

生物酶和微生物技术改善烟叶香气的研究进展

郝捷, 季婧, 李力群*, 郑超, 吴娜, 吴晗, 李选文, 孙志康

内蒙古昆明卷烟有限责任公司, 呼和浩特 010020

摘要: 生物酶和微生物在烟叶醇化发酵过程中发挥着重要作用。目前,利用生物酶和微生物技术提高烟叶品质、改善烟叶香气,已成为烟草行业关注的热点。利用酶制剂处理烟叶可以降解烟叶的蛋白质、果胶、纤维素等生物大分子,以达到提高烟叶品质和改善烟叶香气的作用。利用微生物对烟叶进行发酵可以有效调整和改善烟叶内部化学组分的比例,增加烟叶中的香气物质。综述了生物酶和微生物技术在烟叶产香发酵中的研究进展及其在烟叶发酵机理及增香技术中的应用,重点阐述了微生物和生物酶提高烟叶香气、改善烟叶品质以及降解烟叶中蛋白质、淀粉、果胶、纤维素等大分子物质的研究现状,分析了目前微生物和生物酶在实际应用中存在的问题,以期为今后使用生物酶和微生物技术改善烟叶香气提供理论依据。

关键词: 生物酶;微生物;烟草;吸味品质

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2022.0070

中图分类号:TS413,S572 文献标志码:A

Research Progress on Improving Aroma of Tobacco Leaf with Bio-enzymes and Microorganism Technology

HAO Jie, JI Qiang, LI Liquan*, ZHENG Chao, WU Na, WU Han, LI Xuanwen, SUN Zhikang

Inner Mongolia Kunming Cigarette Co., Ltd., Hohhot 010020, China

Abstract: Biological enzyme and microorganism technology play significant roles in tobacco fermentation. The utilization of bio-enzymes and microorganisms to improve the quality and aroma of tobacco has become the focus of tobacco industry. Treating tobacco with bio-enzyme preparation can degrade biomolecules such as protein, pectin and cellulose in tobacco to proteins, pectins, cellulose and other biological macromolecules in tobacco, thus improving the quality and aroma of tobacco. Using microorganisms to ferment tobacco can adjust and improve the proportion of chemical components and increase the formation of aroma substances in tobacco. The application and progress of the technology of bio-enzyme and microbial technology during tobacco flavor production and fermentation, and the mechanism of tobacco fermentation and aroma enhancement technology, were reviewed, especially expatiated on the microbes and enzymes improve tobacco aroma, improving the quality of tobacco leaves, and degradation of protein, starch, pectin, cellulose and other macromolecules substances in tobacco leaves. The problems in practical application of the microbes and enzymes were analysed, so as to provide a theoretical basis for the use of bio-enzymes and microorganism technology to improve tobacco aroma in the future.

Key words: biological enzyme; microorganism; tobacco; smoking quality

烟草作为一种特殊的经济作物,其产量与品质直接关系到我国国民经济的健康发展。目前,我国是世界上最大的烟草生产国和消费国,每年消费量约占全球消费总量的三分之一^[1]。烟叶的质量由其化学成分、物理性质和外观品质共同决

定,其中化学成分能够体现外观质量,当烟叶的化学成分处于协调状态时,则表现出高品质的外观。近年来,随着烟叶生产技术的不断提高,我国生产的烟叶香气量明显不足,导致我国高等级烟叶所占比例较少,成为影响我国烟叶质量提高的

收稿日期:2022-05-09; 接受日期:2022-05-27

联系方式:郝捷 E-mail: 84508540@163.com; *通信作者 李力群 E-mail: mk_jszx@sina.com

制约性因素^[2]。

对于烟草香气物质的提取,消费者大多偏好自然来源的天然产品,因此,越来越多的研究人员致力于利用非化学合成方法生产香气物质,其中生物技术方法产香方式尤其受欢迎^[3]。未醇化的烟叶由于刺激性强和香气不足不能直接用于卷烟生产^[4]。在合适的温度、湿度条件下对烟叶进行发酵,可以促使烟叶的理化性质发生变化,提升烟叶香气和吸味品质,这对提高烟叶品质具有重要意义。烟叶发酵主要分为自然醇化和人工发酵两种方式。与自然醇化相比,人工发酵具有成本低、发酵周期短、投入资金少等优点,但在提高烟叶香气和吸味品质方面自然醇化效果更加明显^[5-6]。由于经济条件的限制,我国大部分卷烟厂主要以人工发酵为主。目前利用生物酶以及微生物发酵等生物技术进一步改善烟叶发酵技术,在降低成本、提高经济效益、缩短发酵周期的基础上改善烟叶香气、提高产品质量已成为一些烟草科技工作者研究的热点。本文主要对目前利用生物酶和微生物技术在改善烟叶香气和吸味品质中的应用研究进行了简要综述,并分析了目前微生物和生物酶在实际应用中存在的问题,期望随着对烟叶发酵机理及增香技术的深入研究,使生物技术在烟叶发酵方面得到更广泛的应用。

