

## 产香细菌的筛选及香气成分分析\*

梁开朝<sup>1</sup>, 辛玉华<sup>1</sup>, 张 鸽<sup>1,2</sup>, 王 娟<sup>1</sup>, 李爱军<sup>1</sup>, 刘好宝<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 中国烟草总公司 海南省公司 海南雪茄研究所, 海南 海口 571100;

2. 中国农业科学院 烟草研究所, 山东 青岛 266101)

**摘要:**【目的】微生物在提高烟叶品质和生产天然香精香料中均具有重要的意义。本研究探究了烟叶中分离出的产香菌株的产香特性, 以及菌株的应用特征。以期为该菌株的应用提供研究基础。【方法】应用烟叶浸提物培养基对醇化初期的烟叶表面细菌进行了分离, 并通过发酵产香筛选得到 1 株具有明显香味的细菌 M-5, 采用分子生物学方法对产香菌株 M-5 进行了初步鉴定, 并利用气相色谱—质谱 (GC-MS) 联用技术分析了发酵液的香气成分。【结果】菌株 M-5 被初步鉴定为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*), 进一步分析菌株 M-5 利用烟叶发酵液的香气成分, 其所产生的香气物质较多, 主要有 2,3-丁二醇 (23.89%)、苯乙酮 (9.04%)、苯乙醇 (8.13%)、丁酸乙酯 (6.07%)、乙酸丁酯 (4.46%) 和棕榈酸 (2.82%), 这些物质在改善烟叶品质和香精香料中都有应用。【结论】M-5 菌株不仅在烟叶醇化中被用于提高烟叶香气、改善烟叶吸味等, 还在制备烟叶香料香精方面有着潜在的应用前景。

**关键词:** 产香细菌; 香气成分; 气相质谱联用; 烟叶醇化; 香精香料

中图分类号: Q 939.97

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2019) 02-0271-06

## Screening of the Aroma-producing Strain and Its Key Aroma Compounds Analysis

LIANG Kaichao<sup>1</sup>, XIN Yuhua<sup>1</sup>, ZHANG Ge<sup>1,2</sup>, WANG Juan<sup>1</sup>, LI Aijun<sup>1</sup>, LIU Haobao<sup>1,2</sup>

(1. Hainan Cigar Research Institute of Hainan Provincial Branch of China National Tobacco Corporation,

Haikou 571100, China; 2. Tobacco Research Institute of Chinese Academy of

Agriculture Sciences, Qingdao 266101, China)

**Abstract:** [Purpose] Aromatic bacteria show considerable promise for improving the aroma of tobacco leaves and producing flavors and fragrances in an environment-friendly way. The aim of our study was to characterize the aroma-producing strain isolated from tobacco leaves, and analyze its application characteristics. And this finding offers a valuable reference for the application of this strain. [Method] Modified LB media were employed to isolate the aromatic bacteria on the aging flue-cured tobacco, and the modified LB media were made by adding hot water extract of the tobacco sample. And from fermentation test, an aroma-producing bacterium M-5 was selected. 16S rDNA sequence analyses were performed to identify aroma-producing strain M-5. Additionally, the aroma

收稿日期: 2017-11-18

修回日期: 2017-12-24

网络出版时间: 2019-01-25

\*基金项目: 海南省重点研发计划项目 (ZDYF2017155); 中国烟草总公司海南省公司科技重点项目 (2017460000 24056)。

作者简介: 梁开朝 (1964—), 男, 海南海口人, 硕士, 高级农艺师, 主要从事植物保护、烟叶种植和调制技术研究。

E-mail: 13978175666@139.com

\*\*通信作者 Corresponding author: 刘好宝 (1964—), 男, 山东潍坊人, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事烟草营养与施肥以及雪茄烟栽培方面的研究。E-mail: liuhaobao@caas.cn

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201711040](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201711040)

compositions from aroma-producing strain M-5 fermentation were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). [ **Result** ] The strain M-5 was a *Bacillus cereus*. A large number of aroma compositions were detected by GC-MS, and the main components included 2,3-butanediol (23.89%), acetophenone (9.04%), phenylethyl alcohol (8.13%), butanoic acid, ethyl ester (6.07%), acetic acid, butyl ester (4.46%) and n-hexadecanoic acid (2.82%). These compounds have been used in improvement of tobacco leaves and production of flavors and fragrances. [ **Conclusion** ] The aroma-producing strain M-5 is of great application value for improving the aroma of tobacco leaves and producing flavors and fragrances.

