

微生物发酵烟梗水提物的制备及其 在再造烟叶中的应用

张 勃¹,贾玉红²,端李祥¹,郑 琳¹,吴长伟¹,尹开云¹

(1. 云南瑞升技术(集团)有限公司,云南 昆明 650106; 2. 渝中烟工业公司 长城雪茄烟厂,四川 什邡 618400)

摘要: 为提高烟梗水提物的抽吸品质与可用性,采用从红大烟叶表面分离的 HD4、HD12 菌株对烟梗水提物进行发酵处理。经 GC-MS 检测,与未经处理的烟梗水提物(CK)相比,经微生物处理后的烟梗水提物中香味物质的含量增加,其中,经 HD4、HD12 菌株处理后的烟梗水提物样品中香味物质总相对含量分别增加了 12.3 个百分点和 18.7 个百分点;杂环类物质种类和相对含量均明显增加,HD4 菌株处理后的样品杂环类物质由 6 种增加到 11 种,相对含量由 3.29% 增加到 40.63%;进行再造烟叶涂布后感官评价发现,使用微生物处理烟梗水提物的再造烟叶样品香气丰富性与香气量增加、木质杂气减少、细腻性与甜润感改善,抽吸品质有较大提升,且 HD4 样品的抽吸效果好于 HD12 样品。因此,使用微生物对烟梗水提物进行发酵处理是提高烟梗水提物抽吸品质与可用性的有效方法,且 HD4 菌株的效果较优。

关键词: 烟梗提取物;再造烟叶;微生物;发酵;气质联用

中图分类号: Q939.9 S572 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)03-0056-05

Study on Preparation of Fermented Tobacco Stem Extracts and Application to Reconstituted Tobacco

ZHANG Bo¹, JIA Yu-hong², DUAN Li-xiang¹, ZHENG Lin¹, WU Chang-wei¹, YIN Kai-yun¹

(1. Yunnan Reascend Tobacco Technology (Group) Co., Ltd., Kunming 650106, China;

2. Great Wall Cigar Factory of China Tobacco Chuanyu Industrial Corporation, Shifang 618400, China)

Abstract: Tobacco stem extracts were fermented by bacteria from Hongda tobacco to improve the sensory quality and application effect of the original extract. Analyzed by GC-MS, more flavors compared to the control extract (CK) were tested in the tobacco stem extracts fermented by bacteria, among which the extract samples fermented by HD4 strain and HD12 strain increased the flavors 12.3 percentage points and 18.7 percentage points, respectively. Heterocyclic substances were also raised significantly compared to the control sample. Types of heterocyclic substances were increased from six to eleven, and the proportion was increased from 3.29% to 40.63% in the sample fermented by HD4 strain. Reconstructed tobacco coating experiment showed that the reconstructed tobacco samples dealt with fermented tobacco stem extracts could obtain more aroma types and quantity. Additionally, this method could improve the smooth and sweet sense of tobacco as well as sensory quality. In contrast, the HD4 sample had a better sensory quality than HD12 sample. Overall, this is an effective way to increase the sensory quality and application effect of tobacco stem extracts under the fermentation by bacteria, especially by HD4 strain.

Key words: tobacco stem extracts; reconstructed tobacco; microorganism; fermentation; GC-MS

收稿日期:2011-10-18

作者简介:张 勃(1978-),男,河南郑州人,工程师,硕士,主要从事烟用香精香料的研发。E-mail: zbhyyf@yahoo.com.cn

烟梗是烤烟打叶复烤的副产物,通常在卷烟中作为膨胀梗丝、梗片、颗粒梗等填充料的原料^[1],在再造烟叶中主要提供纤维以及部分涂布用的片基料,普通薄片涂布料中烟梗提取物用量在40%~50%,对烟叶薄片的品质有较大影响^[2-4]。由于烟梗中含有的糖分、蛋白质、果胶、有机酸以及其他一些香味成分与烟叶存在着差异,烟梗提取物直接使用会带来点刺、辛辣、发苦、热辣等抽吸方面的不足,同时木质杂气突出,烟草本香略显单薄^[5-6]。因此,研究烟梗提取物的使用性能进而开发出高档再造烟叶具有极大的应用价值。