1 生物酶和微生物技术诱发烟叶香气的研究概况

1.1 烟叶香气的研究概况

烟叶香气是决定烟叶以及卷烟产品品质的重

要标准,燃烧时高品质的烟叶需要具有吃味醇和、香气质纯且量大、香型明显的特点^[7]。生产香气浓郁的优质烟叶,解析其中的香气化学成分,对提高卷烟产品质量和增加烟叶的利用率具有重要意义。一般来说,卷烟的香味主要来自于烟叶本身,但是由于自然环境的影响,烟叶的品质会存在某些不足,且在调控烟叶燃烧后的有害成分时,往往也会影响其香气成分的变化,导致烟叶中的致香成分不能稳定存在,难以靶向性地改善烟叶香气,使烟叶品质受到影响^[8]。

烟叶的香味是由各种致香物质混在一起反应的结果,其成分复杂且种类繁多,一直是烟叶研究的重点领域。经过多年研究,烟草工作者对烟叶的致香成分有了基本了解。根据致香物质的基团不同,主要可分为醇类、酯类、酸类、酮类、酚类、醛类、呋喃类、烃类、酰胺类、羰基类、醚类和氮杂环类^[9]。烟叶中的致香物质主要通过复杂的合成、分解过程转化形成,多为次级代谢产物。有研究表明,烟叶致香物质不仅包括挥发性的致香成分,还包括致香前体物^[10]。其中较为常见且重要的主要有5类,包括多酚类物质、质体色素(类胡萝卜素、叶绿素)、西柏烷类化合物、烟碱、高级脂肪酸和非挥发性有机酸^[7]。这些致香前体物自身并不具备香气特征,它们大多是结构复杂的大分子化合物,主要通过莽草酸代谢途径、醋酸—丙二酸代谢途径、甲羟戊酸代谢途径和氨基酸代谢途径由糖类物质转变生成^[11],图1对烟叶中糖类物质转变为致香物质的代谢途径进行了简要描述。目前对其代谢途径以及烟叶香气的代谢机制仍需要进一步深入研究。

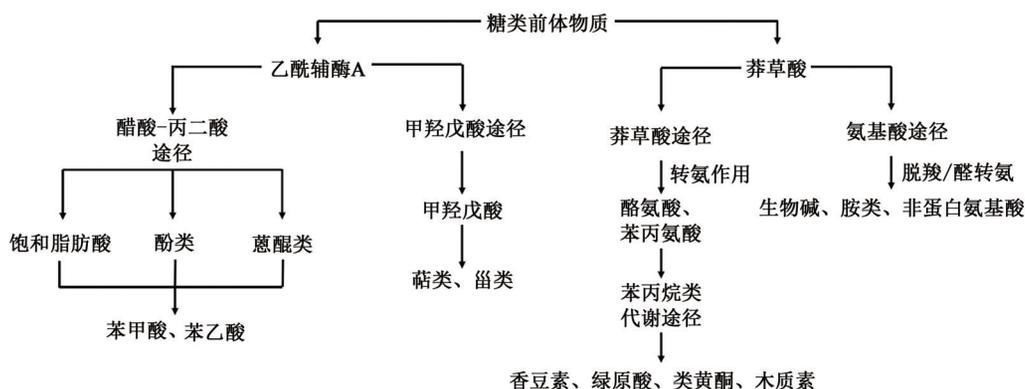


图1 烟叶中从糖类物质转变为次生致香物质的代谢途径^[12-14]

Fig. 1 Metabolic pathway of flavour-causing substances from carbohydrate precursor to secondary substances in tobacco leaves^[12-14]

1.2 微生物在烟叶产香发酵中的应用

研究发现,微生物活动是引发烟叶发酵的前体因素,而无机催化剂的催化反应在发酵后期才起作用^[15]。发酵过程中烟叶表面存在大量活跃的微生物,这些微生物群落具有缩短烟叶发酵时间、降低烟碱含量、增加烟叶香气含量等多种功能^[16]。研究发现,在烤烟表面存在的微生物中,细菌的数量和种类均占绝大部分,其中芽孢杆菌属因其生长迅速、抗性强等特点成为烟叶发酵过程中的优势菌群;霉菌和放线菌与细菌相比数量较少,主要是曲霉和链霉菌^[17-19]。表1和表2对烟叶中存在的微生物种类及其作用进行了总结^[20-26]。

