

# 烟草调制期间微生物研究进展

祝明亮\*

(云南省烟草科学研究所 玉溪 653100)

**摘要:** 烟草调制期间, 烟叶上的微生物对烟叶产品质量具有重要影响。从微生物的主要类群、变化动态、对烟叶品质的影响及其控制利用等方面进行了阐述。

**关键词:** 烟草调制, 微生物, 变化动态, 控制与利用

## Advances in Microbes During Tobacco Curing

ZHU Ming-Liang\*

(Yunnan Tobacco Science Research Institute, Yuxi 653100)

**Abstract:** During curing of harvested fresh tobacco leaves, microbes affect obviously the quality of tobacco leaves. This review provides the advance in main groups, occurrence dynamics, effects to quality of tobacco leaves, and control and utilization.

**Keywords:** Tobacco curing, Microbes, Occurance dynamics, Control and utilization

烟草在田间生长一定时间后, 烟叶逐渐生长成熟, 经采摘后获得的鲜烟叶是一类富含水分和富有生命力的烟草器官, 既不能吸用, 也无法保存, 只有就地加工, 才可能成为产品, 通常将这一加工过程称为烟草调制<sup>[1]</sup>。烟叶表面和环境中存在大量的微生物, 它们在鲜烟叶调制过程中对烟叶产品的形成及其品质产生了不同的作用。烟叶调制加工所需时间较短, 此期间微生物的活动及其对烟叶品质的影响也较少受到关注, 对它们的研究报道较少。随着烟草调制对烟叶产品质量重要性认识的加深, 烟草调制期间微生物的活动规律及其影响日益引起人们的重视。

### 1 烟草调制期间微生物的主要类群

烟草成熟后采摘的鲜烟叶上, 存在细菌、真菌、酵母、放线菌等不同的微生物。这些微生物在烟叶

调制期间由于受到调制环境条件的影响, 其不同类群的数量在调制过程中可表现出不同的变化趋势, 某些微生物可成为优势类群, 而一些微生物则成为次要类群。Morin A等<sup>[2]</sup>对加拿大烤烟调制期间的微生物类群进行了研究, 结果表明细菌是调制烟叶上的优势微生物类群, 其次是真菌(包括酵母和霉菌)和耐热放线菌。张玉玲等<sup>[3]</sup>对白肋烟晾制期间的细菌进行了分离鉴定, 结果表明在整个晾制期间假单胞菌属(*Pseudomonas*)分离菌株数较多, 而不同晾制时期细菌的主要类群不同。晾制前期(0 d~15 d)的细菌主要类群为假单胞菌属、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、根瘤菌属(*Rhizobium*); 晾制中期为假单胞菌属、肠杆菌属(*Enterobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)和副球菌属(*Paracoccus*); 晾制末期为节杆菌属(*Arthrobacter*)、肠杆菌属、泛菌属、红

球菌属(*Rhodococcus*)和棒杆菌属(*Corynebacterium*)。祝明亮等<sup>[4]</sup>从白肋烟TN90和TRM的2个品种分离到33株内生细菌,经初步鉴定属于假单胞菌属、黄单胞菌属、节杆菌属、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、棒杆菌属、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、气球菌属(*Aerococcus*)和利斯特氏菌属(*Listeria*),这些内生细菌由于存在于白肋烟组织内,可随采摘收获的鲜烟叶存在于烟草调制过程中。