微生物用于香料生产的研究已有很多。目前,已经得到应用的产香微生物主要包括生香活性干酵母(生香 ADY)、假丝酵母、乳酸菌、黑曲霉等。这些产香微生物主要应用于酒类、食醋、香料、面包、烟用香料、果汁的生产和加工等^[7-10]。鉴于此,使用红大烟叶表面分离出的菌株,接种至烟梗提取液中进行生物产香,以期为提高烟梗水提物的抽吸品质与可用性提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

再造烟叶及涂布料材料:云南烟梗(昆明卷烟厂)、云南烟末(昆明卷烟厂车间退回)、再造烟叶片基(云南瑞升)。

菌株:HD4、HD12 微生物产香菌株(实验室分离筛选自红大烟叶表面)。

培养基材料:葡萄糖(AR,广东汕头市西陇化工厂);氯化钾(AR,天津市博迪化工有限公司);牛肉膏(BR,北京奥博星生物技术责任有限公司);蛋白胨(BR,上海中科昆虫生物技术开发有限公司)。同时蒸馏萃取材料:无水硫酸钠(AR,广东汕头市西陇化工厂);二氯甲烷(AR,天津市博迪化工有限公司)。

1.2 仪器与设备

SKY-211B 大容量恒温培养摇床(上海苏坤实业有限公司);SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);电热水浴锅(北京泰克仪器有限公司);数显恒温电热套(巩义市予华仪器有限责任公司生产);KDM 型调温电热套(山东鄞城华鲁电热仪器有限公司);同时蒸馏萃取器(自制);BUCHIR-3000 型旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司);6890N/5973N 气相色谱/质谱联用仪(美国 Agilent 公司);电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);超净工作台(昆明金京田科贸有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株的保存与培养 菌株保存于80%的灭菌甘油中, $V_{\text{(菌液)}}:V_{\text{(甘油)}}=1:4$ 。活化时将在80%甘油中保存的菌株在牛肉膏蛋白胨固体培养基中划线培养,待菌落出现后挑取单菌落转接到LB液体培养基中,30℃下振荡培养约24h,至光密度值 $OD_{600}=2.0$ 左右,菌液待用。

1.3.2 烟梗水提物的制备 用电子天平称取烟梗400g,放入5000mL圆底烧瓶中,在圆底烧瓶中加入10倍于烟梗质量的自来水(4000g),用KDM型调温电热套加热,在80~90℃下提取40min,过滤得到烟梗浸提液。一部分浸提液灭菌后通过减压浓缩至膏状,制得烟梗水提物(CK),另一部分浸提液作为生物发酵底物。

对云南烟末采用相同的水提浓缩方法进行叶膏的制备,留作制备再造烟叶涂布料及涂布试验所用。

1.3.3 烟梗水提物的生物发酵处理 烟梗浸提液灭菌后按2%的接菌量加入HD4菌株发酵液,混合均匀,30℃恒温发酵48h。取出发酵液于100℃条件下灭活处理10min,过滤,滤出清液减压浓缩至膏状,制得生物发酵处理烟梗水提物。HD12菌株发酵同以上操作过程。

1.3.4 同时蒸馏萃取 分别将烟梗水提物(CK)和HD4、HD12菌株生物发酵的烟梗水提物25g放入同时蒸馏萃取装置一端的500mL圆底烧瓶中,加入250mL蒸馏水,用电热套加热;装置的另一端为盛25mL二氯甲烷的100mL圆底烧瓶,在60℃下水浴加热,同时蒸馏萃取3h。二氯甲烷萃取液用无水硫酸钠干燥,置于4℃下过夜,过滤,将滤液倒入浓缩瓶中用Vigreux柱浓缩至约1mL,用于GC-MS分析。