**Keywords:** aromatic bacteria; aroma compounds; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); aging process of tobacco leaves; flavors and fragrances

未经醇化的烟叶因其不具有优良的感官和香气特征而不适合作为成品烟叶制品<sup>[1]</sup>, 故醇化是烟叶品质提高必不可少的一个环节, 微生物在烟叶醇化过程中有着举足轻重的作用, 它们可以赋予烟叶醇香、柔和等特征<sup>[2]</sup>。微生物利用烟叶产香, 并应用于提高烟叶品质的研究不在少数, 也有不少研究表明: 这些微生物作用于烟叶, 对于提高烟叶在醇化过程中的香味有一定效果<sup>[3-4]</sup>。余翔等<sup>[5]</sup>从 14 种烟叶表面筛选出 1 株能够利用烟末发酵产香的克雷伯氏杆菌, 研究表明: 特征香气物质为 4-乙基愈创木酚, 且经过单因素优化后, 4-乙基愈创木酚的含量可高达 0.725 mg/mL, 这将有利于定向增加烟叶的香气, 为烟叶增香提供科学依据。ENGLISH 等<sup>[6]</sup>从醇化的烟叶上分离出几株嗜热细菌, 其中, 3 株枯草芽孢杆菌和 1 株环状芽孢杆菌单独或混合作用于烟叶, 均可使烟叶产生芳香的气味。郑勤安<sup>[7]</sup>利用 1 种增香菌、1 种活性干酵母和 1 种蛋白酶做成了烟草发酵增质剂, 烟草原料经此发酵增质剂处理后, 糖含量、pH 值、蛋白质含量均明显下降, 加香评吸结果表明此微生物发酵增质剂可提高烟叶整体的香吃味质量。

除此之外, 微生物合成天然香料香精也备受关注, 许多研究表明: 有些酵母菌、细菌以及真菌都可以产香。芽孢杆菌作为载体合成天然香料香精的研究也是层出不穷, 林群等<sup>[8-9]</sup>通过对枯草芽孢杆菌和衣芽孢杆菌的发酵代谢产物进行研究, 表明: 这两株菌均可产生多种香味物质, 如 2,3-丁二醇、愈创木酚、3-羟基 2-丁酮、乙酸、丁酸、3-甲基丁酸、丁二酮等。同样, 黄永光等<sup>[10]</sup>分别从酱香型白酒生产制曲、堆积酒醅和发酵期酒醅

中分离出了地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌, 其发酵代谢产香的特征性成分表明: 枯草芽孢杆菌发酵代谢产物中的主要香气物质有乙醇、乙酸乙酯等, 发酵过程中呈现的特征性风味为醇香、果香和甜香; 地衣芽孢杆菌发酵代谢产物中的主要香气物质有草酸、甲酸乙酯、丙酮醛等, 发酵过程中呈现的特征性风味为辛香、蜂蜜香、醋酸香和酱香; 解淀粉芽孢杆菌发酵代谢产物中的风味成分有异丁醇、 $\alpha$ -松油醇、愈创木酚、异冰片和冰片, 其特征分析表明发酵过程中的风味为醇香、芳香、药香和酱香。

本研究从烟叶中通过烟叶浸提物培养基分离得到了 1 株菌 M-5, 该分离培养基在一定程度上模拟了菌株的生长环境, 以期分离出之前未从烟叶上分离得到的具有产香效果的微生物。采用分子生物学方法对其进行了鉴定, 并将此筛选得到的菌株利用烟叶样品进行发酵, 分析了香气成分, 目的在于讨论利用菌株 M-5 改善烟叶香气品质和制备增香香料香精的可行性, 为提高烟叶品质和微生物制备香精香料提供理论研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验仪器与试剂

仪器: GSP-9080MBE 隔水式恒温培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; LDZF-75KB-II 型立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; DELTA-320pH 计, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司; N-1100 旋转蒸发仪, 日本 Eyela 公司; OSB-2100 油 (水) 浴锅, 日本 Eyela 公司; CX41 显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; SHZ-CA 型循环水式多用真空泵, 巩义市予华仪器有限公司; DLSB-5L/