## 2 烟草调制期间微生物变化动态

尽管烟草调制是一个复杂的物理化学反应过程,但这一加工过程的显著特征是富含水分的鲜烟叶失水而成水分含量较低的干烟叶。此外,除白肋烟、香料烟在自然温度条件下的晾棚内进行调制外,烤烟在特制的烤房内进行烘烤调制的过程中,要经历从自然温度到最高67℃的温度变化。因此,环境温度的变化和烟叶水分含量的减少对微生物的动态变化具有不同影响。Morin A等<sup>[2]</sup>研究表明,在烤烟烘烤过程中,细菌和霉菌的数量,从烘烤开始到结束,减少10~100倍,而耐热放线菌在烘烤过程中种群数量变化不大,而且直接加热和间接加热两种不同的烘烤处理中,细菌、真菌和放线菌的种群数量没有明显差异。张树堂等<sup>[5]</sup>研究了不同烘烤方式和烘烤条件下烤烟中细菌的种类和数量变化,结果表明,细菌总量在烤烟烘烤开始后逐渐增多,到48 h时烟叶变黄前后达到最大,每克干烟叶样品所带的细菌数量由烘烤前的 $2.6 \times 10^5 \sim 3.3 \times 10^5$ 个增到 $2.6 \times 10^6 \sim 6.5 \times 10^6$ 个,其后随烟叶的脱水干燥,细菌数量逐渐下降。在不同的烘烤方式中,以密集烘烤的细菌数量增加最多,保持高细菌数量的时间最长,每克干烟叶样品的细菌数量由烘烤前的 $3.04 \times 10^5$ 个增加到48 h时的 $6.5 \times 10^6$ 个,到72 h时仍为 $1.62 \times 10^6$ 个;普通烘烤次之,细菌数量由 $3.29 \times 10^5$ 个增加到 $4.63 \times 10^6$ 个,72 h时为 $2.75 \times 10^5$ 个;自动烤箱最低,细菌数量由 $2.63 \times 10^5$ 个增加到 $2.62 \times 10^6$ 个,再降至72 h时的 $1.97 \times 10^5$ 个。在不同的变黄温湿度间,以高温高湿变黄条件下细菌数量增加最多,由 $2.63 \times 10^5$ 个增加到48 h时的 $4.61 \times 10^6$ 个;其次为高温低湿,由 $3.23 \times 10^5$ 个增加到 $3.51 \times 10^6$ 个;低温高湿和低温低湿相接近。到72 h后,温度上升到50℃以上,叶片逐渐失水干燥,细菌量降低,各处理的细菌量趋于一致。试验表明,细菌种类随烘烤时间的增加而

减少,烘烤方式和烘烤条件对细菌类群的变化无明显影响;细菌数量在变黄期逐渐增加,烟叶变黄时达最大,以后逐渐减少;在密集烘烤和高温高湿条件下,细菌数量高于普通烘烤和低温低湿条件下,说明采用低温低湿变黄有可能抑制细菌活动。张玉玲等<sup>[3]</sup>研究表明,白肋烟砍收时烟叶中细菌含量最大,随着晾制时间的延长,细菌的含量逐渐减小,到晾制40 d时,烟叶细菌含量达到最小值。但在晾制10 d~15 d期间,烟叶中的细菌数量逐步上升。总体表现为晾制前期细菌数量较大,而随着时间的推移数量逐渐减少,该研究结果与Koga K等<sup>[6]</sup>的研究结果相似。

## 3 烟草调制期间微生物对烟叶品质的影响

由于烟草调制加工的时间相对较短,微生物对烟草调制加工的影响研究报道较少。但目前的研究表明,微生物对烟草调制的影响主要表现在引起烟叶腐烂变质和烟草特有亚硝胺(Tobacco-specific nitrosamines,简称TSNAs)的积累两个方面。

### 3.1 引起烟叶腐烂变质

由于收获的鲜烟叶不可避免带有部分病原菌,它们将继续存在于调制期间的烟叶上,一旦条件适宜,这些微生物将大量繁殖引起烟叶的腐烂变质。如核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、灰霉菌(*Botrytis cinerea*)和细链格孢菌(*Alternaria tenuis*)引起雪茄烟调制腐烂病<sup>[7]</sup>,少根根霉(*Rhizopus arrhizus*)在津巴布韦南部引起凉烟的腐烂病,瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)和胡萝卜软腐欧氏杆菌(*Erwinia carotovora*)在美国东南部引起烤烟在烘烤期间的腐烂病害<sup>[8]</sup>。研究表明,欧氏杆菌可引起烤烟在烤房内的炕腐病,并导致烟叶TSNAs数量增加<sup>[9]</sup>;赤星病菌(*Alternaria alternata*)在烘烤过程中的病斑数量和病斑面积均继续增加60%以上,对烟叶烘烤造成较大的损失;感染烟草空茎病菌(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)的烟株烟叶在潮湿季节采收后在烤房内会发生“吊腐”,引起叶柄腐烂,叶片脱落,并发出烂菜气味<sup>[10]</sup>。此外,由于烟叶调制过程中的某些阶段温湿度较大,容易引起环境中的一些微生物(如曲霉、青霉等)的快速生长繁殖,引起烟叶的腐烂变质;一些细菌还引起烤房内烟叶叶柄腐烂掉落,造成严重损失。浅色晾烟在调制过程中如遇高湿度条件,将会延缓调制过程,为真菌和细菌提供理想

