高水分固态发酵上部烟叶对其微生物量和化学成分的影响

李士林[1]，王宜君[1]，张薄博[1]，汤朝起[2]，许赣荣[*1]

（1. 江南大学 生物工程学院，工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 上海烟草集团有限责任公司，上海 200082）

摘要：研究了高水分固态发酵上部烟叶过程中烟叶微生物数量和化学成分的变化。结果表明：在高水分、常温好氧发酵中，烟叶发酵到第二三天开始发霉，发酵被迫终止。发酵过程中好氧细菌逐渐减少，酵母和霉菌大量繁殖；高水分、常温厌氧发酵过程中，厌氧细菌小幅度减少，酵母数量发酵前期迅速增加，发酵到第 4 天后数量趋于稳定；高水分、高温好氧和厌氧发酵过程中，酵母和霉菌不再生长，好氧细菌和厌氧细菌均大幅度减少；在这 4 种发酵方式中，烟叶淀粉和蛋白质的含量均随着发酵时间的延长而逐渐降低。

关键词：高水分发酵；上部烟叶；微生物；化学成分

中图分类号：TS 444　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)12—1319—07

Preliminary Study of High Moisture Solid-State Fermentation of the Upper Leaves of Flue-Cured Tobacco

LI Shilin[1]，*WANG Yijun*[1]，*ZHANG Bobo*[1]，*TANG Zhaoqi*[2]，*XU Ganrong*[*1]

（1. School of Biotechnology，The Key Laboratory of Industrial Biotechnology，Ministry of Education，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. Shanghai Tobacco Group Co. Ltd.，Shanghai 200082，China）

Abstract：In this study，the changes of microorganisms amount and chemical compositions of tobacco leaves during high moisture solid-state fermentation. The experimental results showed that：In high moisture normal temperature aerobic solid-state fermentation，the tobacoo leaves became moldy after 2~3 days，aerobic bacteria gradually reduced，yeasts and moulds grew rapidly. In high moisture normal temperature anaerobic solid-state fermentation，the amount of anaerobic bacteria had a slight reduction，but the amount of yeasts increased substantially at the early days and stabilized after 4 days. In high moisture high temperature aerobic and anaerobic solid-state fermentations，yeast and mould did not grow，both of aerobic and anaerobic bacteria reduced significantly. In all four fermentations，the content of starch and protein in tobacoo decreased with time.

收稿日期：2014-02-17

基金项目：上海烟草集团有限责任公司科技项目(SZBCW201000744)。

* **通信作者**：许赣荣(1957—)，男，江西赣州人，工学博士，教授，博士研究生导师，主要从事发酵工程与生物化工研究。

E-mail：grxu123@126.com

Keywords: high moisture solid-state fermentation, upper leaves of flue-cured tobacco, microorganism, chemical composition

我国的烟草种植面积、年产量均居世界首位，然而每年也会产生大量的低次烟叶。低次烟叶淀粉、蛋白质等的大分子物质含量过高，化学成分不协调，导致吸食品质差，只能用于低档卷烟的配方中，或者直接丢弃，这不仅严重影响了企业和国家的经济利益，也造成了大量的材料浪费。探索出一种改善低次烟叶品质的方法，是一个值得研究的课题[1-3]。

目前，烟厂处理烟叶的主要方法是以自然陈化为主，人工发酵为辅[4]。自然陈化的温度随着当地温度的变化而变化，最高温度一般不会超 40 ℃。人工发酵的温度大约在 45~55 ℃[5]。自然陈化和人工发酵中，为了防止烟叶发霉，烟叶的水分都限制在质量分数 20%以下。由于烟叶水分很低，烟叶发酵速度缓慢，所以两者的发酵周期一般都较长[6-7]。如果提高烟叶水分，可以加速烟叶的发酵。本实验旨在探索低次烟叶在高水分发酵过程中微生物和化学成分的变化，为探索高水分发酵低次烟叶提供一定的理论基础。

