

## 研究报告

## 耐高温亚硝酸盐降解菌的分离、鉴定及降低雪茄烟叶亚硝胺的应用

王光路<sup>1</sup>, 卢玉松<sup>1</sup>, 刘兰茜<sup>1</sup>, 贾玉红<sup>2</sup>, 李鹏<sup>3</sup>, 胡希<sup>\*2</sup>, 杨雪鹏<sup>\*1</sup>

1 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001

2 四川中烟工业有限责任公司长城雪茄厂, 四川 什邡 618000

3 中国烟草总公司郑州烟草研究院, 河南 郑州 450001

王光路, 卢玉松, 刘兰茜, 贾玉红, 李鹏, 胡希, 杨雪鹏. 耐高温亚硝酸盐降解菌的分离、鉴定及降低雪茄烟叶亚硝胺的应用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3970-3982.

WANG Guanglu, LU Yusong, LIU Lanxi, JIA Yuhong, LI Peng, HU Xi, YANG Xuepeng. Heat-tolerant nitrite-degrading bacterial strains: isolation, identification, and applications in reducing nitrosamines in cigar tobacco leaves[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3970-3982.

**摘要:**【背景】烟草特有亚硝胺(tobacco-specific nitrosamines, TSNA)是烟草于调制和发酵阶段产生的一类致癌物质, 由烟草生物碱与氮氧化物发生亚硝化反应生成, 生物碱和亚硝酸盐是 TSNA 的直接前体物质。【目的】发掘适用雪茄高温发酵且显著降低 TSNA 形成与积累的微生物。【方法】以 TSNA 前体物质亚硝酸盐的高效降解为目标, 对从雪茄烟叶分离得到的烟草源微生物菌株进行高温培养、亚硝酸盐降解及亚硝酸盐耐受能力研究, 得到可于 50 °C 高效降解亚硝酸盐及耐受高浓度亚硝酸盐的微生物菌株, 将菌株应用于雪茄烟叶高温发酵 35 d, 对发酵前后亚硝酸盐、TSNA、常规化学成分和中性香味成分含量进行测定, 分析菌株在雪茄烟叶发酵中对 TSNA 含量及烟叶品质的影响。【结果】获得了 3 株于 50 °C 高效降解亚硝酸盐的菌株 NY7、NY8 和 NY9, 分别鉴定为莫海威芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*) NY7、耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*) NY8 和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) NY9, 其中 *B. halotolerans* NY8 亚硝酸盐降解能力最为显著。添加了菌株 NY8 的雪茄烟叶发酵过程中亚硝酸盐和 TSNA 含量均显著降低, 亚硝酸盐含量减少 96.86%, TSNA 总量减少 67.14%, 烟碱的下降幅度明显高于空白组。中性香味成分总量(除新植二烯外)略有升高。【结论】该菌株适用于雪茄烟叶高温发酵, 并高效降解亚硝酸盐, 有效减少 TSNA 的形成和积累, 对雪茄烟叶减害具有重要的科学价值和应用潜力。

**关键词:** 雪茄烟叶; 菌株筛选; 高温发酵; 亚硝酸盐降解; 烟草特有亚硝胺

资助项目: 国家烟草总公司重点研发项目(110202102020, 110202202006)

This work was supported by the Key Research and Development Program of National Tobacco Corporation (110202102020, 110202202006).

\*Corresponding authors. E-mail: HU Xi, xj\_huxi@cytobacco.com; YANG Xuepeng, yangxuepeng@zzuli.edu.cn

Received: 2023-01-08; Accepted: 2023-03-11; Published online: 2023-04-10

# Heat-tolerant nitrite-degrading bacterial strains: isolation, identification, and applications in reducing nitrosamines in cigar tobacco leaves

WANG Guanglu<sup>1</sup>, LU Yusong<sup>1</sup>, LIU Lanxi<sup>1</sup>, JIA Yuhong<sup>2</sup>, LI Peng<sup>3</sup>, HU Xi<sup>\*2</sup>, YANG Xuepeng<sup>\*1</sup>

1 College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, Henan, China

2 The Great Wall Cigar Factory, China Tobacco Sichuan Industrial Limited Company, Shifang 618000, Sichuan, China

3 Zhengzhou Tobacco Research Institute of China National Tobacco Corporation, Zhengzhou 450001, Henan, China

**Abstract: [Background]** Tobacco-specific nitrosamines (TSNAs) are produced by the nitrosation of tobacco alkaloids with nitrogen oxides during the processing of tobacco, especially during the modulation and fermentation stages. **[Objective]** To mine the microorganisms that can tolerate high-temperature fermentation of cigar tobacco leaves and reduce the accumulation of TSNAs. **[Methods]** We examined the high-temperature tolerance, nitrite degradation, and nitrite tolerance of the bacterial strains derived from cigar tobacco leaves that could efficiently degrade nitrite and tolerate high concentrations of nitrite at 50 °C. A efficient strain was then selected and used for a 35-day high-temperature fermentation of cigar tobacco leaves. We determined the levels of nitrite, TSNAs, conventional chemical components, and neutral aromatic components before and after fermentation to analyze the effects of the strain on TSNAs and tobacco quality during the fermentation process. **[Results]** Three bacterial strains capable of degrading nitrite at 50 °C were isolated and identified, which were *Bacillus mojavensis* NY7, *B. halotolerans* NY8, and *B. subtilis* NY9. Among them, *B. halotolerans* NY8 exhibited the strongest nitrite-degrading capacity. The high-temperature fermentation of cigar tobacco leaves with NY8 reduced nitrite by 96.86% and TSNAs by 67.14%. Moreover, the nicotine reduction caused by the inoculation of NY8 was significantly higher than that of the control group, and the total neutral aromatic components (except neophytadiene) were slightly increased. **[Conclusion]** The isolated strains are suitable for high-temperature fermentation of cigar tobacco leaves and demonstrate high efficiency in degrading nitrite and reducing the accumulation of TSNAs. The findings provide inspiration for reducing the harm of cigar tobacco leaves.

**Keywords:** cigar tobacco leaves; screening of microorganisms; high-temperature fermentation; degradation of nitrite; tobacco-specific nitrosamines

烟草特有亚硝胺(tobacco-specific nitrosamines, TSNAs)是烟草中特有的致癌物质<sup>[1]</sup>, 其中, N-亚硝基降烟碱(N-nitrosonornicotine, NNN)、4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮[4-(nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone,

NNK]、N-亚硝基新烟碱(N-nitrosoanatabine, NAT)和 N-亚硝基假木贼碱(N-nitrosoanabasine, NAB)是烟草和烟气中主要的 TSNAs<sup>[2]</sup>。已有大量研究表明, TSNAs 含量与硝酸盐、亚硝酸盐和烟碱含量呈不同程度的正相关关系<sup>[3-5]</sup>, 其中

TSNAs 含量与亚硝酸盐含量呈极显著正相关关系<sup>[6-7]</sup>。目前普遍认为 TSNAs 由亚硝酸盐及亚硝酸盐分解产生的氮氧化物(NO、NO<sub>2</sub>和 N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)与烟草生物碱发生亚硝化反应产生<sup>[8]</sup>。

