



烟叶微生物及其在烟叶发酵和醇化中的作用研究进展

李秀妮 李猛 万德建 李林林 陈栋 丁松爽* 时向东*

河南农业大学 国家烟草栽培生理生化研究基地 河南 郑州 450002

摘要: 微生物在烟叶发酵和醇化过程中具有十分重要的作用。本文综述了烟叶微生物概况及其在烟叶发酵和醇化中的应用和研究进展。主要介绍了烟叶微生物的区系划分、烟叶发酵和醇化过程中微生物动态变化以及外源添加微生物的应用方法。阐述了微生物在缩短烟叶发酵和醇化周期、改善烟叶品质、降低烟叶有害物质和提高烟叶安全性等方面的研究应用成果。最后, 对该领域今后的研究方向提出了展望。

关键词: 烟草, 微生物, 发酵, 醇化, 应用

Role of microorganisms in tobacco fermentation and alcoholization: a review

LI Xiu-Ni LI Meng WAN De-Jian LI Lin-Lin CHEN Dong DING Song-Shuang*
SHI Xiang-Dong*

National Tobacco Cultivation and Physiology and Biochemistry Research Center, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China

Abstract: Microorganisms play an important role in tobacco fermentation and aging. In this review, we address the role of microorganisms in tobacco fermentation and aging, including the distribution of microorganisms on tobacco, their application and research progress. The division of microorganism on tobacco, the dynamic change of microorganism during the process of fermentation and aging and the application of inoculating microorganism are mainly introduced. Some research and application results showed that tobacco leaf microorganisms could shorten the period of fermentation and aging, improve the quality of flue-cured tobacco, reduce harmful substances and improve smoking safety. Finally, the subsequent research of correlation studies is also prospected.

Keywords: Tobacco, Microorganism, Fermentation, Aging, Application

关于烟叶发酵和醇化的研究首见于 1858 年^[1], 国内起步相对较晚但目前发展较快。随着科研工作者对微生物在加快烟叶醇化速度、提高烟叶质量、降低烟叶有害物质等多个方面认识的加强, 相关研

究迅速增长。在实际生产应用中, 大量中低档烟叶 (约占 25%) 由于内在化学物质比例的不协调造成其工业可应用性下降, 废弃物增多, 严重影响生态环境^[2]。目前普遍认为对烟叶进行发酵和醇化是改善

Foundation item: Scientific and Technological Projects of Hubei Provincial Company (027y2018-003)

*Corresponding authors: E-mail: DING Song-Shuang: shuangsd@126.com; SHI Xiang-Dong: yancaosxd@163.com

Received: 24-07-2018; Accepted: 26-09-2018; Published online: 19-10-2018

基金项目: 湖北省公司科技项目(027y2018-003)

*通信作者: E-mail: 丁松爽: shuangsd@126.com; 时向东: yancaosxd@163.com

收稿日期: 2018-07-24; 接受日期: 2018-09-26; 网络首发日期: 2018-10-19

烟叶品质的重要生化过程,其机理主要包括酶作用、微生物作用和化学作用3个方面^[3]。微生物作用贯穿烟叶发酵和醇化的整个过程,在适宜的条件下,微生物可将烟叶中的有机成分(如淀粉、蛋白质、脂肪、核酸等大分子物质)用作自身代谢基质,通过某些代谢途径最终将有机大分子成分转化为小分子物质^[4-6],这可能是推动烟叶发酵过程中物质转化和品质改良的生物催化剂之一^[7-8]。从文献分布情况可知,前人对叶面微生物区系研究较多,随后开始关注微生物区系与环境的关系,而目前研究最多的是烟叶表面有益微生物的筛选和再添加。本文对烟叶表面微生物及其在烟草发酵、醇化中的作用进行了综述,以期探索烟叶微生物应用技术提供参考。

1 烟叶微生物概况

1.1 烟叶微生物区系

烟叶微生物种类繁多,数量庞大,国内外对烤烟烟叶微生物的研究不在少数,鉴定方法和结果也各不相同。前些年,烟叶微生物主要采用传统的可培养方法进行鉴定,研究发现:每克烟叶中约含有5-8万个微生物^[9],可分为细菌、霉菌、放线菌和酵母菌(Yeast)4大类,其中细菌数量最多,霉菌数量次之,放线菌数量较少,酵母菌数量最少^[10]。细菌包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)和芽孢乳杆菌属(*Sporolactobacillus*)等8个属,其中以芽孢杆菌属(*Bacillus*)为优势菌群^[11];霉菌以曲霉和青霉为主;放线菌有链霉菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)和动孢菌属(*Kineosporia*)3个属,其中以链霉菌为主,酵母菌为痕量^[12]。但许多烟叶微生物并不能在实验室条件下培养出来^[13],因此传统的测试方法难以满足科研人员对准确性的要求,随着科技的飞速发展,高通量测序因其能更全面、更准确地反映叶面微生物群落结构而广受欢迎^[14]。近年来,通过16S rRNA基因高通量测序得知,细菌类群中占主导地位的为厚壁菌门(*Firmicutes*)下的芽孢杆菌(*Bacillus*)、变形菌门(*Proteobacteria*)下的假单胞菌(*Pseudomonadaceae*)及放线菌门(*Actinobacteria*)下

的微球菌(*Micrococcaceae*)^[15]。Su等^[16]应用16S rRNA基因克隆文库技术从津巴布韦烟叶表面分离到84个微生物分类单元,发现主要菌属为细菌中的泛生菌属(*Pantoea*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)。而Huang等^[17]采用限制性片段长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)分析技术发现优势菌属为芽孢杆菌属。舒明等^[18]采用Roche 454 FLX焦磷酸测序法分析结果表明在废次烟末水提液中细菌含量最多,其中厚壁菌门(*Firmicutes*)占比例最高,而厚壁菌门中占主导地位的是赖氨酸芽孢杆菌属(*Bacillus lysine*)和乳杆菌属(*Lactobacillus*)。陈善义等^[19]采用MiSeq高通量测序技术对云南沾益、贵州长顺、福建尤溪、河南确山等烟区自然醇化的片烟样品分析发现,这些产区烟叶中优势菌门均为子囊菌门(*Ascomycota*),同一部位不同产地自然醇化片烟真菌群落结构差异主要体现在优势菌属的占比方面。同样基于高通量测序平台测得,同一产地,不同仓储环境,真菌群落的格局分布不同^[20]。