的生长繁殖条件, 这些微生物对烟叶的损坏称为室烧, 使烟叶干物质减少, 品质下降<sup>[11]</sup>。

### 3.2 引起烟叶 TSNAs 含量的积累

烟草中的TSNAs是一组仅发现于烟草及其制品的致癌物质, 主要包括N-亚硝基去甲基烟碱(NNN)、4-(N-甲基-亚硝基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK)、N-亚硝基新烟草碱(NAT)和N-亚硝基假木贼碱(NAB)等4种成分, 其中NNN和NNK具有显著的致癌作用, 而NAB和NAT则无明显的致癌作用<sup>[12]</sup>。20世纪80年代以来, TSNAs成为烟草科学研究中最受关注的领域之一<sup>[13]</sup>。TSNAs是由于天然存在的烟草生物碱的亚硝化作用而形成的。烟叶中的TSNAs基本都是在采收后的调制过程中产生的。微生物在TSNAs的形成中起着重要作用, 在调制过程中改变微生物活性和数量, 也必然会影响TSNAs的累积。研究证明: 调制期叶片表面的湿度与微生物活性在一定范围内呈线性关系, 叶片表面相对湿度小, 微生物活性低, 产生的亚硝酸盐和TSNAs的量少。因此, 调制时适当降低空气和叶片表面湿度将有利于降低烟叶中的TSNAs含量。另外, 也有实验证明, 调制前用利福平、链霉素等药物处理过的叶片, 其表面的微生物数量减少, 调制后TSNAs含量降低<sup>[14]</sup>。在高湿度和空气流通条件下, 烤烟容易发生在收获前就已经感染的细菌性炕腐病。深棕色至黑色叶片和溶解的髓部为炕腐病特征。明显带有炕腐病斑的烟叶被作为“氧化”叶分级。该病由致病的欧氏杆菌引起, 这些细菌是兼性厌氧菌。调制时, 它们利用硝酸盐来呼吸, 产生氧化氮, 氧化氮和生物碱反应生成TSNAs。Harvey等<sup>[9]</sup>通过分析采用热交换器避免燃气接触烤房内烘烤烟样的TSNAs、生物碱、糖和硝酸盐, 以判断炕腐病烟叶的TSNAs含量是否增加, 分析结果表明, 去除主脉的炕腐病上部烟叶与正常上部烟叶比较, 有7个处理的TSNAs含量偏高, 而脚叶(NIXO等级)主脉和叶片的TSNAs含量较高, 总生物碱、糖和硝酸盐含量下降, 由此推断在烘烤过程中炕腐病的发展导致了TSNAs含量的增加。目前大多数假设认为: 在调制过程中, 烟草中的硝酸盐被微生物还原为亚硝酸盐以及氮氧化物(NO<sub>x</sub>), 然后与烟草生物碱作用形成TSNAs<sup>[15-19]</sup>。不同类型烟草的TSNAs含量以白肋烟最高, 香料烟和烤烟都较低, 表明烟草TSNAs含量与微生物活动、烟草类型、调制方式和调制条件等有关。

## 4 烟草调制期间微生物的控制与利用

目前的研究表明, 烟草调制期间某些微生物的活动会引起烟叶腐烂变质或增加白肋烟的TSNAs含量, 必须对这些微生物加以控制, 以降低它们对烟草调制加工带来的不利影响, 通过适当改进调制方式, 加强调制过程中温湿度的管理等方法, 最大限度减少微生物对烟草调制带来的负面影响。同时, 也有研究表明, 某些微生物具有降低白肋烟TSNAs含量的作用<sup>[4,20-22]</sup>, 可通过筛选获得一些对烟草品质有利的微生物应用于烟草调制过程中, 以达到降低烟草有害物质, 提高烟叶品质的目的。

