

不同品质烟叶微生物群落与其挥发性成分的关联研究

黄贺敏^{1,2}, 吴丽香^{1,2}, 邓梅忠³, 王雨晴^{1,2}, 张雯^{1,2}, 陈善义³,
张恩仁³, 詹仁锋³, 方璟³, 倪莉^{1,2}, 李菁菁^{*3}

(1. 福州大学 食品科学技术研究所, 福建 福州 350108; 2. 福建省食品生物技术创新工程技术研究中心, 福建 福州 350108; 3. 福建中烟工业有限责任公司, 福建 厦门 361021)

摘要: 为揭示烟叶表面优势微生物群落与其品质的关系, 采用高通量技术分析了不同品质烟叶的微生物群落结构, 使用固相微萃取与气相色谱-质谱联用技术检测其挥发性香气物质, 通过计算 Pearson 相关系数分析与烟叶挥发性香气成分形成相关的优势微生物种属。结果显示, 烟叶中优势细菌为贪噬菌属 (*Variovorax*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Spingomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 优势真菌为桑帕约氏酵母 (*Sampaiozyma*)、曲霉 (*Aspergillus*)、枝孢霉属 (*Cladosporium*)。细菌群落与烟叶品质差异相关, 贪噬菌属 (*Variovorax*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Spingomonas*)、红球菌属 (*Rhodococcus*) 等的相对丰度在上等烟、中等烟中上调; 而真菌群落与烟叶的地域差异相关。在中、上等烟中含有较高呈焦糖香的糠醛和 5-羟甲基糠醛, 呈甜奶香的香兰素等挥发性成分; 下等烟中则含有更多 α -尼古丁, 增加烟气刺激性。结合相关性分析, 发现细菌物种与烟叶中多种挥发性香气物质呈正相关, 红球菌属 (*Rhodococcus*)、贪噬菌属 (*Variovorax*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 是烟叶中主要的风味关联菌。结果表明烟叶中优势菌群在促进其香气品质形成中发挥着重要作用, 这为实现以微生物技术对烟叶提质减害、风味定向调控提供了理论参考。

关键词: 烟叶品质; 微生物群落结构; 挥发性成分

中图分类号: S 961.6 文章编号: 1673-1689(2022)12-0085-11 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.12.010

Study on the Correlation Between Microbial Communities and Volatile Aroma Compounds in Tobacco Leaves of Different Qualities

HUANG Hemin^{1,2}, WU Lixiang^{1,2}, DENG Meizhong³, WANG Yuqing^{1,2}, ZHANG Wen^{1,2},
CHEN Shanyi³, ZHANG Enren³, ZHAN Renfeng³, FANG Jing³, NI Li^{1,2}, LI Jingjing^{*3}

(1. Institute of Food Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China; 2. Fujian Center of Excellence for Food Biotechnology, Fuzhou 350108, China; 3. China Tobacco Fujian Industrial Co., Ltd., Xiamen 361021, China)

Abstract: To reveal the relationship between the dominant microbial communities on tobacco leaf surface and the quality of tobacco, the structure of microbial community in tobacco with different qualities was analyzed by high-throughput sequencing technique, and the volatile aroma compounds

收稿日期: 2022-07-13

基金项目: 中国烟草总公司重点研发项目(110202102017); 福建中烟工业有限责任公司科技项目(FJZYKJJH2020008)。

* 通信作者: 李菁菁(1985—), 男, 硕士, 农艺师, 主要从事烟叶原料方面的研究。E-mail: lj23025@fjtic.cn

were detected by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC/MS), and the dominant microbial species related to the formation of volatile aroma components in tobacco were analyzed by calculating Pearson correlation coefficient. The results showed that the dominant bacteria in tobacco were *Variovorax*, *Spingomonas*, and *Bacillus*, while the dominant fungi were *Sampaiozyma*, *Aspergillus*, and *Cladosporium*. The bacterial communities were related to the difference of tobacco leaf qualities, and the relative abundance of *Variovorax*, *Spingomonas*, and *Rhodococcus* was up-regulated in the high-grade and middle-grade tobacco leaves. However, the fungal communities were related to the geographic location differences of tobacco leaves. The contents of volatile compounds were higher in high-grade and middle-grade tobacco, such as furfural and 5-methyl-2-furancarboxaldehyde of caramel aroma, and sweet milk-flavored vanillin. There was more α -nicotine producing irritating smoke in the low-grade tobacco. Combined with the correlation analysis, a positive correlation was found between bacterial species and various volatile aroma compounds in tobacco leaves, and *Rhodococcus*, *Variovorax* and *Bacillus* were the main flavor-associated bacteria in tobacco. The results showed that the dominant microbiota in tobacco played a critical role in promoting the formation of tobacco aromatic quality, which could provide a theoretical reference for the realization of tobacco quality improvement and damage reduction, as well as the targeted regulation of flavor based on the microbial technology.

Keywords: tobacco quality, microbial community structure, volatile components

醇化是烟叶加工过程中的重要步骤,对烟叶的品质影响尤为突出。微生物作为烟叶醇化过程中的主要生物驱动力,可参与烟叶中蛋白质、烟碱和香气前体物质等分解转化^[1],促进烟叶本身独特风味的形成,从而提升烟叶品质。

近年来,学者们对烟叶醇化中的微生物群落结构、微生物菌群及其功能特征进行了相关研究。Huang等分别对未醇化和已醇化的 K326 烤烟细菌群落进行分析,发现鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas* sp.)等可促进烟叶醇化进程^[2];而醇化后的津巴布韦烟叶中微生物群落主要以假单胞菌属(*Pseudomonas*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和丘氏菌属(*Buttiiauxella izardii*)为主导,具有改善烟叶品质的潜力^[3]。烟叶中化学成分含量的差异直接决定烟叶香吃味的形成,且与微生物作用相关。Zhang等明确了云南和河南烤烟的差异成分为绿原酸、西柏烷类致香物质(α -和 β -4,8,13-西柏三烯-1,3-二醇)^[4],而高通量测序表征河南和云南烟叶中优势菌群分别为栖热菌属(*Thermus*)和不动杆菌属(*Acinetobacter*)、经黏液真杆菌属(*Blautia*)和瘤胃球菌属(*Ruminococcus*),且两产区的优势菌群在芳香化合物代谢方面存在差异^[5]。此外,Zhang等对烤烟香型风格与微生物菌群进行表征,发现黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、葡萄