表1 烟叶中的微生物种类

Table 1 Species of microorganisms in tobacco leaves

种类	菌属
细菌	芽孢杆菌属、梭状芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、假单胞菌属、不动杆菌属、泛菌属、乳酸杆菌属、棒杆菌属、肠杆菌属
霉菌	曲霉属、青霉属、木霉属、毛霉属、小孢霉属、头孢霉属、梗束霉属
放线菌	链霉菌属、动孢菌属、小单孢菌属

表2 烟叶中的微生物作用及优势菌群

Table 2 Function and dominant bacterial community of microorganisms in tobacco leaves

作用	优势菌
提高香气	芽孢杆菌属、小球菌、泛菌属、微球菌属
降低有害成分	假单胞菌属、芽孢杆菌属、巨大芽孢杆菌属、微球菌属、嗜热菌、根瘤菌属、节枝杆菌属
缩短发酵时间	枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、酵母菌

此外,研究还发现微生物的活跃程度与烟叶的发酵条件也密切相关。烟叶发酵的起始阶段,细菌数量大幅度增加,而当发酵温度升高、氧气较少时,细菌的数量则开始减少。如果发酵的环境湿度过高或者缺少氧气时,微生物则会增多,从而导致发酵后的烟叶出现酸臭气味^[27]。目前,研究发现微生物改善烟叶香气的作用方式主要有两种:一种是利用非持久香型微生物改善烟叶香气,这类微生物能够产生作用于烟叶表面的香气物质,改善烟叶香味,但是香气保留时间较短;另一种是利用持久香型微生物改善烟叶香气,这类微生物作用于烟叶内部,其自身代谢可产生 α -淀粉

酶、蛋白酶、果胶酶、纤维素酶等多种活性酶,使烟叶中的大分子物质降解为能够产生香气的小分子物质。此外,持久香型微生物产生的小分子物质还可以激活多种酶系统,加快香气物质的转化,该作用方式产生的香气保留时间长且不易挥发^[28]。

Tamayo等^[18]最先利用小球菌和芽孢杆菌来改善烟叶香气。此后,关于利用微生物提高烟叶香气的研究越来越多。例如,黄文静等^[29]用短小芽孢杆菌 Van35 处理后发现烟叶香气明显提高、刺激性降低、卷烟吸味得到显著改善。内蒙古昆明卷烟有限责任公司分别利用高产 β -葡聚糖酶的地衣芽孢杆菌 LCCC10150、高产纤维素酶的康宁木霉 LCCC30119 接种烟叶,结果显示,烟叶中淀粉、绿原酸、木质素、果胶含量明显降低,总糖含量和烟叶本香增加,烟气更加协调、柔和,烟叶品质得到明显改善^[30-31]。于少藤等^[32]将菌株 yc10 接种于烟叶表面,发现发酵烟叶中蛋白质、淀粉、木质素、果胶等含量降低,致香成分的含量以及总糖含量增加,其中烟叶中的糖分在热分解时使烟气的 pH 呈酸性,促进烟碱中和,降低了刺激性,使烟气更加平衡。此外,还有研究发现按一定比例使用多种微生物共同处理烟叶也可提高烟叶香气。例如,English等^[33]从烟叶表面分离出3个枯草杆菌菌系和1个环状芽孢杆菌菌系,将这些菌株按一定比例混合接种于烟叶均可使烟叶产生香气。Wu等^[34]采用解淀粉芽孢杆菌单一处理烟叶后烟叶甜度、香气品质显著提高,但是烟气的柔和度和刺激性变化不明显,用地赤芽孢杆菌单一处理烟叶也有类似的趋势。当把解淀粉芽孢杆菌和地赤芽孢杆菌按3:1比例混合处理烟叶2d后,烟叶的香气、甜度、刺激性等不同指标均表现出更全面的改善,表明两个菌株对烟叶的香气品质具有协同作用。以上研究表明,醇化发酵过程中选择合适的微生物和适宜的发醇条件均可显著改善烟叶的香气品质,提高烟叶的质量。

1.3 生物酶在烟叶产香发酵中的应用

生物酶是一种环保、无毒,可以促进生物系统中大多数反应的生物催化剂,包括蛋白质和少部分RNA,具有专一性、低反应条件、高效性、可降低生化反应活化能等特殊的催化功能^[35]。微生物可以在一定条件下促进烟叶发酵,有研究证明微

生物的活动也会影响酶活性,在烟叶发酵过程中两者是相互影响的。微生物在代谢过程中会产生各种代谢酶,这些酶可以转化和分解烟叶中的大部分化合物,如多酚类等大分子物质可在酶的作用下被降解为小分子物质,使烟叶中的醇类、酯类、酚类等成分增加^[36],但其具体作用机理尚不清楚。烟叶醇化发酵过程中,在一定温度和湿度条件下利用生物酶制剂加工处理烟叶,以调控烟叶

