

微生物休止细胞发酵制备烟草浸膏 及其在卷烟中的应用

吴长伟¹, 杨清², 杨蕾², 端李祥¹, 刘煜宇¹, 李仙¹, 李勇²

(1. 云南瑞升烟草技术(集团)有限公司, 云南 昆明 650106; 2. 红云红河烟草(集团)有限责任公司, 云南 昆明 650202)

摘要: 为改善烟草浸膏的抽吸品质, 采用从红大烟叶表面分离的 HD4 产香菌株对烟叶碎片水提物进行发酵处理。经气质联用(GC-MS)检测, 与未经发酵处理的烟叶浸膏(CK)相比, HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏的致香成分种类分别增加了 5 种和减少了 8 种, 但致香成分含量则分别增加了 28.76% 和 59.18%; 3-羟基-2-丁酮、茄酮、 β -大马酮等 7 种主要酮类物质的含量分别增加了 3.89 倍和 6.88 倍。在红大烟叶(X2L)上的添加试验表明, 与添加未经发酵处理的烟叶浸膏(CK)相比, 添加 HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏的烟叶样品, 其香气量、丰富性、细腻性和甜润感均有明显改善, 其中添加 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏样品的抽吸效果好于添加 HD4 发酵烟叶浸膏的样品。烟叶浸膏(CK)、HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏和 HD4 发酵烟叶浸膏在红大烟丝上的最佳添加量分别为 0.04%、0.03% 和 0.04%。

关键词: 烟叶碎片; 烟叶浸膏; 微生物; 休止细胞; 气质联用

中图分类号: Q815 TS452 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)01-0155-05

Preparation of Tobacco Extracts by Resting Cell Fermentation and its Application in Cigarettes

WU Chang-wei¹, YANG Qing², YANG Lei², DUAN Li-xiang¹, LIU Yu-yu¹, LI Xian¹, LI Yong²

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

2. Hongyun Honghe Tobacco(Group) Co., Ltd., Kunming 650202, China)

Abstract: Extracts from tobacco leaf fragments were fermented by bacteria from Hongda tobacco to improve the sensory quality. Analyzed by GC-MS, the components of the two extracts fermented by HD4 strain and HD4 resting cells increased 5 kinds and decreased 8 kinds, respectively, compared to the control extract (CK), while their contents of the flavors increased 28.76% and 59.18%, and seven kinds of ketone substances increased 389% and 688%. By addition of fermented and unfermented extracts, the results showed that the Hongda tobacco (X2L) samples dealt with fermented extracts of tobacco leaf fragments could obtain more aroma types, sweet sense and content. The extract fermented by HD4 resting cells had a better effect on the sensory quality than the other two extracts, with the optimum content of 0.03%, while the optimum content of the control extract and the extract fermented by HD4 strain were both 0.04%.

Key words: tobacco leaf fragments; microorganism; resting cells; GC-MS

烟叶碎片是卷烟生产中产生的大宗副产品之一, 这些副产品的化学成分与干烟叶几乎完全相同^[1], 通常用来为再造烟叶提供纤维和片基料^[2-4]。

利用烟叶碎片制备的烟草浸膏可以增加烟草本香, 在卷烟工业中被广泛应用。因此, 合理利用烟叶碎片, 开发出高品质的烟草浸膏可产生巨大的经济效

收稿日期: 2012-09-10

基金项目: 云南中烟工业公司科技计划项目(2012JC08)

作者简介: 吴长伟(1984-), 男, 河南项城人, 工程师, 硕士, 主要从事烟用香精香料的研发。E-mail: wucw1984@sina.com

益和良好的社会效益^[5-7]。

微生物发酵产香技术已被广泛研究和应用^[8],目前,大多将产香微生物直接接种到物料中进行生物发酵产香,但该方法的生物代谢途径相对复杂,发酵过程不易控制,致香物质的转化率不高^[9-10]。而微生物休止细胞发酵技术具有反应专一性强、底物转化率高、不易染杂菌、产物对菌体生长的抑制作用较小等特点,发酵产物得率高,可以部分实现物质的定向转化,且发酵过程易于控制^[11]。鉴于此,利用从优质红大烟叶表面分离得到的 HD4 菌株,采用微生物休止细胞发酵技术对烟叶碎片水提物进行生物发酵产香,以期开发出抽吸品质较好的烟草浸膏。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