由于雪茄烟的推广程度远远低于烤烟,因此有关雪茄烟微生物的研究远远低于烤烟的微生物研究。1933年,Reid等^[21]最早开展了雪茄烟叶表面微生物的研究,结果发现雪茄烟烟叶表面存在着大量以巨大芽孢菌群为主的细菌和以青霉、曲霉为主的霉菌。此后,研究者从正在进行人工发酵的雪茄外包皮烟叶叶面分离鉴定到8种菌株,分别为:蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蕈状芽孢杆菌(*Bacillus mycooides*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)。其中,巨大芽孢杆菌占有芽孢杆菌的50%以上,其次是枯草芽孢杆菌,占19%左右^[22]。

综上所述,烟叶微生物中包括14种细菌、9种霉菌和4种放线菌(表1)。无论国内外研究学者采用何种方式对烟叶微生物进行鉴定,其结果都是细菌的数量和种类均占绝对优势,霉菌次之。细菌中的芽孢杆菌属因其抗性强、生长速度快以及对营养要

表 1 烟叶微生物种类统计表^[9-12,15-18]Table 1 Statistical table of microbial species of tobacco^[9-12,15-18]

细菌 Bacteria	霉菌 Mould	放线菌 Actinomyce
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	曲霉属 <i>Asperillus</i>	链霉菌属 <i>Streptomyces</i>
梭状芽孢杆菌属 <i>Clostridium</i>	青霉属 <i>Pencillium</i>	小单孢菌属 <i>Micromonospora</i>
芽孢乳杆菌属 <i>Sporolactobacillus</i>	毛霉属 <i>Mucor</i>	动孢菌属 <i>Kineosporia</i>
黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i>	根霉属 <i>Rhizopus</i>	微球菌 <i>Micrococcaceae</i>
微球菌属 <i>Micrococcus</i>	头孢霉属 <i>Cephalosporium</i>	
棒杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	小孢霉属 <i>Syzygites</i>	
欧文氏菌属 <i>Erwinia</i>	梗束霉属 <i>Coremium</i>	
芽孢八叠球菌属 <i>Sporosarcina</i>	镰刀菌属 <i>Fusarium</i> sp.	
类芽孢杆菌属 <i>Paenibacillus</i> sp.	木霉属 <i>Tichoderma</i>	
肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> sp.		
柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i> sp.		
泛菌属 <i>Pantoea</i> sp.		
假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>		
乳杆菌属 <i>Lactobacillus</i>		

求不高等特点,在整个发酵和醇化过程中一直以优势菌群存在,直至发酵结束依然还有大量的芽孢杆菌存在烟叶表面。曲霉属和微球菌属分别为霉菌和放线菌中的优势菌属。对于不同产地的烟叶分析发现其表面微生物群落分布仅存在优势菌属占比上的差异,不同品种的烟叶各种微生物的数量有所差异,不同仓储环境,真菌的群落分布不同。因此,国内外学者采用各种方法对多种烟叶微生物鉴定的结果大不相同的原因大致可以归结于与烟草品种、产地、鉴定方法、发酵时间及条件不同有关^[6-7]。雪茄烟与烤烟叶面微生物的种类有着巨大差异,这与烟草类型差异也有着密切关系。

1.2 烟叶发酵醇化过程中微生物的变化

烟叶发酵和醇化过程伴随着微生物群落结构的变化,随着烟叶发酵和醇化的进行,烟叶表面的微生物种类无明显变化^[23],数量会有一定量的减少^[5,7,24],这可能是在醇化过程中烟叶含水量较低抑制其生长所致,也可能是微生物之间存在拮抗作用^[9,13]。同时,当醇化时间相同时,叶面微生物的数量及种类会随着种质资源优良度以及烟叶等级的提高而增加。di Giacomo 等^[25]利用 DGGE 技术系统研究了意大利 Toscano 烟叶发酵过程中菌群的变

化,发现在发酵初期葡萄球菌科(*Staphylococcaceae*)和乳酸杆菌目(*Lactobacillales*)细菌为优势细菌,随着发酵过程温度和 pH 的升高,芽孢杆菌属成为优势菌属。因多种芽孢杆菌均能分解烟碱而产生一些碱性代谢物,所以这导致 pH 进一步增加,并促使发酵后期中度耐盐和嗜碱性放线菌的生长。这一结论在杜佳等^[26]和李晓强^[27]的研究结论中也有所证实。杜佳等^[26]在发酵 42 d 后的雪茄烟叶表面分离出大量的芽孢杆菌,李晓强^[27]发现烟叶在醇化 30 个月时,放线菌的数量表现出增加趋势。但朱大恒等^[3]通过对自然醇化和人工发酵的对比研究得出了不一样的结论,作者规定实验中自然醇化的取样方法为从仓库中分别取自然醇化 0、6、12、18、24 和 30 个月的烟样。人工发酵的取样方法为:将复烤后新烟放置于恒温恒湿柜中,温度设定为 45 °C,相对湿度保持在 60%–65%之间,发酵 0、3、6、9、12、15 d 后取样。研究结果发现,在醇化初期,细菌中的芽孢杆菌为优势细菌,随着发酵过程的进行,人工发酵过程中的放线菌数量有所增加,而自然醇化中的细菌、霉菌和放线菌数量均表现出下降趋势。作者认为,自然醇化受自然环境条件影响较大,人工发酵可准确控制温湿度,两者

之间温湿度的差异对烟叶表面微生物的种类及数量有着显著影响。

此外,杨金奎等^[28]在研究过程中发现了一个非常有趣的现象,在烟叶醇化 18 个月时,柠檬酸杆菌属和欧文氏菌属消失,但在醇化时间达到 30 个月时,柠檬酸杆菌属再一次出现,而欧文氏菌属消失。迄今为止,研究者对醇化后期柠檬酸杆菌属再一次出现的现象尚未给出合理的解释,推测这与烟叶醇化环境的变化以及烟叶内部化学成分比例的变化有关。