祝明亮等<sup>[4]</sup>从白肋烟内生细菌中筛选出TEB11、TEB17、TEB23、TEB26、TEB30、TEB34等6株还原硝酸盐和亚硝酸盐能力较强的菌株, 以粉碎烟叶接种、叶柄浸泡接种和叶面喷雾接种3种方式处理调制白肋烟后, 化验分析结果表明, 接种内生细菌能降低27.56%~99.88%的白肋烟TSNAs含量, 降低百分率以粉碎烟叶接种最高, 其次是叶柄浸泡接种, 叶面喷雾接种最低。张玉玲等<sup>[21]</sup>利用筛选到的细菌菌株WB5分别对移栽成活的烟株进行细菌灌根处理, 烟株砍收时进行细菌喷洒烟叶处理, 并以砍收时进行清水喷洒烟叶为对照的田间小区试验, 晾制期间对烟叶样品进行4种烟草特有亚硝胺测定, 检测整个晾制期间烟叶中TSNAs含量的动态变化。结果表明, 晾制前期(晾制20d以前), 烟叶中TSNAs含量比较低且变化幅度较小, 灌根处理的TSNAs含量稍高; 晾制中期(20d~30d), 烟叶中TSNAs含量都较高, 灌根处理烟叶的TSNAs含量最高; 晾制末期, 灌根和喷洒处理烟叶中TSNAs含量明显降低, 其中灌根处理比同一时期对照烟叶中TSNAs含量降低50.98%, 喷洒处理比同一时期对照烟叶中TSNAs含量降低81.32%。雷丽萍等<sup>[22]</sup>从白肋烟TN90品种的主脉中分离到1株内生芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)WT, 在温室移栽时将该菌株接种于白肋烟TN90, 并在收获后喷施该细菌悬液于烟叶表面, 调制结束后进行亚硝胺类物质的检测, 结果表明, 接种WT菌株后白肋烟TSNAs总量比对照减少, 其中叶片组织减少21.7%~44.6%, 主脉组织减少16.7%~80%, 整个根系接种分别降低叶片和主脉组织38%和80%的TSNAs含量, 叶面喷施降低叶片组织44.6%的TSNAs含量。

目前推测, 微生物降低白肋烟TSNAs含量可能包括两个方面的作用, 一方面是接种还原硝酸盐和亚硝酸盐的微生物后, 由于其数量远大于引起TSNAs 积累的自然微生物类群, 抑制了自然微生物类群的生长繁殖, 接种微生物成为优势类群后大量生长繁殖, 在这个过程中大量还原白肋烟烟叶内的硝酸盐和亚硝酸盐, 减少了形成TSNAs的前体物质, 导致白肋烟TSNAs含量的下降<sup>[4]</sup>; 另一方面是接种微生物产生抗生素类物质抑制了烟叶表面引起TSNAs累积微生物的生长繁殖, 从而降低了白肋烟TSNAs的含量<sup>[22]</sup>, 但有关作用机理尚待深入研究。

烟草调制是烟叶采收后的一个重要加工环节, 其可控性非常强, 对利用微生物改进提高烟叶品质非常有利。微生物资源丰富, 代谢功能复杂, 而且易于培养再生, 因此, 筛选开发利用对烟草品质有利的微生物具有非常大的前景。最近, Giacomo等<sup>[23]</sup>报道了研究任何类型的烟草发酵、烤制、醇化和储存的基础以及利用标准或者分子的方法研究烟草微生物学的方法和程序。随着研究技术的不断发展, 对烟草调制期间微生物的研究将不断扩展深入, 有利于人们进一步认识和了解这类微生物的活动规律, 积极利用和控制它们对烟叶品质的影响。