供试材料:红大烟叶碎片、红大烟叶(X2L)(红云红河集团);HD4 产香菌株(实验室分离筛选自红大烟叶表面)。

供试试剂: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)、无水 Na_3PO_4 (AR,广东汕头市西陇化工厂)、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)、KDM 型调温电热套(山东鄄城华鲁电热仪器有限公司)、同时蒸馏提取器(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)。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株的保存与培养 HD4 菌株保存于 80% 的灭菌甘油中, $V_{\text{菌液}} : V_{\text{甘油}} = 1 : 4$ 。活化时将保存的菌株在 LB 固体培养基中划线培养,挑取单菌落转接到 LB 液体培养基中,30℃ 下培养。

1.3.2 休止细胞的制备 将 HD4 接种到液体 LB 培养基中,30℃ 下振荡培养约 24 h 至光密度值达 2.0。菌液于 8 000 r/min、4℃ 条件下离心 10 min,收集菌体,然后用 50 mmol/L 的磷酸钠缓冲液(pH 值为 7.0)洗涤 3 次。菌体于 100 mL 的 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 值为 7.0)中重悬,此悬浮细胞即为 HD4 菌株的休止细胞。

1.3.3 烟叶碎片水提物的制备 称取烟叶碎片

400 g,放入 5 L 圆底烧瓶中,在圆底烧瓶中加入 10 倍于碎片质量的自来水(4 kg),用 KMD 型调温电热套加热,在 80~90℃ 下提取 1 h,过滤,滤液灭菌后即烟叶碎片水提物,将其减压浓缩至膏状,制得烟叶浸膏(CK)。

1.3.4 HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏的制备 按照 1.3.3 制备烟叶碎片水提物,灭菌后分别按 2%、1% (V/V) 的接种量加入 HD4 菌株发酵液和 HD4 菌株的休止细胞,光密度值(OD_{600})均为 2.0,30℃ 恒温发酵 12 h。发酵液于 100℃ 条件下灭活处理 10 min,过滤,滤出液减压浓缩至膏状,分别制得 HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏。

1.3.5 同时蒸馏萃取 分别将烟叶浸膏(CK)、HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏各 25 g 放入同时蒸馏萃取装置一端的 500 mL 圆底烧瓶中,加入 250 mL 蒸馏水,装置的另一端为盛有 25 mL 二氯甲烷的 100 mL 圆底烧瓶,在 60℃ 下水浴加热,同时蒸馏萃取 3 h。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 1 mL,用于 GC-MS 分析。

1.3.6 GC-MS 分析条件 气相色谱条件:毛细管柱 HP-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm),进样温度 240℃,载气 He,流速 1.0 mL/min,分流比 25:1,进样量 2 μL ,升温程序为起始温度 50℃ 保持 1 min,以 10℃/min 上升到 260℃,保持 5 min,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 70 eV,扫描范围 35~455 amu,扫描速率 1.65 scan/s。

1.3.7 谱图检索及质谱图的鉴定 采用 Wiley、Nist 谱图库进行检索,并结合标准质谱图确定挥发性成分。

1.3.8 不同处理烟叶浸膏在烟丝上的应用试验 将烟叶浸膏(CK)、HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏分别按照 0.02%、0.03%、0.04% 的添加量在红大烟丝(X2L)上进行添加试验。烟丝加样后制成烟支,在温度 22℃、湿度 60% 的恒温恒湿箱中平衡 12 h,经由 7 人组成的专业评吸小组对添加效果进行感官评价。

2 结果与分析

2.1 不同处理烟叶浸膏的香气成分分析

由表 1 可知,与 CK 相比,发酵处理烟叶浸膏的致香成分含量发生变化。烟叶浸膏(CK)、HD4 发酵烟叶

浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏的致香物质含量分别为 87.47、112.63、139.24 $\mu\text{g/g}$, 后两者较 CK 分别增加了 28.76% 和 59.18%。3 种烟叶浸膏检测出的物质成分分别为 51、56、43 种。与 CK 相比, HD4 发酵烟叶浸膏的致香成分种类增加了 5 种, 其中新增的 9 种成分主要是 3-甲基-2-丁烯醛、2,3-丁二醇、2-吡啶甲醛、 β -紫罗兰酮、胡薄荷酮等羰基化合物, 消失的 4 种成分主要是 3-甲基-1-丁醇等醇类物质; HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏的致香成分种类减少了 8 种, 其中新增的 6 种成分主要是 2,3-丁二醇、2-甲基-3-戊醇、 β -紫罗兰酮、十四醛等, 消失的 14 种成分主要是 3-甲基-1-丁醇、面包酮、丁内酯、苯甲醛、1-(3-吡啶基)-乙酮、去氢去甲基烟碱、香叶基丙酮、金合