烟叶人工发酵的温度主要是常温发酵(30 ℃左右)和高温发酵(45~55 ℃)，本实验中也采用常温(30 ℃)和高温(50 ℃)对烟叶进行好氧和厌氧发酵，并对发酵过程中烟叶微生物数量和化学成分进行测定和研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

上部低次烟叶，由上海烟草集团有限责任公司提供，为 2012 年福建烟叶；牛肉膏、鱼粉蛋白胨、孟加拉红琼脂、浓硫酸、盐酸、氢氧化钠、硫酸铜、硫酸钾、冰醋酸，均购自中国国药集团化学有限公司。H2-2 型电热恒温振荡水槽，上海精宏实验设备有限公司制造；UV3000 型紫外-可见光分光光度计，日本 Hitachi 公司制造；FA1004 型电子天平，上海舜宇恒平科学仪器有限公司制造；PL602-S 电子天平，METTLER TOLEDO 仪器上海仪器有限公司制造；PB-10 型 pH 计，SartoriUs 公司制造；YHG-300BS 型鼓风恒温干燥箱，上海康路仪器设备有限公司制造；Sartorius MA-40 型红外线水分测试仪，德国赛多利斯公司制造；PYX-XHS-405 型电热恒温培养箱，上海跃进医疗器械厂制造；SW-CJ-IFD 超净工作台，苏州安泰空气技术公司制造；红外智能 8 孔消化炉，上海沛欧分析仪器有限公司制造。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备 将发酵前后的上部低次烟叶样品剪成碎片，取烟叶碎片 1.0 g 置于盛有 100 mL 无菌水的三角瓶中 37 ℃振荡 20 min，制成菌悬液，用于菌落计数。

1.2.2 好氧细菌平板计数法 在超净台中将菌悬液稀释成一定浓度，取 200 μL 均匀涂在肉汤琼脂培养基平板中，于培养箱中 37 ℃培养 24 h。

1.2.3 厌氧细菌双层平板计数法 在超净台中取稀释一定浓度的菌悬液 200 μL，均匀涂在肉汤琼脂培养基平板中，再倒入一层 40 ℃左右未凝固的肉汤培养基，待冷却凝固后于培养箱中 37 ℃培养 24 h。

1.2.4 酵母和霉菌平板计数法 在超净台中取稀释一定浓度的菌悬液 200 μL，均匀涂在孟加拉红琼脂培养基平板中，于培养箱中 30 ℃培养 2~4 d[8-9]。

$$N_y=\frac{N_p\times 5\times n}{1-w} \quad (1)$$

式(1)中：N_y 为烟叶菌落数，N_p 为平板中菌落数，单位 cfu/g；n 为稀释倍数；w 为烟叶中含水质量分数；5 数字代表 200 μL 换算成 1 mL 的系数。

1.3 固态发酵方法

取 50 g 烟叶，根据含水量的设置安排，加入一定量的蒸馏水，装入 500 mL 的三角瓶中，在培养箱中，分别于 30 ℃和 50 ℃温度下进行固态发酵。发酵结束后取少许样品测定微生物数量，其余样品于鼓风恒温干燥箱烘干后测化学成分。

1.4 分析方法

1.4.1 烟叶水分的测定 取待测烟叶 0.5~1.0 g，放入红外快速水分测定仪中进行测定。

1.4.2 淀粉的测定 采用 DNS 法：取烟样，粉碎，过 80 目筛，准确称取烟叶粉末 0.6 g，用 50 mL 体积分数 80%酒精浸泡 12 h，80 ℃水浴 30 min，过滤，所得到的滤渣用 50 mL 蒸馏水冲入 250 mL 的烧杯

中,加入7 mL 盐酸溶液(浓盐酸与蒸馏水体积比为5:4),于烘箱中105 ℃处理 2.5 h,用 NaOH 溶液调节pH 至中性后定容到 100 mL,即为淀粉待测液,按照文献[10]的方法对淀粉待测液进行测定。