以前国内外多采用添加剂<sup>[9]</sup>、生物减害<sup>[10]</sup>、物理减害<sup>[11-13]</sup>、农艺<sup>[14]</sup>及烟叶调制<sup>[15]</sup>等多种技术对烟草特有亚硝胺开展减害研究,取得较好效果。随着微生物在烟草中的应用日益成熟<sup>[16-18]</sup>,采用微生物降低烟叶中 TSNAs 含量逐渐受到关注。祝明亮等<sup>[19]</sup>从白肋烟中筛选得到 6 株内生菌,接种菌株 35 °C 处理 7 d 后白肋烟中 TSNAs 含量最多降低了 99.88%;孙政<sup>[20]</sup>将从烟叶和土壤中分离纯化的 2 株恶臭假单胞菌接种于烤烟烟叶表面 28 °C 发酵 21 d 后发现,烟叶中 NNN 和 NNK 含量分别下降了 56.48%和 57.83%;单宏英等<sup>[21]</sup>筛选出了硝酸盐和亚硝酸盐转化能力强的菌株 AS97, 30 °C 发酵 10 d 能够显著降低烟丝硝酸盐、亚硝酸盐和 TSNAs 含量。

上述微生物降低烟叶 TSNAs 均来源于烤烟和白肋烟,目前未见雪茄烟叶中反硝化细菌的报道,且筛选得到的菌株多为常温发酵条件,难以适用雪茄烟叶高温发酵条件。相较于烤烟和白肋烟,雪茄烟叶烟碱及其他含氮化合物的含量更高,发酵在高温高湿条件下进行,导致微生物大量积累,使得硝酸盐还原为亚硝酸盐反应活跃<sup>[22-23]</sup>,高温使得亚硝酸盐进一步分解产生气态氮氧化物<sup>[24]</sup>,亚硝酸盐和氮氧化物与烟草生物碱发生亚硝化反应,最终导致雪茄烟叶更容易产生 TSNAs。因此,筛选雪茄烟叶中耐高温亚硝酸盐降解菌并将其应用于雪茄烟叶高温发酵,对于降低雪茄烟叶中 TSNAs 形成具有重要意义。本研究对雪茄烟叶中微生物进行耐高温亚硝酸盐降解菌的筛选、鉴定,对筛选的菌株开展亚硝酸盐降解及耐受能力研究,将降解能力优异的菌株应用于雪茄烟叶高温发酵

以达到有效降低 TSNAs 形成与积累的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

供试烟叶:晾晒后雪茄烟叶,海南建恒哈瓦那昌江分公司。

#### 1.1.2 培养基

TSB 液体培养基(g/L):胰酪蛋白胨 17.0,大豆蛋白胨 3.0,葡萄糖 2.5, NaCl 5.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5, 121 °C 灭菌 30 min。

TSB 固体培养基(g/L):每 100 mL TSB 液体培养基加入 2 g 琼脂粉, 121 °C 灭菌 30 min。

亚硝酸钠唯一氮源培养基(g/L):K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13.3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.0, 亚硝酸钠 0.10, 葡萄糖 10.0, MnSO<sub>4</sub> 0.021 8, CaCl<sub>2</sub> 0.015 1, FeSO<sub>4</sub> 0.010 9, 121 °C 灭菌 30 min。

亚硝酸盐发酵培养基(g/L):K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13.3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.0, 酵母浸粉 5.0, 亚硝酸钠 0.10, 葡萄糖 10.0, MnSO<sub>4</sub> 0.021 8, CaCl<sub>2</sub> 0.015 1, FeSO<sub>4</sub> 0.010 9, 121 °C 灭菌 30 min。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

亚硝酸钠,天津市大茂化学试剂厂;对氨基苯磺酸和盐酸萘乙二胺,阿拉丁试剂有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。

紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;光学显微镜,徕卡仪器有限公司;PCR 仪,上海塞默生物科技有限公司;连续流动分析仪,布朗卢比公司;气相色谱质谱联用仪,Agilent 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 雪茄烟叶共栖微生物的初筛

将 5.0 g 雪茄烟叶剪碎后置于含有 200 mL 0.9% (质量体积分数)无菌生理盐水的三角瓶

中, 37 °C、200 r/min 振荡 30 min 后加入转子放置于磁力搅拌器上搅拌 30 min, 获得微生物菌悬液。将菌悬液于 5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体沉淀, 用无菌生理盐水重悬微生物菌体。取 1 mL 重悬液接种至 100 mL 无菌 TSB 液体培养基, 于 37 °C、200 r/min 振荡培养 12–15 h。扩大培养后的菌液经梯度稀释( $10^{-1}$ – $10^{-7}$ )后涂布于 TSB 固体平板, 37 °C 培养 8–12 h, 待长出单菌落后进行划线培养获得初筛微生物菌株。

### 1.2.2 耐高温亚硝酸盐降解菌的复筛

挑取单菌落接种于 100 mL 亚硝酸钠唯一氮源培养基, 50 °C、200 r/min 培养 36 h, 观察菌株生长情况, 在该条件下生长的菌株即为耐高温和能够降解亚硝酸盐的复筛微生物菌株。

## 1.3 菌株的鉴定

### 1.3.1 形态学观察

将筛选出的菌株以划线法接种至 TSB 固体培养基上, 50 °C 培养 12 h 后进行革兰氏染色, 结合菌落形态和革兰氏染色结果进行初步鉴定。

### 1.3.2 分子生物学鉴定

根据细菌 DNA 提取试剂盒说明书提取复筛微生物菌株基因组 DNA, 采用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3') 进行 PCR 扩增, 扩增产物交由生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序, 并将测序得到的基因序列上传至 GenBank 数据库获得登录号。PCR 反应体系、反应条件、基因测序、序列对比和发育树的构建参考文献[25]。

## 1.4 亚硝酸盐降解效率试验

挑取分离的耐高温亚硝酸盐降解菌单菌落接种于 100 mL TSB 液体培养基, 50 °C、200 r/min 培养 12 h 得到种子液, 按 2.5% 接种量接种于 50 mL 亚硝酸盐发酵培养基, 50 °C、200 r/min 培养 12 h, 每隔 1 h 测定发酵过程菌体密度( $OD_{600}$ )

和亚硝酸盐含量。

亚硝酸盐的测定采用盐酸萘乙二胺法<sup>[26]</sup>: 取 1.0 mL 发酵液于试管中, 加入 1.5 mL 1.0 g/L 对氨基苯磺酸溶液, 混匀静置 3–5 min 后加入 1.5 mL 1.0 g/L 盐酸萘乙二胺溶液, 混匀静置 15 min, 取 600  $\mu$ L 加入 1 cm 比色池中, 以水为参比, 于 538 nm 处测定吸光值。

标准曲线的制作: 取质量浓度为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 g/L 的亚硝酸钠标准溶液 1.0 mL, 与发酵液同样处理, 数据处理采用 Excel 软件, 以亚硝酸盐浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

## 1.5 亚硝酸盐耐受能力测定

挑取分离的耐高温亚硝酸盐降解菌接种于 100 mL TSB 液体培养基, 50 °C、200 r/min 培养 12 h 得到种子液。按 2.5% 的接种量接种于 50 mL 亚硝酸盐浓度为 1 g/L 和 2 g/L 的亚硝酸盐发酵培养基, 50 °C、200 r/min 条件下发酵培养, 每隔 1 h 测定发酵过程中菌体密度( $OD_{600}$ )和亚硝酸盐含量。

