

烟叶表面微生物及其应用*

刘 萍 张广民** 郑小嘎 张修国

(山东农业大学植物保护学院 泰安 271018)

摘要: 利用微生物发酵技术改善烟叶品质, 是目前国内外学者争相研究的课题。在发酵过程中有微生物、酶及化学物质的协同作用, 诱发一系列与香气物质变化有关的生化反应。其中微生物贯穿烟叶发酵始终, 对烟叶品质起重要作用。人为的将微生物用于烟叶发酵是提高烟叶品质、改善烟气特性的新途径, 给予烟叶自然、醇和芳香, 减少苦涩气味, 改善余味。基于以上目的, 文中综括烟叶微生物种类及应用概况, 试图将微生物资源广泛应用于烟叶发酵, 诱发烟叶内与香气物质转化有关的生化代谢途径, 达到改善烟叶品质和增进烟叶香气目的。

关键词: 烤烟叶, 烟叶发酵, 微生物, 香气, 应用

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0105-06

1 烟叶发酵过程中微生物种类

研究发现, 未发酵或人工发酵的烤烟叶面存在大量微生物群落。Reid^[1]率先发现,

* 云南省红河卷烟厂赞助项目

联系人 E-mail: zhanggm@sdau.edu.cn

收稿日期: 2002-12-06, 修回日期: 2003-02-10

雪茄烟叶表面具有大量细菌和霉菌。Tamayo^[2]从烟叶上分离的微生物种类主要是芽孢杆菌和球菌。谢和^[3]研究发现烤烟 NC82 叶表面的主要微生物类群是细菌,放线菌和霉菌。陈福星^[4]研究表明在烤烟人工发酵中后期,烟叶表面均有大量稳定的微生物。但不同学者分离鉴定的微生物种类和数量有别,这与烤烟品种、产地、时间、等级及发酵条件不同有关^[5]。根据前人研究,烤烟叶面微生物类群主要包括细菌、霉菌和放线菌,另有少量酵母菌。其中细菌占绝对优势,达到 90%~99%^[6],放线菌、霉菌和酵母菌比例甚小。烟叶中的细菌主要是芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.),芽孢梭菌 (*Clostridium* sp.),假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)及葡萄球菌 (*Staphylococcus* sp.);放线菌主要是链霉菌 (*Streptomyces* sp.);霉菌主要是曲霉菌 (*Aspergillus* sp.)和青霉菌 (*Penicillium* sp.)。其中芽孢杆菌和芽孢梭菌占烟叶表面微生物种类数量的 90%左右。烟叶发酵过程中微生物种类和数量总体呈下降趋势^[7],可能是因陈化过程中,烟叶含水量较低,抑制其生长;另一方面是微生物之间的拮抗作用。据有关资料报道^[7],烤烟叶面霉菌受几种微生物不同程度的抑制,有趣的是人工发酵过程中霉菌数量增加,这可能由于温湿度条件有利霉菌生长所致。

2 微生物在烟叶发酵过程中的安全性

烟叶发酵过程中,烟叶表面微生物种类繁多,其中有些微生物具诱香作用。但迄今为止,尚未见关于微生物诱香安全性问题的研究报道。美籍华人左天觉^[8]从吸烟与健康角度出发,提出烟叶可用性新概念,即消费者接受的程度,除包括烟叶色、香、味及可加工性外,还包括吸烟消费者的安全性。可见,利用微生物改善烟叶内在品质,烟叶安全性评价是一不容忽视的问题。

烤烟进行微生物发酵存在两方面问题,发酵烟叶喷施微生物孢子悬液时,是否发生霉变、腐败;其次烟叶微生物自身代谢产物及与基质相互作用是否产生对人体有毒害作用的物质。如何检测毒害物质,怎样消除毒害物质的产生,提高吸烟者安全性显得尤为重要。通过改变烟叶表面微生物群落结构,减少有害微生物,增加有益微生物,其中喷施有益且能诱香的微生物,既改善烟叶品质,增加香气,又保证消费者安全性,这是目前微生物发酵工程在烟叶发酵过程中密切关注的重要问题。Wiley T. cockrell. Jr^[9]等对咀嚼烟和鼻烟上的微生物种类进行分离鉴定,共发现 4 种细菌和 12 种真菌,皆为非致病菌,且所测试烟叶产品中,未发现毒害物质。Michael R. Tansey^[10]研究发现半知菌 (*Humicola lanuginosa*) 对人体无害。Vincent W. Ogundero^[11]从发酵烟叶上分离获得 9 种嗜热真菌,其中部分对人畜具致病作用,如毛霉菌 (*Mucor pusillus*) 和橘黄嗜热菌 (*Thermoaspora aurantiacus*) 产生的真菌毒素可引起胃溃疡;曲霉菌引起肺霉菌病。