1.4.3 蛋白质的测定 采用凯氏定氮法:准确称取0.500 g 80 目烟样粉末(精确至 0.001 g),置于 250 mL 的烧杯中,加入 50 mL 质量分数 0.5%醋酸,加热煮沸 15 min,迅速用定量滤纸真空抽滤,并用质量分数 0.5%醋酸冲洗锥形瓶和沉淀物至滤液无色,然后将滤纸和残渣转移至消化管中,加入 0.4 g 硫酸铜、10 g 硫酸钾及 10 mL 浓硫酸,于红外消化炉中进行高温消化,待液体呈蓝绿色澄清透明后,取下冷却,加入 20 mL 水,此为蛋白质待测液。具体测定方法见文献[11]。

$$r_s=\frac{w_{s1}-w_{s2}}{w_{s1}}\times 100\% \quad (2)$$

$$r_p=\frac{w_{p1}-w_{p2}}{w_{p1}}\times 100\% \quad (3)$$

公式(2)(3)中:r_s 为淀粉降解率,w_{s1} 为原烟叶淀粉质量分数,w_{s2} 为发酵后烟叶淀粉质量分数;r_p 为蛋白质降解率,w_{p1} 为原烟叶蛋白质质量分数,w_{p2} 为发酵后烟叶蛋白质质量分数。烟叶淀粉和蛋白质的质量分数均为烟叶干基中淀粉和蛋白质质量分数。

2 结果与讨论

2.1 上部低次烟叶 30 ℃好氧发酵过程中微生物数量和化学成分的变化

在常温好氧发酵过程中,烟叶中微生物数量、淀粉和蛋白质的变化及烟叶水分质量分数和发酵时间有着密切的关系,作者所在实验室中烟叶水分质量分数分别设为 30%、40%、50%、60%,发酵温度为 30 ℃,发酵过程中定期取样。当烟叶水分质量分数为 30%和 40%时,发酵到第 3 天烟叶发霉,遂停止发酵。当烟叶水分质量分数为 50%和 60%时,发酵到第 2 天烟叶发霉,遂停止发酵。因此烟叶水分含量较高时,易长霉。这也是烟叶常温下一般控制在低水分条件下的原因。

2.1.1 上部低次烟叶 30 ℃下好氧发酵过程中微生物数量的变化 本实验对不同水分质量分数、30 ℃下好氧发酵上部低次烟叶过程中微生物数量进行取样检测,结果如表 1 和表 2 所示。

由表 1 可见,在 30 ℃好氧发酵上部低次烟叶过程中,酵母随着发酵时间的延长而大量繁殖。发酵水分对酵母的生长有较大促进作用,发酵水分越

表 1 上部低次烟叶 30 ℃下好氧固态发酵过程中好氧细菌和酵母数量的变化

Table 1 Changes of the amount of aerobic bacteria and yeast in tobacoo during aerobic fermentation in 30 ℃

cfu/g

水分质量分数/%	好氧细菌				酵母			
	0	第 1 天	第 2 天	第 3 天	0	第 1 天	第 2 天	第 3 天
30	4.09×10^5	3.00×10^5	2.32×10^5	1.40×10^5	50	70	360	1 090
40	4.09×10^5	2.05×10^5	5.6×10^4	1.09×10^4	50	60	4.06×10^5	3.88×10^7
50	4.09×10^5	1.04×10^5	1.46×10^3	–	50	6.00×10^4	1.37×10^7	–
60	4.09×10^5	8.15×10^4	1.35×10^3	–	50	2.10×10^5	1.10×10^7	–

表 2 上部低次烟叶 30 ℃下好氧固态发酵过程中霉菌数量的变化

Table 2 Changes of mould amount in tobacoo during aerobic fermentation in 30 ℃

cfu/g

水分质量分数/%	0	第 1 天	第 2 天	第 3 天
30	60	90	90	3.7×10^3
40	60	80	350	1.38×10^4
50	60	3.7×10^3	1.06×10^4	–
60	60	2.7×10^3	4.11×10^4	–