## 1.6 雪茄烟叶中亚硝酸盐、TSNAs、常规化学成分和中性香味成分含量测定

菌株活化: 将筛选得到的菌株接种至 100 mL TSB 培养基, 44 °C、200 r/min 培养至  $OD_{600}$  为 2.0。

雪茄烟叶样品准备: 烟叶在 44 °C、相对湿度 70% 条件下平衡 2 d。

发酵: 取上述菌液 10 mL 于 50 mL 离心管中, 5 000 r/min 离心 20 min, 弃上清。采用 25 mL 0.9% (质量体积分数) 无菌生理盐水重悬沉淀获得菌悬液。将菌悬液均匀喷洒于 100 g 烟叶上, 对照组喷洒等量无菌生理盐水。于 44 °C、相对湿度 70% 条件下发酵 35 d。取样测定发酵前后烟叶中亚硝酸盐、TSNAs、常规化学成分及中性香味成分含量。

亚硝酸盐测定采用离子色谱法<sup>[27]</sup>, 水溶性总糖和还原糖参考文献[28]测定, 总氮、钾、氯参考文献[29-31]测定, 烟碱测定采用气相色谱法<sup>[32]</sup>, 中性香味成分采用气质联用分析仪进行测定<sup>[33]</sup>。

烟叶 TSNA<sub>s</sub> 含量的测定方法为高效液相色谱-质谱联用法: 称取 1.0 g 烟样, 将其放入 100 mL 锥形瓶中, 准确加入 30.0 mL 萃取溶液(10 mmol/L 乙酸铵), 置于超声波发生器(500 W、50 kHz)连续超声萃取 20 min, 静置 5 min 后取 2 mL 萃取液置于 10 000 r/min 离心 5 min, 取 1 mL 上清液经 0.22  $\mu$ m 水相滤膜过滤, 移至色谱分析瓶中进行测定分析。

## 1.7 数据处理

主要数据处理方法为单因素方差分析, 数据处理软件为 SPSS 23 和 Microsoft Excel 2019, 作图软件为 Origin 2021。

# 2 结果与分析

## 2.1 耐高温亚硝酸盐降解菌筛选及鉴定

### 2.1.1 耐高温亚硝酸盐降解菌筛选

从雪茄烟叶表面经初筛得到 12 株菌, 将 12 株菌分离纯化并进行保存。对得到的 12 株菌进行高温培养和亚硝酸盐唯一氮源培养基复筛, 筛选出 3 株在亚硝酸盐唯一氮源培养基、50  $^{\circ}$ C 条件下生长良好的菌株, 编号为 NY7、NY8 和 NY9。

### 2.1.2 菌株形态学鉴定

将菌株 NY7、NY8 和 NY9 接种至 TSB 固体培养基培养 12 h 后观察菌落形态, 染色后在普通光学显微镜下观察。如图 1 所示, 菌株 NY7 菌落呈白色规则圆形、表面粗糙干燥、中间突起、边缘整齐; 菌株 NY8 菌落呈白色不规则圆形, 表面粗糙干燥、中心为乳白色, 边缘透明且呈放射状; 菌株 NY9 菌落呈白色不规则圆形,

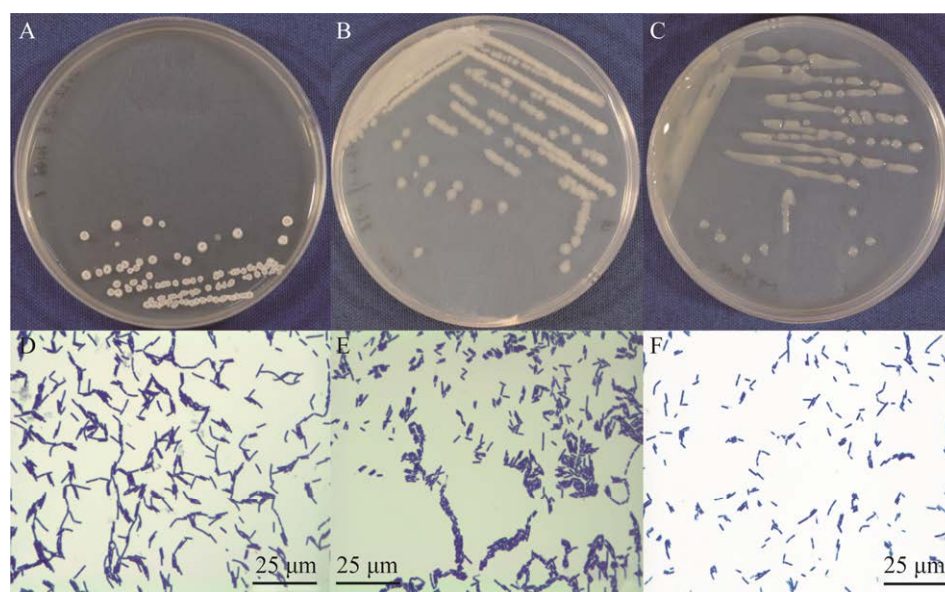


图 1 菌株菌落形态及镜检图 A、B 和 C 分别为 NY7、NY8 和 NY9 菌落形态图。D、E 和 F 分别为 NY7、NY8 和 NY9 镜检图

Figure 1 Colony morphology characteristics and morphology characteristics under optical microscope of screening strains. A, B and C are colony morphology characteristics of NY7, NY8 and NY9, respectively. D, E and F are morphology characteristics of NY7, NY8 and NY9, respectively.

中间突起、表面光滑、有黏性、湿润。革兰氏染色结果表明, 3 株菌均染色为紫色, 为革兰氏阳性菌, 细胞形态均为杆状, 均具有细菌特征。

### 2.1.3 分子生物学鉴定结果

PCR 扩增获得菌株 NY7、NY8 和 NY9 的 16S rRNA 基因序列, 交由生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。使用 DNAMAN 软件对测序结果进行拼接, 拼接后 NY7、NY8 和 NY9 序列长度均为 1 455 bp, 将拼接后的序列上传至 GenBank 数据库, 登录号分别为 OQ533133 (NY7)、OQ533134 (NY8)和 OQ533135 (NY9)。同

时将测得的核苷酸序列通过 NCBI-BLAST 程序在 GenBank 数据库中进行比对, 选取相似性高的序列采用 MEGA 7 软件中 neighbor-joining 法构建系统发育树。如图 2 所示, 菌株 NY7、NY8 和 NY9 与多株芽孢杆菌相似性为 99%以上, 菌株 NY7、NY8 和 NY9 分别与莫海威芽孢杆菌(*B. mojavensis*)、耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)处于同一分支, 结合形态学鉴定结果分析, 可鉴定菌株 NY7 为莫海威芽孢杆菌(*B. mojavensis*)、菌株 NY8 为耐盐芽孢杆菌(*B. halotolerans*)、NY9 为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。