球菌属(*Staphylococcus*)、枝孢属(*Cladosporium*)、洛德酵母属(*Lodderomyces*)均与清香型风格显著正相关,而镰刀菌(*Fusarium*)、丛赤壳菌属(*Cryphonectria*)和青霉(*Cyanoderma*)与浓香型风格呈显著正相关^[6]。

由此可见,烟叶中存在丰富多样的微生物菌群,且其多样性与烟叶的风味和品质可能存在着关联。为此,以来自福建和云南两个产地上等烟、中等烟和下等烟为研究对象,解析烟叶中细菌和真菌群落组成及多样性,并通过多元统计分析方法分析微生物群落与挥发性风味物质之间的相关性,旨在解析促进烟叶香韵特征形成的关键微生物,为筛选和利用关键微生物改善烟叶品质提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

烟叶样品:福建中烟工业有限责任公司提供,分别为福建和云南的上等烟、中等烟和下等烟各2份(具体信息见表1)。采集的样品混合均匀转移至无菌袋中置于-4℃下保存备用。

50/30 μ m DVB/CAR/PDMS 和 Stableflex 固相微萃取头:默克 Supelco 公司产品;Agilent 5975C 气质联用仪(GC-MS):美国安捷伦科技公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 样品 DNA 提取和 Illumina MiSeq 测序 称取 10 g 烟叶于锥形瓶中,加入 60 mL PBS(pH 7.4)溶液,200 r/min 振荡 40 min;取 40 mL PBS 缓冲液少量多次冲洗烟叶,收集总洗涤液,经超滤(0.22 μm)富集滤膜上的菌泥,用于基因组 DNA 抽提。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

品质分级	样品编号
上等烟	HY-1、HY-2 HF-1、HF-2
中等烟	MY-1、MY-2 MF-1、MF-2
下等烟	LY-1、LY-2 LF-1、LF-2

注:H、M 和 L 分别表示上等、中等和下等烟草样品;Y 表示云南烟叶样品,F 表示福建烟叶样品。

经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 质量后,使用引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGC AGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCT AAT-3') 对细菌 16S rDNA V3-V4 可变区域进行 PCR 扩增;使用引物 ITS1F (5'-CTTGTCATT TAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2R (5'-GCTGCGTTCTT CATCGATGC-3') 对真菌 ITS 区段进行扩增。于 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统确定样本测序量,进行 Miseq 文库构建和 Illumina MiSeq 测序。Illumina MiSeq 高通量测序与序列处理由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.2.2 生物信息学分析 于 Illumina Miseq 平台获得片段经拼接、质控和过滤,选取 OTU 序列相似度为 97% 以上并进行 OTU 聚类分析和物种分类学分析。基于分类学信息数据库 SILVA/16S rRNA,使用 Uparse 和 RDP Classifier 软件在各个分类水平上进行群落结构的统计分析。在上述分析的基础上,通过 R 语言进一步对样本进行主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)差异计算及显著性检验等一系列可视化分析。

1.2.3 烟叶挥发性成分测定 1) 样品萃取条件 称取 0.400 g 烟叶粉末于顶空进样瓶中,加入 3 μL 混标。将顶空瓶放置在 CTC 自动进样盘中。萃取参数设定为:100 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 10 min,顶空吸附萃取 40 min 后,于 GC-MS 进样口处 250 $^{\circ}\text{C}$ 解吸 4 min。

2) 色谱柱 HP-5MS (60 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm),

氮气流量为 1 mL/min。升温程序为起始温度 50 $^{\circ}\text{C}$,保持 2 min,以 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 280 $^{\circ}\text{C}$,保持 25 min;后运行温度 280 $^{\circ}\text{C}$,后运行时间 5 min。不分流进样,溶剂延迟时间 4 min。

3) MS 条件 采用全扫描模式(m/z 30~550)进行采集,离子源温度和四级杆温度分别为 230 $^{\circ}\text{C}$ 和 150 $^{\circ}\text{C}$ 。

将检测到挥发性成分的质谱信息结合 NIST 14 标准质谱数据库进行定性确定,采用内标法对各组分定量分析。

1.3 数据处理

使用 Excel 计算数据的平均值和误差。通过 SIMCA 对烟叶中挥发性成分进行 PLS-DA 分析。使用 STAMP (ver2.1.3) 对挥发性成分进行显著性分析, $P<0.05$ 及 $P<0.01$ 均为差异具有统计学意义。聚类热图于 <https://www.omicstudio.cn> 网站上使用 OmicStudio 工具绘制。

2 结果与分析

2.1 不同品质烟叶表面细菌菌群的特征

通过 Illumina MiSeq 测序分析不同品质烟叶表面的细菌群落,共获得 690 929 条有效序列。基于相似度大于 97%,将整个样本序列进行优化和归类后,注释到 33 个门,839 个属,1 984 个 OTU。由图 1 可知,在相对丰度大于 5% 水平上,主要为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteriota);其中贪噬菌属(*Variovorax*, 11.02%)、鞘氨醇单胞菌属(*Spingomonas*, 8.01%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 7.78%)、肠杆菌属(*Enterobacter*, 6.60%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*, 6.34%)为相对丰度占比前 5 的优势细菌属。

相对丰度最高的贪噬菌属在上等烟和中等烟中的占比高于下等烟。在烟叶醇化的相关研究中鲜有关于贪噬菌属的报道,贪噬菌作为一种附生和内生菌,常在植物的根际和叶际中被发现,具有促进植物生长的潜力^[7];贪噬菌属还在生物修复方面发挥重要优势^[8],对芳香族化合物中硝基苯、苯酚等均有降解作用。鞘氨醇单胞菌属(*Spingomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)为烟叶中普遍存在的功能细菌微生物^[9-10]。鞘氨醇单胞菌属对呋喃和芳香烃等物质降解以及合成类胡萝卜素等方面的贡献尤为突出^[11]。芽孢杆菌属表现出综

合产酶潜力,可产生蛋白酶^[12]、纤维素酶^[13]、淀粉酶^[14]等,进而降低烟叶中杂气物质,减轻刺激性气味。假单胞菌属为调控烟叶中尼古丁的主要微生物,可降低烟叶中尼古丁含量^[15],并对芳烃、碳氢化合物、脂

肪族化合物和木质素的降解发挥着重要作用^[16],可强化烟叶的品质并保证安全性。总而言之,丰富多样的优势细菌菌群有利于烟叶中基质成分的转化,从而促进烟叶的品质形成。