中的化学成分,从而改善烟叶的吸味品质。例如,淀粉酶、蛋白酶可以降解烟叶中的淀粉、蛋白质等大分子物质,用其处理低等级的烟叶可以减少燃烧时产生刺激性焦糊气味,提升低等级烟叶的可用性和经济效益。表3对烟叶发酵过程中使用的相关生物酶种类及其作用进行了总结^[37-39]。随着对生物酶的深入研究,应用生物酶技术来改善烟叶的香气和香气量已成为烟草行业的研究热点。

表3 烟叶发酵过程中相关生物酶种类及作用

Table 3 Species and functions of related enzymes during tobacco fermentation

生物酶种类	分解或转化底物	产物
蛋白酶	蛋白质	氨基酸
淀粉酶	淀粉	糊精、麦芽糖、葡萄糖
麦芽糖酶	麦芽糖	葡萄糖
转化酶	蔗糖	葡萄糖、果糖
纤维素酶	纤维素	葡萄糖
果胶酶	果胶	可溶性糖
脂酶	三酰基甘油	一酰基甘油、二酰基甘油、游离脂肪酸
多酚氧化酶	酚类物质	醌类物质
脂氧合酶	类胡萝卜素	香叶醇、紫罗兰酮、紫黄质黄质醛

近年来,许多烟草研究人员在烟叶生产过程中应用生物酶制剂,使烟叶的香气得到了不同程度的改善。He等^[40]使用含有果胶酶的溶液处理切下的烟梗后,还原糖和产物例出的含量分别增加了20.5%和67.2%。于建军等^[41]单独使用果胶酶降解烟叶中的果胶,发现烟叶细胞壁物质含量显著下降,中性香气物质含量增加29.94%,显著提高了烟叶的香气和整体感官体验。除果胶酶外,也可单独利用纤维素酶对烟叶进行处理。纤维素是烟叶结构的主要成分,在烟叶中约占11%。高纤维素含量使烟叶变粗、变脆,烟气刺激性强,降低了卷烟的烟叶风味和烟气质量。烟叶的等级越低纤维素的含量越高,因此,低等级的烟叶利用率较低^[42]。周瑾等^[43]利用对烟叶纤维素组织有特异作用的纤维素酶处理烟叶后,发现烟叶中还原糖含量增多、刺激性降低、香气增加、低等级烟叶的使用性能明显提升。随着研究的深入,发现在烟叶发酵过程中使用单种酶只对某一种降解对象的作用效果较好。而由于烟叶中含有的影响烟叶香气的物质较多,因此使用单种酶的降解效果并

不理想,综合使用两种或两种以上的酶制剂在提高发酵效率、调控烟叶化学成分、改善烟叶香气品质方面效果更加显著。在复合酶的应用中,内蒙古昆明卷烟有限责任公司选用纤维素酶和果胶酶,按照一定配比将两种酶制剂混合后处理烟叶,烟叶的发酵时间缩短至20 h,大大提高了发酵效率,且这种自主研发的生物酶制剂配方显著改善了烟叶中化学成分的协调性和感官品质^[44]。迟广俊等^[45]将菠萝蛋白酶、淀粉-1,4-葡萄糖苷酶、纤维素酶等酶制剂按照一定配比配成复合酶制剂,在生产中用该复合酶制剂处理膨胀烟丝后发现,烟丝中蛋白质、淀粉的含量分别降低了9.48%和6.69%,还原糖和总糖含量分别提高了6.27%和5.63%,烟丝的刺激性和木质气、枯焦气明显减弱,同时香气增强、余味干净、烟气更加柔和,整体感官评价明显提升。对烟叶中的致香成分进行分析后,发现加酶组烟丝的致香成分含量都有所增加。此外,Bailey等^[46]在一定的温湿度条件下用硝酸盐还原酶和蔗糖转化酶处理烟叶,烟叶发酵10 d后产生了类似调制干草样的香气,继续发酵

2 d甜香气更加浓厚,带有香豆素香气,并且杂气减小、烟气柔和。因此,适当的选用多种酶优化组合处理烟叶,可以更好的提高发酵效率,有效地分解细胞壁物质,选择性地改变烟叶的结构,增加香气物质的含量,从而改善烟叶的内在品质。