欢基丙酮等。

按香味物质类别分析, 与 CK 相比, HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏中酮醛类及有机酸酯类物质的种类有明显变化, 含量也有较大幅度的提升, 尤其是酮类物质增幅尤为明显, 主要有 3-羟基-2-丁酮、茄酮、 β -大马酮、 β -二氢大马酮、 β -紫罗兰酮、金合欢基丙酮 A、茄那士酮, 7 种酮类物质总含量较 CK 分别增加了 3.89 倍和 6.88 倍。该类物质是烟草中主要的香味物质, 可以赋予卷烟木香、花香和果香香味, 有利于烤烟抽吸品质的提升。属于大分子有机酸的棕榈酸含量也有大幅提升, 较 CK 分别增加了 5.86 倍和 10.32 倍, 该物质具有平衡烟气酸碱度, 降低卷烟刺激性的作用。

表 1 不同处理烟叶浸膏的 GC-MS 分析结果

保留时间/ min	化合物名称	化合物含量/($\mu\text{g/g}$)		
		烟叶浸膏(CK)	HD4 发酵 烟叶浸膏	HD4 休止细胞 发酵烟叶浸膏
2.45	1-戊烯-3-酮	0.164	0.263	0.866
2.63	3-羟基-2-丁酮	0.114	2.028	3.023
2.85	3-甲基-1-丁醇	0.072	—	—
3.01	吡啶	0.270	0.260	—
3.44	3-甲基-2-丁烯醛	—	0.024	—
3.46	2,3-丁二醇	—	7.869	9.869
3.67	2-甲基-3-戊醇	—	0.290	1.290
3.74	面包酮	0.279	0.106	—
4.11	糠醛	0.298	2.017	4.017
4.30	1-(2-丙烯基氧基)-2-丙醇	1.780	—	—
4.43	糠醇	0.282	0.976	1.928
4.93	2-环戊烯-1,4-二酮	0.194	0.458	0.683
5.39	1-(2-呋喃基)-乙酮	0.279	0.329	0.369
5.43	丁内酯	0.062	0.098	—
6.08	2-吡啶甲醛	—	0.062	0.060
6.14	5-甲基-2-呋喃甲醇	0.172	0.537	0.517
6.31	苯甲醛	0.006	0.069	—
6.33	5-甲基糠醛	0.055	0.067	0.062
6.88	1-(2-甲氧基-1-甲基乙氧基)异丙醇	1.531	—	—
7.00	4-吡啶甲醛	—	0.064	0.064
7.65	苯甲醇	0.215	0.563	0.533
7.87	苯乙醛	0.376	0.620	0.660
8.14	1-(1H-吡咯-2-基)-乙酮	0.051	0.146	0.158
9.07	1-(3-吡啶基)-乙酮	0.439	0.092	—
9.24	苯乙醇	0.144	0.271	0.285
9.78	2-乙酰基-1,4,5,6-四氢吡啶	0.212	0.208	0.228
9.90	2,6-壬二烯醛	—	0.031	—
10.06	1-[1-甲基-2-(2-丙烯基)乙氧基]异丙醇	8.462	—	—
10.70	苯并[b]噻吩	0.040	0.035	0.036
10.81	藏花醛	0.041	0.051	0.054
11.19	胡薄荷酮	—	0.010	—
11.64	2,3-二氢苯并呋喃	0.163	0.191	0.161
12.64	吡嗪	0.125	0.207	0.107
12.97	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	0.234	0.883	0.283
13.64	茄酮	0.718	1.882	2.872