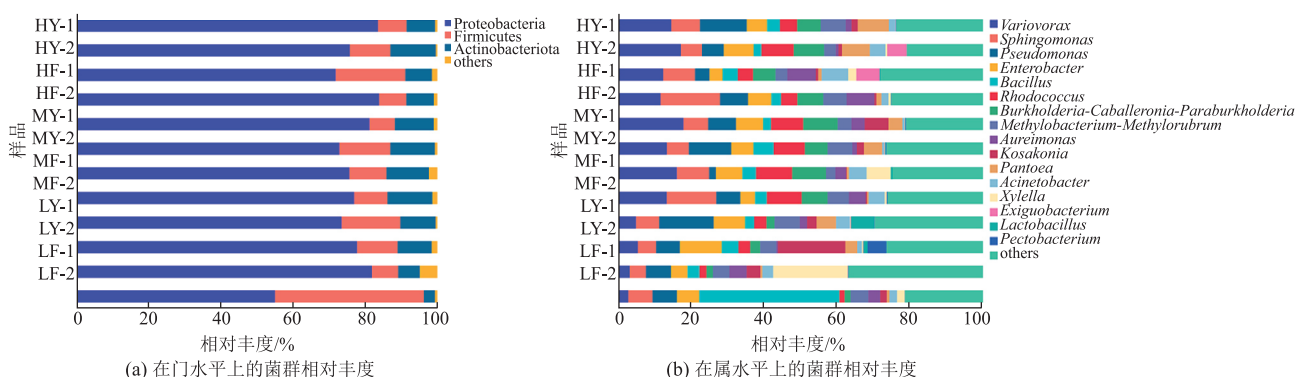


图 1 不同品质烟叶表面细菌群落的相对丰度柱形图

Fig. 1 Column diagram of relative abundance of bacterial communities on the surface of different quality tobacco

根据细菌群落在属水平上的丰度信息进行 PCoA 以表征不同品质烟叶中细菌群落结构的差异,结果见图 2(a)。细菌群落的多样性与地域和烟叶品质均有关系,上等烟和中等烟细菌群落相似,与下等烟存在差异,样品分在了 PC1 轴两侧;而云南和福建的烟叶样品被分在了 PC2 轴两侧。

进一步通过 Welch's *t* 检验分析烟叶细菌菌群在属水平上的差异性,比较不同等级烟叶中相对丰度排在前 10 位且差异显著的细菌物种,结果见图 2(b)。上、中等与下等烟的差异菌属主要为贪噬菌属 (*Variovorax*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Spingomonas*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、伯克霍尔德氏菌属 (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*),且这些差异菌属在上、中等烟叶样品中的相对丰度显著高于下等烟。根据云南和福建烟叶中细菌菌群差异信息(见图 2(c)),发现差异细菌物种主要为假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、金色单胞菌属 (*Aureimonas*)、泛菌属 (*Pantoea*)、类芽孢杆菌 (*Paenibacillus*)等,其中金色单胞菌属 (*Aureimonas*) 和类芽孢杆菌 (*Paenibacillus*) 在福建烟叶中明显上调。

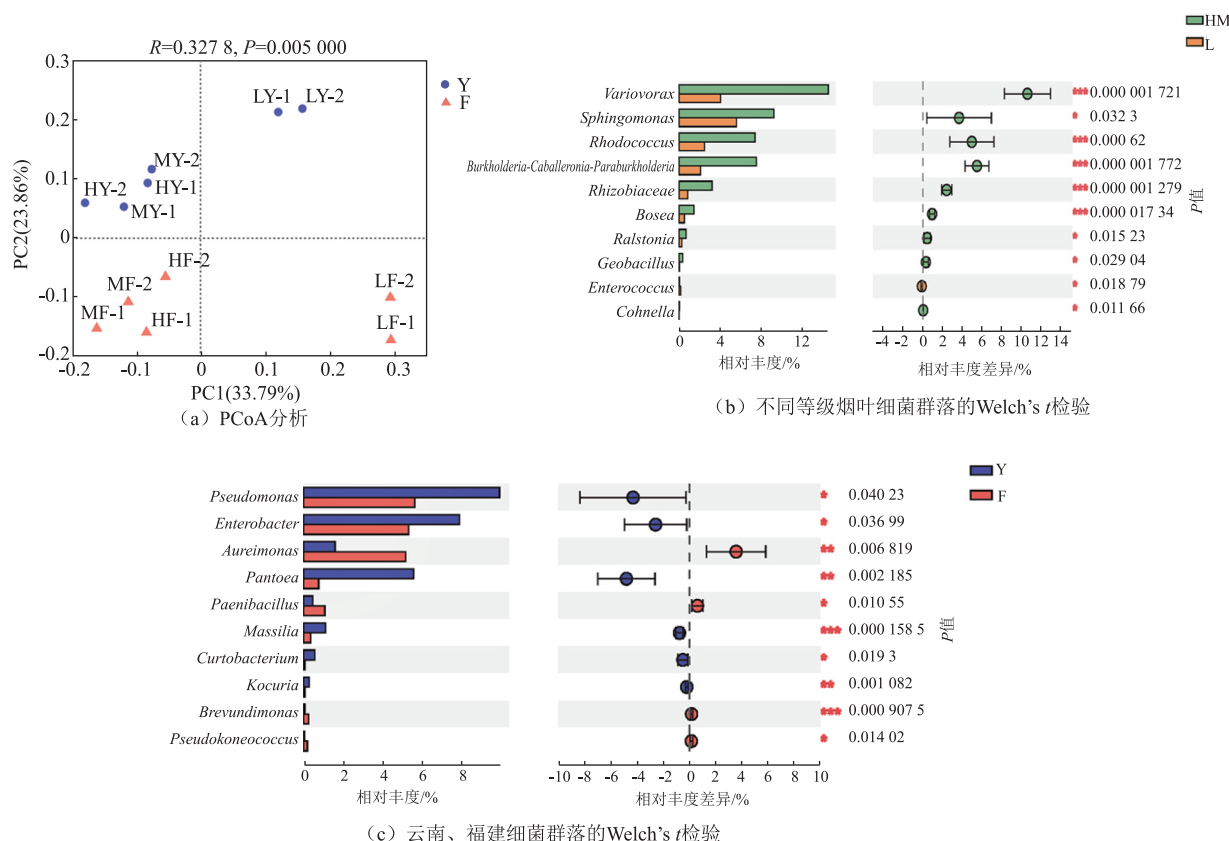
据研究报道,红球菌属 (*Rhodococcus*) 在降解芳香族化合物方面具有优势性,对异戊二烯物质具有降解作用^[17];而贪噬菌属与类芽孢杆菌共存时可产生纤维素酶^[18],增加糖类含量,从而促进烟叶醇化中非酶棕色反应产生香气。区域差异菌属多为内生