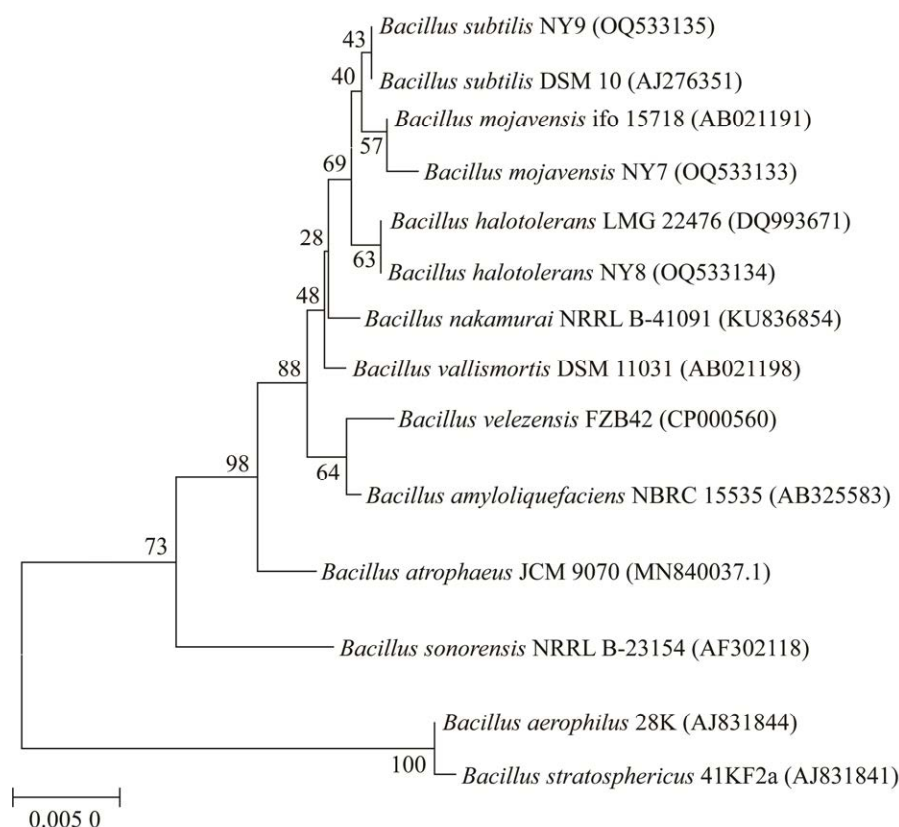


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中序号是相关菌株 GenBank 登录号; 分支点数值代表进化树 bootstrap 值; 标尺刻度 0.005 0 是序列差异的分支长度

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence. The number in parentheses are GenBank accession number of related strains; Values at branch nodes represent bootstrap value; Bar=0.005 0 is nucleotide divergence.



## 2.2 菌株亚硝酸盐降解及耐受能力验证

### 2.2.1 亚硝酸盐降解试验结果

将菌株 *B. mojavensis* NY7、*B. halotolerans* NY8 和 *B. subtilis* NY9 制成种子液后接种于亚硝酸盐发酵培养基发酵培养, 测定菌体密度变化和亚硝酸盐含量变化, 结果如图 3 所示。发酵条件为 50 °C、200 r/min、亚硝酸钠浓度为 0.1 g/L 时, 菌株 NY7 和 NY8 亚硝酸盐降解率达 95% 以上的发酵时间均为 3 h, 菌株 NY9 亚硝酸盐降解率达 95% 以上的发酵时间为 4 h; 发酵 3 h 时, 菌株 NY7、NY8 和 NY9 菌体密度分别为  $2.693 \pm 0.083$ 、 $3.471 \pm 0.325$  和  $2.668 \pm 0.038$ ; 达到菌体密度最大值至发酵结束, 菌体密度下降幅度分别为 31.11%、9.87% 和 34.01%。上述结果表明, 菌株 NY8 和 NY7 亚硝酸盐降解率达 95% 以上所需时间均小于菌株 NY9, 且发酵 3 h 时菌株 NY8 菌体密度高于菌株 NY7, 因此 3 株菌在 50 °C、亚硝酸盐浓度 0.1 g/L 条件下亚硝酸盐降解能力为菌株 NY8>NY7>NY9。

### 2.2.2 亚硝酸盐耐受能力验证

将菌株 NY7、NY8 和 NY9 制成种子液后接种于亚硝酸盐发酵培养基中, 50 °C、200 r/min

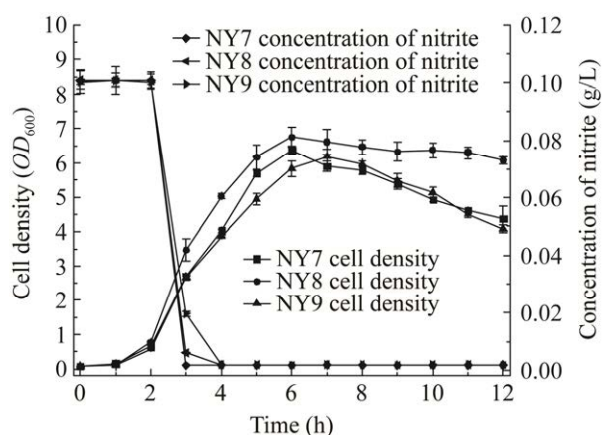


图 3 菌株 NY7、NY8 和 NY9 菌体密度变化和亚硝酸盐含量变化趋势图

Figure 3 Variation of cell density and nitrite content of strains NY7, NY8 and NY9.

发酵培养, 测定发酵过程中菌体密度变化和亚硝酸盐含量变化, 结果如图 4 所示。亚硝酸盐浓度为 1 g/L 时, 菌株 NY7、NY8 和 NY9 亚硝酸盐降解率达 95% 以上的发酵时间分别为 4、4 和 5 h, 发酵 4 h 菌体密度分别为  $3.914 \pm 0.057$ 、 $4.256 \pm 0.161$  和  $3.458 \pm 0.032$ , 菌体密度达到最大值至发酵结束菌体密度下降幅度分别为 32.84%、14.62% 和 39.11%; 亚硝酸盐浓度为 2 g/L 时, 菌株 NY7、NY8 和 NY9 亚硝酸盐降解率达 95%

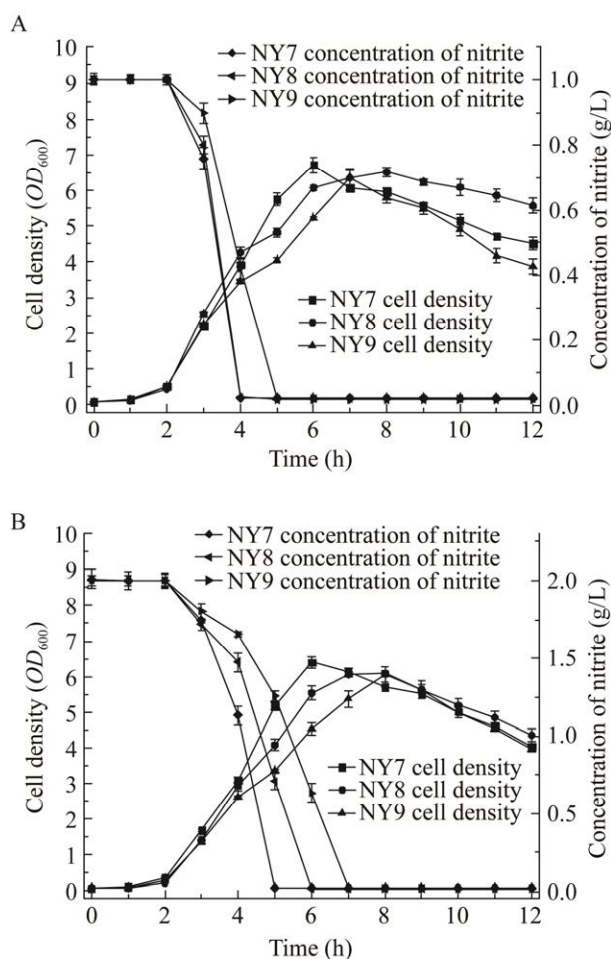


图 4 菌株 NY7、NY8 和 NY9 菌体密度变化和亚硝酸盐含量变化图 A: 1 g/L 亚硝酸盐. B: 2 g/L 亚硝酸盐

Figure 4 Variation of cell density and nitrite content of strains NY7, NY8 and NY9. A: 1 g/L nitrite. B: 2 g/L nitrite.