2 生物酶和微生物技术的综合利用

通过对多种生物酶的研究,发现许多酶在干燥环境中具有较强的耐热性,甚至在高温环境下也能保持其活性,能够高效地提高烟叶内在质量,改善烟叶香气。然而,大多数生物酶制剂的费用偏高,水解条件下效果并不理想。微生物在代谢过程中通常利用某些营养源分泌具有生物活性的多种酶,这些酶可以催化烟叶发酵过程中化学成分的转化和品质提升^[47]。同时,微生物发酵具有生产成本低、发酵条件易于控制的特点,可以弥补生物酶发酵过程的不足。此外,生物酶与微生物作用于烟叶的机理不同,也可以起到互补作用。一般情况下,酶主要以降解的方式降解烟叶中多酚、亚硝胺及大分子物质等,而微生物主要通过生物转化的方式将烟叶中影响烟叶香气的物质转化为小分子物质及无害物质^[48-49]。在提高烟叶质量、改善烟叶香气过程中将这两种方式结合起来处理烟叶,效果会更加明显。

目前,微生物和生物酶的结合使用已在烟草发酵过程中广泛应用。马林^[50]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地降低烟叶中对香气和吸味品质不利的成分,处理后的烟叶刺激性和杂气降低、香气改善、余味干净。赵铭钦等^[51]应用一种烟叶发酵增质剂研究烟叶发酵自然陈化和人工发酵过程中烟叶的增香增质效果。该烟叶发酵增质剂由4种菌和2种酶配制而成,发酵增质剂处理后的烟叶香气质和香气量均有提升,刺激性和杂气减轻,分析烟叶化学成分发现糖、碱、氮等主要成分及其比例更加协调。此外,还有研究发现,用生物酶处理后的烟叶香气和整体品质都得到了改善,在此基础上分别或混合加入杆菌属和微球菌属后,烟叶中的酰胺氮、胺、氨等可溶性氮含量增加,蛋白质含量减少^[52]。由此可见,利用生物酶和微生物在一定条件和比例下处理烟叶可以弥补单独使用生物酶或微生物的不足,能够更大程度地减少卷烟的刺激性和青

杂气,同时改善香气质、香气量和吸味品质。

3 生物酶和微生物技术在烟叶产香发酵中存在的问题

3.1 生物酶在烟叶产香发酵应用中存在的问题

酶的活性受温度、浓度、时间、酸碱度以及选用溶剂等多方面因素的影响,烟叶在发酵、加工过程中所需的条件并不完全符合酶的催化条件,这导致生物酶制剂虽然在实验室阶段的研究报道较多,但尚未实现卷烟工业规模化的应用^[53]。因此,在工业化生产中,不同烟叶的发酵过程要针对不同的发酵工艺实施酶的种类和比例的具体调控。在此基础上,还需要进一步探究生物酶制剂对烟叶化学成分的调控,以及醇化发酵过程中生物酶的影响因素和作用机制,对各种酶制剂之间的比例进行合理配伍、优化配方,将先进的分子生物学手段与传统发酵工艺相结合,从源头上改善烟叶品质,正向改善感官吸味,降低烟叶杂气和刺激性,使香气特征更加明显。

3.2 微生物在烟叶产香发酵应用中存在的问题

微生物对烟叶醇化发酵过程中的化合物转化发挥着重要作用,整个过程中其自身可产生多种代谢产物,除了一些能够改善烟叶香气和品质的活性酶、有机酸外,还会向细胞外分泌一些有害物质^[54]。并不是所有的微生物都能够对烟叶的醇化发酵产生积极的影响,有些微生物甚至还会降低烟叶的质量和使用价值。例如,烟叶较容易吸收水分,采收后的运输、储存,尤其是醇化发酵期间均易导致部分烟叶发生霉化变质。这些微生物菌群的生长环境与烟叶的储存环境相近,会导致微生物持续繁殖,这不仅污染烟叶的处理环境,而且会造成烟叶变化不可控的局面。其中青霉菌、曲霉菌、链孢菌、枝孢菌和毛壳菌等大多数以霉菌形式存在的真菌可能是导致烟叶腐烂变质的主要原因^[55]。这些霉菌能够消耗烟叶中的蛋白质、淀粉、糖类等营养物质,产生有毒、有害的成分,改变烟叶的物质积累,破坏烟叶内部化学成分的平衡,降低烟叶的品质以及香气质和香气量。更让人担忧的是,烟叶中某些微生物(细菌和真菌)或者微生物毒素(内毒素和真菌毒素)可能导致慢性炎症、癌症等疾病的发生^[56-57]。在一项对4个卷烟品牌