菌,如泛菌属 (*Pantoea*) 在水稻中被发现^[19];金色单胞菌 (*Aureimonas*) 于茶叶的内生菌群中被发现^[20],对改善茶叶的品质具有潜在作用,其在清香型烟叶以及许多产区的烟叶中均存在^[6],推测可能与烟叶的产香机制有着紧密的联系;肠杆菌属 (*Enterobacter*) 对烟碱、烟酸等具有降解潜力^[16]。在烟叶醇化过程中这些优势差异细菌对烟叶中营养基质成分的分解转化和代谢作用在一定程度上导致了烟叶品质差异,并体现出了地域差异。

2.2 不同品质烟叶表面真菌菌群的特征

对 12 个不同品质烟叶表面真菌群落进行分析,共获得 811 724 条有效序列,并注释到 10 个门,561 个属,1 580 个 OTU。选取相对丰度大于 1%,由图 3(a)可知,真菌群落以子囊菌门 (*Basidiomycota*)、担子菌门 (*Ascomycota*) 为主。由图 3(b)可知,在属水平上以桑帕约氏酵母 (*Sampaiozyma*, 28.43%)、曲霉 (*Aspergillus*, 24.51%)、枝孢霉属 (*Cladosporium*, 9.50%)、链格孢霉属 (*Alternaria*, 6.67%) 等为主。烟叶中真菌群落物种的种类少于细菌群落,在不同品质烟叶中真菌群落相对丰度无明显差异。

桑帕约氏酵母作为烟叶样品的第一优势真菌属,有研究表明其为烟叶的内生真菌^[21],属于担子菌门,但目前未有报道关于其在醇化烟叶中的具体功能特征。李治滢等从云南星云湖水样中分离出桑帕约氏酵母菌株可降解类胡萝卜素类物质^[22],而从异龙湖水样中分离出的 *Sampaiozyma vanillica* 具有降



Y 为云南烟叶样品, F 为福建烟叶样品; HM、L 分别表示上、中等及下等烟样品; $P < 0.05$, 置信区间 95%。

图 2 不同品质烟叶表面细菌群落差异性分析

Fig. 2 Analysis of the difference of bacterial community on the surface of different quality tobacco

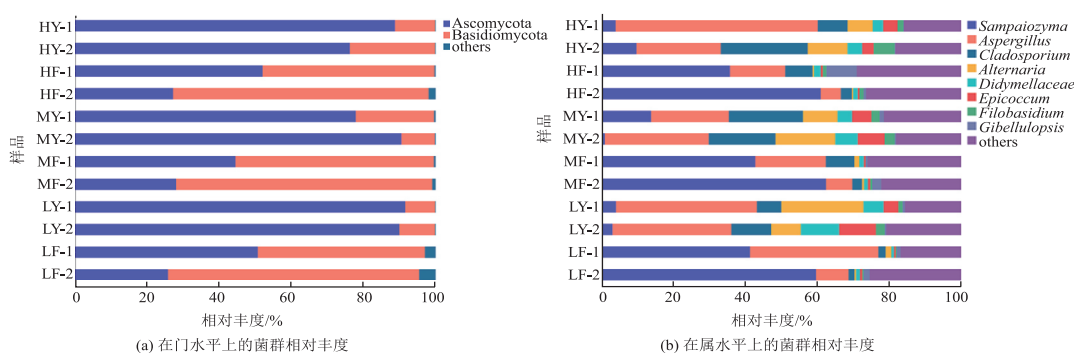


图 3 不同等级烟叶真菌群落的相对丰度柱形图

Fig. 3 Column diagram of relative abundance of fungal communities in different quality tobacco

解果胶、脂肪等能力^[23]。桑帕约氏酵母显示出和风味相关的潜在价值,有待进一步研究。曲霉在许多发酵食品中表现出具有降解糖类化合物和蛋白质的作用^[24-25],从而促进香味物质合成。而枝孢霉、链格孢霉属等为烟叶中常见的腐生真菌^[26],易导致烟叶发生霉变^[27],往往与烟叶品质呈负相关。

根据烟叶中真菌群落的丰度信息进行 PCoA,

结果见图 4(a)。不同等级烟叶样品中真菌群落区分度较低,仅与地域存在相关性。云南和福建的烟叶样品被分在 PC1 轴两侧,表明烟叶中真菌菌群主要与烟叶产区有关,不同等级烟叶中真菌群落的差异不明显。采用 Welch's t 检验对福建和云南的真菌菌群进行差异分析,结果见图 4(b)。云南烟叶中曲霉(*Aspergillus*)、枝孢霉属(*Cladosporium*)、链格孢霉