以上的发酵时间分别为 5、6 和 7 h, 发酵 5 h 菌体密度分别为  $5.170 \pm 0.096$ 、 $4.078 \pm 0.147$  和  $3.343 \pm 0.037$ , 菌体密度达到最大值至发酵结束菌体密度下降幅度分别为 39.06%、28.33% 和 34.66%。上述结果表明, 亚硝酸盐浓度为 1 g/L 和 2 g/L 时, 菌株 NY7 和 NY8 亚硝酸盐降解速率相当且均优于菌株 NY9。其中亚硝酸盐浓度为 1 g/L 时, 菌株 NY8 具有最优的耐受能力, 菌体密度下降幅度最小, 高温培养条件不易衰老死亡; 亚硝酸盐浓度为 2 g/L 时, 尽管菌株 NY7 耐受能力更好, 但菌株 NY8 同样显示出更小的菌体密度下降幅度, 有利于高温发酵时保持相对多的菌体数量。由于雪茄烟叶亚硝酸盐含量范围为  $10\text{--}100 \mu\text{g/g}$ <sup>[34]</sup>, 且烟叶发酵周期较长(35 d), 因此, 亚硝酸盐降解能力优异且生长稳定的菌株 NY8 更适合应用于后续烟叶高温发酵试验。

## 2.3 菌株对雪茄烟叶发酵过程中亚硝酸盐、TSNAs 含量及烟叶品质的影响

### 2.3.1 发酵前后亚硝酸盐和 TSNAs 测定结果

将菌株 NY8 应用于雪茄烟叶高温发酵过程, 测定发酵前后亚硝酸盐及 TSNAs 的含量变化, 结果如表 1 所示。由表 1 可知, 对比空白组, 添加菌株 NY8 发酵雪茄烟叶亚硝酸盐含量显著下降, 降低幅度达 96.86%, 远高于空白组

的 15.31%; 烟草特有亚硝胺测定结果表明, 在雪茄烟叶高温发酵过程菌株 NY8 能够有效降低 NNN、NNK、NAT 和 NAB 含量, 降低幅度分别为 65.59%、33.20%、69.38% 和 63.72%, TSNAs 总量降低幅度为 67.14%。

### 2.3.2 发酵前后常规化学成分和中性香味成分测定结果

为考察添加菌株发酵对烟叶品质的影响, 测定了发酵前后雪茄烟叶的常规化学成分和中性香味成分, 结果见表 2 和表 3。由表 2 可知, 空白对照组和添加菌株 *B. halotolerans* NY8 组在发酵过程中总糖、还原糖、总氮、烟碱含量均有一定下降, 钾、氯含量无明显变化, 钾氯比经发酵后也有所下降。由于添加菌株 *B. halotolerans* NY8 发酵后烟碱下降幅度明显大于空白组, 导致发酵后糖碱比和氮碱比均高于空白组。由表 3 可知, 空白对照组和添加菌株 *B. halotolerans* NY8 发酵后, 新植二烯含量均明显增加。除新植二烯外, 添加菌株 *B. halotolerans* NY8 发酵后中性香味物质总量略高于空白组, 大马酮、二氢  $\beta$ -紫罗兰酮、吡嗪、香紫苏醇、香紫苏内酯含量发酵后明显高于空白组, 苯乙醇、苯乙醛、 $\beta$ -紫罗兰酮、香叶基丙酮、二氢猕猴桃内酯均低于空白组。

表 1 烟叶发酵前后亚硝酸盐和烟草特有亚硝胺含量变化

Table 1 Variations of nitrite and tobacco-specific nitrosamines content before and after fermentation

化学成分 Chemical components	发酵前 Before fermentation	发酵后 After fermentation	
		空白(未加菌) Blank (no strain added)	添加 <i>B. halotolerans</i> NY8 Added <i>B. halotolerans</i> NY8
Nitrite ( $\mu\text{g/g}$ )	$5.42 \pm 0.04\text{a}$	$4.59 \pm 0.02\text{b}$	$0.17 \pm 0.00\text{c}$
NNN (ng/g)	$2078.04 \pm 12.98\text{b}$	$2619.98 \pm 35.67\text{a}$	$713.05 \pm 8.03\text{c}$
NNK (ng/g)	$79.57 \pm 2.29\text{b}$	$113.81 \pm 0.28\text{a}$	$53.15 \pm 2.04\text{c}$
NAT (ng/g)	$2666.62 \pm 13.89\text{a}$	$2326.76 \pm 32.86\text{b}$	$816.44 \pm 4.23\text{c}$
NAB (ng/g)	$68.42 \pm 2.75\text{a}$	$65.93 \pm 0.14\text{b}$	$24.82 \pm 0.29\text{c}$
TSNAs (ng/g)	$4892.64 \pm 31.92\text{b}$	$5063.53 \pm 43.49\text{a}$	$1607.48 \pm 9.93\text{c}$

同行数值后不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。下同

Different lowercase letters after the same value indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). The same below.



表 2 烟叶发酵前后常规化学成分变化

Table 2 Variations of routine components in tobacco leaves before and after fermentation

化学成分 Chemical components	发酵前 Before fermentation	发酵后 After fermentation	
		空白(未加菌) Blank (no strain added)	添加 <i>B. halotolerans</i> NY8 Added <i>B. halotolerans</i> NY8
总糖 Total sugar (%)	2.92±0.00a	2.02±0.02b	1.79±0.00c
还原糖 Reducing sugar (%)	1.26±0.02a	0.86±0.02b	0.78±0.00c
烟碱 Nicotine (%)	5.96±0.00a	5.20±0.01b	3.90±0.00c
总氮 Total nitrogen (%)	2.26±0.06a	1.87±0.02b	2.19±0.05a
钾 Potassium (%)	6.05±0.05a	6.16±0.04a	6.13±0.04a
氯 Chlorine (%)	1.51±0.05b	1.62±0.02a	1.63±0.02a
钾氯比 K/Cl	4.01±0.01a	3.80±0.00b	3.76±0.01b
糖碱比 Sugar-nicotine ratio	0.49±0.00a	0.39±0.01c	0.46±0.00b
氮碱比 Nitrogen-nicotine ratio	0.38±0.03b	0.36±0.03b	0.56±0.04a

