一株胶红酵母 *Rhodotorula mucilaginosa* YG14 的筛选及混菌发酵提高梗丝品质

刘文莉[1,2,3]，张 娟[*1,2,3]，堵国成[1,2,3]，罗 诚[4]，李东亮[4]

（1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 协同创新中心，江苏 无锡 214122；4. 四川中烟责任有限公司，四川 成都 610000）

摘要：基于产香及促进漆酶合成的特性，从烟梗中筛选获得一株产类胡萝卜素物质的胶红酵母 YG14（*Rhodotorula mucilaginosa* YG14）。通过灵芝菌、胶红酵母 YG14 单菌和共培养混菌固态发酵梗丝，进行了细胞壁物质成分分析、梗丝中性致香成分检测及品吸质量评价。结果表明，筛选获得的胶红酵母 YG14 与灵芝菌共培养后，混菌固态发酵梗丝在细胞壁物质降解、中性致香成分质量分数和感官品吸等方面的改善比两株菌单独固态发酵梗丝效果显著增强。共培养混菌固态发酵结束后梗丝总细胞壁物质降解率达到 37.20%；中性致香成分质量分数提升 20.44%；感官品吸评价为甜感提升明显，木质气息改善明显，香气量有一定提升，灼烧刺激感改善明显，香气更显圆润。胶红酵母 YG14 与灵芝菌共培养后固态发酵梗丝能够显著改善梗丝的品质，增加梗丝在卷烟中的利用率。

关键词：胶红酵母 YG14；灵芝菌；共培养混菌固态发酵；梗丝；细胞壁物质；香气成分；感官评价

中图分类号：TS 413　**文章编号**：1673-1689(2021)09-0064-09　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.09.009

Screening and Mixed Fermentation of *Rhodotorula mucilaginosa* YG14 to Improve Tobacco Stems Quality

LIU Wenli[1,2,3]，*ZHANG Juan*[*1,2,3]，*DU Guocheng*[1,2,3]，*LUO Cheng*[4]，*LI Dongliang*[4]

（1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Collaborative Innovation Center, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. China Tobacco Sichuan Industry Co., Ltd., Chengdu 610000, China）

Abstract: Based on the characteristics of aroma production and promotion of laccase synthesis, a carotenoid-producing strain of *Rhodotorula mucilaginosa* YG14 was screened from tobacco stems. After solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*, *Rhodotorula mucilaginosa* YG14 and co-cultured mixed stalks. The contents of cell wall materials were measured, the neutral aroma components were determined, and the sensory quality evaluation was performed on the stalks. The results showed that the solid fermentation fermented silk of the two strains co-cultured had significant improvements in cell wall material degradation, neutral aroma content, and sensory

收稿日期：2020-01-19

基金项目：国家“十三五”重点研发计划项目（2017YFB0308401）；国家轻工业技术与工程一流学科计划项目（LITE2018-08）。

* **通信作者**：张 娟（1981—），女，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事基于系统生物学的微生物代谢工程改造和与之相关的食品微生物生理学、组学研究及其功能强化研究。E-mail：zhangj@jiangnan.edu.cn

absorption compared to those of two strains alone. After solid-state fermentation of the co-cultured mixed bacteria, the total cell wall material of stems degraded to 37.20%, and the neutral aroma components content (mass fraction) increased by about 20.44%. The sensory evaluation showed that the sweetness was significantly improved, the woody flavor was significantly improved, the aroma was improved to a certain extent, the burning sensation was significantly improved, and the aroma was more mellow. It can significantly improve the quality of tobacco stems and increase its utilization rate in tobacco.

Keywords: *Rhodotorula mucilaginosa* YG14, *Ganoderma lucidum*, co-culture mixed bacteria fermentation, stem silk, cell wall material, aroma components, sensory evaluation

烟草中的烟梗是烟叶中相对粗硬的一部分，其质量约占叶质量的 30%[1]。烟梗与烟叶相比，烟梗的细胞壁物质纤维素、半纤维素、木质素和果胶等含量较高，还原糖和总糖含量较低，糖碱比失调。将烟梗切丝后应用在卷烟中，燃吸时呈现出木质气息明显、刺激感和灼喉感较重，以及香气贫乏等问题，这些问题会严重影响卷烟的品质[2]。因此，烟梗目前多作为废弃物处理[3]，这会造成环境的大量污染和资源的浪费。近年来，随着烟草减害降焦工作的持续发展和对梗丝处理工艺的提升，梗丝在卷烟中的应用越来越广泛。因此，对烟梗的品质提升和充分再利用也成为卷烟行业研究的热点之一[4]。

为了降低烟梗中的细胞壁含量，目前主要通过生物法来改善烟梗品质。陈兴等选取了中性蛋白酶、半纤维素酶、果胶酶、漆酶、纤维素酶和糖化酶 6 种生物酶作为复合酶制剂处理烟梗、梗丝[5]。张见对烟梗的酶降解应用进行了研究与评价[6]。同时也有人通过微生物制剂来改善烟梗品质。宋丽丽等利用白腐真菌液态发酵烟梗 24 h 后，烟梗中木质素成分降解了 23.11%[7]。施林燕通过对烟梗进行黑曲霉发酵和外加酶处理，使得烟梗中纤维素、果胶和淀粉含量降低[8]。