高,酵母繁殖越快;好氧细菌的数量随着发酵时间的延长而降低。烟叶物料水分对好氧细菌有明显的影响,好氧细菌数量随着烟叶物料水分的增多而递减。好氧细菌随着发酵时间的延长逐渐减少,而酵母和霉菌(见表 2)则随着发酵时间的延长而快速繁殖。细菌的变化和酵母、霉菌的变化呈现负相关性,可能是酵母和霉菌的大量繁殖,抑制了细菌的繁殖。

由表 2 可见,在 30 ℃好氧发酵上部烟叶过程中,霉菌大量繁殖。发酵水分越高,越利于霉菌的生长。当烟叶物料水分质量分数为 30%~40%时,烟叶发酵到第 3 天开始发霉,出现霉菌斑点,用肉眼可以清晰地看出。当发酵烟叶水分质量分数为 50%~60%时,烟叶发霉时间提前到第 2 天。由数据和观察现象可见,当烟叶中霉菌的数量达到 10^4 cfu/g 时,便出现霉菌斑点,用肉眼就可以发现。

2.1.2 上部低次烟叶 30 ℃下好氧固态发酵过程中化学成分的变化 对 30 ℃下好氧发酵上部低次烟叶发酵过程中烟叶的淀粉和蛋白质质量分数进行定期取样检测,结果如图 1 所示。可见,在 30 ℃下好氧固态发酵上部低次烟叶过程中,烟叶中淀粉的质量分数随着发酵时间的延长而逐渐降低;当烟叶物料水分质量分数为 30%~40%时,烟叶中蛋白质的质量分数随着发酵时间的延长而逐渐降低;当烟叶物料水分质量分数超过 40%时,烟叶中蛋白质的质量分数随着发酵时间的延长而出现先降低后不变的趋势。这可能是当烟叶物料水分质量分数超过 40%时,酵母大量繁殖,酵母菌体蛋白质增多,从而间接增加了烟叶中蛋白质的质量分数。

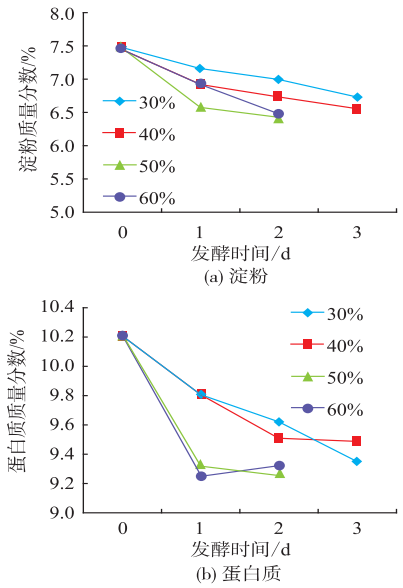


图 1 上部低次烟叶 30 ℃好氧固态发酵过程中烟叶淀粉和蛋白质质量分数的变化

Fig. 1 Changes of the content of starch and protein in tobacoo during aerobic fermentation in 30 ℃

2.2 上部低次烟叶 30 ℃下厌氧发酵过程中微生物数量和化学成分的变化

烟叶厌氧发酵,霉菌生长受到抑制,故可以适当延长发酵时间。本实验设计烟叶发酵水分质量分数为 30%、40%、50%、60%,发酵温度为 30 ℃,在第 4 天、第 8 天、第 12 天取样测微生物数量和烟叶淀粉和蛋白质等化学成分。