的细菌宏基因组学研究中,发现卷烟中广泛存在潜在的致病微生物,其中不动杆菌、伯克霍尔德菌、芽孢杆菌、梭菌、克雷伯菌、假单胞菌等最为显著,在卷烟样本中占90%。检出的其他病原菌还包括弯曲杆菌、肠球菌和葡萄球菌^[58]。对微生物群落进行FAPROTAX分析发现,烟叶陈化过程中约有7.3%的微生物包含人类致病菌,包括红螺菌目、假单胞菌目、黄单胞菌目和肠杆菌目等^[25]。这些研究都表明烟叶或卷烟本身可能是吸烟者和其他接触二手烟的人接触潜在致病微生物的来源。

总之,微生物技术对于烟叶醇化发酵的质量和烟叶制品的安全性具有重要价值。在这一方面,要注意的问题主要有:烟叶醇化发酵过程中要避免使用的微生物菌剂造成烟叶发生霉化变质,导致烟叶质量下降、香气减弱;其次,要避免一些微生物分泌的有害物质危害消费者的身体健康,合理协调有益微生物和有害微生物之间的关系,做到既可以提高烟叶品质、改善烟叶香气质量,又能保证产品的安全。

4 展望

我国烟草资源丰富,利用生物酶和微生物技术改善烟叶香气、提高烟叶整体品质被证明是可行的,但是具体的作用机制因其复杂性尚不清楚。目前,国外在烟草发酵方面已取得重大进展,而我国利用生物技术在烟草领域的研究仅在实验室层面比较成熟,在工业生产中的应用时间较短,范围较小。要想在烟叶发酵过程中实现生物酶和微生物作用的生产实践,在今后的研究和实际应用中,必须一方面进一步探究生物酶和微生物技术改善烟叶香气的机制,加强生物酶和微生物技术的综合使用,将生物技术应用到烟叶的整个生产加工过程中,注重与工业生产相结合;另一方面,生物酶和微生物的活性受温度、浓度、酸碱度等多方面因素的影响和制约,需要根据不同烟叶的具体发酵情况以及各种生物酶和微生物对烟叶化学成分的影响,精确筛选不同的生物酶以及微生物种类,确定影响生物酶和微生物作用的主要因素,综合使用生物酶和微生物发酵技术,进一步完善生物技术处理烟叶的工艺配方并贯穿于烟叶发酵的整个过程。

随着人们生活水平的日益提高,消费者对卷

烟产品的质量要求更加严格,因此生物酶制剂和微生物在生态环境、生产过程以及消费者这三个层面的安全性尤为重要。未来需要深入探究生物酶和微生物在烟叶发酵过程中代谢产物对吸食者的影响,进一步提高卷烟产品的安全性。目前,利用生物酶以及微生物技术改善烟叶的香气对于烟草工作者来说仍是一个亟待研究的重要课题,它们在烟草的研究、开发和实际生产中的广泛应用,对卷烟工业的发展具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] XU X, ZHANG X, HU T W, *et al.* Effects of global and domestic tobacco control policies on cigarette consumption per capita: an evaluation using monthly data in China[J/OL]. *BMJ Open*, 2019, 9(6):e025092[2019-05-17]. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2018-025092>.
- [2] 蔡宪杰,刘茂林,谢德平,等. 提高上部烟叶工业可用性技术研究[J]. *烟草科技*,2010(6):10-17.
- [3] MALDONADO R G, RODRIGUEZ B E, SANCHEZ C A, *et al.* Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process[J]. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2003, 62(5): 484-488.
- [4] HUANG J, YANG J, DUAN Y, *et al.* Bacterial diversities on unaged and aging flue-cured tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis[J]. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2010, 88(2): 553-562.
- [5] LIU F, ZHAO Z, ZHAO M. Detection and quantitative analysis of dominant bacteria on aging flue-cured tobacco leaves[J]. *Agric. Sci. Tech.*, 2016, 17(11): 2611-2614.
- [6] LIU F, WU Z, ZHANG X, *et al.* Microbial community and metabolic function analysis of cigar tobacco leaves during fermentation[J/OL]. *Microbiologyopen*, 2021, 10(2): e1171[2021-01-17]. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1171>.
- [7] 周昆,周清明,胡晓兰. 烤烟香气物质研究进展[J]. *中国烟草科学*,2008,29(2): 58-61.
- [8] LI J, ZHAO Y, QIN Y, *et al.* Influence of microbiota and metabolites on the quality of tobacco during fermentation[J]. *BMC Microbiol.*, 2020, 20(1):1-15.
- [9] MOOKHERJEE B, WILSON R. Tobacco constituents-their importance in flavor and fragrance chemistry[J]. *Perfum. Flavor*, 1990, 15: 27-49.
- [10] BANOŽIĆ M, JOKIĆ S, AČKAR D, *et al.* Carbohydrates-key players in tobacco aroma formation and quality determination [J/OL]. *Molecules*, 2020, 25(7): 1734 [2020-04-09]. <https://doi.org/10.3390/molecules25071734>.
- [11] KUMAR J, GUPTA P K. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants[J]. *Plant Biotechnol. Rep.*, 2008, 2: 93-112.
- [12] 段胜智,李军营,杨利云,等. 烟叶致香物质及其环境影响因