20 型低温冷却液循环泵, 巩义予华仪器有限公司; SW-CJ-2FD 医用洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; ZHWY-1102 双层小容量恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; 7890A-5975C 气相色谱—质谱联用仪, 美国 Agilent 公司; BAS 822 型分析天平 (精度 0.01 g), 德国 Sartorius 公司; T100TM PCR 仪, 美国 BIO-RAD 公司; Cary50 型紫外—可见分光光度计, 美国 Varian 公司。

试剂: 胰化蛋白胨 (Tryptone), 酵母提取物 (Yeast extract) 均为生物纯, 购自英国 Oxoid 公司; 琼脂也为生物纯, 北京索莱宝科技有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技有限公司; DNA Marker2000, 日本 TaKaRa; Kodaq 2× PCR MasterMix with dye, 加拿大 abm-Good; 琼脂糖, 青岛 MDBio Inc; 生理生化试剂盒, 广东环凯微生物科技有限公司; NaCl、丙三醇和葡萄糖均为优级纯, 国药集团化学试剂有限公司。

材料: K326 烟叶样品由红云红河烟草 (集团) 责任有限公司提供。

### 1.2 培养基

烟叶水浸提物固体培养基: 15 g 烟叶样品加入 350 mL 蒸馏水, 煮沸提取 30 min, 冷却后, 两层纱布过滤, 得烟叶沸水浸提液。

10% 烟叶水浸提液固体培养基成分及配制为: 100 mL 烟叶水浸提液, 900 mL 蒸馏水, 胰化蛋白胨 (Tryptone) 9 g, 酵母提取物 4.5 g, NaCl 9 g, 琼脂 20 g, pH 自然, 115 ℃ 高压蒸汽灭菌 30 min。

10% 烟叶水浸提液液体培养基成分及配制为: 100 mL 烟叶水浸提液, 900 mL 蒸馏水, 胰化蛋白胨 (Tryptone) 9 g, 酵母提取物 4.5 g, NaCl 9 g, pH 自然, 115 ℃ 高压蒸汽灭菌 30 min。

发酵培养: 1 000 mL 蒸馏水, 葡萄糖 20 g, K326 烟叶样品 (37 ℃ 烘干, 过 40 目筛) 5 g。

### 1.3 细菌的分离纯化

随机抽取 K326 烟叶样品 2 g 左右, 在无菌条件下, 利用灭菌的剪刀剪碎后, 浸泡于 150 mL 无菌水中, 在恒温振荡培养箱中, 振荡培养 30 min 以上, 培养条件: 温度 (37±1) ℃, 转速 180 r/min。用无菌单层纱布过滤培养液, 9 000 r/min 离心 15 min 后, 弃上清, 沉淀用 5 mL 无菌水重悬, 得原

始菌悬液; 将原始菌液稀释 0、10、100、1 000、10 000 和 100 000 倍后, 分别吸取 100 μL 在烟叶水浸提物固体培养基涂布均匀, 37 ℃ 培养 48 h; 培养所获得的菌落, 应用平板划线法纯化, 直至获得单菌落。

### 1.4 产香细菌的筛选

将分离到的细菌接种至烟叶浸提物液体培养基中, 于 37 ℃ 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 1.0 左右后, 以接种量 5% (V/V) 接种至发酵培养基中, 37 ℃ 于恒温振荡器中发酵 5 d, 通过嗅香评定筛选出 1 株发酵后具有明显香气的菌株, 并将其命名为 M-5。

### 1.5 产香细菌的鉴定

将细菌 M-5 接种至烟叶浸提物液体培养基中, 于 37 ℃ 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 1.0 左右后, 通过 16S rDNA 进行鉴定, 鉴定以细菌基因组为模板进行聚合酶链式反应 (PCR), 细菌基因组提取用细菌基因组提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, 北京)。其中, PCR 反应体系 (25 μL): mix 酶 12.5 μL, 引物 27F 0.5 μL, 引物 1492R 0.5 μL, 模板 DNA 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.0 μL。PCR 扩增程序为: 预变性 95 ℃ 5 min, 变性 95 ℃ 30 s, 退火 55 ℃ 30 s, 延伸 72 ℃ 1 min 30 s, 延伸 72 ℃ 5 min, 12 ℃ 保存, 30 个循环<sup>[1]</sup>。引物为: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。最后将 PCR 产物, 送测序公司测序。