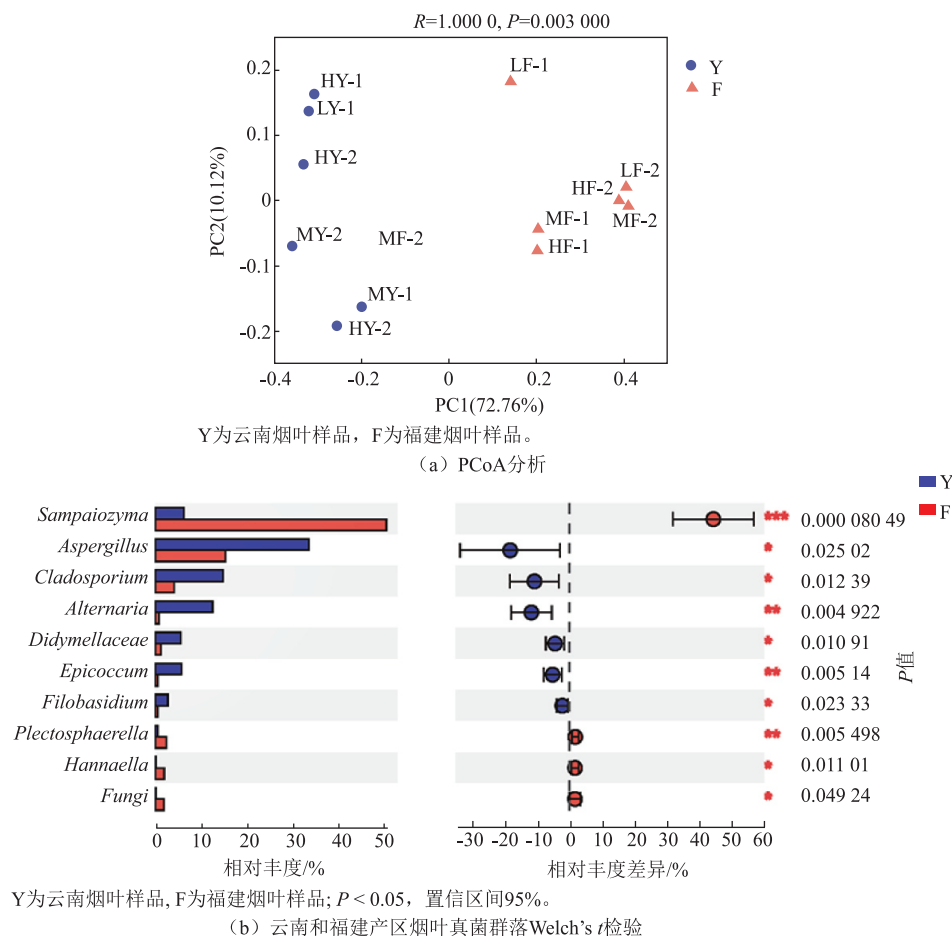


图4 不同品质烟叶真菌群落差异性分析

Fig. 4 Difference analysis of fungal communities in different quality tobacco

属(*Alternaria*)等霉菌类物种的相对丰度显著高于福建烟叶,而福建烟叶中则以桑帕约氏酵母(*Sampaiozyma*)以及样品中相对丰度较低的物种为上调差异菌属。烟叶中真菌群落差异性反映了不同地域烟叶中微生态特征。

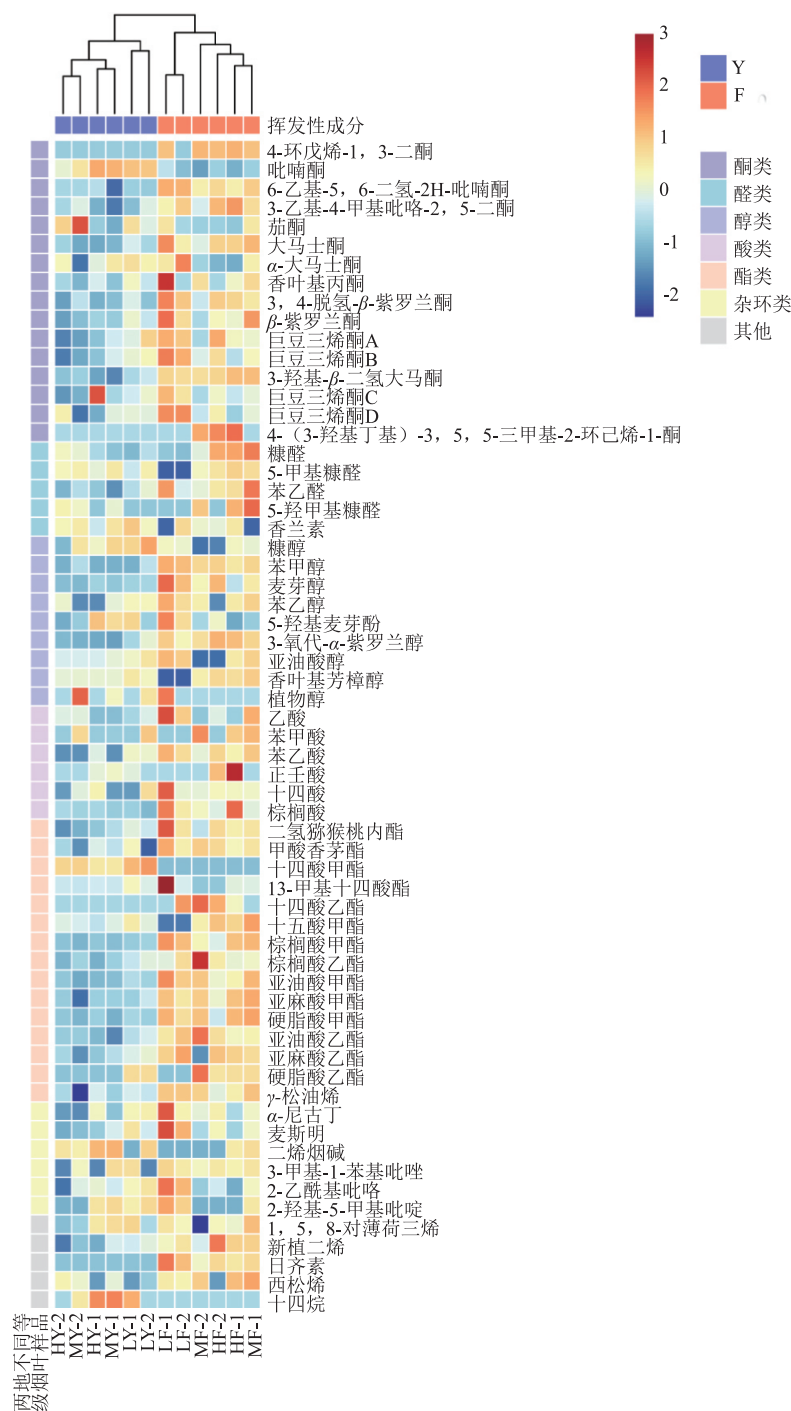
2.3 不同品质烟叶中挥发性香气成分的特征

挥发性香气成分是评价烟叶品质的重要因素。通过 SPME-GC/MS 检测不同品质烟叶样品的挥发性化合物,结果见图 5。共测得 62 种挥发性成分,包括 16 种酮类、15 种酯类、9 种醇类、6 种酸类、6 种杂环类、5 种醛类和 7 种其他物质。酮类是形成烟叶细腻、清香特征的主要成分,而酯类成分对烟叶的香气和吃味有一定的影响,可以增加烟气的醇和感^[28]。另外,福建和云南的样品被分为两类,且福建烟叶样品中各挥发性成分的相对质量浓度明显高于云南烟叶。另外,由烟叶样品的层级聚类可知,上

等烟和中等烟的挥发性物质差异不大,并与下等烟区分开,这一结果与细菌群落的结果具有相似性。而 Hu 等在跟踪烤烟中微生物群落和化学成分动态变化特征时发现,烟草的物质转化规律与细菌群落的功能相对应^[29]。细菌群落对于烟叶物质分解和转化发挥着更为关键的作用,从而促进烟叶香气形成。