1.3.5 GC-MS 分析条件 气相色谱条件:毛细管柱 HP-5MS(30m×0.25mm×0.25μm);进样温度240℃;载气He,1.0mL/min;分流比25:1;进样体积2μL;程序升温,起始温度50℃保持1min,以10℃/min上升到260℃,保持260℃5min。GC-MS接口温度280℃。质谱条件:EI方式,离子源温度230℃,离子化电压70eV,扫描范围35~455amu;扫描速率1.65scan/s。

1.3.6 谱图检索及质谱图的鉴定 采用Wiley、Nist谱图库进行检索,并结合标准质谱图和有关文献确定挥发性成分。用色谱峰面积归一化法测定各挥发性成分的峰面积。

1.3.7 再造烟叶涂布试验 各烟梗水提物样品按

照叶膏：烟梗水提物：基料=45：45：10 的质量比例调配涂布液，并进行片基涂布试验。涂布率为 55%左右，经由 7 人组成的专业评吸小组对涂布效果进行感官评价。

2 结果与分析

2.1 不同处理烟梗水提物的 GC-MS 分析

由表 1 可见，菌株发酵处理前后烟梗水提物的成分发生较大变化，且不同菌株发酵处理后的烟梗水提物成分也存在较大差异。烟梗水提物(CK)样品的香味物质总相对含量为 72.05%，HD4 发酵烟梗水提物和 HD12 发酵烟梗水提物样品的香味物质总相对含量分别为 84.35%、90.73%，分别比 CK 增加了 12.3 个百分点和 18.7 个百分点，可见经过红大菌株发酵处理后的烟梗水提物中香味物质含量有较大提升；从检测出的物质种类来看，以上 3 种样品分别为 44 种、53 种、28 种，其中，HD4 菌株发酵

处理后的样品香味物质种类增加了 9 种。

按香味物质类别分析，检测出的酸类物质有 5 种，对比菌株发酵处理前后的样品，未进行发酵处理的烟梗水提物中酸类物质为多碳酸，HD4 菌株处理后的烟梗水提物中结构更为简单的乙酸则占有较大含量，而 HD12 菌株处理后的烟梗水提物中多碳酸则完全消失。菌株处理后烟梗水提物中杂环类物质含量与种类增多，HD4 菌株处理的样品尤为明显，由未经菌株处理的 6 种(相对含量为 3.29%)增加到 11 种(相对含量为 40.63%)。其中，2,6-二甲基-吡嗪的增加尤为明显，该物质可以带来舒适的烘烤香、坚果香，是构成卷烟香气的重要组成部分。2-乙基-6-甲基-吡嗪、三甲基-吡嗪、2-乙基-6-甲基-吡嗪也有明显增加或新增，这些物质能够丰富与增加烘烤香、坚果香。作为烟草中重要致香成分的杂环类物质增多，能够更加有利于抽吸品质的提升。