在烟叶陈化过程中,烟叶质量降低与霉菌有很大关系。它能引起烟叶发生霉变,且能产生毒素物质。引起霉变的微生物类群主要是霉菌,其中腐霉菌和青霉菌占霉菌总量的 78.1%,黄曲霉次之。值得注意的是黄曲霉毒素是一严重的化学致癌物质。因此,利用微生物发酵烟叶,应设法减少霉菌数量,施用具有诱香效果明显且对霉菌有抑制作用的微生物,对减少烟叶的非安全性具有极其重要作用。

3 开展微生物诱香研究的经济意义

人们试图利用各种途径增加烟叶内香味物质。利用现代生物技术充分挖掘烟叶的

可开发利用潜力,提高烟叶可用性,其中利用微生物发酵技术诱发烟叶内物质的转化,促进烟叶香味物质合成,对加强改善烟叶内香味物质方面的研究具有极其重要的意义。

烟叶发酵分自然陈化和人工发酵两种方法,自然陈化是提高烟叶香气的传统方法,具人工发酵不可替代的优势。但是自然陈化烟叶贮存周期长,占用仓库面积大,积压资金多,生产成本低,对国内烟草企业形成较大的负担,故多数厂家仍采用人工发酵法处理烟叶。

圈烟工艺生产中,由于对烟叶品质、档次要求较高,低档烟叶不能被利用,给个造成很大经济损失。如果将低档烟经有益微生物发酵处理,内部化学物质向利于提高烟叶香气物质转化,使低档烟吸用品质得到改善,节省资源,就能提高企业利润。烟叶中细胞壁物质对卷烟品质影响程度较大。如纤维素、半纤维素、木质素及果胶质等,在烤烟烟叶中约占干物质重量的28.1%,这些物质在适当条件下可降解为许多小分子香味物质。近几年的研究表明,烟叶内木质素类、蜡质、类脂物及色素等微量成分与卷烟品质与香味有相关性^[3]。在低次烟中,该类物质含量较高,总糖含量则很低,使烟叶具有强烈的刺激气味,吸味辛辣、涩,烟叶香气差。利用微生物发酵低次烟,发酵烟便作为卷烟填充料,可以降低卷烟成本,改善烟叶吸用品质,提高烟叶等级。

4 微生物诱发烟叶香气的研究状况

4.1 烟叶微生物发酵的生物学基础 微生物在增殖过程中可产生多种高活性酶,如蛋白酶、纤维素酶、酯化酶、氧化还原酶及裂合酶。在酶促作用、化学作用及在微生物体内复杂代谢的协同作用下,可使底物充分降解、氧化、还原、聚合、偶连,形成各种小分子化合物,其中包括各种香味物质,如醇类、醛类、酮类、酚类、酯类、呋喃类、吡嗪类、吡啶类、萜烯类等,这些香气物质也是烟草香气的重要成分。

利用微生物发酵烟叶,处理后所产生的香气物质,是否适合于烟草香气特征,取决于产香的种类、配比以及发酵的条件。通过选择特别菌种和发酵条件,就可定向筛选出适合诱香的菌株。

4.2 烟叶香气的研究概况 随着烟草中烟碱和焦油含量降低,其吸味和香气会下降,品质受到影响。传统的增香措施,一般采用品种改良、栽培技术、施肥方法、烟叶调制技术及添加香料等。关于利用微生物诱导烟叶产生香气物质的研究开展较少。20世纪60年代,发达国家才开始开展这方面研究,其研究结果与烟草集团利益密切相关,研究结果具有一定保密性,故有关报道较少。