2.2.1 上部低次烟叶 30 ℃下厌氧固态发酵过程中微生物数量的变化 对 30 ℃下厌氧固态发酵上部低次烟叶过程微生物数量定期取样检测,见如表 3。

表 3 上部低次烟叶 30 ℃下厌氧固态发酵过程中厌氧细菌和酵母数量的变化

Table 3 Changes of the amount of anaerobic bacteria and yeast in tobacoo during anaerobic fermentation in 30 ℃

cfu/g

水分质量分数/%	厌氧细菌				酵母			
	0	第 4 天	第 8 天	第 12 天	0	第 4 天	第 8 天	第 12 天
30	5.64×10^5	1.63×10^5	2.10×10^4	4.24×10^4	50	50	50	50
40	5.64×10^5	3.75×10^5	2.10×10^5	6.98×10^4	50	8.66×10^3	2.37×10^4	4.09×10^4
50	5.64×10^5	3.21×10^5	2.00×10^5	8.91×10^4	50	1.84×10^4	3.38×10^4	4.47×10^4
60	5.64×10^5	5.03×10^5	2.70×10^5	1.36×10^5	50	2.11×10^4	4.03×10^4	7.30×10^4

由表 3 可见,在 30 ℃下厌氧固态发酵上部低次烟叶过程中,烟叶厌氧细菌的数量随着发酵时间的延长呈缓慢下降的趋势。烟叶物料水分对厌氧细菌的生长有明显促进作用,发酵水分越高,厌氧细菌数量越多;当烟叶发酵水分质量分数超过 40%,发酵前 4 d,酵母大量出现,但随着发酵时间的延

长,酵母的数量增加很慢,基本趋于平衡。这可能是由于自封袋的发酵环境刚开始会存在少量空气,酵母利用这些少量的氧气进行繁殖。当发酵时间超过4 d以后,酵母的数量不再有明显增长,说明发酵环境中的氧气被酵母完全消耗而进入厌氧环境。酵母进行厌氧发酵,繁殖减慢。

2.2.2 上部低次烟叶30 ℃下厌氧固态发酵过程中化学成分的变化 对30 ℃下厌氧固态发酵上部低次烟叶过程中烟叶淀粉和蛋白质质量分数进行定期检测,结果如图2所示。可见,在30 ℃下厌氧固态发酵上部低次烟叶过程中,烟叶淀粉和蛋白质的质量分数都随着发酵时间的延长而降低。烟叶物料水分的提高会加快烟叶淀粉和蛋白质的降解。由表3可知,烟叶物料水分的增加会促进厌氧微生物繁殖,这可能是烟叶淀粉和蛋白质的降解加速的原因之一。

2.3 上部低次烟叶50 ℃下好氧固态发酵过程中微生物数量和化学成分的变化

50 ℃发酵时,霉菌已经不再生长,故可以延长发酵时间。50 ℃也不是大多数细菌生长的适宜温度,50 ℃固态发酵上部低次烟叶必然会对烟叶中的微生物产生明显的抑制作用。本实验设计发酵温度为50 ℃,发酵水分质量分数为30%、40%、50%、60%,在第4天、第8天、第12天取样测微生物数量和烟叶的化学成分。

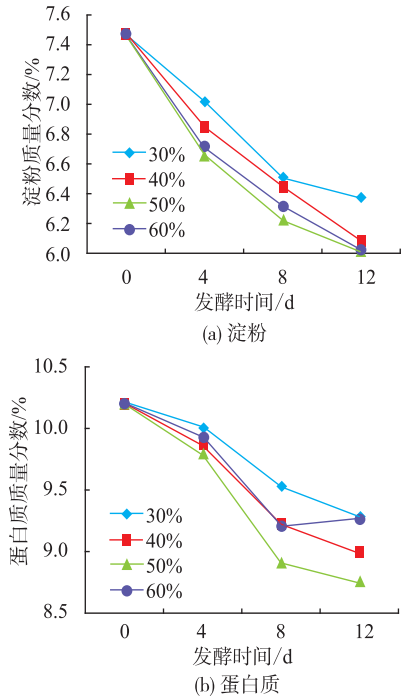


图2 上部低次烟叶30 ℃厌氧固态发酵过程中烟叶淀粉和蛋白质质量分数的变化

Fig. 2 Changes of the content of starch and protein in tobacoo during anaerobic fermentation in 30 ℃