目前已有利用微生物对烟梗发酵的研究只是针对细胞壁物质的降解，以及产香微生物单独或者菌剂复合发酵梗丝，但对于同时兼顾降解细胞壁物质和增香的共培养体系发酵以改善梗丝品质的研究很少。本研究中通过安全可靠的药食同源真菌灵芝菌结合定向筛选获得一株产香微生物胶红酵母共培养后，并进行梗丝固态发酵。灵芝菌作为药食用白腐真菌，能够产生漆酶和少部分纤维素酶、果胶酶，且本身同时合成多糖类、三萜类、腺苷类、生物碱等活性物质，并具有特有的香味[9-10]，但单一灵芝菌固态发酵梗丝在细胞壁降解和香气提升方面效果有限。有研究表明，类胡萝卜素物质可促进白腐真菌漆酶基因的表达[11]。因此本研究中通过有目的地在烟梗上筛选出一株产类胡萝卜素的菌株，在对灵芝菌产漆酶具有诱导作用的同时，其所产生的类胡萝卜素物质作为烟草四大主要香气成分之一，与烟草的香气量和香气品质呈正相关关系[12]；该菌通过与灵芝菌共培养混菌固态发酵梗丝来改善梗丝品质，在提高梗丝利用效率方面具有良好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 梗丝材料 烟梗、梗丝：四川中烟责任有限公司梗丝生产车间提供（水分质量分数 11%~13%）。

1.1.2 菌种 灵芝菌(*Ganodermalucidum*,*G. lucidum*)：作者所在实验室保藏；胶红酵母 YG14(*Rhodotorula mucilaginosa* YG14)：分离自烟梗。

1.1.3 培养基 PDB 培养基：葡萄糖 20 g/L、土豆 200 g/L；pH 自然，121 ℃灭菌 20 min。

发酵培养基：葡萄糖 20 g/L、酵母粉 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 1 g/L、KH_2PO_4 1 g/L、Vb_1 0.1 g/L；pH 自然，121 ℃灭菌 20 min。

YEPD 液体培养基：葡萄糖 20 g/L、蛋白胨 20 g/L、酵母粉 10 g/L；pH 自然，121 ℃灭菌 20 min。

产类胡萝卜素菌株筛选培养基：葡萄糖 20 g/L、酵母粉 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 1 g/L、KH_2PO_4 1 g/L；pH 6.0，121 ℃灭菌 20 min。

木质素固体培养基：木质素 5 g/L、酵母粉 10 g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 1 g/L、KH_2PO_4 1 g/L，琼脂 20 g/L；pH

自然,121 ℃灭菌 20 min。

羧甲基纤维素钠(CMC-Na)固体培养基:CMC-Na 15 g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 1 g/L、KH_2PO_4 1 g/L,琼脂 20 g/L;pH 自然,121 ℃灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 灵芝菌固态发酵梗丝 灵芝菌液的制备:灵芝种子液经过 PDB 培养基活化 5 d 后,用玻璃珠打散菌丝体,以 5%(体积分数)接种量接种于发酵培养基中,30 ℃、150 r/min 培养 7 d,玻璃珠打散菌丝体得到混合均匀的灵芝菌液;

梗丝的固态发酵:将制备的灵芝菌液分别以梗丝质量的 10%、20%、30%、40%的接种量均匀喷洒至梗丝上,将梗丝装入密封袋中,并扎少量小孔,放置在温度 30 ℃、湿度 75%的恒温恒湿培养箱中发酵 6 d,将温度升至 80 ℃保持 2 h 高温灭活。固态发酵结束后将梗丝于 40 ℃烘箱中烘至水分质量分数为 11%~13%[13]。

1.2.2 梗丝细胞壁成分测定 纤维素、半纤维素、木质素和果胶测定方法参照文献[14]。四川中烟责任有限公司所产烟梗中纤维素质量分数为 28.91%,木质素质量分数为 8.81%,半纤维素质量分数为 7.9%,果胶质量分数为 13.95%。

1.2.3 产类胡萝卜素菌株的筛选 用无菌水在摇瓶中振荡洗涤烟梗,获得烟梗上的微生物,经过平板稀释涂布,挑选颜色为黄色、橙色或者红色的菌株进行分离纯化和鉴定,并对筛选到的 10 株带有颜色的菌株进行产类胡萝卜素能力的测定[15]。

类胡萝卜素质量分数测定方法:离心收集菌体,细胞破壁后用蒸馏水洗涤 2~3 次,加入等体积丙酮提取类胡萝卜素,离心后取上清液即为类胡萝卜素提取液,475 nm 下测定吸光度。

$$I(\mu g/g)=A_{\lambda_{max}}DV/0.16W \quad (1)$$

式(1)中:I 为类胡萝卜素质量分数(以干菌体质量计),μg/g;$A_{\lambda_{max}}$ 为最大吸收波长 475 nm 下的吸光度;V 为提取所用有机溶剂的总体积,mL;D 为浸提液稀释倍数;W 为菌的干质量,g;0.16,类胡萝卜素的消光系数。

对初筛得到的 10 株菌分别在木质素作为唯一碳源的固体培养基和 CMC-Na 作为唯一碳源的固体培养基上进行划板培养,放到 30 ℃培养箱中培养 2~4 d 后观察菌株是否生长。