1.3 烟草微生物区系与环境条件的关系

烟叶发酵醇化的整个过程中,环境温度和相对湿度都会直接影响烟叶表面微生物的种类和数量。由于环境条件不同,烟叶表面微生物种群的结构、酶活性、化学物质含量也有所差异^[29]。李跃锋等^[30]采用真菌形态学和 rDNA-ITS 分子标记相结合的方法得知:引起烟叶霉变的微生物主要为球桔青霉、黄曲霉、球孢枝孢和米曲霉,属有害微生物。当温度在 20–35 °C,湿度在 85%时霉菌生长迅速^[31]。叶面致香型微生物属有益微生物,在温度为 49 °C,相对湿度为 60%时数量最多。另外,烟叶表面真菌类微生物如黑曲菌(*Aspergillus*)、根霉毛霉(*Rhizopus*)、酵母菌在环境温度高于 15 °C,湿度大于 60%时,其孢子和菌丝体就能够进行快速繁殖。而烟叶表面的厌氧芽孢梭菌(*Clostridium anaerobicus*)是一种抗逆能力极强且能形成芽孢的菌种,在外界温度过高或过低时均能保持活性。

鉴于以上情况,在进行烟叶发酵时应避免环境温度过低而促使大部分霉菌快速生长的情况发生。需将发酵温度控制在 49 °C 左右,同时环境湿度不超过 60%,以便有目的地增加有益微生物的种类和数量,从而达到增香保质、缩短发酵和醇化周期的目的。

2 烟草微生物在烟叶发酵醇化中的应用

2.1 可人工添加的有益微生物

烟草微生物种类繁多,但总体可分为有益微生物和有害微生物两大类。所有的相关研究均致力于

筛选出有益微生物并寻找出与之对应的最适宜的生存条件。前人大量的研究表明可缩短烟叶发酵和醇化时间的微生物有:酵母菌^[32]、枯草芽孢杆菌和某些叶面优势菌混合制剂^[9]等;可降低烟碱的微生物有:恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)^[33]、假单胞菌 Nic22^[34]、假单胞菌 HF-1^[35]、假单胞杆菌 ZUTSKD^[36]、土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)^[37]、嗜组氨醇节杆菌 EA-17 (*Arthrobacter histidinolorans*)^[38]、巴氏微杆菌 11L140 (*Microbacteriumbarkeri*)^[39]、根瘤菌菌株 5-28 (*Sinorhizobiumsp*)及其休止细胞^[40]、纺锤形赖氨酸芽孢杆菌菌株 GZUIFR -YC02 (*Spindle-shaped Lysinibacillus*)^[41]、嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonasmaltophilia*)和副短短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)^[41]等;可降低蛋白质的微生物有:蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[42]、芽孢杆菌属 F-Y-11 (*Bacillus*)^[43]、微球菌属(*Micrococcus*)^[44]、杆菌属(*Bacillus*)^[44]、嗜热菌^[45]和由活性干酵母和蛋白酶等配制而成的微生物复合制剂^[46];可降低 TSNAs 的微生物有:恶臭假单胞菌^[47]、内生细菌^[48]、根瘤菌属^[49]、芽孢杆菌^[49]、假单胞菌属^[49]等;可增加烟叶香气物质含量的微生物有:芽孢杆菌和小球菌^[50]、克雷伯氏杆菌^[51]、西姆芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*) V16 菌株^[52]、嗜热芽孢杆菌(*Thermophilic bacillus*)^[52]等。

2.2 可人工添加微生物酶类

在烟叶发酵和醇化过程中微生物的作用在很大程度上与其产生的酶类有关。利用酶催化作用能将烟叶中的细胞壁物质(主要为果胶质和纤维素)催化降解成小分子物质,降低烟叶在燃吸过程中烟叶的细胞壁物质所带来刺激性和安全性问题,进而提高烟叶的吸味品质^[53]。陈小敏^[54]从晾晒烟上分离得到 85 株产酶细菌,所产生的酶类包括纤维素酶、木聚糖酶、淀粉酶、果胶酶、蛋白酶等多种酶类。经鉴定发现,短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的产酶能力较强,推断芽孢杆菌属可能会促进发酵过程中大分

子物质的降解^[55]。除芽孢杆菌属所产酶类可降解大分子物质外还有其他酶类有此作用。邓国宾等^[56]表示用降果胶质菌株 DPE-005 产生的果胶酶处理烤烟上部烟叶,可有效降低烟叶果胶质含量和细胞壁物质含量,从而使得烟叶刺激性和杂气有所下降,烟叶的使用价值有所提高。李国栋等^[57]研究表明湖北 C3F 等级烟叶中的纤维素含量与外加酶量成反比,总糖和还原糖含量与外加酶量成正比。另外,也有不少关于复合酶类添加的研究,阮祥稳等^[58]研究显示添加复合酶(蛋白酶和纤维素酶)在相对湿度和温度分别为 5% 和 48 °C 条件下将烟叶发酵 12 h,分析其化学成分可以发现烟叶内蛋白质含量降低了 15.6%、总糖含量提高了 14.9%。烟叶经过评吸表明:经酶促发酵后的烟叶,青杂气和刺激性降低,香气质和香气量均有提高。该作者还利用纤维素酶和蛋白酶处理 B3F、C3F 和 X3F 等级烟叶,在一定条件下使烟叶内各物质比例接近协调。在复合酶(蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶、果胶酶)中加入活性添加剂制成复合制剂处理烟叶,同样也能有效促使烟叶内在化学成分趋于平衡^[59-64]。这些酶与微生物之间错综复杂的关系无疑又给外源微生物添加了更多的探索空间,因此,对烟用微生物酶类的研究在未来的几十年内都将是热点。