### 3 讨论

TSNAs 作为烟草中特有的一类致癌物质, 一直以来备受关注。雷丽萍等<sup>[35-36]</sup>筛选得到了一株非亚硝酸盐还原菌 K18, 随后又以 NNK 为唯一碳源和氮源, 筛选得到一株芽孢杆菌 05-5402, 研究发现, 两株菌均能有效降解烟叶中 TSNAs 含量, 但未对 TSNAs 降解机制及安全性做进一步研究。本研究以亚硝酸盐为唯一氮源筛选能够高效降解亚硝酸盐的菌株, 相较于直接降解 TSNAs, 优势在于降解途径清晰, 不会产生有毒有害物质。

发酵是雪茄烟叶品质形成的关键时期, 也是 TSNAs 大量积累的时期<sup>[4]</sup>, 目前采用微生物手段降低前体物亚硝酸盐含量, 进而减少烟叶中 TSNAs 形成的研究均以烤烟和白肋烟为研究对象<sup>[37]</sup>, 筛选出的 TSNAs 降解微生物均为中温(28–35 °C)培养<sup>[19-21]</sup>, 虽然降解效果显著, 但均难以应用于雪茄烟叶高温发酵。本研究通过耐高温筛选得到一株能够在 50 °C 高温条件下生长且具有优异亚硝酸盐降解能力和耐受能力的芽孢杆菌 *B. halotolerans* NY8。将该菌株应用于雪茄烟叶高温发酵过程, 有效降解了亚硝酸

盐并显著减少 TSNAs 积累, 其中亚硝酸盐含量降低了 96.86%、TSNAs 总量降低了 67.14%。

微生物对烟叶发酵的品质有着重要的影响<sup>[16]</sup>, 但多数学者忽略了利用微生物减害的同时其对烟叶品质产生的影响。本研究对发酵前后雪茄烟叶常规化学成分和中性香味成分进行了测定。结果表明, 添加菌株 *B. halotolerans* NY8 发酵后总糖和还原糖含量降低且低于空白组; 中性香味成分总量略高于空白组, 其中大马酮、二氢大马酮和二氢  $\beta$ -紫罗兰酮等香味物质含量明显高于空白组。郭文龙等<sup>[38]</sup>研究发现雪茄烟叶在 30 d 发酵过程中总糖、还原糖和总氮持续下降, 与本文研究结果一致, 且随着总糖和还原糖含量降低, 烟叶的吸品质明显提升。因此, 推测菌株 *B. halotolerans* NY8 对雪茄烟叶发酵品质有一定的提升, 但还需进一步进行评吸验证。

*B. halotolerans* NY8 从雪茄烟叶筛选而来, 为烟草本源微生物, 且目前已有文献报道将菌株 *B. halotolerans* 应用于小麦和草莓的生物防治<sup>[39-40]</sup>, 说明 *B. halotolerans* NY8 具有较好的生物安全性。同时, 本研究对比发酵前后烟碱含量变化趋势发现, 经菌株 *B. halotolerans* NY8

表 3 烟叶发酵前后主要中性香味物质变化

Table 3 Variations of main aroma substances in tobacco leaves before and after fermentation

香气物质名称	发酵前	发酵后 After fermentation (μg/g)	
Aromatic components	Before fermentation	空白(未加菌)	添加 <i>B. halotolerans</i> NY8
	(μg/g)	Blank (no strain added)	Added <i>B. halotolerans</i> NY8
苯丙氨酸转化产物 Phenylalanine conversion product			
苯乙醇 Phenethyl alcohol	2.48	22.27	17.24
苯乙醛 Phenylacetaldehyde	0.51	7.02	3.07
棕色化反应产物 Browning reaction product			
2-丁基四氢呋喃 2-butyltetrahydrofuran	3.75	—	—
西柏烷类降解产物 Ccmbrances degradation product			
茄酮 Solanone	9.54	21.84	18.80
西柏三烯-4-醇 2,7,11-cembratrien-4-ol	16.64	8.09	8.24
类胡萝卜素降解产物 Carotenoid degradation products			
大马酮 Damascenone	2.81	3.38	6.34
二氢大马酮 β-damascone	0.27	10.29	11.33
4-羟基-β-二氢大马酮	1.16	1.28	1.81
4-hydroxy-beta-damascone			
β-紫罗兰酮 Irisone	1.47	8.09	4.69
二氢-β-紫罗兰酮 Dihydro-beta-ionone	0.18	—	9.41
4-羟基-β-紫罗兰酮 4-hydroxy-beta-ionone	0.77	—	0.93
香叶基丙酮 Geranylacetone	0.62	2.77	—
巨豆三烯酮 Megastigmatrien	27.11	18.22	16.70
二氢猕猴桃内酯 Dihydroactinidiolide	2.12	1.30	—
法尼基丙酮 Farnesyl acetone	2.17	12.24	8.90
芳樟醇 Linalool	0.17	0.94	0.58
其他 Others			
吲哚 Indole	1.47	1.79	6.85
异叶绿醇 Isophytol	2.36	—	1.28
异长叶醇 Isolongifolol	—	—	0.93
香紫苏醇 Sclareol	7.29	2.88	9.76
香紫苏内酯 Sclareolide	1.23	—	5.34
雪松醇 Cedrol	1.46	—	—
总计 Total	85.58	122.40	132.20
烟碱 Nicotine	517.60	493.95	409.86
新植二烯 Neophytadiene	307.27	892.67	847.99

—: 未检出

—: Not detected.

发酵后, 烟碱含量降低幅度明显大于空白组, 说明该菌株同时也具有一定降解烟碱的能力, 从而更有效地减少 TSNA 的形成, 对于该菌株的烟碱降解能力和高烟碱浓度耐受能力有待于进一步的研究。

## 4 结论

本研究通过对晾晒后雪茄烟叶共栖微生物的分离、筛选与鉴定, 得到了一株具有性能优异的耐高温、强亚硝酸盐降解能力的烟草源微生物。

物菌株耐盐芽孢杆菌(*B. halotolerans*) NY8。该菌株在摇瓶发酵和烟叶发酵中均能够高效降解亚硝酸盐,并且能够显著减少雪茄烟叶高温发酵过程中 TSNAs 的积累,该菌株在雪茄烟叶发酵减害方面具有重要科学价值和很大的应用潜力。