- 子的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2015(1): 45-52.
- [13] 杨铁钊,李钦奎,李伟. 植物次生代谢与烟草香味物质[J]. 中国烟草科学, 2005, 26(4): 23-26.
- [14] 王霞,杨铁钊,殷全玉,等. 影响烟草香味的主要次生代谢途径及其研究进展[J]. 中国烟草科学, 2008, 29(1): 47-50.
- [15] 宫长荣,于建军. 烟草原料初加工[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1993.
- [16] 于会喜,王毅,马永凯,等. 发酵烟叶表面微生物的多样性及其应用现状[J]. 河北农业科学, 2009, 13(10): 59-60.
- [17] CHOPYK J, CHATTOPADHYAY S, KULKARNI P, *et al.* Temporal variations in cigarette tobacco bacterial community composition and tobacco-specific nitrosamine content are influenced by brand and storage conditions[J/OL]. *Front. Microbiol.*, 2017, 8: 358[2017-03-07]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00358>.
- [18] TAMAYO A I, CANCHO F G. Microbiology of the fermentation of Apanish tobacco[C]//International Congress of Microbiology, 1953, 6: 48-50.
- [19] DAI J, DONG A, XIONG G, *et al.* Production of highly active extracellular amylase and cellulase from *Bacillus subtilis* ZIM3 and a recombinant strain with a potential application in tobacco fermentation[J/OL]. *Front. Microbiol.*, 2020, 11:1539[2020-07-21]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01539>.
- [20] 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):1520-1529.
- [21] SU C, GU W, ZHE W, *et al.* Diversity and phylogeny of bacteria on Zimbabwe tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis[J]. *Appl. Microbiol. Biot.*, 2011, 92(5): 1033-1044.
- [22] 舒明,樊虎,刘金莉,等. 基于高通量测序的废次烟末水提液中细菌群落分析[J]. 烟草科技, 2016, 49(4):1-7.
- [23] 虞有朋,王刚,段旺军,等. 利用生物技术对烤烟发酵的研究[J]. 食品与发酵科技, 2020, 56(2):69-75.
- [24] 杜佳,张晓娟,吴刚,等. 雪茄茄衣人工发酵过程中叶面微生物区系研究[J]. 生物技术进展, 2016, 6(3):188-192, 230.
- [25] ZHOU J, YU L, ZHANG J, *et al.* Characterization of the core microbiome in tobacco leaves during aging[J/OL]. *Microbiologypopen*, 2020, 9(3): e984 [2019-12-05]. <https://doi.org/10.1002/mbo3.984>.
- [26] 梅涌,姜兴涛,刘辉. 烟叶陈化中的微生物多样性及其对烟叶品质改良的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(20): 3801-3803.
- [27] REID J J, MCKINSTRY D W, HALEY E E. Studies on the fermentation of tobacco I. The microflora of cured and fermenting cigar-leaf tobacco[J]. *Pennsylv. Agric. Exper. Station Bull.*, 1933, 356: 1-17.
- [28] 刘萍,张广民,郑小嘎,等. 烟叶表面微生物及其应用[J]. 微生物学通报, 2003, 30(6):105-110.
- [29] 黄静文,段焰青,者为,等. 短小芽孢杆菌改善烟叶品质的研究[J]. 烟草科技, 2010, 8(277):61-64.
- [30] 郝捷,赵新海,柴颖,等. 地衣芽孢杆菌 LCCC10150 在生产 β -葡聚糖酶和烟叶发酵中的应用:CN110616212A[P]. 2019-12-27.
- [31] 柴颖,陈顺,郝捷,等. 康宁木霉 LCCC30119 在生产纤维素酶和烟叶发酵中的应用:CN110616153A[P]. 2019-12-27.
- [32] 于少藤,毛淑蕊,胡安妥,等. 改善烟叶品质微生物的筛选及其作用效果研究[J]. 南京农业大学学报, 2021, 44(4):766-777.
- [33] ENGLISH C F, BELL E J. Isolation of thermophiles from broadleaf tobacco and effect of pure culture inoculation on cigar aroma and mildness[J]. *Appl. Microbiol. Biot.*, 1967, 15: 117-119.
- [34] WU X, ZHU P, LI D, *et al.* Bioaugmentation of *Bacillus amyloliquefaciens*-*Bacillus kochii* co-cultivation to improve sensory quality of flue-cured tobacco[J]. *Arch. Microbiol.*, 2021, 203(9): 5723-5733.
- [35] PORTER J L, RUSLI R A, OLLIS D L. Directed evolution of enzymes for industrial biocatalysis[J]. *ChemBioChem*, 2016, 17(3): 197-203.
- [36] LI Z, WANG L, YANG G, *et al.* Study on the determination of polyphenols in tobacco by HPLC coupled with ESI-MS after solid-phase extraction[J]. *J. Chromatogr. Sci.*, 2003, 41(1): 36-40.
- [37] YU J, LI L, PANG T, *et al.* Research advancement of tobacco fermentation[J]. Henan Agricultural University, 2006, 40(1): 108-112.
- [38] 丁冉,马宇平,周浩,等. 烟草中蛋白质研究概述[J]. 广州化工, 2014, 42(5):5-8+26.
- [39] 王林,朱金峰,许自成,等. 不同酶制剂对烤烟上部叶化学成分、游离态和糖苷结合态中性香气成分的影响[J]. 生物技术进展, 2015, 5(6):455-460.
- [40] HE B, SHEN X, CHEN X, *et al.* Study on improving the internal quality of tobacco stems by using pectinase[J]. *Agric. Sci. Technol.*, 2013, 14(9): 1299-1321.
- [41] 于建军,马海燕,杨寒文,等. 利用果胶酶降解烟叶中果胶的研究[J]. 江西农业学报, 2009, 21(3):136-138.
- [42] REN X, CHEN G, MA H, *et al.* Research on the effect of cell wall matter components on the tobacco quality[J]. *Chin. Agric. Sci. Bull.*, 2010, 26(4): 113-116.
- [43] 周瑾,李成斌,邓国斌,等. 烤烟叶面微生物产生的纤维素酶对上部烟叶品质改善作用的研究[J]. 烟草科学研究, 2004, (1):62-64.
- [44] 郝捷,王磊,王胜利,等. 一种烟草发酵处理方法及系统:CN110742300A[P]. 2020-02-04.
- [45] 迟广俊,宁伟,徐赫男,等. 制丝在线添加复合生物酶对膨胀烟丝感官质量及适用性的影响[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(2):91-97.
- [46] BAILEY C F, PETRE A W. Progress Report[C]//Philip Morris & Company Ltd., 1937.
- [47] 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(6):84-91.
- [48] 赵铭钦,李芳芳. 微生物和酶学技术在烟草发酵中的应用及展望[J]. 中国农学通报, 2007, 23(1):314-318.
- [49] 夏露,张娟,王远亮,等. 生物技术在烟叶发酵中的应用研究