2.3.1 上部低次烟叶50 ℃下好氧固态发酵过程中微生物数量的变化 对50 ℃下好氧固态发酵上部低次烟叶过程微生物数量定期检测,见表4。

表4 上部低次烟叶50 ℃下好氧固态发酵过程中好氧细菌和霉菌数量的变化

Table 4 Changes of the amount of aerobic bacteria and mould in tobacoo during aerobic fermentation in 50 ℃

cfu/g

水分质量分数/%	好氧细菌				酶菌			
	0	第4天	第8天	第12天	0	第4天	第8天	第12天
30	4.09×10^5	5.04×10^4	3.13×10^3	2.08×10^3	50	350	310	260
40	4.09×10^5	5.13×10^4	1.3×10^3	1.04×10^3	50	430	400	330
50	4.09×10^5	2.55×10^4	1.04×10^3	2.60×10^2	50	560	520	430
60	4.09×10^5	1.62×10^3	2.60×10^2	2.43×10^2	50	610	580	440

由表4可见,在50 ℃下好氧固态发酵上部低次烟叶过程中,好氧细菌的数量随着发酵时间的延长而迅速减少。烟叶物料水分的提高不利于好氧细菌的生长代谢,随着烟叶物料水分的增加,好氧细菌的数量逐渐减少;霉菌还是会少量生长,但数量较少,烟叶表面也没有观察到霉菌菌落,如此少量的霉菌尚不能影响烟叶的吸食品质。由此可见,发酵温度为50 ℃时可以较好地解决高水分发酵烟叶过程中霉菌的生长问题;50 ℃好氧固态发酵上部低次烟叶过程中,酵母已经不再生长繁殖,故表4没有列出。可见,烟叶中自带的酵母在50 ℃厌氧固态发酵过程中无法生长繁殖。

2.3.2 上部低次烟叶 50 ℃下好氧固态发酵过程中化学成分的变化 对 50 ℃好氧发酵上部低次烟叶过程中烟叶淀粉和蛋白质质量分数进行定期检测，结果如图 3 所示。

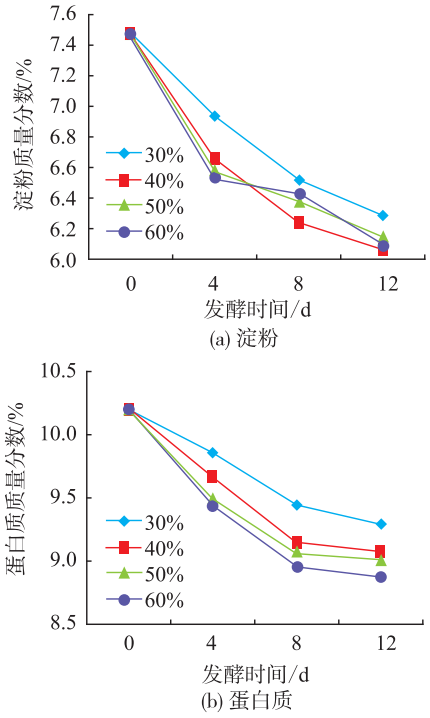


图 3 上部低次烟叶 50 ℃下好氧固态发酵过程中淀粉和蛋白质质量分数的变化

Fig. 3 Changes of the content of starch and protein in tobacoo during aerobic fermentation in 50 ℃

由图 3 可见，在 50 ℃好氧固态发酵上部低次烟叶过程中，烟叶淀粉和蛋白质的质量分数都随着发酵时间的延长而降低。烟叶物料水分的增加会加快烟叶淀粉和蛋白质的降解。50 ℃可能是烟叶本身自带复合酶的适合温度，水分的提高会提高复合酶水解淀粉和蛋白质的效果。