3 微生物在烟叶发酵和醇化中的作用

3.1 缩短烟叶发酵和醇化时间

烟叶经调制后,需经过发酵和醇化方可投入使用。烤烟、晾晒烟的发酵时间一般为 15-45 d。雪茄烟一般需要经过 2 次以上发酵,醇化时间更是在 1-3 年不等。大量文献调研结果显示,在烟叶表面施用有益微生物能够明显缩短烟叶发酵和醇化时间^[11,14,32,64]。19 世纪中叶, Koller^[32]首次尝试在雪茄烟叶发酵时添加酵母菌,发现酵母菌可使雪茄烟发酵时间大大缩短,且口感表现更好。随后谢和等^[12]指出在烤烟发酵过程加入枯草芽孢杆菌可使人工发酵时间缩短至 8 d,之后有学者研究指出在采用微生物发酵 8 d 再醇化 90 d 与其自然发酵 20 d

再醇化 730 d-1 095 d 的烟叶质量非常接近^[64]。因此,对微生物发酵、醇化烟叶的应用开发,可以缩短库存时间,从而降低发酵和醇化成本,具有巨大的经济潜力。

3.2 改善烟叶品质

3.2.1 调控烟叶化学成分含量

烟草生物碱 95% 以上是烟碱(尼古丁),是烟草中含氮生物碱的主要成分。有关微生物降烟碱的研究成为国内外研究热点,国外的研究显示: Civilini 等^[33]对氧化节杆菌(*Arthrobacter oxidans*) $\alpha 2$ 、氧化节杆菌 pAO1 和恶臭假单胞菌等 3 株菌降解烟碱的效果进行了研究,结果发现恶臭假单胞菌降解烟碱的效果最好; Chen 等^[34]从烟叶及植烟土壤中筛选到一株能有效降解烟碱的假单胞菌 Nic22,该菌在 pH 6.5、温度为 30-34 °C 条件下能降解约 73.1% 的烟碱; Ruan 等^[35]从烟草废弃物污染的土壤中分离到一株假单胞菌 HF-1,该菌在最佳条件下培养 25 h 后能降解培养基中 99.6% 的烟碱; Zhong 等^[36]利用分离到的假单胞杆菌 ZUTSKD 在一定条件下 12 h 内能降解培养基中 97% 的烟碱。国内的研究中,李珏等^[37]从张家界的植烟土壤中筛选到一株能以烟碱为唯一碳源的放射形土壤杆菌或根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*),该菌在含烟碱培养基中培养 48 h 后可降解约 71% 的烟碱;伍良伟从 81 株可降解烟碱微生物进一步筛选出降烟碱能力最强的菌株 EA-17,降烟碱率可达 80% 以上^[38]。另有大量学者研究表明,巴氏微杆菌菌株 11L140^[39]、根瘤菌菌株 5-28^[40]、纺锤形赖氨酸芽孢杆菌菌株 GZUIFR-YC02^[41]、嗜麦芽寡养单胞菌和副短链芽孢杆菌^[41]等都具有极强的降烟碱能力,只需在烤烟发酵前接种上述微生物即可使烟叶中有机酸成分增多,烟碱含量大幅度下降,为降烟碱打下了良好的基础。

蛋白质含量过高的烟叶往往在燃烧时会产生刺鼻的烧焦羽毛臭味,且燃烧性差,严重影响烟叶品质和吸烟者健康^[42]。我国利用微生物技术在烟叶发酵醇化过程中降低蛋白质的技术已经相对成熟。

目前已进行研究的可用于降解蛋白质的微生物主要是芽孢杆菌属, 其次还有微球菌属(*Micrococcus*)和嗜热菌等, 且均都属于细菌。芽孢杆菌属降解蛋白质含量的机理是将大分子蛋白质降解为氨基酸等小分子物质, 从而降低烟叶蛋白质含量^[24]。其中芽孢杆菌属的研究中, 李宁等^[42]将蜡样芽孢杆菌应用于雪茄烟堆积发酵, 可使烟叶中的蛋白质含量降低 13.53%; 冯志珍等^[43]将菌株 F-Y-11 (芽孢杆菌属) 制成菌剂对烟丝进行发酵, 测得蛋白质降解率为 29.32%。微球菌属和嗜热菌的研究中, Izquierdo 等^[44]发现将微球菌属与杆菌属(*Bacillus*)单独或混合接种烟叶时, 均可使烟草蛋白质含量降低; Malik 等^[45]利用嗜热菌处理烟叶发现嗜热菌降解烟叶中的含氮化合物的效果十分明显。在造纸法再造烟叶处理过程中, 添加由 1 种增香菌、1 种活性干酵母和 1 种蛋白酶配制而成的微生物复合制剂可以使成品烟支中糖含量明显降低, 蛋白质含量也有所下降, 内在化学成分比趋于更合理^[46]。马林^[65]将酶解和微生物发酵等生物技术综合应用于改变低次烤烟化学组分上, 蛋白质降解量高达 41.34%。由此可见, 微生物对降低烟叶中蛋白质含量的作用是极其显著的。

3.2.2 降低烟叶 TSNA 含量

烟草特异性亚硝胺(Tobacco-specific nitrosamines, TSNA)是一种烟草特有的有害物质, 利用微生物减少烟叶和烟气中的亚硝胺(TSNA)含量, 提高烟草制品的安全性是一个新兴的研究热点。目前已进行研究的可用于降解烟碱的微生物主要是细菌^[66-68]。利用高效反硝化细菌(Denitrifying bacteria)可将硝酸盐还原为亚硝酸盐, 进一步还原为气体, 从而达到了降低 TSNA 含量的目的。将恶臭假单胞菌 T1-2、T2-2 的发酵液直接喷洒在上部烤烟烟叶表面, 在温度 28 °C、相对湿度 45%的条件下醇化 14 d 时硝酸盐降解率最高, 分别达到 2.25%和 8.05%, 醇化 21 d 时亚硝酸盐降低率最高, 分别达到 19.90%和 20.99%^[47]。另外, 用 6 株对硝酸盐和亚硝酸盐还原能力较强的内生细菌, 分别用 3 种接种方式处理调