1967年,Ratnavathi首次对烟叶香气有关的化学物质进行分析测定,大致分为酮类、醇类、脂类、烯酸、氨基酸糖、氨基酸酮、类胡萝卜素、烯醇类、酚类等。随着鉴定分析手段发展,烟叶中新发现的香气物质还在逐年增加。但是,由于烟草成分复杂,很多香气物质含量不稳定,且烟叶香气是多种香气物质相互影响协和作用的结果,所以将各种香气成分分离鉴定,并确定其特性难度较大。进入20世纪90年代,国外很多学者^[7,12-15]从事利用微生物诱导烟叶产生香气的研究。Koller^[12]最早进行将微生物接种烟叶以增加香气、改善吸味的尝试。Izquierdo Tamayo^[7]等研究发现,单独用微球菌(*Micrococcus* sp.)和芽杆菌或两者混合物处理烟叶,发酵后香气和物理性状均得到改善。Ray F. Dawson^[13]研究发现,在湿度较低条件下,嗜热性放线菌(*Thermophilic actinomyces*)在陈化烟叶中生长缓慢,但可使烟叶产生令人心怡的香气。V. L. Geiss^[14]

报道微球菌和纤维单胞菌 (*Cellulomonas* sp.) 可降低发酵烟叶中的硝酸盐, 并且纤维单胞菌还可降低烟碱, 改善烟叶品质。English^[15] 用枯草杆菌 3 个菌系和环状芽孢杆菌 1 个菌系, 单独或混合接种贮藏期烟叶, 能迅速出现悦人的芳香。我国对烤烟香气研究起步较晚, 20 世纪 90 年代才开展烟叶香气物质化学成分分析的研究, 与国外研究结果基本一致。关于烟叶诱香微生物研究尚处探索阶段。陈福星^[4] 用烤烟叶上分离的 4 个优势菌种处理烟叶, 结果发现发酵处理过的烟叶均比人工或自然发酵的香气加浓, 发酵时间缩短。罗家基^[16] 研究也证实, 微生物发酵能提高烟叶等级质量, 缩短发酵时间。谢和^[3] 研究表明, 将烟叶表面的芽孢杆菌接种到烤烟烟叶上, 可明显提高烟叶香气, 改善烟叶品质。目前, 有关微生物诱香制剂的研制开发报道极少。最近, 赵铭欣^[17] 利用 4 种由优势增香菌和高生物活性的 α -淀粉酶、蛋白酶配制成烟草发酵增质剂, 将其应用到烟叶发酵中。结果发现, 烟草发酵增质剂具有促进烟叶内部有机物质分解和转化, 加速烟叶发酵进程, 缩短发酵周期等优点。与对照相比, 经发酵增质剂处理后的烟叶香气质改善, 香气量增加, 烟叶固有的杂气和刺激性减轻, 烟叶内部的糖、氮、碱等主要化学成分及其比例趋势于平衡。另外, 朱大恒^[18] 用烟末、豆粕、烟秸杆等作为产香菌的发酵物生产香精, 应用于烟叶发酵, 效果比较明显。

5 诱香机理

烟叶内在品质的改善是多种因素综合作用结果。多年来, 人们对烤烟发酵机理一直没有一致认识。1950 年, Frankenburg 据前人研究成果, 将烤烟发酵机制概括为三个假说: 酶作用学说, 微生物作用学说及化学作用学说。微生物作用是一复杂的过程, 并且贯穿于烟叶发酵的始终, 需做更深入的研究。

5.1 酶的作用 在烤烟不同陈化时期, 酶活性不同。前苏联有人曾就烟叶发酵过程中三羧酸循环酶类进行分析, 发现在烟叶发酵过程中存在与三羧酸循环有关的活性酶。韩锦峰^[19] 对不同陈化时期 5 种酶活性 (见表 2) 进行研究, 结果表明: α -淀粉酶、蛋白

表 2 不同陈化时间烤烟中酶活性及相关成分的含量

陈化时间/月	0	6	12	18	24	30
α -淀粉酶/mg 麦芽糖 $\cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	85.5	128.7	270.8	45.6	41.8	51.0
蛋白酶/mg 氨基 N $\cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	0.13	1.48	1.87	0.32	0.11	0.17
脂氧合酶 $\Delta OD_{234nm} \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$	21.2	31.7	24.0	11.2	10.5	6.3
还原糖/%	22.1	23.8	25.3	24.4	18.8	18.4
蛋白质/%	11.8	11.2	9.8	8.3	8.7	8.6
总脂质%	6.51	6.17	5.68	4.91	4.69	4.52