续表 1 不同处理烟叶浸膏的 GC-MS 分析结果

保留时间/ min	化合物名称	化合物含量/($\mu\text{g/g}$)		
		烟叶浸膏(CK)	HD4 发酵 烟叶浸膏	HD4 休止细胞 发酵烟叶浸膏
14.00	β -大马酮	0.383	2.779	5.796
14.49	β -二氢大马酮	0.290	1.222	4.222
14.63	去氢去甲基烟碱	0.818	0.172	—
14.99	香叶基丙酮	0.038	0.088	—
15.65	β -紫罗兰酮	—	1.301	1.321
16.59	2,3'-联吡啶	0.171	0.423	0.123
16.69	二氢猕猴桃内酯	0.164	0.569	2.569
17.26	巨豆三烯酮 A	0.451	0.298	0.258
17.60	巨豆三烯酮 B	3.073	1.232	3.232
18.30	巨豆三烯酮 C	0.493	0.895	0.695
18.53	巨豆三烯酮 D	2.588	1.594	4.594
18.85	3-氧代- α -紫罗兰醇	0.051	0.246	1.246
19.84	十四醛	—	0.162	0.762
21.61	茄那土酮	0.056	1.123	2.123
22.00	新植二烯	37.716	43.306	53.306
22.49	邻苯二甲酸二丁酯	0.978	0.698	1.698
23.18	金合欢基丙酮 A	0.895	1.685	—
23.24	棕榈酸甲酯	0.526	0.803	—
23.71	棕榈酸	0.897	6.155	10.155
24.27	棕榈酸乙酯	1.539	1.625	1.025
25.07	寸拜醇	2.967	3.075	2.875
25.45	亚麻酸甲酯	13.128	13.317	6.415
25.72	植醇	1.560	5.278	5.578
27.31	西柏三烯二醇	1.102	3.621	3.121
28.77	金合欢基丙酮 B	0.810	0.253	—

注：“—”为未检出；挥发性成分的结果不包含烟碱含量。

2.2 添加不同处理烟叶浸膏烟丝的感官评价结果

由表 2 可知,与添加烟叶浸膏(CK)相比,添加 HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏的卷烟样品在香气量、丰富性、甜润感和细腻性上均有明显改善。其中,添加 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏的卷烟样品整体抽吸效果好于添加 HD4 发酵烟叶浸膏的样品,尤其是在甜润感和舒适性等方面,但在浓度和丰富性方面略差于添加 HD4 发酵烟叶浸膏的样品。

就单一样品不同添加量间分别进行比较,未经微

生物发酵处理的烟叶浸膏(CK)在红大烟叶上添加量为 0.04%时效果最好,甜润感和丰富性改善明显;添加 0.04% HD4 发酵烟叶浸膏的红大烟叶在甜润感、细腻性和丰富性方面的表现优于 0.02%和 0.03%的添加量;添加 0.03%HD4 休止细胞发酵浸膏的红大烟叶在甜润感、细腻性、香气量和舒适度方面提升最为明显。烟叶浸膏(CK)、HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏在红大烟叶(X2L)上的最佳添加量分别为 0.04%、0.04%和 0.03%。

表 2 添加不同处理烟叶浸膏烟丝(红大烟叶)的感官评价结果

样烟添加成分	添加量	香气量	细腻性	甜润感	浓度	杂气	刺激性	余味	综合描述
烟叶浸膏(CK)	0.02%	较少	较粗糙	较差	较淡	略重	较大	尚适	香气弱,刺激大,甜润感一般
	0.03%	有	较粗糙	中等	中等	略重	较大	尚适	浓度提升,甜感较好,略有刺激
	0.04%	有	较细腻	较强	中等	有	略大	尚适	丰富性、甜润感提升,尚干净
HD4 发酵烟叶浸膏	0.02%	有	较细腻	中等	中等	有	略大	尚适	甜润感、丰富性增加,略有残留
	0.03%	尚足	较细腻	中等	中等	较轻	略有	尚适	甜润感、香气质感增加
	0.04%	尚足	较细腻	较强	中等	较轻	略有	尚适	甜润感、细腻性、丰富性增加
HD4 休止细胞发酵 烟叶浸膏	0.02%	尚足	较细腻	中等	较浓	较轻	略有	尚适	甜润感提升,香气量增加,略有刺激
	0.03%	较足	细腻	较强	较浓	较轻	略有	舒适	甜润感、细腻性和舒适度提升, 香气量增加,烟气骨架感好
	0.04%	较足	尚细腻	较强	较浓	较轻	略有	尚适	甜润感、细腻性提升,稍焦

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、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