制中的白肋烟, 能使白肋烟 TSNA 含量降低 27.56%–99.88%^[48]。用根瘤菌属、芽孢杆菌、假单胞菌属处理白肋烟后发现, TSNA 含量分别降低 53.11%、72.8%和 48.96%^[49]。TSNA 含量的降低大大提高了烟叶的安全性, 但在烤烟及白肋烟上发现的降 TSNA 的微生物是否可用于雪茄烟等其他类型的烟叶还有待于进一步探索。

3.2.3 增加烟叶香气物质含量

烟叶香气质是评价烟叶质量优劣的关键因素之一, 在降焦减害工作的推动下, 研究人员发现在降低烟叶中有害物质含量的同时也会造成了烟叶香气质的降低。1953 年 Tamayo 等^[50]最先做了微生物接种烟叶增加香气的试验, 研究证实芽孢杆菌和小球菌可以改善烟叶香气, 此后许多烟叶产香微生物被相继报道。例如, 泛菌属微生物被证实可降解类胡萝卜素生成烟草中重要香味物质^[69], 仅有部分放线菌具有催化阿魏酸产生香兰的能力^[70]。对烟叶而言, 在其叶面接种克雷伯氏杆菌^[51]、西姆芽孢杆菌菌株 V16 或嗜热芽孢杆菌^[52]后, 经感官评吸可知, 烟叶会迅速产生一种令人愉悦的香气; 通过对烟叶化学成分的分析发现, 烟叶中的醛类、酮类、酚类、醇类、酸类、杂环类等致香成分的含量都有不同程度的增加。另外, 在造纸法再造烟叶上浸涂微生物发酵增质浓缩液, 再进行卷支加香评吸, 其整体香味质量有非常明显的提升^[46]。众多研究表明在醇化发酵过程中选择适当的微生物、适宜的发酵条件, 可明显提高烟叶的质量和香气。目前国内外已有众多香料生产企业引进了这项技术, 节约了大量成本。

3.2.4 抑制烟叶霉变

由于烟叶发酵醇化时间较长, 稍不注意就会导致烟叶霉变, 每年由于霉变而导致的损失十分巨大。研究者从烤烟中分离筛选出了 5 株优势微生物(M1、M2、M3、M4、M5), 发现其对培养基、烟丝和烟叶表面霉菌的生长繁殖均有不同程度的抑制作用, 其中以 M1 菌株的抑霉作用最为显著^[3]。这一研究结果为利用微生物抑制烟叶霉变开辟了新途径, 但有关添加微生物来抑制烟叶霉变的报道

并不多,而上述作者并未给出 M1 菌株的具体名称,这就给后人的研究带来了很大困难。

4 展望

微生物是一个非常庞大的生物群体,普遍存在于自然界,对农业、化学工业、医药工业、能源工业、食品工业以及环境保护等多个领域都产生了重要影响。其中,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。随着人们对“吸烟与健康”认识的加强,通过微生物发酵来实现烟叶降焦减害和提质增效,成为烟草业今后研究的重点。作者认为今后微生物在烟草制品中的研究应用主要体现在以下 3 个方面:第一,在缩短发酵和醇化时间的同时抑制烟叶霉变的发生,控制企业发酵成本;第二,通过调控有益微生物的数量,达到增香保质、减少低次烟叶废弃率、提高企业经济效益的目的;第三,降焦减害,降低烟叶 TSNA 含量,提高烟草制品的吸食安全性。前人对微生物产生酶的途径、微生物的代谢产物等基础理论方面研究报道较少,并且在研究中鲜有提及微生物筛选及培养、添加的难易程度和生产应用成本,后续相关研究中可做进一步细化研究。

此外,随着现代生物工程技术研究手段的提高,相信未来人们可以通过人工生产天然的烟用调香物质并将其应用于加热非燃烧烟草制品中^[71]。“非燃烧烟草制品”的全称是“加热非燃烧烟草制品”,按热源不同一般可分为燃料(碳)加热型、电加热型及理化加热型 3 种,它是以“加热不燃烧”为思路设计的“低温卷烟”,这种制品能使烟叶在不燃烧的情况下散发出烟草的味道,降低传统烟草制品有害物质成分及其含量,满足吸烟者对吸食品质和自身健康的需要。

REFERENCES

- [1] Wang RX. Tobacco Chemistry[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003 (in Chinese)
王瑞新. 烟草化学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003
- [2] Xia L, Zhang J, Wang YL, et al. Research progress on the application of biotechnology in tobacco fermentation[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(22): 12013-12015 (in Chinese)
- [3] Zhu DH, Chen R, Chen ZG, et al. The relationship between microorganisms and enzyme activities in flue-cured tobacco during aging and fermentation[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2001, 7(2): 26-30 (in Chinese)
朱大恒, 陈锐, 陈再根, 等. 烤烟自然醇化与人工发酵过程中微生物变化及其与酶活性关系的研究[J]. 中国烟草学报, 2001, 7(2): 26-30
- [4] Tang L, Zhou B, Hua YK, et al. Research advance in alcoholization technology for improving quality of tobacco leaf[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2013, 25(7): 53-56 (in Chinese)
唐丽, 周冰, 华一崑, 等. 醇化技术在改善烟叶品质中的研究进展[J]. 江西农业学报, 2013, 25(7): 53-56
- [5] Zhao MQ, Li XQ. Review of the action mechanisms of microbe in tobacco fermentation and application of biologic preparation[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2007, 42(6): 84-91 (in Chinese)
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, 42(6): 84-91
- [6] Jin XY. Effects of compound biological additives on organic acids and free amino acids during tobacco aging[D]. Hefei: Master's Thesis of China University of Science and Technology, 2006 (in Chinese)
金晓艳. 复合生物添加剂对烟草陈化过程中有机酸和游离氨基酸含量影响分析研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学硕士学位论文, 2006
- [7] Zhao MQ, Li FF. The application and prospect of the technology of microbe and enzyme during tobacco leaf fermentation[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(1): 314-318 (in Chinese)
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
- [8] Qiu LY, Zhao MQ, Yue XM, et al. Isolation and identification of the microflora on tobacco leaves during the natural fermentation of flue-cured tobacco[J]. Tobacco Science & Technology, 2000(3): 14-17 (in Chinese)
邱立友, 赵铭钦, 岳雪梅, 等. 自然发酵烤烟叶面微生物区系的分离鉴定[J]. 烟草科技, 2000(3): 14-17
- [9] Sun YY. Research progress of microorganism in tobacco fermentation[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2014(9): 302-303,306 (in Chinese)
孙玉宇. 烟草发酵中微生物研究进展[J]. 现代农业科技, 2014(9): 302-303,306
- [10] Shu M, Fan H, Yang Y, et al. Isolation, identification and characteristics of nicotine degrading strain from tobacco waste extract[J]. Microbiology China, 2017, 44(5): 1028-1037 (in Chinese)
舒明, 樊虎, 杨洋, 等. 废烟叶提取液源尼古丁降解菌分离鉴定和特性[J]. 微生物学通报, 2017, 44(5): 1028-1037
- [11] Zhao MQ, Qiu LY, Zhang WQ, et al. Study on the changes of