为了更明确不同品质和产地烟叶中挥发性成分的差异,通过 PLS-DA 模型按不同等级对烟叶中挥发性成分进行统计分析,结果见图 6(a)。云南和福建烟叶的挥发性成分差异显著,且不同产地的上等烟和中等烟的挥发性物质差异不大,与下等烟样品有较大差异。

基于 PLS-DA 模型得到各个挥发性化合物的变量重要性投影值(VIP),用来衡量各挥发性成分对烟叶样品分类判别的影响强度和解释能力。如图



Y 为云南烟叶样品, F 为福建烟叶样品。

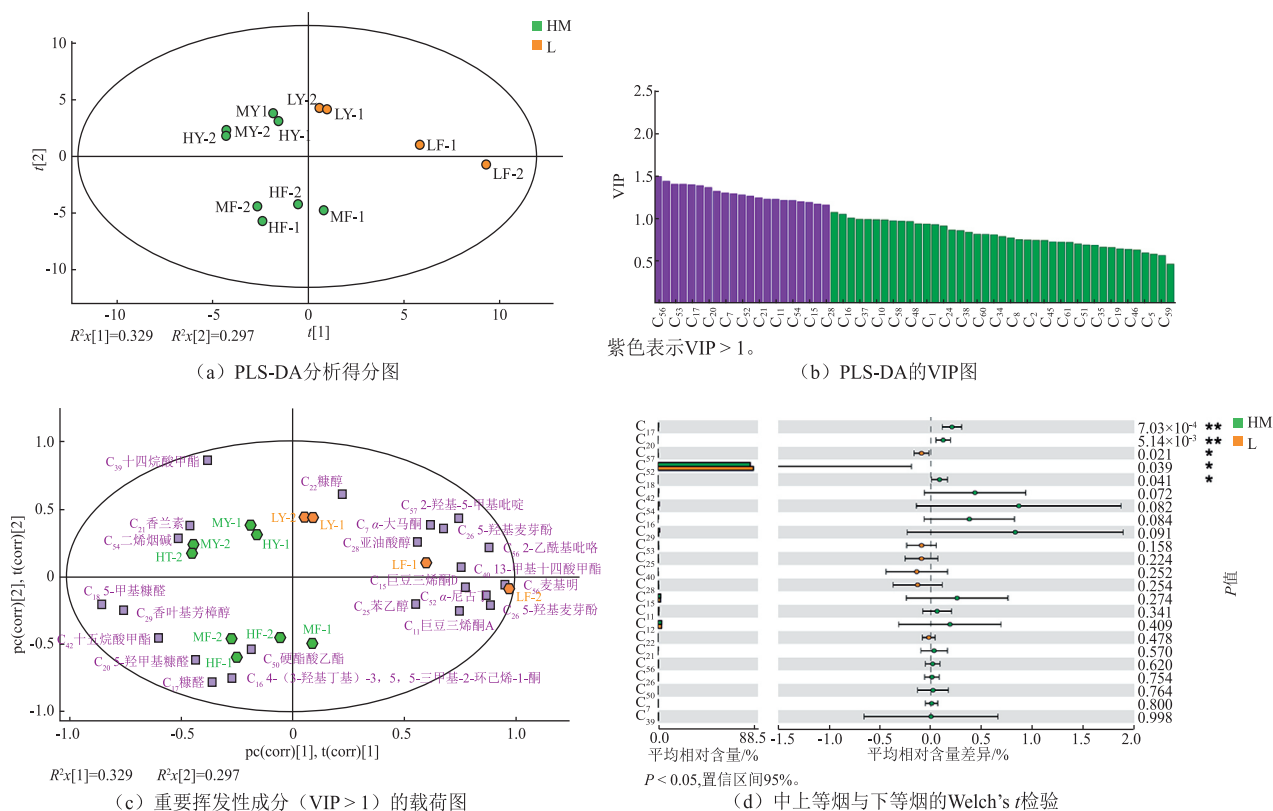
图 5 不同等级烟叶样品挥发性成分聚类热图

Fig. 5 Cluster heat map of volatile components in different quality tobacco

6(b)所示,VIP 值大于 1(紫色)的挥发性成分共有 23 种, 主要为 2-乙酰基吡咯 (C_{56})、5-甲基糠醛 (C_{18})、麦斯明(C_{53})、5-羟甲基糠醛(C_{20})、巨豆三烯酮 B(C_{12})、 α -大马酮(C_7)、5-羟基麦芽酚(C_{26})、 α -尼古丁(C_{52})、香叶基芳樟醇(C_{29})、巨豆三烯酮 A(C_{11})等。

这些重要挥发性成分多为类胡萝卜素降解产物,如呈甜味的 α -大马酮^[30]、具有坚果及烟草香的巨豆三烯酮类物质^[31],可作为潜在风味化合物对烟叶的整体香气具有很好的调和与修饰作用。

将 VIP 值大于 1 的重要挥发性物质于载荷图



Y 为云南烟叶样品, F 为福建烟叶样品; HM 和 L 分别为上、中等烟和下等烟样品。

图 6 不同品质烟叶挥发性风味成分 PLS-DA 分析和差异性分析

Fig. 6 PLS-DA and difference analysis of volatile flavor components in different quality tobacco

中进行标注,同时对其进行差异分析。根据载荷图(见图 6(c))可知,在福建的中、上等烟附近主要聚集了糠醛(C_{17})、5-羟甲基糠醛(C_{20})、5-甲基糠醛等具有焦糖香的物质^[32],云南的中、上等烟附近则主要为香兰素(C_{21})。其中,糠醛带有果香和面包香,5-羟甲基糠醛带有花香,5-甲基糠醛带有甜味,突显中、上等福建烟叶具有焦甜香、微弱花果香的特征;香兰素带有香草气息且呈浓而甜的奶香^[33],赋予中、上等云南烟叶丰满度和甜味的特征。而下等烟与 α -尼古丁(C_{52})、麦斯明(C_{53})位置相近,且 α -尼古丁和麦斯明在下等烟中含量较高,从而增加下等烟烟气的刺激性和杂气。由不同等级烟叶挥发性成分的差异分析发现(见图 6(d)),相较于下等烟,大部分重要挥发性成分(VIP > 1)在中、上等烟中的相对含量有增加的趋势,丰富中、上等烟的香气特征。

2.4 烟叶表面菌群与其挥发性香气物质关联分析

为进一步明确微生物群落与挥发性成分之间的关系,选取属水平上总相对丰度排在前 10 位的细菌物种和前 4 位的真菌物种,分别与烟叶中所有

挥发性风味成分($n=62$,平均相对含量大于 0.1%)计算 Pearson 相关系数,采用 Cytoscape 软件绘制相关性网络,结果见图 7。挥发性成分和微生物之间共有 168 个成对相关($|r| > 0.6, P < 0.05$),其中以红线表示正相关,以蓝线表示负相关。在这些挥发性化合物中的相关性分析中,44 种与细菌相关,33 种与真菌相关。