酶和脂氧合酶活性在陈化过程中均表现为前期升高, 后期下降的单峰曲线; 烤烟细胞内的多酚氧化酶和琥珀酸脱氢酶活性在陈化前较高, 陈化期间呈逐渐下降的趋势。另外, 化学成分在陈化后期均趋于平衡, 与相应酶活性的动态变化规律一致。表明陈化过程中化学成分的变化与酶活性密切相关。任军林^[20] 研究发现在烟丝中施加一定量的微生物高活性转化酶, 经发酵处理后可以增加卷烟香气, 消除或减轻烟气中的杂气和刺激性, 提高卷烟质量。程彪^[21] 报道, 利用微生物及其酶可改善烟叶、烟梗和烟叶薄

片的质量,认为微生物及其酶的作用将是今后烟草业持续研究的一个重要课题。朱大恒^[22]研究了烤烟自然醇化与人工发酵过程中微生物数量和酶活性间存在明显的线性关系,并且不同发酵阶段,不同微生物对各种酶活性影响不同。该研究显示将诱香微生物施于发酵烟丝或烟叶,其诱香机理与微生物自身酶的活性具明显相关性。

5.2 化学作用 烟草中很多化学成分及含量与烟叶香气、品质有关。研究表明,与烟叶香气有关的化学物质主要包括有机酸;醇类;羰基类;酯类、内酯及杂环类化合物。烟叶中醇类化合物为0.77%~1.25%,其中有些醇类具有不同的香气。目前已鉴定出19种醛,50种酮和少数醌类化合物,其中多种挥发性醛、酮类化合物是烟叶的重要致香物质。有些成分含量很低,但对烟叶香气有很大影响。目前已从烟叶和烟气中分离鉴定了数百种酯类化合物,这些化合物大都由脂肪酸、脂肪醇、萜醇及甾醇酯化而成,许多酯类化合物对烟叶香气有好的影响,挥发性酯类物质具有明显的香气,一般低级脂肪酸的甲酯和乙酯具有水果香或酒香、脂肪香、蜡香,其中不少是烟气香精的重要成分。烟叶在发酵过程中常发现一系列与形成香气物质有关的化学变化,如淀粉在酶系统的作用下降解为低聚糖,蛋白质在多酶系统作用下降解为氨基酸,果胶质在一系列酶作用下水解为醋酸、甲醇、乳糖及乳糖醛。烟叶内还常发生梅拉德(Malillard)反应,且梅拉德反应产物经阿马杜里(Amadori)和海因比(Heyns)重排,可进一步经环化或裂解形成多种致香物质,被认为是香气成分形成的重要过程。另外,杂环类化合物、醇类、羰基化合物等与烟叶发酵醇化后的各种香气密切相关。烟叶香气成分主要是在调制及发酵过程中形成的。在调制和发酵过程中常发生许多与香气物质形成有关的化学反应,如蛋白质水解成多种氨基酸,淀粉水解成糖^[22]。烟叶中总氨基酸含量与香气量和吸味成正相关,当总氨基酸的含量增加时,烟叶香气和吸味增加,但刺激性增强,杂气加重。因此,微生物发酵处理过的烟叶,其氨基酸增加量不宜过多。施木克值是判断烤烟和香料烟烟叶品质的指标。卷烟产品中可溶性总糖量随等级提高而增加,而蛋白质随等级提高而减少,施木克值较大,烟质较好,烟叶香气充足。因此,微生物发酵处理的烟叶施木克值比对照增大与否是衡量菌株诱香效果的一个重要指标。另外,氮碱比及糖碱比皆是衡量烟叶品质和香气品质优劣的指标。一般前者的比值1:1或低于1:1较为适宜,后者的比值10:1较好,国内外不同地区对烟叶最佳糖碱比值看法不一。一般认为,浓香型烟叶适宜糖碱比值偏低,而清香型烟叶适宜糖碱比值相对偏高。上述技术指标皆可用于衡量微生物诱香效果优劣的参考。