1.2.4 灵芝菌、胶红酵母 YG14 单菌和共培养混菌发酵液漆酶测定(ABTS 法)

按照方法 1.2.1 获得灵芝菌液、按照方法 1.2 获得胶红酵母、共培养混菌菌液。

酶活测定方法:3 mL 反应体系里含有 0.5 mL 1 mmol/L ABTS 溶液、2 mL 0.05 mol/L pH 3 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液和 0.5 mL 粗酶液(发酵菌液 8 000 r/min 离心 5 min 取上清液),在 45 ℃下反应 5 min,沸水浴 10 min 终止反应,测定 $OD_{420\ nm}$。

$$k(U/L)=10^6\times V_{总}\times A_{420}/\varepsilon\times V_{酶}\times\Delta t \quad (2)$$

式(2)中:k 为漆酶酶活,U/L;$V_{总}$为漆酶酶活测定反应体系总体积,mL;$V_{酶}$为添加酶液体积,mL;Δt 为反应时间,min;ε 为 3.6×10^4,L/(mol·cm)[16]。

1.2.5 胶红酵母 YG14、灵芝菌和胶红酵母 YG14 共培养混菌固态发酵梗丝

1)胶红酵母菌液的制备 胶红酵母 YG14 经过 YEPD 液体培养基活化 2 d 后,以 2%(体积分数)接种量接种于发酵培养基中,30 ℃、220 r/min 培养 2 d 后得到胶红酵母 YG14 菌液。

2)灵芝菌与胶红酵母共培养菌液的制备 灵芝种子液经过 PDB 培养基活化 5 d 后,用玻璃珠打散菌丝体,以 5%(体积分数)接种量接种于发酵培养基中,30 ℃、150 r/min 培养 2 d,随后将摇瓶培养 2 d 的胶红酵母 YG14 菌以 5%(体积分数)的接种量接种至灵芝菌发酵摇瓶内,共同培养 4 d,得到共培养菌液,其中胶红酵母活菌数约 7×10^8 CFU/mL,灵芝菌体干质量浓度约 11 g/L。

3)梗丝的固态发酵 胶红酵母 YG14 固态发酵梗丝:将 1)中制备的胶红酵母 YG14 菌液分别以梗丝质量的 10%、20%、30%、40%的接种量均匀喷洒至梗丝上,将梗丝装入密封袋中,并扎少量小孔,放置在温度 30 ℃、湿度 75%的恒温恒湿培养箱中发酵 6 d,将温度升至 80 ℃保持 2 h 高温灭活。固态发酵结束后将梗丝于 40 ℃烘箱中烘至水分质量分数为 11%~13%。

共培养混菌固态发酵梗丝:将 2)中制备的共培养菌液以梗丝质量的 5%、10%、20%、30%的接种量均匀喷洒至梗丝上,将梗丝装入密封袋中,并扎少量小孔,放置在温度 30 ℃、湿度 75%的恒温恒湿培养箱中发酵 6 d,将温度升至 80 ℃保持 2 h 高温灭活。固态发酵结束后将梗丝于 40 ℃烘箱中烘至水分质量分数为 11%~13%。

1.2.6 梗丝挥发性香气成分测定

1)样品前处理　灵芝菌、胶红酵母 YG14 单菌和共培养混菌固态发酵后的梗丝在 40 ℃烘箱中干燥，用粉碎机粉碎后过 40 目筛，准确称取 1 g 样品于顶空瓶内用顶空微萃取法进行萃取后进行 GC-MS 分析，对照组为喷洒高温灭活的发酵液梗丝[17-33]。

2)GC-MS 联用仪分析条件　顶空萃取头：DVB/CAR/PDMS（50/30 μm）；色谱柱：TG-5MS（30 m×0.25 mm×0.25 μm）毛细管柱；进样口温度：260 ℃；载气：Methane，1 mL/min；程序升温：55 ℃保持 1 min，5 ℃/min 升至 80 ℃，3 ℃/min 升至 200 ℃，5 ℃/min 升至 260 ℃保持 5 min；进样量：2 μL；分流比：20:1；传输线温度：280 ℃；电离方式：EI；电离能量：70 eV；离子源温度：300 ℃；四级杆温度：160 ℃；质量范围（*m/z*）：33~600。结果分析采用 NIST05、Wiley275 普库进行检索定性[28]。

1.2.7 梗丝感官品吸评价

将空白处理梗丝，灵芝菌、胶红酵母 YG14 单菌和共培养混菌发酵的梗丝制成手工卷制的烟支，在（22±1）℃、（60±1）%相对湿度下平衡 48 h，然后组织四川中烟责任有限公司相关评吸专家进行梗丝的品吸评价[29]。

1.2.8 数据处理

用 SPSS 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 灵芝菌固态发酵梗丝结果

梗丝经过灵芝菌固态发酵 6 d 后，烘干并测定细胞壁纤维素、半纤维素、木质素和果胶的质量分数，通过计算得到细胞壁物质降解结果（见表 1）。灵芝菌固态发酵梗丝，总细胞壁降解程度随着灵芝菌接种量（质量分数）的增加呈先上升后下降的趋势，在接种量为梗丝质量的 20%时总细胞壁物质降解程度达到最高，降解率为 16.40%，其中纤维素降解率为 14.74%、木质素降解率为 24.40%、半纤维素降解率为 15.82%、果胶降解率为 15.13%，灵芝菌固态发酵对梗丝的木质素降解效果较好，但是对其他物质的降解效果一般，使得梗丝总细胞壁物质的降解率较低。