2.4 上部低次烟叶 50 ℃下厌氧固态发酵过程中微生物数量和化学成分的变化

本实验设计发酵温度为 50 ℃，烟叶物料水分质量分数为 30%、40%、50%、60%，厌氧发酵第 4 天、第 8 天、第 12 天取样测微生物数量和烟叶淀粉和蛋白质等化学成分。

2.4.1 50 ℃下厌氧固态发酵上部低次烟叶过程中微生物数量的变化 对 50 ℃下厌氧固态发酵上部低次烟叶过程中微生物数量进行定期检测，结果如表 5 所示。

表 5 上部低次烟叶 50 ℃厌氧固态发酵过程中烟叶厌氧细菌和酵母数量的变化

Table 5 Changes of the amount of anaerobic bacteria and yeast in tobacoo during anaerobic fermentation in 50 ℃

cfu/g

水分质量分数/%	0	第 4 天	第 8 天	第 12 天
30	5.64×10^5	2.90×10^4	8.85×10^3	7.81×10^3
40	5.64×10^5	4.21×10^4	9.28×10^3	1.28×10^4
50	5.64×10^5	1.24×10^4	1.09×10^4	8.96×10^3
60	5.64×10^5	1.16×10^4	9.86×10^3	8.33×10^3

由表 5 可见，在 50 ℃下厌氧固态发酵上部低次烟叶过程中，烟叶厌氧细菌的数量随着发酵时间的延长呈缓慢下降的趋势。烟叶物料水分对厌氧菌有明显抑制作用，烟叶物料水分越多，厌氧细菌数量越少；在此条件下酵母没有生长繁殖，故没有在表 5 列出，结合表 4 分析可见，烟叶中自带的酵母在 50 ℃下无法生长繁殖。

2.4.2 上部低次烟叶 50 ℃下厌氧固态发酵过程中烟叶化学成分的变化 由图 4 可见，在 50 ℃下厌氧固态发酵上部低次烟叶过程中，烟叶淀粉和蛋白质的质量分数随着时间的增长而逐渐降低。

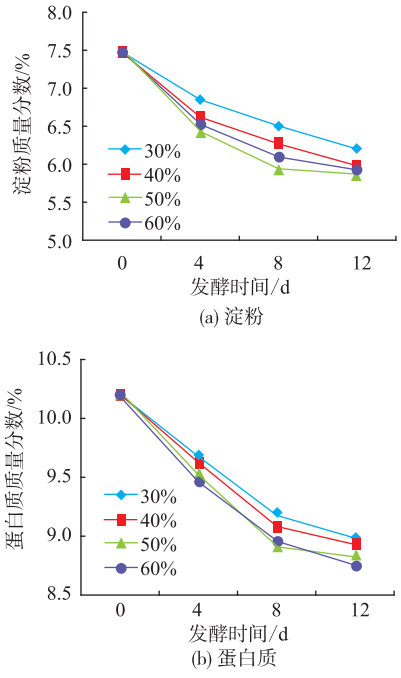


图 4 上部低次烟叶 50 ℃厌氧固态发酵过程中烟叶淀粉和蛋白质质量分数的变化

Fig. 4 Changes of the content of starch and protein in tobacoo during anaerobic fermentation in 50 ℃

烟叶物料水分越高，淀粉和蛋白质的降解率越高。50 ℃可能是烟叶本身自带复合酶的适合温度，水分的增加会提高复合酶水解淀粉和蛋白质的效果。

3 结 语

研究了高水分固态发酵上部烟叶过程中烟叶微生物数量和化学成分的变化。结果表明：在常温好氧发酵中，烟叶发酵到第二三天开始发霉，发酵被迫终止。发酵过程中好氧细菌逐渐减少，酵母和霉菌大量繁殖；常温厌氧发酵过程中，厌氧细菌小幅度减少，酵母数量发酵前期迅速增加，发酵到第 4 天后数量趋于稳定；高温好氧和厌氧发酵过程中，酵母和霉菌不再生长，好氧细菌和厌氧细菌均大幅度减少。常温和高温发酵过程中，烟叶淀粉和蛋白质的质量分数均随着时间的延长而逐渐降低。