### 1.6 产香细菌的香气成分分析

将菌株 M-5 接种至烟叶浸提物液体培养基中, 37 ℃ 培养至 OD<sub>600</sub> 为 1.0 左右后, 按照 5% 的接种量接种至发酵培养基中 37 ℃, 180 r/min 振荡培养 5 d 后, 将发酵液 5 000 r/min 离心 15 min, 并分离上清液和沉淀物。上清液用等体积乙酸乙酯萃取, 萃取液 35 ℃ 旋蒸浓缩。取 1 mL 旋蒸后的样品, 经无水硫酸钠除水后过滤, 用 GC-MS 检测。

香气成分采用气相色谱—质谱联用仪 (7890A-5975C, Agilent, 美国) 分析。色谱柱: HP-IN-NOWAX 毛细管柱 (30 mm×0.25 mm×0.25 μm); 色谱条件: 进样口温度 250 ℃; 进样量 1 μL; 分流比为 10:1; 升温程序 (初始柱温 40 ℃, 保持 5 min, 以 5 ℃/min 速率升温至 100 ℃, 再以 13 ℃/min 的速率升温至 230 ℃, 保持 10 min); 载气: 高纯氦气; 柱流量: 1.0 mL/min。质谱条件: 电

离方式为 EI, 电子能量 70, 离子源温度 230 ℃, 四极杆温度 150 ℃, 质量范围 40~500, 定性采用 NIST08.L 标准谱库检索。

## 2 结果和分析

### 2.1 产香细菌的筛选和鉴定

本研究以 K326 的烟叶样品为研究材料, 应用 10% 烟叶浸提物培养基, 从样品中分离出 1 株具有特别香味的菌株, 初步命名为 M-5。根据华大基因公司给出的 16S rRNA 基因序列测序结果 (1 419 bp), 借助 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 平台, 比对出相似性最高 (均为 100%) 的菌株的相关序列, 并从 GenBank 数据库中导出相似性高的菌株序列, 利用 MEGA 7.0, 以距离依靠法中的邻接法 (引导值>50%) 构建该菌株基因序列系统进化树 (图 1), 结果表明: 与菌株 M-5 最相近的菌株是蜡样芽孢杆菌 MER\_TA\_49 (*Bacillus cereus* strain MER\_TA\_49), 初步判断 M-5 为蜡样芽孢杆菌属的一种。

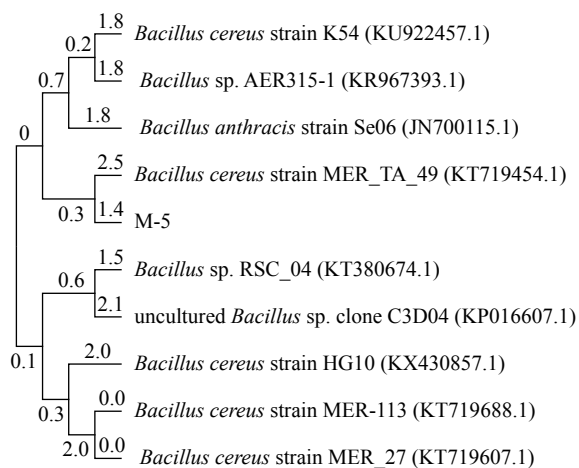


图 1 菌株 M-5 与相关菌种的 16S rRNA 基因序列系统进化树 (邻接法)

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of M-5 and its closest relative species (neighbor-joining method)

### 2.2 香气成分分析

菌株 M-5 发酵后, 发酵液经萃取后, 通过 GC-MS 分析表明: 在分离出的化合物中, 有 43 个对香气有贡献的成分 (表 1), 峰面积百分比占总成分的 63.18%, 其主要的香气成分有 2,3-丁二醇、苯乙酮、苯乙醇、丁酸乙酯、乙酸丁酯和棕榈酸等, 其含量分别占 23.89%、9.04%、8.13%、