表 1　灵芝菌固态发酵梗丝细胞壁物质测定结果

Table 1　Cell wall substance measurement results of *G. lucidum* solid fermentation stem silk

接种量（质量分数）/%	纤维素质量分数/%	木质素质量分数/%	半纤维素质量分数/%	果胶质量分数/%	总细胞壁质量分数/%
0	28.91±0.18 ^{a}	8.81±0.12 ^{a}	7.90±0.08 ^{a}	13.95±0.11 ^{a}	59.57±0.17 ^{a}
10	24.74±0.39 ^{d}	7.48±0.09 ^{b}	6.92±0.14 ^{b}	12.12±0.21 ^{b}	51.26±0.20 ^{c}
20	24.65±0.34 ^{d}	6.66±0.11 ^{c}	6.65±0.09 ^{c}	11.84±0.07 ^{c}	49.80±0.13 ^{d}
30	26.13±0.54 ^{c}	6.55±0.19 ^{c}	6.91±0.06 ^{b}	11.74±0.04 ^{c}	51.33±0.06 ^{c}
40	27.30±0.49 ^{b}	6.52±0.07 ^{c}	6.87±0.06 ^{b}	11.50±0.10 ^{d}	52.20±0.17 ^{b}

注：不同字母代表差异显著（$P<0.05$）。

将灵芝菌发酵的梗丝进行品吸，结果见表 2。灵芝菌接种量为梗丝质量的 20%时品吸效果最好，其甜感提升明显，木质气息有所减轻，灼烧感较轻微，刺激感较轻微。灵芝菌固态发酵过程中产灵芝多糖和漆酶，因此对梗丝的甜感和木质气息改善较明显，但是对纤维素和果胶的降解效果不显著，因此在灼烧感和刺激感方面改善较不明显。而香气感在接种量加大后才有显著提升，猜测主要是加入的大量菌液中带入一些灵芝菌发酵液中的成香物质，但是接种量过多会导致因菌体过多在燃吸时产生异味。

通过细胞壁物质降解和品吸评价，灵芝菌固态发酵梗丝最佳接种量为梗丝质量的 20%，但是灵芝菌对于梗丝品质的提升效果有限，因此选择从烟梗上筛选一株菌进行复合固态发酵梗丝，来增强梗丝

表 2　灵芝菌固态发酵梗丝感官品吸评价

Table 2　Sensory evaluation of *G. lucidum* solid fermentation stem silk

接种量（质量分数）/%	感官评价描述	综合排名
10	甜感稍有提升，木质气息明显，灼烧感稍有，刺激感较明显	3
20	甜感提升明显，木质气息有所减轻，灼烧感较轻微，刺激感较轻微	1
30	香气甜感提升明显，木质气息有所减轻，灼烧感和刺激均较轻微，但香气中稍有异味	2
40	香气甜感提升明显，木质气息有所减轻，灼烧感和刺激均较轻微，但香气中异味稍明显	4

的降解效果和香气量的提升。通过查找文献发现类胡萝卜素能够促进白腐真菌漆酶的表达,另外类胡萝卜素物质也是烟叶中四大主要香气成分之一。因此选择筛选一株能够产类胡萝卜素物质,并且可同时降解纤维素和木质素等物质的菌株与灵芝菌共培养复合处理梗丝。

2.2 产类胡萝卜素菌的筛选

类胡萝卜素一般呈现红色至黄色,对烟梗上分离的 45 株菌进行产类胡萝卜素菌的筛选,初筛得到带有类胡萝卜素颜色特征的菌株共 10 株(见图 1),通过序列分析比对和鉴定分别为 *Rhodosporidiobolus*、*Rhodotorula mucilaginosa*、*Methylorubrum*、*Planococcus*、*Mixta intestinalis*、*Sphingomonas*、*Franconibacter*、*Stenotrophomonas*、*Ochrobactrum*、*Microbacterium*。分别命名为 *Rhodosporidiobolus* YG1、*Rhodotorula mucilaginosa* YG14、*Methylorubrum* YG17、*Planococcus* YG19、*Mixta intestinalis* YG20、*Sphingomonas* YG21、*Franconibacter* YG22、*Stenotrophomonas* YG24、*Ochrobactrum* YG25、*Microbacterium* YG27。对这 10 株菌进行产类胡萝卜素能力测定,结果如表 3 所示,产类胡萝卜素的共有 5 株菌,其产类胡萝卜素能力由大到小依次为:*Rhodotorula mucilaginosa* YG14、*Rhodosporidiobolus* YG1、*Sphingomonas* YG21、*Planococcus* YG19、*Methylorubrum* YG17。