表 1 不同处理烟梗水提物的 GC-MS 分析结果

| 保留时间/min | 化合物名称 | 相对含量/% | | |
|----------|------------------|---------------|-----------------|------------------|
| | | 烟梗水提物 (CK) | HD4 发酵 烟梗水提物 | HD12 发酵 烟梗水提物 |
| 2.19 | 乙酸 | — | 16.45 | — |
| 2.32 | 3-甲基-丁醛 | 2.18 | 0.75 | — |
| 2.40 | 2-甲基-丁醛 | 2.22 | 0.30 | — |
| 2.60 | 2-戊酮 | — | 0.38 | — |
| 2.74 | 2-乙基-呋喃 | 0.31 | — | — |
| 2.80 | 2,5-二甲基呋喃 | — | 0.22 | — |
| 2.83 | 3-羟基-2-丁酮 | — | — | 4.84 |
| 3.41 | 3-甲基-2-戊酮 | — | 0.76 | 0.28 |
| 3.78 | 2,3-丁二醇 | 3.36 | 0.34 | 12.00 |
| 4.63 | 甲基-吡嗪 | 0.10 | 0.31 | 0.17 |
| 4.84 | 糠醛 | 16.06 | 1.32 | 0.22 |
| 5.31 | 糠醇 | 3.65 | 1.79 | 0.14 |
| 5.72 | 1-甲氧基-2-丁醇 | — | — | 0.19 |
| 6.03 | 2-环戊烯-1,4-二酮 | 1.55 | 0.69 | — |
| 6.19 | 2-庚酮 | — | 1.09 | 0.08 |
| 6.69 | 2,6-二甲基-吡嗪 | — | 29.04 | 3.10 |
| 6.74 | 4-羟基-丁酸 | 4.00 | — | — |
| 7.37 | 2,6-二甲基苯酚 | 0.16 | — | — |
| 7.73 | 2-吡啶甲醛 | 0.17 | 0.04 | — |
| 7.89 | 5-甲基-2-呋喃甲醇 | 1.28 | 1.20 | 0.23 |
| 8.07 | 苯甲醛 | 1.10 | 1.03 | 0.91 |
| 8.14 | 5-甲基-2-呋喃甲醛 | 2.13 | 0.80 | — |
| 8.22 | 5-甲基-2-庚酮 | — | — | 0.32 |
| 8.97 | 2-戊基-呋喃 | 0.24 | 0.07 | — |
| 9.12 | 2-乙基-6-甲基-吡嗪 | — | 2.02 | — |
| 9.23 | 三甲基-吡嗪 | — | 4.68 | 3.64 |
| 9.37 | 1H-吡咯-2-甲醛 | 0.47 | — | — |
| 9.64 | 2-乙基-6-甲基-吡嗪 | 0.37 | 3.08 | — |
| 9.82 | 乙酰基吡嗪 | — | 0.23 | — |
| 9.93 | 3-甲基-1,2-环戊二酮 | 0.21 | 0.35 | — |
| 10.17 | 苯甲醇 | 0.60 | 0.23 | 0.28 |
| 10.35 | 3,4-二甲基-2,5-呋喃二酮 | 0.37 | — | — |
| 10.48 | 苯乙醛 | 8.21 | 2.08 | 0.94 |
| 10.94 | 1-(1H-吡咯-2-基)-乙醇 | 3.29 | 0.73 | 0.27 |

续表 1 不同处理烟梗水提物的 GC-MS 分析结果

| 保留时间/min | 化合物名称 | 相对含量/% | | |
|----------|-------------------------------|---------------|-----------------|------------------|
| | | 烟梗水提物 (CK) | HD4 发酵 烟梗水提物 | HD12 发酵 烟梗水提物 |
| 11.20 | 4-甲基-苯甲醛 | 0.63 | 0.43 | — |
| 11.50 | 3-乙基-2,5-二甲基-吡嗪 | — | 0.66 | 0.12 |
| 11.60 | 1-(2-呋喃基)-2-羟基乙酮 | 0.27 | — | — |
| 11.73 | 四甲基-吡嗪 | — | 0.22 | 1.68 |
| 11.90 | 2-壬烷酮 | — | 1.11 | — |
| 12.34 | 1-(3-吡啶基)-乙酮 | 0.13 | 0.04 | — |
| 12.44 | 麦芽酚 | 0.76 | — | — |
| 12.51 | 苯乙醇 | 0.44 | 0.41 | 0.21 |
| 12.74 | 1-甲基-1H-吡咯-2-甲醛 | 0.94 | 0.22 | — |
| 12.97 | 苯基丙酮 | — | 4.02 | — |
| 13.34 | 2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-吡喃-4-酮 | 1.92 | — | — |
| 13.89 | 2,3,5-三甲基-6-乙基吡嗪 | — | — | 0.34 |
| 14.19 | 辛酸 | 0.71 | — | — |
| 14.26 | 薄荷醇 | — | 0.20 | 0.07 |
| 15.71 | 5-羟甲基-糠醛 | 0.81 | — | — |
| 16.33 | 苯乙酸 | 0.42 | 0.44 | — |
| 16.88 | 壬酸 | 1.30 | 0.10 | — |
| 17.54 | 1-十三烯 | — | 0.58 | — |
| 17.60 | 2-十一酮 | — | 0.40 | — |
| 18.16 | 2-甲氧基-4-乙烯基苯酚 | 0.46 | 0.24 | 0.09 |
| 19.09 | 烟碱 | 5.28 | 1.33 | 52.32 |
| 19.45 | γ -壬内酯 | — | 0.55 | — |
| 19.54 | 三环烯(三环萜) | 1.74 | 0.28 | — |
| 20.06 | 反式- β -大马酮 | 0.50 | 0.26 | 0.09 |
| 20.38 | 香兰素 | 0.26 | — | — |
| 22.23 | 2-乙基-苯酚 | 0.08 | 0.11 | — |
| 22.58 | 二烯烟碱 | 1.51 | 0.49 | 7.31 |
| 22.74 | 1-十五碳烯 | — | 0.98 | — |
| 22.83 | 2-十三酮 | — | 0.65 | — |
| 23.56 | 2,3-二吡啶 | 0.35 | 0.10 | 0.11 |
| 23.61 | 二氢猕猴桃内酯 | 0.49 | 0.12 | 0.07 |
| 23.87 | 3,4-二氢-4,5,6-三甲基-1(2H)-萘酮 | — | 0.19 | — |
| 24.18 | 巨豆三烯酮 | 0.11 | 0.05 | 0.71 |
| 25.04 | 3-羟基- β -二氢大马酮 | 0.91 | 0.19 | — |