- biological activity of flue-cured tobacco leaves during aging[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2000, 19(6): 537-542 (in Chinese)
- 赵铭钦, 邱立友, 张维群, 等. 陈化期间烤烟叶片中生物活性变化的研究[J]. *华中农业大学学报*, 2000, 19(6): 537-542
- [12] Xie H, Han ZL, Zhao WN. Effect of microbial fermentation on internal quality of flue-cured tobacco[J]. *Journal of Mountain Agriculture & Biology*, 1999, 18(4): 227-230 (in Chinese)
- 谢和, 韩忠礼, 赵维娜. 微生物发酵对烤烟内在品质的影响[J]. *山地农业生物学报*, 1999, 18(4): 227-230
- [13] Zhao MQ, Wang BX, Li FX, et al. Analysis of bacterial communities on aging flue-cured tobacco leaves by 16S rDNA PCR-DGGE technology[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 73(6): 1435-1440
- [14] Gong J, Liu YP, Li YY. Comparative analysis of microbial communities on tobacco leaves between clone library and high-throughput sequencing[J]. *Journal of East China Normal University (Natural Science)*, 2016(3): 92-101 (in Chinese)
- 龚俊, 刘玉配, 李媛媛. 烟叶表面微生物类群两种检测方法的比较研究[J]. *华东师范大学学报: 自然科学版*, 2016(3): 92-101
- [15] Chen XM, Lin Y, Liang SL. Enzyme production analysis and structure identification of bacterial communities on the tobacco leaves[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(7): 1760-1766 (in Chinese)
- 陈小敏, 林影, 梁书利. 烟叶表面微生物群落结构鉴定及其产酶分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(7): 1760-1766
- [16] Su C, Gu W, Zhe W, et al. Diversity and phylogeny of bacteria on Zimbabwe tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(5): 1033-1044
- [17] Huang JW, Yang JK, Duan YQ, et al. Bacterial diversities on unaged and aging flue-cured tobacco leaves estimated by 16S rRNA sequence analysis[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88(2): 553-562
- [18] Shu M, Fan H, Liu JL, et al. High-throughput bacterial analysis on aqueous extract of waste tobacco scrap[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2016, 49(4): 1-7 (in Chinese)
- 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
- [19] Chen SY, Li JJ, Lin J, et al. High-throughput sequencing fungal community structures in aging tobacco strips from different growing areas and stalk positions[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2018, 51(4): 12-19 (in Chinese)
- 陈善义, 李菁菁, 林俭, 等. 基于高通量测序的不同产地和部位自然醇化片烟真菌群落结构分析[J]. *烟草科技*, 2018, 51(4): 12-19
- [20] Zhou JX, Yu LF, Zhang XM, et al. Analysis of fungal community composition on the stored tobacco surfaces[J]. *Mycosystema*, 2018, 37(4): 434-443 (in Chinese)
- 周家喜, 喻理飞, 张晓敏, 等. 仓储烟叶表面真菌群落组成成分分析[J]. *菌物学报*, 2018, 37(4): 434-443
- [21] Reid JJ, Mckinsty DW, Haley EE. Studies on the fermentation of tobacco I. The microflora of cured and fermenting cigar-leaf tobacco[J]. *Pennsylvania Agricultural Experiment Station Bulletin*, 1933, 356: 1-17
- [22] Zhang XJ. Studies on artificial fermentation and microflora on leaf surface of cigar-wrapper tobacco[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2006 (in Chinese)
- 张晓娟. 雪茄外包皮烟人工发酵工艺及叶表微生物区系研究[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2006
- [23] Gong J. The diversity and dynamic of microorganism on flue-cured tobacco leaves during different aged phases[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China Normal University, 2015 (in Chinese)
- 龚俊. 烤后片烟储存过程中微生物多样性及变化动态[D]. 上海: 华东师范大学硕士学位论文, 2015
- [24] Wang Y, Ma LL, Lü X, et al. Effects of single and mixed culture solid state fermentation on main chemical components in cigarette blend[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2015, 48(11): 47-52 (in Chinese)
- 王颖, 马玲玲, 吕欣, 等. 单一和复配微生物固态发酵对卷烟叶组主要化学成分的影响[J]. *烟草科技*, 2015, 48(11): 47-52
- [25] di Giacomo M, Paolino M, Silvestro D, et al. Microbial community structure and dynamics of dark fire-cured tobacco fermentation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(3): 825-837
- [26] Du J, Zhang XJ, Wu G, et al. Studies on leaf surface microflora of cigar-wrapper during artificial fermentation[J]. *Current Biotechnology*, 2016, 6(3): 188-192,230 (in Chinese)
- 杜佳, 张晓娟, 吴钢, 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
- [27] Li XQ. Study on quantitative detection and mutant breeding of dominant bacteria on aging flue-cured tobacco leaves[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2008 (in Chinese)
- 李晓强. 陈化烤烟烟叶表面优势菌株的定量检测与诱变增效研究[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2008
- [28] Yang JK, Duan YQ, Chen CM, et al. Identification and phylogenesis analysis of cultivable microorganisms on tobacco leaf surface during aging[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2008(11): 51-55 (in Chinese)
- 杨金奎, 段焰青, 陈春梅, 等. 醇化烟叶表面可培养微生物的鉴定和系统发育分析[J]. *烟草科技*, 2008(11): 51-55
- [29] Zhou JX. Effects of microbial communities on quality of tobacco leaves in different storage environments[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2017 (in Chinese)
- 周家喜. 不同仓储环境微生物群落对烟叶陈化品质的影响[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2017
- [30] Li YF, Wang RL, Chen HX, et al. Identification and biological characterization of microorganisms resulted mildew cigarette[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2017, 50(6): 9-15 (in Chinese)
- 李跃锋, 王锐亮, 陈河祥, 等. 烟支霉变微生物的鉴定及其生物学特性分析[J]. *烟草科技*, 2017, 50(6): 9-15
- [31] Li SL, Wang YJ, Zhang BB, et al. Effect of roasted-rice leachate on tobacco microorganisms during fermentation process[J].

- Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2016, 14(2): 41-46 (in Chinese)
李士林, 王宜君, 张薄博, 等. 糊米汁对烟叶发酵过程中微生物的影响[J]. 生物加工过程, 2016, 14(2): 41-46
- [32] Koller JBC. Dertabak in Nature Wissenschaftlicher[M]. Augsburg: Land Wirtschaftlicher and Technischer Beziehung, 1858
- [33] Civilini M, Domenis C, Sebastianutto N, et al. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms[J]. Waste Management & Research, 1997, 15(4): 349-358
- [34] Chen CM, Li XM, Yang JK, et al. Isolation of nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. Nic22, and its potential application in tobacco processing[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, 62(3): 226-231
- [35] Ruan AD, Min H, Peng XH, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain HF-1, capable of degrading nicotine[J]. Research in Microbiology, 2005, 156(5/6): 700-706
- [36] Zhong WH, Zhu CJ, Shu M, et al. Degradation of nicotine in tobacco waste extract by newly isolated *Pseudomonas* sp. ZUTSKD[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(18): 6935-6941
- [37] Li J, Zhao JX, Tian FW, et al. Isolation and characterization of a nicotine-degrading strain Z7[J]. China Biotechnology, 2007, 27(11): 82-85 (in Chinese)
李珏, 赵建新, 田丰伟, 等. 一株降烟碱细菌的筛选、鉴定及降解特性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(11): 82-85
- [38] Wu LW. Isolation of nicotine degradation microbe and its application in the tobacco stalks composting fermentation[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese)
伍良伟. 降解烟碱微生物的筛选及在烟秆腐熟发酵中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2013
- [39] Zhao LP, Xia ZY, Lei LP, et al. Isolation and nicotine degrading characterization of strain 11L140[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2013, 28(3): 366-371 (in Chinese)
赵丽萍, 夏振远, 雷丽萍, 等. 烟碱降解菌株 11L140 的鉴定及降解特性研究[J]. 云南农业大学学报, 2013, 28(3): 366-371
- [40] Chen C, Ma GH, Lei LP, et al. Isolation, identification and characteristics of nicotine-degrading bacterium strain 5-28[J]. Tobacco Science & Technology, 2012(5): 74-78 (in Chinese)
陈晨, 麻广慧, 雷丽萍, 等. 烟碱降解细菌 5-28 菌株的分离鉴定和降解特性[J]. 烟草科技, 2012(5): 74-78
- [41] Zhou JX, Zhang XM, Hu DM, et al. Isolation and identification of ammonifying bacteria in the flue-cured tobacco and characteristics of degrading organic nitrogen[J]. Chinese Journal of Ecology, 2016, 35(11): 3005-3011 (in Chinese)
周家喜, 张晓敏, 胡大鸣, 等. 陈化烟叶中氨化细菌鉴定及有机氮降解特性[J]. 生态学杂志, 2016, 35(11): 3005-3011
- [42] Li N, Wang CG, Zeng DL, et al. Isolation and identification of *Bacillus cereus* and its application in cigar leaf fermentation[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2012, 18(2): 65-69 (in Chinese)
李宁, 汪长国, 曾代龙, 等. 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)筛选鉴定及在雪茄烟叶发酵中的应用研究[J]. 中国烟草学报, 2012, 18(2): 65-69
- [43] Feng ZZ, Chen TC, Hu XH, et al. Solation, screen and identification of *Bacillus* with high proteolytic activity from tobacco leaf surfaces[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2012, 18(1): 101-105 (in Chinese)
冯志珍, 陈太春, 胡喜怀, 等. 烟叶表面高效降解蛋白质芽孢杆菌的分离筛选及其鉴定[J]. 中国烟草学报, 2012, 18(1): 101-105
- [44] Izquierdo Tamayo A. Bacteria in tobacco fermentation[J]. TA, 1958(2): 2146
- [45] Malik VS, Semp BA, Bravo HG, et al. Thermophilic denitrification of tobacco: US, 4685478[P]. 1987-08-11
- [46] Zheng QA. Study of the application of microorganism quality-enhancer in manufacturing tobacco slice by papermaking process[J]. Journal of Zhejiang University of Technology, 2004, 32(4): 442-446,458 (in Chinese)
郑勤安. 造纸法再造烟叶生产过程中微生物增质剂的应用研究[J]. 浙江工业大学学报, 2004, 32(4): 442-446,458
- [47] Sun Z. Screening of denitrifying bacteria and its application on TSNA reduction[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2011 (in Chinese)
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
- [48] 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)
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
- [49] Li W. Studies on decreasing nicotine by endophyte in tobacco[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2011 (in Chinese)
李薇. 内生菌降低烟草 TSNA 研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2011
- [50] Tamayo AI, Cancho FG. Microbiology of the fermentation of Spanish tobacco[R]. Rome: International Congress of Microbiology, 1953: 48-50
- [51] Yu X, Li YS, Liu D, et al. Isolation and identification of an aroma-producing strain and optimization of its fermentation condition[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2016, 28(4): 670-675 (in Chinese)
余翔, 李元实, 刘栋, 等. 一株增香微生物的分离鉴定及其发酵产香条件优化[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(4): 670-675
- [52] Chen X, Zhang TD, Dang LZ, et al. Study on improving tobacco quality by using *Bacillus siamensis*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2016, 30(2): 322-327 (in Chinese)
陈兴, 张天栋, 党立志, 等. 利用西姆芽孢杆菌改善烟叶品质的研究[J]. 云南农业大学学报: 自然科学, 2016, 30(2): 322-327
- [53] Chen CQ. Study on effect of tobacco's quality through exerting addictive in tobacco factory[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2008: 5 (in Chinese)
陈长清. 添加剂在卷烟生产中应用对烟叶品质影响的研究[D].