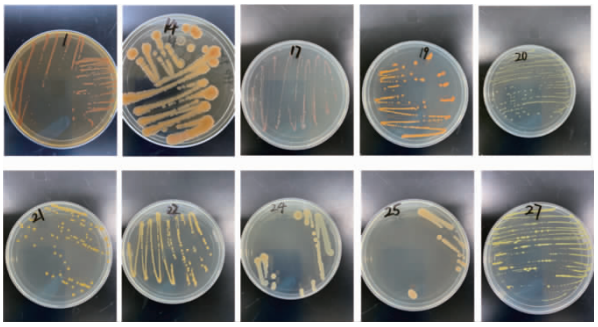


图 1 烟梗上产类胡萝卜素菌的初筛

Fig. 1 Primary screening of carotenoid producing bacteria on tobacco stems

本次筛选一株产类胡萝卜素菌的目的是与灵芝菌共培养混菌固态发酵梗丝,因此在高产类胡萝卜素的基础上还能够降解细胞壁物质,因此考察了这 10 株菌对木质素和 CMC-Na 的利用情况,能够利用木质素的有 4 个菌株,菌号分别为 YG1、YG14、YG17、YG19;能够利用 CMC-Na 的有 3 个菌株,菌号分别为 YG1、YG14、YG20。

菌号 YG14 和 YG1 两株菌不仅产类胡萝卜素,同时可利用木质素和 CMC-Na,而且 YG14 的类胡萝卜素产量最高。因此,选择烟梗上筛选到的一株胶红酵母 YG14 作为灵芝菌的共培养菌进行梗丝的混菌固态发酵。

表 3 烟梗上筛选的 10 株菌测定结果

Table 3 Measurement results of 10 strains selected on tobacco stems

种名	菌号	类胡萝卜素产量/(μg/g)	可利用木质素	可利用 CMC-Na
Rhodosporidiobolus	YG1	52.5	+	+
Rhodotorula mucilaginosa	YG14	88.1	+	+
Methylorubrum	YG17	3.5	+	—
Planococcus	YG19	11.7	+	—
Mixta intestinalis	YG20	—	—	+
Sphingomonas	YG21	29.8	—	—
Franconibacter	YG22	—	—	—
Stenotrophomonas	YG24	—	—	—
Ochrobactrum	YG25	—	—	—
Microbacterium	YG27	—	—	—

注:+表示可利用;—表示不产或者不利用。

2.3 胶红酵母 YG14 固态发酵梗丝

将胶红酵母 YG14 固态发酵处理梗丝 6 d 后,烘干并测定细胞壁纤维素、半纤维素、木质素和果胶的质量分数,通过计算得到细胞壁物质降解结果(见表 4),胶红酵母 YG14 固态发酵梗丝总细胞壁降解程度随着接种量(质量分数)的增加呈先上升后下降的趋势,在接种量为梗丝质量的 20%时总细胞壁物质降解程度达到最高,降解率为 24.91%。其

表 4　胶红酵母 YG14 固态发酵梗丝细胞壁物质测定结果

Table 4　Determination of cell wall material in solid fermented stem of *R. mucilaginosa* YG14

接种量(质量分数)/%	纤维素 质量分数/%	木质素 质量分数/%	半纤维素 质量分数/%	果胶 质量分数/%	总细胞壁 质量分数/%
0	28.91±0.18 [a]	8.81±0.12 [a]	7.90±0.08 [a]	13.95±0.11 [a]	59.57±0.17 [a]
10	22.93±0.31 [c]	7.98±0.09 [b]	5.76±0.08 [c]	12.11±0.08 [c]	48.73±0.13 [c]
20	19.42±0.25 [e]	7.75±0.13 [b]	5.25±0.07 [d]	12.31±0.10 [c]	44.73±0.08 [e]
30	21.49±0.19 [d]	7.88±0.04 [b]	5.66±0.02 [c]	12.71±0.14 [b]	47.74±0.20 [d]
40	24.52±0.15 [b]	7.87±0.11 [b]	6.22±0.05 [b]	12.62±0.17 [b]	51.23±0.23 [b]

注：不同字母代表差异显著(P<0.05)。

中纤维素降解率为32.83%、木质素降解率为12.03%、半纤维素降解率为33.54%、果胶降解率为11.76%，胶红酵母 YG14 对纤维素和半纤维素的降解效果较好。

胶红酵母 YG14 固态发酵梗丝在以梗丝质量20%的接种量时梗丝品吸效果最好(见表 5)，与灵芝菌固态发酵梗丝相比，香气量提升的比较明显，但是烧纸气息和木质气息改善较不明显，猜测主要是因为胶红酵母 YG14 对梗丝木质素和果胶的降解效果不明显。

表 5　胶红酵母 YG14 固态发酵梗丝感官品吸评价

Table 5　Sensory evaluation of *R. mucilaginosa* YG14 solid fermentation stem silk

接种量(质量分数)/%	感官评价描述	综合排名
10	甜感稍有提升，木质气息改善不明显，灼烧感稍有，口感较原样提升了些圆润感	3
20	甜感稍有提升，木质气息稍改善，香气量有一定提升，灼烧刺激感稍有改善	1
30	甜感提升较为明显，木质气息改善，香气量有一定提升，但香气质略感浑浊，灼烧刺激感有所改善	2
40	甜感提升明显，木质气息改善，香气量有一定提升，但香气质略感浑浊，有异味杂气，灼烧刺激感改善明显	4