## 参 考 文 献

- [1] 王能如主编. 烟叶调制与分级. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 2002, pp.1-4.
- [2] Morin A, Porter A, Ratavicius A. *et al.* Evolution of tobacco-specific nitrosamines and microbial populations during flue-curing of tobacco under direct and indirect heating. *Contributions to tobacco Research*, 2004, **21**(1): 40-46.
- [3] 张玉玲, 黄 琼, 汪安云, 等. 白肋烟晾制期间烟叶中细菌的分离和鉴定. *中国烟草学报*, 2007, **13**(2): 37-40.
- [4] 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. *微生物学报*, 2004, **44**(4): 422-426.
- [5] 张树堂, 祝明亮, 杨雪彪. 烘烤方式及烘烤条件对烤烟烘烤中细菌变化的影响. *烟草科技*, 2001, **4**: 42-43.
- [6] Koga K, Katsuya S, Sakanushi M, *et al.* Change in nitrate-reducing bacteria flora on leaves of burley tobacco during air-curing and nitrate-reducing abilities of isolated bacteria. *Tobacco Science Research Conference Abstract*, 2001, **55**: 76.
- [7] 许大凤, 杨建卿, 檀根甲. 储烟病害研究及其进展. *安徽农业科学*, 2005, **33**(8): 1912-1914.
- [8] Holdeman QL, Burkholder WH. The identity of barn rots of flue-cured tobacco in South Carolina. *Phytopathology*, 1956, **46**: 69-72.
- [9] Harvey W SPURR Jr, Arnold HAMM Jr. 烘烤过程中亚硝胺随炕腐病的发展而增加. 中国烟草学会, 中国科技大学烟草与健康研究中心译. 第 57 届烟草科学研究会论文集, 2003, p.53.
- [10] 朱贤朝, 王彦亭, 王智发主编. 中国烟草病害. 北京: 中国农业出版社, 2001, p.174.
- [11] Davis DL, Nielsen MT. 烟草生产, 化学和技术. 国家烟草专卖局科技教育司, 中国烟草科技信息中心组织翻译. 北京: 化学工业出版社, 2003, p.143.
- [12] Cui MW, Burton RH, Bush LP. Effect of maleic hydrazide application on accumulation of tobacco-specific nitrosamines in air-cured burley tobacco. *J Agric Food Chem*, 1994, **42**(12): 2912-2916.
- [13] Hecht SS. Biochemistry, Biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol*, 1998, **11**: 559-603.
- [14] 刘万峰, 王元英. 烟叶中烟草特有亚硝胺(TSNA)的研究进展. *中国烟草科学*, 2002, **2**: 11-14.
- [15] Bush LP, Hamilton JL, Davis DL. Chemical quality of burley tobacco modified by curing regime. *Tob Chem Res Con*, 1979, **33**: 10.
- [16] Burton HR, Childs GH, Anderson RA, *et al.* Changes in chemical composition of tobacco during senescence and curing. Tobacco-specific nitrosamines. *J Agric Food Chem*, 1989, **37**(2): 426-430.
- [17] Burton HR, Dye NK, Bush LP. Relationship between tobacco-specific nitrosamines and nitrate from different air-cured tobacco varieties. *J Agric Food Chem*, 1994, **42**(11): 2007-2011.
- [18] Tso TC. Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant. Ideals Inc: Beltsville, Maryland, 1990, p.753.
- [19] Wiernik A, Christakopoulos A, Johansson L, *et al.* Effect of air-curing on the chemical composition of tobacco. *Rec Adv Tob Sci*, 1995, **21**: 39-80.
- [20] Katsuya S, Koga K, Saito H. Reduction of TSNA in burley tobacco leaves using bacteria. *Coresta Congress Programme and Abstracts*, 2006, **50**: 73.
- [21] 张玉玲, 汪安云, 黄 琼, 等. 施用细菌菌株(WB5)对烟草特有亚硝胺含量变化的初步研究. *中国烟草学报*, 2004, **10**(6): 29-32.
- [22] 雷丽萍. 烟草内生芽孢杆菌降低烟叶亚硝胺类物质含量的研究. *西南农业学报*, 2007, **20**(3): 515-520.
- [23] Giacomo MD, Paolino M, Silvestro D, *et al.* Microbial community structure and dynamics of dark fire-cured tobacco fermentation. *Applied and Environment Microbiology*, 2007, **73**(3): 825-837.