈值的一般导则: GB/T 22366—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [15] 方嘉炜, 严锦申, 钟帅, 等. 毕节烟区不同产地烟叶的感官质量特征及关键香气成分[J]. 烟草科技, 2024, 57(8): 21-31.
- [16] 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.
- [17] 李登科, 田楠, 田志章, 等. 应用顶空气相-离子迁移谱与相对气味活度值法分析卷烟特征香气物质[J]. 分析测试学报, 2021, 40(8): 1164-1170.
- [18] 倪超, 宋小宁, 张松杰, 等. 高碳基土壤修复肥对舞阳烟叶化学成分和致香物质的影响[J]. 江西农业学报, 2017, 29(12): 63-67.
- [19] ELMENHORST H. The identification of maltol in cigarette smoke/nachweis von maltol in cigarettenrauch[J]. Contributions to Tobacco Research, 1971, 6(2): 70-73.
- [20] 史清照, 李河霖, 王超, 等. 卷烟烟气内源性花香成分分析及花香特征调控[J]. 烟草科技, 2023, 56(5): 56-67.
- [21] 刘俊辉, 杨春强, 范武, 等. 卷烟烟气中 7 种香韵特征赋予组群的筛查[J]. 烟草科技, 2019, 52(4): 44-50.
- [22] 吴彦辉, 薛立新, 许自成, 等. 烤烟巨豆三烯酮研究现状与展望[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(3): 150-156.
- [23] MOOKHERJEE B D, WILSON R A. Tobacco constituents-their importance in flavor and fragrance chemistry[J]. Perfumer and Flavorist, 1990, 15: 27-49.
- [24] 詹军, 周芳芳, 朱海滨, 等. 基于理化指标的烤烟中常见致香物质的分类与分布[J]. 农业科学与技术(英文版), 2013, 14(9): 1358-1364.
- [25] 张小慧, 连梦瑶, 李欢, 等. 不同品种辣椒挥发性香味物质的对比[J]. 食品工业, 2023, 44(12): 119-125.
- [26] 李萌, 王旭东, 罗昭标, 等. 混菌固态发酵低次烟叶工艺优化及挥发性致香成分分析[J]. 河南农业科学, 2022, 51(9): 171-180.
- [27] 杜康, 张尉, 顾丽莉, 等. 初烤烟叶中烟碱和新植二烯的提取工艺研究[J]. 核农学报, 2021, 35(6): 1394-1401.
- [28] 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.
- [29] 卢绍浩, 谢永恒, 许利平, 等. 基于 OPLS-DA 模型的雪茄烟叶香气差异分析[J]. 中国农业科技导报, 2024, 26(12): 176-186.
- [30] 邵淑贤, 徐梦婷, 林燕萍, 等. 基于电子鼻与 HS-SPME-GC-MS 技术对不同产地黄观音乌龙茶香气差异分析[J]. 食品科学, 2023, 44(4): 232-239.
- [31] 孙凤林, 郝志峰. OPLS 在非线形偏最小二乘回归模型的应用[J]. 计算机工程与设计, 2010, 31(12): 2826-2829.
- [32] 杨志晓, 夏海乾, 蔡凯, 等. 特色烟草新品种贵烟 28 的选育及其特征特性[J]. 中国烟草科学, 2024, 45(5): 1-7.
- [33] 贾学伟, 代玉祥, 崔春, 等. 甘草固体颗粒香料的改良及卷烟加香应用[J]. 中国烟草学报, 2025, 31(1): 30-39.

Analysis of aroma difference of low-grade tobacco leaves prior to and after treatment by bacterial-enzyme co-fermentation

SU Zan¹, CAO Yuan², SUN Jiansheng¹, HU Zhizhong¹, ZOU Kexing¹,

LIU Hong¹, LONG Zhangde¹, XU Chunping²

1. Technology Center, China Tobacco Guangxi Industrial Co., Ltd., Nanning 530001, China;

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

Abstract: In order to explore the difference of aroma components of tobacco leaves before and after the synergistic treatment of bacteria and enzymes, a strain of *Bacillus velezensis* YUNM-4 screened from the surface of Yunyan 87

tobacco leaves and three kinds of biological enzymes (cellulase, lipase and neutral protease) were used to make a compound biological enzyme preparation, and the upper low-grade tobacco leaves were subjected to synergistic fermentation treatment. The conventional chemical components and aroma components of the treated tobacco leaves were determined by continuous flow analyzer and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), respectively. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) and independent t test ($P<0.05$) were used to screen out the components with significant differences in the content of tobacco leaves before and after fermentation, and the relative odor activity value (ROAV) was used to analyze the difference in the contribution of aroma components in tobacco leaves before and after fermentation. The results showed that: 1) Compared with the control group, the total potassium, nicotine, total sugar, reducing sugar and potassium chloride ratio of the conventional chemical components of the fermented tobacco leaves reduced significantly, while the sugar-nicotine ratio increased significantly. 2) The total content of volatile aroma components after fermentation tobacco leaves significantly increased, reaching 498.09 $\mu\text{g/g}$, an increase of 53.7%, mainly alcohols, ketones, hydrocarbons, organic acids, furans and phenols; The OPLS-DA model had good experimental repeatability without over-fitting phenomenon. Through this model, 32 components with significant differences in content were screened out can better distinguish the differences in aroma components of tobacco leaves before and after fermentation. 3) The ROAV of 12 volatile aroma components in the fermented tobacco leaves was higher than that in the pre-fermented tobacco leaves. 4) The ROAV values of 11 components such as benzyl alcohol, phenylethyl alcohol, damascenone, β -ionone, acetophenone and dihydroactinidiolide were greater than 1, which were the key aroma components of fermented tobacco leaves, and could significantly improve the sensory quality of cigarettes.

Key words:bacteria-enzyme combination;tobacco leaf fermentation;low-grade tobacco leaves;aroma analysis

[责任编辑:杨晓娟 刘春奎]