5.3 微生物作用 参考前人的研究,将微生物改善烟叶香味的过程概括为如下几种作用方式:1)微生物自身能够产生改善烟叶香气的物质,该类微生物属产香型微生物。但是这类微生物由于产生的香味物质仅作用于烟叶表面,易挥发,香味持续时间短,称非持久香型微生物。2)微生物自身代谢可产生多种化学物质,包括多种活性酶、有机酸及有害作用物质,并不断分泌到细胞外,其中属于活性酶的 α -淀粉酶、果胶质酶、苹果酸脱氢酶、蛋白酶及纤维素酶等可降解烟叶内多种有机物质,产生与香味有关的小分子物质。另外,这些代谢产物与烟叶相互作用可激活烟叶内的多种酶系统,加速烟叶内大分子物质的降解与转化成小分子香气物质的速度。由于该类微生物作用于烟叶内部,诱发烟叶产生的香气物质不易挥发,香味持续时间长,称持久香型微生物。在研究过程中获得持久香型微生物具有很大的开发利用价值。

在烟叶自然或人工发酵过程中,持久香型微生物主要作用于烟叶内的特定化学物

质。微生物对糖的作用主要是将糖分解为醇类、酯类、醛类、酮类及各种有机酸等多种低分子香味物质,从而使烟叶香气得到改善。对蛋白质的作用主要是将蛋白质降解为氨基酸,协调烟叶因蛋白质过多而产生的刺激性气味。微生物在发酵过程中,需要一定量的微量元素,如 K^+ , Cl^- ,这一措施使烟叶具有更好的持久性。

6 展望

利用微生物发酵技术提高烟叶内在品质,是当前烟草业的一个重要研究领域。我国加入世贸组织后,未来全球经济一体化的进程,将使我国烟草产业发展面临许多机遇和挑战,加速烟草科学研究力度,加强烟草学科与其它相关学科的纵横结合,开辟新效益型研究领域,对改善我国烟叶品质和提高我国烟草企业的国际竞争力具有极其重要的意义。将微生物用于烟草发酵工艺生产,具工艺简便,易于推广等优点,是一项具有创新性的研究,值得进一步的研究和探索。

参考文献

- [1] Reid J J, Gibbons M F, Haley D E. *J Research*, 1944, (69): 373 ~ 381.
- [2] Tamayo A I, Cancho F G. *International Congress of Microbiology*, 1953, (6): 48 ~ 50.
- [3] 谢和, 秦克, 王亮, 等. 贵州农学院丛刊, 1990, (1): 95 ~ 107.
- [4] 陈福星, 王磊, 莫湘涛. 微生物学通讯, 1990, (2) 37 ~ 39.
- [5] 邱立友, 赵铭心, 岳雪梅, 等. 烟草科技, 2000, (3): 14 ~ 17.
- [6] 韩锦峰, 朱大恒, 刘卫群, 等. 烟草科技, 1997, (4): 13 ~ 14.
- [7] Izquierdo Tamayo A. *TA*, 1958, (2): 2146.
- [8] 左天觉. 中国烟草学报, 2000, (6): 34 ~ 36.
- [9] Wiley T, Cockrell Jr. *Tobacco Science*, 1989 (33): 107 ~ 108.
- [10] Michael R, Tansey. *Applied Microbiology*, 1975, 128 ~ 129.
- [11] Vincent W, Ogundero. *Mycopathologia*, 1980, (71): 9 ~ 11.
- [12] Koller J B C. *Landwirtschaftlicher and Technischer Beziehung*, 1858.
- [13] Ray F, Dawson. *Philip Morris Tobacco Company*. 1965.
- [14] Geiss V L. *R A T S*, 1989, (15): 182 ~ 209.
- [15] English C F. *Appl. Microbio*, 1967, (15): 117 ~ 119.
- [16] 罗家基, 朱子高, 罗毅. 烟草科技, 1998, (1): 6.
- [17] 赵铭欣, 剂伟城, 邱立友. 河南农业科学, 1998, (12): 13 ~ 14.
- [18] 朱大恒, 韩锦峰, 周御风. 烟草科技, 1997, (1): 30 ~ 31.
- [19] 韩锦峰, 朱大恒. 中国烟草科学, 1999, (1): 1 ~ 2.
- [20] 任焯林, 刘阵宇. 烟草科技, 2000, (4): 9 ~ 10.
- [21] 程彪, 贾涛. 烟草科技, 1999, (3): 8 ~ 11.
- [22] 朱大恒, 陈锐. 中国烟草学报, 2001, (7): 26 ~ 30.
- [23] 孙福山. 中国烟草科学, 1997, (2): 39 ~ 41.