注:“—”为未检出。

2.2 不同处理烟梗水提物的再造烟叶涂布感官评价结果

按 1.3.7 的方法使用烟梗水提物(CK)、HD4 发酵烟梗水提物、HD12 发酵烟梗水提物调配得到 3 种涂布料,并涂布于同种片基上得到再造烟叶样品,分别为对照、HD4 样品和 HD12 样品,经 7 人小组进行感官评价,结果见表 2。由表 2 可见,与对照相比,使用了菌株发酵处理后烟梗水提物的再造烟叶样品,在

香气量、丰富性和杂气方面明显改善,其中木质气的减少尤为突出。在细腻性与甜润感方面有所改善。余味方面变化不大,但处理后的样品略有苦味,个别评价人员反映样品抽吸时略带蛋白气息。2 种菌株发酵处理的样品之间进行感官评价对比,评价人员普遍反映 HD4 样品抽吸效果好于 HD12 样品。尤其是 HD12 样品,涂布抽吸时在余味上有回苦的反映,在甜润感方面也略差于 HD4 样品。

表 2 再造烟叶涂布感官评价结果

| 样品 | 香气量 | 细腻性 | 甜润感 | 浓度 | 杂气 | 刺激性 | 余味 | 综合描述 |
|------|-----|-----|-----------------|-----------------|----|-----------------|-----------------|---------------------------------|
| CK | 有 | 较细腻 | 中等 | 中等 | 略重 | 较大 | 尚适 | 木质气较重,刺激与热辣感较强 |
| HD4 | 尚足 | 尚细腻 | 较强 | 较浓 ⁻ | 较轻 | 略大 ⁻ | 尚适 | 甜润感较强,香气丰富性与香气量增加,木质气轻微,透发性略有降低 |
| HD12 | 尚足 | 尚细腻 | 较强 ⁻ | 较浓 ⁻ | 有 | 略大 ⁻ | 尚适 ⁻ | 甜润感较强,香气丰富性与香气量增加,微有木质杂气,略有回苦 |

注:香气量:足、较足、尚足、有、较少、少;细腻性:细腻、尚细腻、较细腻、较粗糙、粗糙;甜润感:强、较强、中等、较差、差;浓度:浓、较浓、中等、较淡、淡;杂气:无、较轻、有、略重、较重、重;刺激性:无、微有、有、略有、略大、较大、大;余味:舒适、较舒适、尚适、欠适、滞舌。