在细菌菌群和挥发性成分相关性分析中(见图 7(a))。金色单胞菌属(*Aureimonas*)为与挥发性成分连接数最多的一种优势菌属,与烟叶中 14 种香气物质正相关,尤其是与烟叶中重要香气物质新植二烯具有较强相关性($|r| > 0.7$)。其次,芽孢杆菌属(*Bacillus*)与烟叶中 14 种香气物质有相关性,呈正相关有 11 种,包括 β -紫罗兰酮、二氢猕猴桃内酯、香叶基丙酮、2-乙酰基吡咯,这些物质多为类胡萝卜素降解产物,有研究表明芽孢杆菌可以产生糖苷酶促进烟叶中类胡萝卜素等物质降解^[34-35],这与前文结果一致。另外,红球菌属(*Rhodococcus*)和贪噬菌属(*Variovorax*)共同表现出对 5-甲基糠醛、5-羟

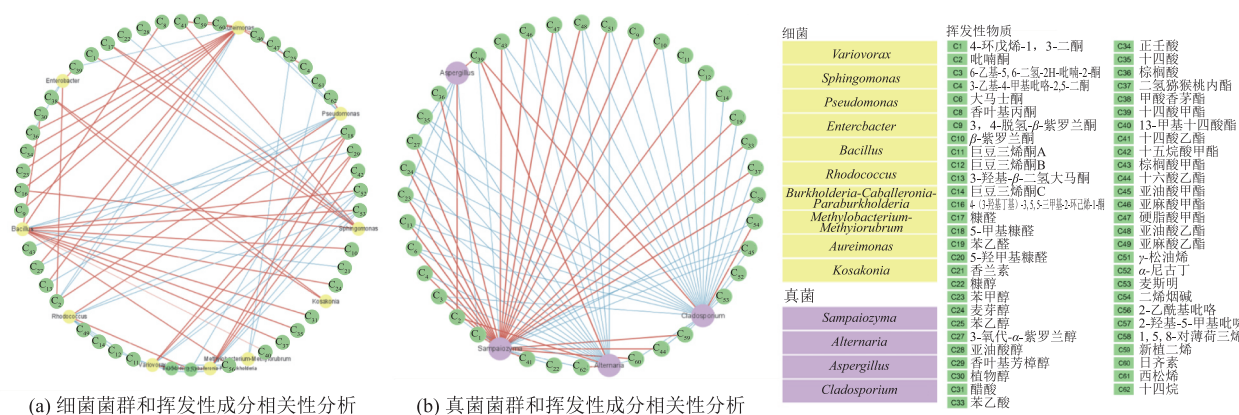


图7 不同等级烟叶挥发性成分与菌群的相关性分析

Fig. 7 Correlation analysis of volatile components and flora in different quality tobacco leaves

甲基糠醛具有正向促进作用,进一步说明在中、上等烟中的优势微生物菌群对其香气特征的形成具有一定贡献。红球菌属(*Rhodococcus*)和伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*)与烟叶中的 α -尼古丁、麦斯明等烟碱类物质呈负相关,其中Gong等已明确红球菌属(*Rhodococcus*)对烟碱类物质具有降解作用^[36],表明这几类菌属对烟碱类物质有降解潜力。

在真菌群落和挥发性成分相关性分析中(见图7(b)),连接数较多的菌属为桑帕约氏酵母(*Sampaiozyma*)、枝孢霉属(*Cladosporium*)和链格孢霉属(*Alternaria*)。其中桑帕约氏酵母(*Sampaiozyma*)与烟叶的香气成分连接数最多,涵盖烟叶中大部分的香气物质。而枝孢霉属(*Cladosporium*)和链格孢霉属(*Alternaria*)与多种香气物质呈负相关,表明枝孢霉属(*Cladosporium*)和链格孢霉属(*Alternaria*)不利于烟叶品质形成。

3 结语

烟叶中丰富多样的微生物资源对其品质形成

具有重要影响。作者对烟叶表面的微生物群落和挥发性风味成分进行分析,结果表明细菌群落结构和挥发性香气成分因烟叶品质的不同而存在差异,在一定程度上阐明微生物与香气品质之间的关系。

烟叶中的细菌群落与香气品质更为相关。芽孢杆菌属(*Bacillus*)作为主要优势物种,对类胡萝卜素类物质具有降解潜力,有助于烟叶香气的形成。贪噬菌属(*Variovorax*)、鞘氨醇单胞菌属(*Spingomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)为上、中等烟与下等烟的差异物种,与烟叶中多种重要挥发性香气物质相关联,并发现红球菌属(*Rhodococcus*)可作为调控烟碱类物质的优势菌源,可应用于降解下等烟中较高含量的 α -尼古丁。对于真菌群落,桑帕约氏酵母(*Sampaiozyma*)对烟叶中多种香气成分的形成具有积极作用,而枝孢霉属(*Cladosporium*)和链格孢霉属(*Alternaria*)与烟叶品质呈负相关。

研究结果表明烟叶微生物的种类和相对丰度对其香气品质具有重要的影响。挖掘烟草中的微生物资源,为提高烟草品质、降低危害,利用微生物资源获得烟草香味物质提供理论参考。

参考文献:

- [1] WANG F, ZHAO H W, XIANG H Y, et al. Species diversity and functional prediction of surface bacterial communities on aging flue-cured tobaccos[J]. *Current Microbiology*, 2018, 75(10): 1306-1315.
- [2] HUANG J, YANG J, DUAN Y, 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.
- [3] 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.