6.07%、4.46% 和 2.82%。化合物 2,3-丁二醇在化工生产、药物制造以及燃料的生产加工均具有广泛的应用。除此之外, 它还可以用在烟草和酒的增香中; 化合物苯乙酮具有类似山楂的气味, 可以用于香皂和纸烟的添香, 还可以作为增塑剂和有机合成的中间体等; 而化合物苯乙醇是国标中规定的可以使用的食用香料, 具有典型的玫瑰花香味, 用于配置各种果香型香精、精油等, 还可以用于日化产品中; 丁酸乙酯具有菠萝香味, 乙酸丁酯有愉快果香气味, 它们都是国标中规定可使用的食用香精, 同样这些香料也可以用于烟用香料。

## 3 讨论

不少研究表明芽孢杆菌对提高烟叶品质有一定的作用, 瞿娇娇等<sup>[12]</sup>从豆豉中分离出的 1 株枯草芽孢杆菌并将其作用于烟叶, 经发酵后, 烟叶的香吃味有了极大地提高, 刺激性也有所降低, 烟叶的整体品质提高, 证明枯草芽孢杆菌在烟叶增香、提质方面有一定的效果。从表 1 可见: 43 种对香气有贡献的挥发性成分包括酯类 3 种、烷类 3 种、酮类 7 种、酸类 9 种、醇类 7 种和醛类 4 种, 其他 10 种主要有 2,3-丁二醇、苯乙酮、苯乙醇、丁酸乙酯、乙酸丁酯和棕榈酸等。2,3-丁二醇含量高达 23.89%, 2,3-丁二醇在中国还被添加到白酒中, 用于改善白酒风味, 同时也是烟叶重要的香气物质, 具有清香的烟气特征。菌株 M-5 发酵后还产生了苯乙醇、苯甲醇等带有明显香气的物质, 它们是烟叶内重要的致香化合物, 赋予烟气甜香、花香和果香的特征, 烟叶香吃味随着它们含量的增多而增高<sup>[13]</sup>, 故苯甲醇、苯乙醇等对烟叶品质的提高有着极大的作用。一些低级脂肪酸的酯类具有水果香味或者酒香、脂肪香、蜡香, 这些酯具有烤烟的香气特征, 可用于烟叶香精中; 而一些有机酸, 如丙酸、乙酸、己酸、苯乙酸、4-甲基戊酸等能够缓和辛辣的烟气, 使吸味醇和, 对烟叶的香味有明显的影响<sup>[14]</sup>; 茄酮以及 3-羟基- $\beta$ -二氢大马酮在发酵液中也可以检测到, 表明发酵后烟叶的香气比较丰富, 菌株 M-5 可以进一步用于烟叶醇化来提高烟叶品质。下一步的研究可将菌株直接作用于烟叶, 并通过评吸试验等确定该菌株用于提升烟叶醇化品质的可行性。除此之外, 还可通过进一步试验验证该