2.4　灵芝菌、胶红酵母 YG14 单菌和共培养混菌发酵液的漆酶测定结果

胶红酵母 YG14 单菌液态发酵 2 d 后取上清液测定漆酶酶活，经过测定可知胶红酵母 YG14 可产生少部分的漆酶，酶活为 14.28 U/L。将灵芝菌液、灵芝菌与胶红酵母 YG14 共培养混合菌液离心后分别取上清液测定漆酶酶活，结果如图 2 所示。灵芝单菌发酵液在第 7 天时漆酶酶活达到最大，为 499.87 U/L；灵芝菌与胶红酵母 YG14 共培养发酵液在第 6 天时漆酶酶活达到最大，为 1 129.17 U/L，比灵芝单菌最高酶活(第 7 天)提高了 1.25 倍。

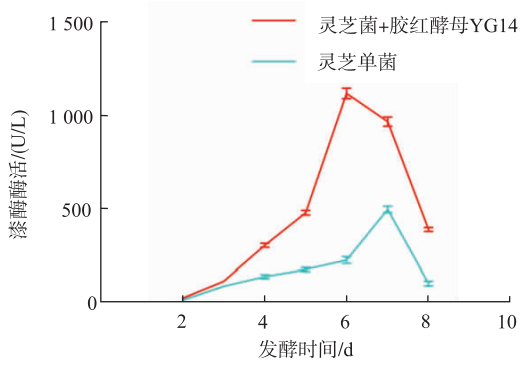


图 2　漆酶酶活测定

Fig. 2　Laccase activity assay

灵芝菌与胶红酵母 YG14 共培养液态发酵，胶红酵母 YG14 能够促进灵芝菌漆酶的表达，共培养菌液中不仅含有胶红酵母 YG14 和灵芝菌两种菌，还含有大量漆酶、少量纤维素酶和果胶酶，比灵芝单菌液态发酵的酶系更全面协调，而且漆酶酶活提高，发酵产酶时间缩短。

2.5　共培养混菌固态发酵梗丝

灵芝菌和胶红酵母 YG14 液态共培养后混菌固态发酵梗丝 6 d，烘干并测定细胞壁纤维素、半纤维素、木质素和果胶的质量分数，通过计算得到细胞壁物质降解结果(见表 6)。在共培养菌液接种量为梗丝质量的 10%时梗丝总细胞壁物质降解效果最好，降解率为 37.20%，其中纤维素降解率为38.81%、木质素降解率为 33.26%、半纤维素降解率为 28.23%、果胶降解率为 41.43%，灵芝菌与胶红酵母 YG14 共培养混菌固态发酵梗丝后细胞壁各物质降解相对比较协调，且降解效果明显，比单菌效果更好。

表 6　共培养固态发酵梗丝细胞壁物质测定结果

Table 6　Co-cultured solid fermented stem silk cell wall substance assay results

接种量(质量分数)/%	纤维素质量分数/%	木质素质量分数/%	半纤维素质量分数/%	果胶质量分数/%	总细胞壁质量分数/%
0	28.91±0.18[a]	8.81±0.12[a]	7.90±0.08[a]	13.95±0.11[a]	59.57±0.17[a]
5	22.28±0.22[b]	6.49±0.16[c]	5.65±0.03[b]	9.29±0.06[d]	43.71±0.15[c]
10	17.69±0.35[d]	5.88±0.09[e]	5.67±0.03[b]	8.17±0.08[e]	37.41±0.22[e]
20	20.44±0.20[c]	6.15±0.11[d]	5.46±0.09[c]	10.31±0.12[c]	42.36±0.30[d]
30	22.27±0.19[b]	6.86±0.09[b]	4.90±0.06[d]	10.72±0.20[b]	44.75±0.37[b]

注:不同字母代表差异显著(P<0.05)。

灵芝菌和胶红酵母 YG14 共培养混菌固态发酵梗丝后梗丝品吸结果见表 7，共培养菌液接种量为梗丝质量的 10%时,梗丝品吸效果最好,甜感提升明显,木质气息改善明显,香气量有一定提升,灼烧刺激感改善明显,并且香气更显圆润。共培养混菌固态发酵梗丝,在较少的接种量情况下降解效率提升明显,梗丝品质改善明显。

表 7　共培养固态发酵梗丝感官品吸评价

Table 7　Sensory evaluation of co-cultured solid fermented stems

接种量(质量分数)/%	感官评价描述	综合排名
5	甜感稍有提升,木质气息减弱,香气量有一定提升,灼烧刺激感改善明显	2
10	甜感提升明显,木质气息改善明显,香气量有一定提升,灼烧刺激感改善明显,香气更显圆润	1
20	甜感有所提升,香气量有所提升但香气质感下降,杂气较为明显,灼烧刺激感有所改善但并不明显	3
30	甜感提升不明显,香气质地变浑浊,有一定灼烧刺激感,香气中杂气异味较为显著	4

2.6　梗丝固态发酵前后致香成分变化

通过 GC-MS 对不同处理条件下的梗丝进行致香成分含量变化检测，共检测到 200 多种成分,其中共检测到 58 种致香成分。对梗丝中性致香成分主要进行以下 6 种分类:苯丙氨酸转化产物、棕色化反应产物、类胡萝卜素转化产物、西柏烷类转化产物、新植二烯和其他物质。