通过本实验研究发现，高温高水分条件下发酵烟叶在防止霉菌生长的同时，大幅度地降低了低次烟叶中淀粉和蛋白质的质量分数。这为下一步利用高温高水分发酵低次烟叶来改善低次烟叶的品质，提供了一定的研究基础。

本实验仅仅研究了烟叶在高水分发酵过程中烟叶微生物、淀粉和蛋白质质量分数的变化，烟叶其他化学成分的变化，以及对烟叶吸食品质的影响，则有待于进一步的研究。

参考文献：

[1] 朱荣誉，于学玲，史劲松. 烟草废弃物的综合利用[J]. 中国野生植物资源，2000，18(3)：25-27.
ZHU Rongyu，YU Xueling，SHI Jinsong. The utilization of tobacco waste[J]. **Chinese Wild Plant Resources**，2000，18(3)：25-27.(in Chinese)

[2] 董占能，白聚川，张皓东. 烟草废弃物资源化[J]. 中国烟草科学，2008，29(1)：39-42.
DONG Zhanneng，BAI Juchuan，ZHANG Haodong. Comprehensive utilization of tobacco waste [J]. **Chinese Tobacco Science**，2008，29(1)：39-42.(in Chinese)

[3] 郭靖里，马敏象，吴绍情，等. 论烟草废弃物的综合利用技术及其发展前景[J]. 中国资源综合利用，2001(3)：18-20.
GUO Jingli，MA Minxiang，WU Shaoqing，et al.The technology of utilization and its development prospects of tobacco waste[J]. **China Resources Comprehensive Utilization**，2001(3)：18-20.(in Chinese)

[4] 朱大恒，韩峰锦，张爱萍，等. 自然醇化和人工发酵对烤烟化学成分变化的影响比较研究[J]. 烟草科技，1999(1)：3-5.
ZHU Daheng，HAN Fengjin，ZHANG Aiping，et al. Effects of art if icial fermentation and aging on the chemical change in flue-cured tobacco[J]. **Tobacco Science & Technology**，1999(1)：3-5. (in Chinese)

[5] 黄嘉扔. 烟草工业手册[M]. 北京：中国轻工业出版社，1999.

[6] 宫长荣，于建军. 烟草原料初加工[M]. 北京：中国轻工业出版社，1993.

[7] 阔克玉，屈剑波，吴殿信，等. 烤烟在人工发酵过程中主要化学成分变化规律的研究[J]. 烟草科技，1998(4)：5-7.
KUO Keyu，QU Jianbo，WU Dianxin，et al. The main chemical change of flue-cured tobacco during artificial fermentation[J]. **Tobacco Science & Technology**，1998(4)：5-7.(in Chinese)

[8] 沈萍，范秀容，李广斌. 微生物实验[M]. 北京：高等教育出版社，1999：215.

[9] 朱素君，谢忠俭，姚许一，等. 3 种培养基对霉菌、酵母菌的检出情况比较[J]. 浙江预防医学杂志，1991(6)：37-38.
ZHU Sujun，XIE Zhongjian，YAO Xuyi，et al. The comparision of detecting molds and yeasts with three medium [J]. **Zhejiang Journal of Preventive Medicine**，1991(6)：37-38.(in Chinese)

[10] 尹建雄，卢红，谢强，等. 3，5-二硝基水杨酸比色法快速测定烟草水溶性总糖、还原糖及淀粉的探讨[J]. 云南农业大学学报，2007，22(6)：829-838.
YIN Jianxiong，LU Hong，XIE Qiang，et al. A study on rapid colorimetric determination of water soluber total suger，reducing suger and starch in tobacco with 3，5-dinitrosalicylic acid[J]. **Journal of Yunnan Agricultural University**，2007，22(6)：829-838.(in Chinese)

[11] 诸葛健，王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京：中国轻工业出版社，1994.