## REFERENCES

- [1] HOFFMANN D, BRUNNEMANN KD, PROKOPCZYK B, DJORDJEVIC MV. Tobacco-specific N-nitrosamines and *ARECA*-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1994, 41(1): 1-52.
- [2] 周骏, 雷丽萍, 刘兴余. 应用生物技术降低烟草中特有 N-亚硝胺[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2016. ZHOU J, LEI LP, LIU XY. Application of Biotechnology to Reduce the Specific N-nitrosamines in Tobacco[M]. Beijing: Scientific and Technical Documents Publishing House, 2016 (in Chinese).
- [3] 周炎, 史宏志, 季辉华, 周骏, 张杰, 白若石, 杨惠娟. 中美部分品牌烟草制品 TSNA 及其前体物的含量和关系[J]. *中国烟草学报*, 2022, 28(2): 42-49. ZHOU Y, SHI HZ, JI HH, ZHOU J, ZHANG J, BAI RS, YANG HJ. The correlation between TSNAs content and their precursors content in some tobacco products on Chinese and the United States' markets[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2022, 28(2): 42-49 (in Chinese).
- [4] 李晶晶, 史宏志, 杨兴有, 周骏, 白若石, 秦艳青, 阳苇丽. 发酵条件对雪茄烟叶 TSNAs 及其前体物含量变化的影响[J]. *中国烟草学报*, 2019, 25(6): 120-125. LI JJ, SHI HZ, YANG XY, ZHOU J, BAI RS, QIN YQ, YANG WL. Effects of fermentation conditions on contents of TSNAs and their precursors in cigar filler tobacco[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2019, 25(6): 120-125 (in Chinese).
- [5] SHI HZ, WANG RY, BUSH LP, ZHOU J, YANG HJ, FANNIN N, BAI RS. Changes in TSNA contents during tobacco storage and the effect of temperature and nitrate level on TSNA formation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(47): 11588-11594.
- [6] 朱凤鹏, 赵明月, 胡清源. 硝酸盐、亚硝酸盐和烟碱对卷烟主流烟中烟草特有 N-亚硝胺的影响[J]. *中国烟草学报*, 2005, 11(4): 11-16. ZHU FP, ZHAO MY, HU QY. Influence of nitrate, nitrite and nicotine on tobacco specific N-nitrosamines in mainstream smoke[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2005, 11(4): 11-16 (in Chinese).
- [7] 李诗平, 舒俊生, 章存勇, 林辉, 陈军, 杨俊. 亚硝酸盐清除剂阻断烟草特有亚硝胺形成的研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(35): 20472-20473. LI SP, SHU JS, ZHANG CY, LIN H, CHEN J, YANG J. Experiment in the block of tobacco specific nitrosamines formation of with nitrite scavenger[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(35): 20472-20473 (in Chinese).
- [8] 杨焕文, 李永忠, 刘彦中, 周平, 崔明午. 烟草特有的 N-亚硝胺形成、积累及其影响因素[J]. *烟草科技*, 1998, 31(4): 31-34. YANG HW, LI YZ, LIU YZ, ZHOU P, CUI MW. From, accumulation and effect factors of tobacco specific nitrosamines[J]. *Tobacco Science & Technology*, 1998, 31(4): 31-34 (in Chinese).
- [9] 高峰涵, 郑赛晶, 汪阳忠, 简小朋, 杨菁, 沈轶. 实验室条件下活性炭吸附法降低口含烟中烟草特有亚硝胺[J]. *烟草科技*, 2020, 53(7): 40-45, 61. GAO YH, ZHENG SJ, WANG YZ, JIAN XP, YANG J, SHEN Y. Reduction of TSNAs in oral tobacco products by activated carbon adsorption under laboratory conditions[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2020, 53(7): 40-45, 61 (in Chinese).
- [10] 戴亚, 郭家明, 肖怡宁, 王茜, 刘启斌. 血红蛋白的提取及降低卷烟烟气中 N-亚硝胺含量的初步实验[J]. *烟草科技*, 2001, 34(1): 19-21. DAI Y, GUO JM, XIAO YN, WANG Q, LIU QB. Preliminary experiments on extraction of hemoglobin and its application in reduction of N-nitrosamine in cigarette smoke[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2001, 34(1): 19-21 (in Chinese).
- [11] SUN XD, LIN WG, WANG LJ, ZHOU B, LYU XL, WANG Y, ZHENG SJ, WANG WM, TONG YG, ZHU JH. Liquid adsorption of tobacco specific N-nitrosamines by zeolite and activated carbon[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2014, 200: 260-268.
- [12] ZHU WB, GAO L, ZHANG YK, ZHANG Q, HONG Y, SHEN WJ, WANG Y, ZHU JH. Insight into the liquid adsorption of tobacco specific nitrosamines on ZIF-8[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2022, 333: 111730.
- [13] LI SH, SHI CL, WANG YZ, SUN XD, QI DW, WU D, WANG Y, ZHU JH. New efficient selective adsorbent of tobacco specific nitrosamines derived from discarded cigarette filters[J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2019, 284: 393-402.
- [14] 陈翔, 周开绪, 杨兴友, 向杰, 何正川, 刘丽, 张艳敏, 程新胜. 不同栽培措施对自肋烟 TSNAs 及其前体物的影响[J]. *中国烟草科学*, 2017, 38(2): 14-18.

- CHEN X, ZHOU KX, YANG XY, XIANG J, HE ZC, LIU L, ZHANG YM, CHENG XS. Effects of different cultivation measures on TSNA and their precursors in burley tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2017, 38(2): 14-18 (in Chinese).
- [15] 赵晓军, 符云鹏, 侯振武, 凡聪, 邱宝平, 李炜, 王静. 调制方法对吉林晒红烟品质的影响[J]. 烟草科技, 2020, 53(10): 10-20.
- ZHAO XJ, FU YP, HOU ZW, FAN C, QIU BP, LI W, WANG J. Effects of curing methods on quality of dark sun-cured tobacco in Jilin[J]. Tobacco Science & Technology, 2020, 53(10): 10-20 (in Chinese).
- [16] 徐清泉, 李石头, 黄申, 毛多斌. 烟草源微生物及其应用研究进展[J]. 轻工学报, 2021, 36(5): 42-50, 58.
- XU QQ, LI ST, HUANG S, MAO DB. Review on tobacco-derived microorganisms and its application[J]. Journal of Light Industry, 2021, 36(5): 42-50, 58 (in Chinese).
- [17] 王芳, 连宾, 张庆明, 王玉平, 丁根胜, 姬厚伟. 一种复合菌剂及其在烟叶醇化中的应用: CN105543122A[P]. 2021-05-28.
- WANG F, LIAN B, ZHANG QM, WANG YP, DING GS, JI HW. Composite inoculant and application thereof in alcoholization of tobacco leaf: CN105543122A[P]. 2021-05-28 (in Chinese).
- [18] 顾金刚, 刘好宝, 杨明川, 马聪聪, 夏鑫鑫, 张磊, 罗泽华, 蔡斌, 辛玉华. 一株高地芽孢杆菌及其在防控雪茄发酵霉变中应用: CN112342169A[P]. 2022-05-03.
- GU JG, LIU HB, YANG MC, MA CC, XIA XX, ZHANG L, LUO ZH, CAI B, XIN YH. *Bacillus altitudinis* and application thereof to prevention and control of cigar fermentation mildew: CN112342169A[P]. 2022-05-03 (in Chinese).
- [19] 祝明亮, 李天飞, 汪安云. 白肋烟内生细菌的分离鉴定及降低 N-亚硝胺含量研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(4): 422-426.
- ZHU ML, LI TF, WANG AY. Isolation and identification of endophytic bacteria in burley tobacco and reduction to TSNA contents of burley tobacco[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(4): 422-426 (in Chinese).
- [20] 孙政. 降低烟草亚硝胺目的菌的筛选及应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2011.
- SUN Z. Screening and application of target bacteria for reducing tobacco nitrosamines[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [21] 单宏英, 陈德鑫, 李晶, 陈太春, 胡怀喜, 郭志刚, 安德荣. 一株源于醇化烟叶表面高效降解 TSNA 菌株 AS97 的分离筛选、鉴定及应用[J]. 微生物学报, 2011, 51(10): 1326-1333.
- SHAN HY, CHEN DX, LI J, CHEN TC, HU HX, GUO ZG, AN DR. Identification and primary application of TSNA degrading bacterial strain AS97 isolated from aging tobacco leaves[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(10): 1326-1333 (in Chinese).
- [22] 杨焕文, 崔明午, BUSH LP, BURTON HR. 影响烟草特有亚硝胺积累的因素[J]. 西南农业大学学报, 2000, 22(2): 164-166.
- YANG HW, CUI MW, LOWELL P, BUSH, BURTON H. Factors influencing the accumulation of tobacco-specific nitrosamines[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 2000, 22(2): 164-166 (in Chinese).
- [23] 朱凤鹏, 赵明月, 胡清源, 杨述元. TSNA 的形成、影响因素、分析及清除方法综述[J]. 烟草科技, 2004, 37(7): 27-30.
- ZHU FP, ZHAO MY, HU QY, YANG SY. Summary on formation, influencing factors, analysis and scavenging of tobacco-specific nitrosamines[J]. Tobacco Science & Technology, 2004, 37(7): 27-30 (in Chinese).
- [24] 王俊, 史宏志, 靳彤, 张梦, 周骏, 杨惠娟, 白若石. 烟叶生物碱组成差异对白肋烟高温贮藏前后 TSNA 形成的影响[J]. 中国烟草学报, 2017, 23(6): 69-76.
- WANG J, SHI HZ, JIN T, ZHANG M, ZHOU J, YANG HJ, BAI RS. Effect of composition differences of alkaloid in burley tobacco leaves on TSNA formation before and after high temperature storage[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2017, 23(6): 69-76 (in Chinese).
- [25] 钟桂芳, 张帆, 郭辉祥, 周忆菲, 马歌丽, 王光路. 高温大曲中产四甲基吡嗪细菌的筛选及鉴定[J]. 中国酿造, 2020, 39(8): 107-111.
- ZHONG GF, ZHANG F, GUO HX, ZHOU YF, MA GL, WANG GL. Screening and identification of tetramethylpyrazine-producing strains from high-temperature Daqu[J]. China Brewing, 2020, 39(8): 107-111 (in Chinese).
- [26] ARJUN B, MURIANA PETER M. Isolation and characterization of nitrate reducing bacteria for conversion of vegetable-derived nitrate to 'natural nitrite'[J]. Applied Microbiology, 2021, 1(1): 11-23.
- [27] 张建平, 黄朝章, 邓其馨, 苏明亮, 谢卫, 许寒春, 刘泽春, 吴清辉. 离子色谱法同时测定烟草中的硝酸盐与亚硝酸盐[J]. 中国烟草学报, 2013, 19(6): 25-33.
- ZHANG JP, HUANG CZ, DENG QX, SU ML, XIE W, XU HC, LIU ZC, WU QH. Simultaneous determination of nitrate and nitrite in tobacco by ion exchange chromatography[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2013, 19(6): 25-33 (in Chinese).