- [4] ZHANG L, WANG X Y, GUO J Z, et al. Metabolic profiling of Chinese tobacco leaf of different geographical origins by GC-MS [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013, 61(11):2597-2605.
- [5] YE J B, DING Y L, QI X N, et al. Geographic and position-based variations in phyllospheric bacterial communities present on flue-cured tobacco[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2021, 105(24):9297-9308.
- [6] ZHANG Q Y, GENG Z Z, LI D L, et al. Characterization and discrimination of microbial community and co-occurrence patterns in fresh and strong flavor style flue-cured tobacco leaves[J]. **Microbiology Open**, 2020, 9(2):1-11.
- [7] NATSAGDORJ O, SAKAMOTO H, SANTIAGO D M O, et al. *Variovorax* sp. has an optimum cell density to fully function as a plant growth promoter[J]. **Microorganisms**, 2019, 7(3):1-15.
- [8] GAO J L, SUN Y C, XUE J, et al. *Variovorax beijingensis* sp. nov., a novel plant-associated bacterial species with plant growth-promoting potential isolated from different geographic regions of Beijing, China[J]. **Systematic and Applied Microbiology**, 2020, 43(6):126-135.
- [9] LI J J, ZHAO Y Y, QIN Y Q, et al. Influence of microbiota and metabolites on the quality of tobacco during fermentation[J]. **BMC Microbiology**, 2020, 20(1):356-372.
- [10] CHATTOPADHYAY S, MALAYIL L, MONGODIN E F, et al. A roadmap from unknowns to knowns:advancing our understanding of the microbiomes of commercially available tobacco products[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2021, 105(7):2633-2645.
- [11] ZHOU J X, YU L F, ZHANG J, et al. Characterization of the core microbiome in tobacco leaves during aging[J]. **Microbiology Open**, 2020, 9(3):1-13.
- [12] DIGIACOMO 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.
- [13] LI Y H, DING M, WANG J, et al. A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus* sp.AC-1[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006, 70(4):430-436.
- [14] PEN J, MOLENDIJK L, QUAX W J, et al. Production of active *Bacillus licheniformis* alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction[J]. **Biotechnology**, 1992, 10(3):292-296.
- [15] HUANG C, SHAN L, CHEN Z, et al. Differential effects of homologous transcriptional regulators NicR2A, NicR2B1, and NicR2B2 and endogenous ectopic strong promoters on nicotine metabolism in *Pseudomonas* sp. strain JY-Q[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2021, 87(3):1-16.
- [16] LIU F, WU Z Y, ZHANG X P, et al. Microbial community and metabolic function analysis of cigar tobacco leaves during fermentation[J]. **Microbiology Open**, 2021, 10(2):1-13.
- [17] CROMBIE A T, KHAWAND M E, RHODIUS V A, et al. Regulation of plasmid-encoded isoprene metabolism in *Rhodococcus*, a representative of an important link in the global isoprene cycle[J]. **Environmental Microbiology**, 2015, 17(9):3314-3329.
- [18] GHIO S, LORENZO G S D, LIA V, et al. Isolation of *Paenibacillus* sp. and *Variovorax* sp. strains from decaying woods and characterization of their potential for cellulose deconstruction[J]. **International Journal of Bichemistry and Molecular Biology**, 2012, 4(2):352-364.
- [19] LIU Z B, WANG Z Y, LYU X C, et al. Comparison study of the volatile profiles and microbial communities of Wuyi Qu and Gutian Qu, two major types of traditional fermentation starters of Hong Qu glutinous rice wine[J]. **Food Microbiology**, 2018, 69:105-115.
- [20] 陈丽莹, 张玉满, 陈晓英, 等. 茶树叶际选择性富集的内生细菌的鉴定[J]. **微生物学报**, 2018, 58(10):1776-1785.
- [21] 周家喜, 王茂胜, 喻理飞, 等. 烟草根部内生真菌群落结构和功能特征[J]. **菌物学报**, 2019, 38(10):1610-1619.
- [22] 李治滢, 樊竹青, 董明华, 等. 云南星云湖酵母菌多样性及产类胡萝卜素的评价[J]. **微生物学通报**, 2019, 46(6):1309-1319.
- [23] 李治滢, 董明华, 周斌, 等. 云南异龙湖可培养酵母菌多样性及产胞外酶和油脂活性菌株筛选[J]. **云南大学学报(自然科学)**

- 版),2020,42(6):1212-1223.
- [24] 周家喜,喻理飞,张晓敏,等. 仓储烟叶表面真菌群落组成分析[J]. 菌物学报,2018,37(4):434-443.
- [25] 郭刚军,胡小静,徐荣,等. 辣木叶茶4种发酵方式不同发酵阶段化学成分与品质变化及其相关性分析[J]. 食品工业科技,2021,42(19):267-274.
- [26] CHEN Q L, CAI L, WANG H C, et al. Fungal composition and diversity of the tobacco leaf phyllosphere during curing of leaves [J]. **Frontiers in Microbiology**, 2020, 11:554051-554066.
- [27] ZHOU J, CHENG Y, YU L, et al. Characteristics of fungal communities and the sources of mold contamination in mildewed tobacco leaves stored under different climatic conditions[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2022, 106(1):131-144.
- [28] 左满兴,薛磊,崔洪亮,等. 增香复合微生物对造纸法再造烟叶香味成分的影响[J]. 安徽农业科学,2020,48(19):194-197.
- [29] HU B, GU K, GONG J, et al. The effect of flue-curing procedure on the dynamic change of microbial diversity of tobaccos[J]. **Science Reports**, 2021, 11(1):5354-5370.
- [30] ZHU J C, NIU Y W, XIAO Z B. Characterization of the key aroma compounds in Laoshan green teas by application of odour activity value(OAV), gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry(GC-MS-O) and comprehensive two-dimensional gas chromatography mass spectrometry(GC x GC-qMS)[J]. **Food Chemistry**, 2021, 339:128-136.
- [31] SLAGHENAUF D, PERELLO M C, MARCHAND S, et al. Quantification of megastigmatrienone, a potential contributor to tobacco aroma in spirits[J]. **Food Chemistry**, 2016, 203:41-48.
- [32] BANOZIC M, JOKIC S, ACKAR D, et al. Carbohydrates-key players in tobacco aroma formation and quality determination[J]. **Molecules**, 2020, 25(7):1734-1747.
- [33] 茅中一,洪祖灿,刘加增,等. 基于香气活性值的福建尤溪烟叶提取物香气特征成分分析[J]. 烟草科技,2021,53(10):56-65.
- [34] WU X Y, ZHU P C, LI D L, et al. Bioaugmentation of *Bacillus amyloliquefaciens*-*Bacillus kochii* co-cultivation to improve sensory quality of flue-cured tobacco[J]. **Archives of Microbiology**, 2021, 203:5723-5733.
- [35] 刘晓柱,张远林,李银凤,等. 高产 β -葡萄糖苷酶酵母菌的诱变选育及对刺梨果酒香气特性的影响[J]. 食品工业科技,2021,42(19):118-125.
- [36] GONG X, MA G, DUAN Y, et al. Biodegradation and metabolic pathway of nicotine in *Rhodococcus* sp. Y22[J]. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 2016, 11(32):1-9.