- 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2008: 5
- [54] Chen XM. Identification of culturable microorganisms from surface of air-cured tobacco and its application in tobacco processing[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2016 (in Chinese)
陈小敏. 晾晒烟表面可培养微生物的鉴定及其在烟草加工上的应用[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2016
- [55] Chen ZY. Research and application of bio-fungicide with *Bacillus* spp.[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(5): 723-732 (in Chinese)
陈志谊. 芽孢杆菌类生物杀菌剂的研发与应用[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 723-732
- [56] Deng GB, Li XM, Li CB, et al. Improving tobacco quality with pectin-degrading microorganisms[J]. Tobacco Science & Technology, 2003(11): 17-18,20 (in Chinese)
邓国宾, 李雪梅, 李成斌, 等. 降果胶菌改善烟叶品质研究[J]. 烟草科技, 2003(11): 17-18,20
- [57] Li GD, Ma HY, Yu JJ, et al. Effect on using cellulase to degradate cellulose in flue-cured tobacco[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2008, 24(12): 256-259 (in Chinese)
李国栋, 马海燕, 于建军, 等. 纤维素酶降解烟叶中纤维素的作用效果[J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 256-259
- [58] Ruan XW, Ren P, Chen WF. Effects of enzyme on internal quality of tobacco leaves[J]. Food Research and Development, 2005, 26(1): 67-68 (in Chinese)
阮祥稳, 任平, 陈卫锋. 酶对烟叶发酵内在品质的影响[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(1): 67-68
- [59] Li ML, Xia BL, Zhang Y. Study on exogenous enzymes to improve the chemical composition of tobacco leaves[A]//2005 Symposium on Tobacco Chemistry, China Tobacco Society Industrial Committee[C]. Haikou: Tobacco Society of China, 2005: 565-567 (in Chinese)
李敏莉, 夏炳乐, 张扬. 外源酶改善烟叶内在化学成分的研究[A]//中国烟草学会工业专业委员会烟草化学学术研讨会论文集[C]. 海口: 中国烟草学会, 2005: 565-567
- [60] Wu X. Preliminary study on enzyme using to improve quality of tobacco leaves at Yuxi[D]. Kunming: Master's Thesis of Kunming University of Science and Technology, 2011 (in Chinese)
吴潇. 酶制剂改善玉溪低次等烟叶内在品质的初步研究[D]. 昆明: 昆明理工大学硕士学位论文, 2011
- [61] Wang JL. Studies on the development and mechanisms of protease enzyme preparation used in tobacco[D]. Kunming: Master's Thesis of Kunming University of Science and Technology, 2012 (in Chinese)
王继莲. 烟用蛋白酶制剂的研发及其作用机制研究[D]. 昆明: 昆明理工大学硕士学位论文, 2012
- [62] Liu MS. Application of lactase in tobacco leaf fermentation[D]. Kunming: Doctoral Dissertation of Kunming University of Science and Technology, 2009 (in Chinese)
刘谋盛. 乳状液酶在烟叶发酵过程中的应用研究[D]. 昆明: 昆明理工大学博士学位论文, 2009
- [63] Song LY, Li ZH, Liu YT, et al. The study of the application of the bio-enzymes on improving the smoking quality of the reconstituted tobacco[J]. Journal of Guangxi Agriculture, 2009, 24(5): 33-36 (in Chinese)
宋凌勇, 李志华, 刘远涛, 等. 应用生物酶制剂改善再造烟叶内在品质的研究[J]. 广西农学报, 2009, 24(5): 33-36
- [64] Schenk S, Hoelz A, Krauß B, et al. Decker K. Gene structures and properties of enzymes of the plasmid-encoded nicotine catabolism of *Arthrobacter nicotinovorans*[J]. Journal of Molecular Biology, 1998, 284(5): 1323-1339
- [65] Ma L. Study on changing tobacco chemical components for improving its smoking quality and safty by bio-technology[J]. Journal of Zhengzhou Institute of Technology, 2001, 22(3): 40-42,45 (in Chinese)
马林. 利用生物技术改变烟叶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, 22(3): 40-42,45
- [66] Sun WS. Effect of nitrate nitrogen level in tobacco leaves and nitrate scavenger on TSNA formation during high temperature storage[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2016 (in Chinese)
孙榭淑. 硝态氮含量及硝酸盐清除剂对烟叶高温贮藏过程中TSNA形成的影响[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2016
- [67] Li MY. Advances in improvement of tobacco leaf quality by microorganisms[J]. Industrial Microbiology, 2006, 36(3): 43-48 (in Chinese)
李梅云. 微生物改善烟叶品质研究进展[J]. 工业微生物, 2006, 36(3): 43-48
- [68] Grether-Beck S, Igloi GL, Pust S, et al. Structural analysis and molybdenum-dependent expression of the pAO1-encoded nicotine dehydrogenase genes of *Arthrobacter nicotinovorans*[J]. Molecular Microbiology, 1994, 13(5): 929-936
- [69] Zhao Y, Zhong GF, Yang XP, et al. Bioconversion of lutein to form aroma compounds by *Pantoea dispersa*[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(8): 1687-1692
- [70] Ma XK, Daugulis AJ. Effect of bioconversion conditions on vanillin production by *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 through an analysis of competing by-product formation[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37(5): 891-899
- [71] Liu S, Cui K, Zeng ST, et al. Analysis of blend and aerosol composition of two heat-not-burn tobacco products[J]. Tobacco Science & Technology, 2016, 49(11): 56-65 (in Chinese)
刘珊, 崔凯, 曾世通, 等. 加热非燃烧型烟草制品剖析[J]. 烟草科技, 2016, 49(11): 56-65