3 结论与讨论

对比 GC-MS 检测结果来看,处理后的烟梗水提物样品中致香成分含量增加较多,物质种类有改变,这与感官评价结论中香气量与丰富性增加是一致的。木质气的减少可能有 2 个方面的原因,一是致香物质的含量增加,起到了一定的掩盖作用;二是菌株在作用于烟梗水提物的时候,使部分导致木质杂气的物质进行了转化。但处理后的样品在抽吸时,部分评价人员反映有蛋白气息,可能是由于有部分菌体残留于烟梗水提物中所致。需要进一步改进微生物处理烟梗水提物的工艺,以减少菌体带来的蛋白气息。

2 种菌株发酵处理的样品之间进行感官评价对比,评价人员普遍反映 HD4 菌株处理的样品抽吸效果好于 HD12 菌株处理的样品。GC-MS 检测结果也反映出 2 种菌株处理样之间的致香物质种类与含量存在较大差异,说明不同菌株在处理烟梗水提物时的效果有所不同。分析原因,虽然 HD4 菌株发酵处理的样品中香味物质含量略少于 HD12 菌株发酵处理的样品,但首先 HD4 菌株处理样中的香味物质种类多于 HD12 样品,从而导致在香气丰富性方面 HD4 样品要好于 HD12 样品;其次在 HD12 菌株处理样品检测出的物质中,烟碱含量占 52.32%,比例较大。虽然烟碱是烟草中的一种重要物质,但其作用更多的是体现在烟气的满足感方面,如果去掉烟碱所占的含量部分,HD12 菌株处理样中的香味物质含量要少于 HD4 菌株处理样品,从而导致在香气量方面 HD4 样品要好于 HD12 样品。因此,在对烟梗水提物进行微生物发酵处理时,菌株的选择也非常重要。

本研究结果表明,使用微生物发酵处理烟梗水提物,能够增加烟梗水提物中的致香物质含量,感官

抽吸效果也有所改善,尤其在增加香气和掩盖减少木质杂气方面具有较好的效果。说明微生物发酵处理烟梗水提物,是提高烟梗水提物的抽吸品质与可用性的一条有效方法。同时经过本试验的对比分析发现,同样是在红大烟叶表面分离出来的菌株,在进行发酵处理烟梗水提物的时候,虽然 2 种菌株都能够达到较好的处理效果,但 HD4 菌株的处理效果要略好于 HD12 菌株。

参考文献:

- [1] 王月侠,葛善礼,贾涛,等. 烟梗化学组分的分析[J]. 烟草科技,1996(3):16-17.
- [2] 李炎强,胡有持,王昇,等. 烤烟叶片与烟梗挥发性半挥发性酸性成分的研究[J]. 中国烟草学报,2001,7(1):1-5.
- [3] 李炎强,冼可发. 烤烟烟梗和叶片中性香味成分的分析[J]. 烟草科技,2002(11):3-11.
- [4] 彭黎明. 烤烟烟梗中某些香味成分的分析[C]//中国烟草学会. 中国烟草学会 2006 年学术年会论文集,2006.
- [5] 韩少卿,赵芹,彭奇均. 膜分离技术提取海藻糖的工艺[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(2):93-96.
- [6] 高扬,王双飞. 木质素的生物降解及酶的作用[J]. 纸和造纸,1996,3(2):51-52.
- [7] 段继铭,曾晓鹰,刘煜宇,等. 葡萄果渣发酵烟用香料的制备及挥发性成分分析[J]. 精细化工,2009(8):781-784.
- [8] 李雪梅,徐若飞,杨黎华,等. 利用香荚兰内生菌制备天然复合香味料及其在卷烟中的应用研究[C]//中国烟草学会. 中国烟草学会 2006 年学术年会论文集,2006.
- [9] 杨黎华,李祖红,陈东,等. 香茅草产香内生真菌的筛选及香气成分分析[J]. 生物技术,2006,16(5):53-56.
- [10] 张玲琪,孙晓鹏. 对鸢尾新鲜根状茎发酵生香的微生物研究[J]. 云南大学学报:自然科学版,1997(4):362-365.