- 进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(22): 12013-12015.
- [50] 马林. 利用生物技术改变烟草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, (9): 40-42.
- [51] 赵铭钦, 齐伟城, 邱立友, 等. 烟草发酵增质剂对烤烟发酵质量的影响[J]. 河南农业科学, 1998(12): 7-9.
- [52] IZQUIERDO T A, ROS A A, GALAN R C. Bacteria in tobacco fermentation[J]. *TA*, 1958(2): 2146.
- [53] 王金棒, 邱纪青, 汪志波, 等. 生物技术在烟草发酵领域的专利布局现状及热点分析[J]. 烟草科技, 2021, 54(10): 96-112.
- [54] CHOPYK J, CHATTOPADHYAY S, KULKARNI P, *et al.* Temporal variations in cigarette tobacco bacterial community composition and tobacco-specific nitrosamine content are influenced by brand and storage conditions[J/OL]. *Front. Microbiol.*, 2017, 8: 358[2017-03-07]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00358>.
- [55] WELTY R E, VICKROY D G. Evaluations of cigarettes made with mold-damaged and nondamaged flue-cured tobacco[J]. *Beitrag Tabakforschung/Contrib. Tobacco Res.*, 1975, 8(2): 102-106.
- [56] PAULY J L, PASZKIEWICZ G. Cigarette smoke, bacteria, mold, microbial toxins, and chronic lung inflammation[J/OL]. *J. Oncol.*, 2011, 2011: 819129[2011-07-09]. <https://doi.org/10.1155/2011/819129>.
- [57] ROONEY A P, SWEZEY J L, WICKLOW D T, *et al.* Bacterial species diversity in cigarettes linked to an investigation of severe pneumonitis in U.S. military personnel deployed in operation iraqi freedom[J]. *Curr. Microbiol.*, 2005, 51(1): 46-52.
- [58] SAPKOTA A R, BERGER S, VOGEL T M. Human pathogens abundant in the bacterial metagenome of cigarettes[J]. *Environ. Health Persp.*, 2010, 118(3): 351-356.