表 1 菌株 M-5 发酵后发酵液中香气成分分析

Tab. 1 The aromatic components analysis of strain M-5

编号 No.	保留时间/min retention time	峰面积 area	匹配项名称 compounds	含量/% content
1	3.401	124 435 903	丁酸乙酯 butanoic acid, ethyl ester	6.07
2	3.495	2 784 785	异丁烯醛 methacrolein	0.14
3	3.632	1 627 708	4-甲基-癸烷 decane, 4-methyl-	0.08
4	3.765	1 349 715	4-甲基十二烷 undecane, 4-methyl-	0.07
5	4.15	91 431 247	乙酸丁酯 acetic acid, butyl ester	4.46
6	4.741	13 688 888	十一烷 undecane	0.67
7	5.431	1 675 461	乙基苯 ethyl benzene	0.08
8	5.67	1 931 405	对二甲苯 o-xylene	0.09
9	5.885	3 100 555	邻二甲苯 p-xylene	0.15
10	7.345	1 365 001	吡啶 pyridine	0.07
11	11.438	8 511 732	羟基丙酮 2-propanone, 1-hydroxy-	0.42
12	15.292	2 216 867	5-羟基-4-辛酮 5-hydroxy-4-octanone	0.11
13	15.986	441 646	乙酸 acetic acid	0.02
14	17.544	699 570	苯甲醛 benzaldehyde	0.03
15	18.285	489 843 705	2,3-丁二醇 2,3-butanediol	23.89
16	18.354	1 795 373	丙酸 propanoic acid	0.09
17	19.043	234 781	异戊醇 2-butanol, 3-methyl-	0.01
18	20.024	185 328 752	苯乙酮 acetophenone	9.04
19	20.191	3 385 532	磷酸三乙酯 triethyl phosphate	0.17
20	20.512	28 129 437	2-甲基丁酸 butanoic acid, 2-methyl-	1.37
21	20.79	925 029	2-鲸蜡醇 2-hexadecanol	0.05
22	21.158	2 801 462	5-异丙基-8-甲基-6,8-壬二烯-2-酮 (茄酮) 6,8-nonadien-2-one, 8-methyl-5-(1-methylethyl)-, (e)-	0.14
23	21.912	2 825 274	3-甲基戊酸 pentanoic acid, 3-methyl-	0.14
24	21.968	407 765	3,4-二甲基苯甲醛 benzaldehyde, 3,4-dimethyl-	0.02
25	22.212	487 865	2-羟基-3-甲基-2-环戊烯酮 2-cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-methyl-	0.02
26	22.439	717 045	己酸 hexanoic acid	0.03
27	22.7	1 956 341	苯甲醇 benzyl alcohol	0.10
28	22.82	871 798	甲基环戊烯醇酮 2-cyclopenten-1-one, 2-methyl-	0.04
29	23.004	166 665 289	苯乙醇 phenylethyl alcohol	8.13
30	24.807	824 579	异植物醇 isophytol	0.04
31	26.104	5 094 105	2,4,6-三甲基苯酚 phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)	0.25
32	26.198	2 838 609	乙酰丙酸 pentanoic acid, 4-oxo-	0.14
33	26.806	3 584 118	异茨醇 isoborneol	0.17
34	26.918	11 030 949	苯甲酸 benzoic acid	0.54
35	27.008	3 431 756	吲哚 indole	0.17
36	27.209	3 984 726	月桂酸 dodecanoic acid	0.19
37	27.444	2 555 853	喇叭茶醇 ledo	0.12
38	27.538	8 258 853	3-羟基- $\beta$ -二氢大马酮 3-hydroxy-.beta.-damascone	0.40
39	27.705	16 008 966	苯乙酸 benzeneacetic acid	0.78
40	29.551	15 187 126	石竹素 caryophyllene oxide	0.74
41	29.654	8 228 236	黑松醇 thunbergol	0.40
42	30.309	57 811 934	棕榈酸 n-hexadecanoic acid	2.82
43	30.908	14 720 387	乙基香草醛 benzaldehyde, 4-hydroxy-	0.72

菌株能否用于改善如白酒、酱料等发酵制品的风味,这将为该菌株进一步的应用提供理论依据。

芽孢杆菌发酵产生香气物质的报道不在少数,且其可产生的香气物质也较为丰富。钟姝霞等<sup>[15]</sup>分离纯化得到蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、泛酸枝芽孢杆菌 (*Virgibacillus pantothenicus*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*),分析菌株发酵后的产物可知:可作为香精香料的物质主要有 3-羟基-2-丁酮(乙偶姻)、2,3-丁二醇和一些酯类物质。M-5 菌株可利用烟叶产生的 10 余种已知的日化 and 食用香精香料物质,这表明该菌在生产香精香料方面有一定的能力,也表明该菌具有比其他菌株在耐受烟叶本身所含的物质如烟碱(尼古丁)、亚硝酸盐等方面有很大的优势,这也极大地提高了其应用范围。

本研究初步表征了 1 株可以利用烟叶生产较多香气物质的芽孢杆菌,表明该菌可以进一步用于烟叶醇化和生产制备香精香料。但本研究仅在实验室水平上说明该菌有产生香气的能力,之后的研究可进一步研究其在烟叶醇化中的应用,并可通过评吸鉴定其确切的用于烟叶醇化的能力。此外,可通过发酵产物的提纯工艺以及发酵优化等试验来提高其生产香精香料化合物的能力,为验证其可进一步用于工业生产香精提供研究基础;还可通过其他发酵试验验证该菌株用于改善其他发酵制品风味的可行性。