- [28] 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]. 北京: 中国标准出版社, 2019.  
State Tobacco Monopoly Bureau of the People's Republic of China. Tobacco and tobacco products — Determination of water soluble sugars — Continuous flow method: YC/T 159—2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019 (in Chinese).
- [29] 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]. 北京: 中国标准出版社, 2004.  
State Tobacco Monopoly Bureau of the People's Republic of China. Tobacco and tobacco products: determination of total nitrogen: continuous flow method: YC/T 161—2002[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004 (in Chinese).
- [30] 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]. 北京: 中国标准出版社, 2007.  
State Tobacco Monopoly Bureau of the People's Republic of China. Tobacco and tobacco products—determination of potassium—continuous flow method: YC/T 217—2007[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007 (in Chinese).
- [31] 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—2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.  
State Tobacco Monopoly Bureau of the People's Republic of China. Tobacco and tobacco products: determination of chloride: continuous flow method: YC/T 162—2002[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004 (in Chinese).
- [32] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品烟碱的测定气相色谱法: YC/T 246—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.  
State Tobacco Monopoly Bureau of the People's Republic of China. Tobacco and tobacco products—determination of nicotine—gas chromatographic method: YC/T 246—2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008 (in Chinese).
- [33] 詹军, 李伟, 王涛, 刘建军, 贺帆, 宫长荣. 密集烘烤定色期升温速度对上部烟叶吸食品质的影响[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(5): 866-872.  
ZHAN J, LI W, WANG T, LIU JJ, HE F, GONG CR. Effect of heating rate during leaf-drying stage of bulk curing on smoking quality of upper flue-cured tobacco leaf[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2011, 33(5): 866-872 (in Chinese).
- [34] 周迪, 孙雨琦, 史宏志, 杨兴有, 周骏, 鲁喜梅, 白若石, 阳苇丽, 赵园园, 秦艳青. 16 个雪茄烟品种的烟碱转化率及与发酵后烟叶 TSNA 含量的关系[J]. 中国烟草学报, 2020, 26(4): 18-25.  
ZHOU D, SUN YQ, SHI HZ, YANG XY, ZHOU J, LU XM, BAI RS, YANG WL, ZHAO YY, QIN YQ. Nicotine conversion rate of 16 cigar varieties and its relationship with TSNA content in fermented tobacco leaves[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2020, 26(4): 18-25 (in Chinese).
- [35] 雷丽萍, 夏振远, 郭荣君, 吴玉萍, 缪作清. 非硝酸盐还原细菌 K18 降低 TSNA 机理的初步研究[J]. 中国烟草科学, 2009, 30(5): 54-57.  
LEI LP, XIA ZY, GUO RJ, WU YP, MIAO ZQ. Mechanism of non-nitrate reduction endophytic bacteria K18 on TSNA reduction[J]. Chinese Tobacco Science, 2009, 30(5): 54-57 (in Chinese).
- [36] 雷丽萍, 吴玉萍, 莫笑晗, 周骏, 夏振远. TSNA 降解菌 05-5402 的筛选及其降解特性研究[J]. 中国烟草学报, 2017, 23(5): 87-91.  
LEI LP, WU YP, MO XH, ZHOU J, XIA ZY. Isolation and screen of TSNA-degrading bacillus 05-5402 and its degradation characteristics[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2017, 23(5): 87-91 (in Chinese).
- [37] 李秀妮, 李猛, 万德建, 李林林, 陈栋, 丁松爽, 时向东. 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.  
LI XN, LI M, WAN DJ, LI LL, CHEN D, DING SS, SHI XD. Role of microorganisms in tobacco fermentation and alcoholization: a review[J]. Microbiology China, 2019, 46(6): 1520-1529 (in Chinese).
- [38] 郭文龙, 琚绍煊, 丁松爽, 刘路路, 潘勇, 刘仡, 卢瑞琳, 时向东. 雪茄烟叶发酵过程中颜色参数与发酵品质的关系[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2022, 50(4): 50-57, 65.  
GUO WL, JU SX, DING SS, LIU LL, PAN Y, LIU Y, LU RL, SHI XD. Relationships of color with fermentation quality of cigar tobacco leaves during fermentation[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2022, 50(4): 50-57, 65 (in Chinese).
- [39] WANG F, XIAO J, ZHANG YZ, LI RY, LIU L, DENG J. Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus halotolerans* against *Botrytis cinerea* causing grey mould in postharvest strawberry fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 174: 111456.
- [40] LI S, XU JQ, FU LM, XU GH, LIN XM, QIAO JQ, XIA YF. Biocontrol of wheat crown rot using *Bacillus halotolerans* QTH8[J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2022, 11(5): 595.