选择灵芝菌、胶红酵母 YG14 单菌和共培养混菌固态发酵梗丝细胞壁降解效果和感官品吸效果最好的 3 个条件下处理的梗丝与对照组梗丝进行中性致香物质的测定,结果见表 8。灵芝单菌固态发酵梗丝在以梗丝质量 20%的接种量时总挥发性成分提升 11.45%;胶红酵母 YG14 单菌固态发酵梗丝在以梗丝质量20%的接种量时梗丝总挥发性成分提升 12.79%;灵芝菌和胶红酵母 YG14 共培养混菌固态发酵梗丝在以梗丝质量 10%的接种量时总挥发性成分提升 20.44%。共培养菌液在以梗丝质量 10%的接种量发酵梗丝时,中性致香成分变化显著的物质为棕色化反应产物和新植二烯,其中棕色化反应产物主要起到改善梗丝气味，增加梗丝的香气、甜味,降低杂气和刺激性的作用;新植二烯会降低烟气中的刺激性和杂气产生,平衡烟气,使其更圆润。根据总挥发性致香成分质量分数变化可以得出灵芝菌和胶红酵母 YG14 共培养混菌比灵芝单菌、胶红酵母 YG14 单菌固态发酵梗丝效果明显更好。

表 8　梗丝处理前后中性致香物质的变化

Table 8　Changes of neutral aroma components before and after tobacco stem treatment

梗丝发酵类型	质量分数/(μg/g)						
	苯丙氨酸转化产物	棕色化反应产物	类胡萝卜素转化产物	西柏烷类转化产物	新植二烯	其他物质	总计
对照组	18.55	19.25	5.05	2.21	5.16	122.9	173.12
灵芝菌接种量 20%	24.13	25.57	4.94	2.97	5.83	129.5	192.94
胶红酵母 YG14 接种量 20%	20.57	27.66	7.76	2.89	5.18	131.2	195.26
共培养混菌接种量 10%	21.58	30.03	6.99	2.94	7.67	139.3	208.51

2.7 梗丝综合感官品吸评价

通过对梗丝细胞壁成分测定和 3 组品吸结果分析，选择灵芝单菌接种量为梗丝质量的 20%、胶红酵母 YG14 单菌接种量为梗丝质量的 20%和共培养混菌接种量为梗丝质量的 10% 3 组固态发酵后的梗丝与对照组梗丝制成手工卷制的烟支，感官品吸结果（见表 9）表明：经过微生物菌液固态发酵后的梗丝甜感提升，木质气息改善，香气量也有一定的提升，灼烧感和刺激感减弱。经过排序结果表明接种质量分数 10%的灵芝菌和胶红酵母 YG14 共培养混菌固态发酵后的梗丝品吸效果最佳。

表 9 梗丝感官品吸评价

Table 9 Tobacco stem sensation evaluation

梗丝发酵类型	感官评价描述	综合排名
灵芝菌接种量 20%	甜感提升明显，木质气息有所减轻，灼烧感较轻微，刺激感较轻微	3
胶红酵母 YG14 接种量 20%	甜感香气量稍有提升，木质气息稍有改善，灼烧刺激感稍有改善，但烧纸感相较于灵芝菌改善不明显	2
共培养混菌接种量 10%	甜感提升明显，木质气息改善明显，香气量有一定提升，灼烧刺激感改善明显，香气更显圆润	1

3 结 语

本研究中从烟梗上筛选到一株辅助灵芝菌降解细胞壁物质并且有提质增香作用的胶红酵母菌。将两株菌进行液态共培养后混菌固态发酵梗丝，发酵结束后梗丝总细胞壁物质降解达到 37.20%；中性致香成分质量分数提升 20.44%；感官品吸评价为甜感提升明显，木质气息改善明显，香气量有一定提升，灼烧刺激感改善明显，香气更显圆润。综上所述，筛选获得的胶红酵母 YG14 与灵芝菌液态共培养后固态发酵梗丝细胞壁物质降解效果明显，感官品质改善明显，具有较好的应用前景。本研究可以为工业化应用奠定一定的技术基础。

参考文献：

[1] 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(1)：39-42.

[2] 李坚，吴敬华，张旭升，等. 碎烟梗筛分对卷烟梗丝加工质量的影响[J]. 广西轻工业，2009，25(2)：46-47.

[3] 周学政，何蓉，戴亚，等. 采用浸泡和螺旋压榨预处理烟梗的工艺方法：CN201110095672.1[P]. 2011-09-14.

[4] 任竹梅，冯云龙，张世强. 梗丝加工参数分析与优化在卷烟中的应用[J]. 科技与企业，2013(3)：271.

[5] 陈兴，巩效伟，邱昌桂，等. 复合酶处理对梗丝品质的影响[J]. 食品工业科技，2014，35(2)：116-120.

[6] 张见. 烟梗的酶降解应用研究与评价[D]. 无锡：江南大学，2012.

[7] 宋丽丽，张永良，张志平，等. 白腐菌液体发酵降解烟梗木质素的研究[J]. 轻工学报，2019，34(1)：36-42.

[8] 施林燕. 微生物发酵及酶解烟梗物料的研究[D]. 无锡：江南大学，2012.