#### 4 结论

本研究以 K326 烟叶为研究对象,应用烟叶浸提物培养基分离了烟叶样品上的细菌,并通过菌株发酵,筛选出 1 株发酵具有明显香味的菌株 M-5,经分子生物学鉴定方法对其进行了初步鉴定,结果表明:该菌株属于蜡样芽孢杆菌;对其发酵产物进行香气成分分析,结果表明:该菌主要的香气成分为 2,3-丁二醇 (23.89%)、苯乙酮 (A9.04%)、苯乙醇 (8.13%)、丁酸乙酯 (6.07%)、乙酸丁酯 (4.46%) 和棕榈酸 (2.82%)。这些物质不仅可以调节烟草的酸碱度,使吸味醇和,还可增加烟气浓度,间接影响烟气的香味,在烟气中可起到平衡烟气的作用,继而提高烟叶品质。除此之外,还可以发现,许多的代谢产物为天然香精香料,有的还是国标规定允许使用的食用香料,可

广泛用于烟酒、化妆品和日用化学品中。总之,菌株 M-5 可利用烟叶产生明显的香味,不仅可以用于烟叶醇化,包括提高烟叶香气、改善烟叶吸味、提高醇化品质等,还可用于制备香精香料。

#### [参考文献]

- [1] WANG J J, XU Z C, FAN J L, et al. Effects of X-ray irradiation on the microbial growth and quality of flue-cured tobacco during aging[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2015, 111: 9. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2015.02.005.
- [2] 罗家基,朱子高,罗毅,等.微生物在烟叶发酵过程中的作用[J].烟草科技,1998(1): 6.
- [3] 赵铭钦,李晓强.烟叶微生物发酵机理及生物制剂应用研究进展[J].甘肃农业大学学报,2007,42(6): 84. DOI: 10.3969/j.issn.1003-4315.2007.06.019.
- [4] 吕欣,王颖,赵德学,等.增香微生物用于烤烟发酵的初步研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39(12): 186,195.
- [5] 余翔,李元实,刘栋,等.一株增香微生物的分离鉴定及其发酵产香条件优化[J].浙江农业学报,2016,28(4): 670. DOI: 10.3969/j.issn.1004-1524.2016.04.20.
- [6] ENGLISH C F, BELL E J, BERGER A J. Isolation of thermophiles from broadleaf tobacco and effect of pure culture inoculation on cigar aroma and mildness[J]. Applied Microbiology, 1967, 15(1): 117.
- [7] 郑勤安.造纸法再造烟叶生产过程中微生物增质剂的应用研究[J].浙江工业大学学报,2004,32(4): 82.
- [8] 林群,董胜,付秋香,等.产香风味枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 分离及发酵代谢产物分析[J].酿酒科技,2013(11): 30.
- [9] 林群,肖之陶,付秋香,等.产香风味地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的分离及发酵代谢产物分析[J].酿酒科技,2013(12): 49.
- [10] 黄永光,杨国华,张肖克,等.产酱香风味芽孢杆菌类菌株发酵代谢产物及其酶分析研究[J].酿酒科技,2013(1): 41.
- [11] JANSSEN P H, O'FARRELL K A. *Succinispira mobilis* gen. nov, sp. nov, a succinate-decarboxylating anaerobic bacterium[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(3): 1009. DOI: 10.1099/00207713-49-3-1009.
- [12] 瞿娇娇,邹晓,张晓敏,等.枯草芽孢杆菌对烟叶主要致香物质的影响[J].贵州农业科学,2014(6): 150. DOI: 10.3969/j.issn.1001-3601.2014.06.039.
- [13] 赵高坤,崔国民,黄维,等.不同烘烤工艺对烟叶醇类化合物的影响[J].安徽农学通报(下半月刊),2012,18(18): 147.
- [14] 史宏志,刘国顺.烟草香味学[M].北京:中国农业出版社,1998.
- [15] 钟姝霞,邓杰,汪文鹏,等.酱香型酒醅产香芽孢杆菌的分离鉴定及其代谢产物分析[J].现代食品科技,2017(4): 89.

责任编辑:何承刚