由 GC-MS 检测结果可知,与 CK 相比,经 HD4 和 HD4 休止细胞发酵处理的烟叶浸膏的致香物质种类和含量均产生变化。HD4 休止细胞发酵处理的烟叶浸膏致香物质成分比 HD4 发酵处理的少了 13 种,但总含量则有 23.6% 的增长,其中,在香气中起重要作用的酮类和大分子有机酸含量增幅较大。分析原因有二:(1)HD4 直接发酵的代谢途径较 HD4 休止细胞发酵复杂,造成 HD4 发酵烟叶浸膏的致香物质种类较 CK 和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏有所增加;(2)与 HD4 直接发酵相比,HD4 休止细胞发酵作用的底物专一、代谢途径简单、底物转化率高,用该技术处理得到的样品致香物质的种类相对简单,但代谢产物的产量有明显增加。

将烟叶浸膏(CK)、HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏分别按 0.02%、0.03% 和 0.04% 的量在红大烟叶(X2L)上进行添加试验,感官评价结果表明,添加 HD4 发酵烟叶浸膏和 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏的烟叶样品香气量、丰富性、细腻性、甜润感较添加烟叶浸膏(CK)处理的烟叶样品均有改善。就单一烟草浸膏样品而言,其在红大烟叶(X2L)上的最佳添加量分别是:烟叶浸膏(CK)为 0.04%,HD4 发酵烟叶浸膏为 0.04%,HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏为 0.03%。但添加 HD4 休止细胞发酵烟叶浸膏的样品整体抽吸效果好于添加 HD4 发酵烟叶浸膏的样品。

参考文献:

- [1] 王娜,程书锋,庞登红,等.产香菌处理烟叶碎片制备特色烟草浸膏的工艺研究[J].香料香精化妆品,2010(2):4-9.
- [2] 张勃,贾玉红,端李祥,等.微生物发酵烟梗水提物的制备及其在再造烟叶中的应用[J].河南农业科学,2012,41(3):56-60.
- [3] 吕品,李丹,黄龙,等.烟叶产香菌的分离及其在烟用香料制备中的应用[J].烟草化学,2009(1):37-42.
- [4] 张杰,宗永立,周会舜,等.一些醛酮类香料在卷烟烟丝和滤嘴中的转移行为[J].烟草化学,2011(7):60-63.
- [5] 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.
- [6] 常剑波,祁春苗,李致新.微生物有机肥对烤后烟叶化学成分和致香物质含量的影响试验[J].现代农业科技,2011(2):60-61.
- [7] 杨永锋,陈红丽,刘国顺,等.烤烟烟叶化学成分与烟气烟碱的相关性研究[J].河南农业大学学报,2008(3):259-262.
- [8] 赵达,刘伟成,裘季燕,等.枯草芽孢杆菌 B03 液体发酵条件的优化[J].华北农学报,2008,23(2):205-209.
- [9] 刘小崔,石金波,赵思明.食品用微生物发酵剂研究进展[J].山西农业科学,2011,39(12):1332-1333.
- [10] 但汉斌,魏雪生.苏云金芽孢杆菌的发酵生物学研究初报[J].天津农业科学,1996,2(1):28-31.
- [11] 张莉,李文,肖正华,等.*Citrobacter freundii* 休止细胞催化合成 L-多巴[J].微生物学通报,2003(2):45-48.

(上接第 151 页)

参考文献:

- [1] 卫生部药典委员会.中华人民共和国药典一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:201.
- [2] 苏艳芳,刘建生.金胆草黄酮类成分的研究[J].中草药,2001,32(6):496-497.
- [3] 严希康.生化分离工程[M].北京:化学工业出版社,2004:44-46.
- [4] Perry D, Haaland. Experimental design in biotechnolo-

gy[M]. New York and Basel: Marcel Dekker, Inc., 1989:1-18.

- [5] 董运贤.野生金胆草的人工栽培技术[J].中国中药杂志,2003,28(10):977-978.
- [6] 李令媛,王素英.金胆草各部位皂苷的含量测定[J].成都医药,1980(6):25.
- [7] 苏艳芳,杨凤英.金胆草总皂苷的制备方法及其应用:中国,CN1957962[P].2007-05-09.
- [8] 王瑞,李文艳.金胆草药材质量标准研究[J].中药材,2010,33(6):884-886.