[9] 邓伟伟，丁重阳，夏海锋，等. 灵芝菌丝体液态发酵中生物质组分定量的研究[J]. 生物加工过程，2017，15(4)：15-21.

[10] 杨从发，丁重阳，章克昌. 灵芝转化小球藻发酵液粗多糖对荷瘤小鼠免疫功能的影响[J]. 中国酿造，2009(6)：54-57.

[11] 赵丽婷. 共培养胶红酵母对阿魏蘑漆酶基因表达及其相关蛋白的影响[D]. 无锡：江南大学，2017.

[12] 徐德阳，王莉莉，杜春梅. 微生物共培养技术的研究进展[J]. 微生物学报，2015，55(9)：1089-1096.

[13] 国家烟草质量监督检验中心. 烟草及烟草制品试样的制备和水分的测定烘箱法：YC/T 31—1996[S]. 北京：中国标准出版社，1996.

[14] 张槐苓，葛翠英，穆怀静，等. 烟草分析与检测[M]. 郑州：河南科学技术出版社，1994.

[15] 樊竹青，李治滢，董明华，等. 云南抚仙湖产类胡萝卜素酵母菌的资源调查[J]. 微生物学通报，2017，44(2)：296-304.

[16] 司静，崔宝凯，戴玉成. 栓孔菌属漆酶高产菌株的初步筛选及其产酶条件的优化[J]. 微生物学通报，2011，38(3)：405-416.

[17] 张燕，李天飞，宗会，等. 不同产地香料烟内在化学成分及致香物质分析[J]. 中国烟草科学，2003(4)：12-16.

[18] LI H,XUE J,WANG Y,et al. Changes in volatile aroma components during reconstitution of reconstituted tobacco leaves[J]. **Tobacco Science & Technology**,2018,51(12):52-64.

[19] 黄志,陶立奇,沙云菲,等. 梗丝掺配对卷烟主流烟气粒相物中香味成分的影响[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2019,47(2):55-60.

[20] 沈剑波. 清香型与浓香型烤烟部分质量因素的比较[D]. 郑州:河南农业大学,2008.

[21] 文冬梅,卓浩廉,赵谋明,等. 烟末中的主要成分及挥发性风味物质测定[J]. 现代食品科技,2011,27(8):1025-1028.

[22] 景延秋,宫长荣,张月华,等. 烟草香味物质分析研究进展[J]. 中国烟草科学,2015(2):44-48.

[23] 范忠,刘鸿,陈志燕,等. 烤烟梗丝与叶丝卷烟主流烟气香味成分的差异性分析[J]. 江西农业学报,2018,30(1):95-100.

[24] 周瑢,孔浩辉,何艳明,等. 生香酵母发酵改善烟梗提取液性质研究[J]. 食品工业科技,2012,33(23):73-75.

[25] 张玉荣,高艳娜,林家勇,等. 顶空固相微萃取 - 气质联用分析小麦储藏过程中挥发性成分变化[J]. 分析化学,2010,38(7):953-957.

[26] 王力,蔡良绥,林智,等. 顶空固相微萃取 - 气质联用法分析白茶的香气成分[J]. 茶叶科学,2010,30(2):115-123.

[27] LI Q,YANG L,YANG W,et al. Application of solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry in analysis of tobacco headspace composition[J]. **Tobacco Science & Technology**,2000(2):21-24.

[28] FU Y,CAI H,DENG J,et al. Differences of density and exudates of glandular trichome among flue-cured tobacco varieties from Zimbabwe and Yunnan[J]. **Tobacco Science & Technology**,2012(9):82-86.

[29] 魏鹏程. 辛夷致香物质提取分离及在卷烟中的加香应用[D]. 郑州:河南农业大学,2013.

[30] QIANG G,YUNFEI S,DA W,et al. Analysis of the volatile components emitted from cut tobacco processing by gas chromatography/mass spectrometry thermal desorption system[J]. **Talanta**,2012(101):198-202.

[31] POPOVA V,IVANOVA T,PROKOPOV T,et al. Carotenoid-related volatile compounds of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) essential oils[J]. **Molecules**,2019,24(19):1-11.

[32] YANG Y,CHU G,ZHOU G,et al. Rapid determination of the volatile components in tobacco by ultrasound-microwave synergistic extraction coupled to headspace solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry[J]. **Journal of Separation Science**,2016,39(6):1173-1181.

[33] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品西柏烷二萜醇的测定气相色谱 - 质谱联用法:YC/T 470—2013[S]. 北京:中国标准出版社,2013.

科　技　信　息

欧盟评估经紫外线处理的面包酵母作为新型食品扩展用途的安全性

2021 年 6 月 30 日,据欧盟食品安全局(EFSA)消息,欧盟营养、新型食品和食物过敏源(NDA)研究小组就经紫外线处理的面包酵母(UV-treated baker's yeast)作为新型食品扩展用途的安全性发表科学意见。

经过评估,专家小组得出结论,在提议的使用条件下,经紫外线处理的面包酵母作为新型食品的扩展用途是安全的。

[信息来源]食品伙伴网.欧盟评估经紫外线处理的面包酵母作为新型食品扩展用途的安全性[EB/OL]. (2021-7-1).http://news.foodmate.net/2021/07/598258.html