



研究报告

我国典型湿热地区变质烟用香精中腐败微生物的多样性分析

米其利¹ 张建平² 楼牧梦¹ 黄世杰³ 朱昆⁴ 李雪梅^{*1}

1 云南中烟工业有限责任公司技术中心 云南 昆明 650231

2 福建中烟工业有限责任公司技术中心 福建 厦门 361022

3 广西中烟工业有限责任公司 广西 南宁 530001

4 红塔集团玉溪卷烟厂 云南 玉溪 653100

摘要:【背景】烟用香精是卷烟生产中的重要辅料,有些香精,特别是剩余的加料香精在运输和储存等过程中可能污染微生物,引起腐败变质发生。【目的】分析变质烟用香精中腐败微生物的群落多样性,确定引起加料香精变质的主要腐败微生物。【方法】采用稀释平板法,对我国典型湿热地区云南、福建和广西三地变质加料香精样品中的污染细菌、霉菌或酵母进行分离,分析其16S rRNA、ITS或26S rRNA基因序列,并通过反证试验确定引起变质的主要腐败微生物。【结果】所考察3个典型湿热地区变质加料香精存在不同程度的细菌、霉菌或酵母污染,其中细菌污染最为普遍。分离的76株污染细菌分布在2门4纲5目10科15属,细菌的群落多样性比较丰富,其中雷尔氏菌属(*Ralstonia*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)及芽孢杆菌属(*Bacillus*)是优势菌群;9株霉菌分布在子囊菌门(*Ascomycota*)的3纲6属,每个属分离到1–2株霉菌;42株酵母分布在子囊菌门的6个属,其中毕赤酵母属(*Pichia*)、细枝钩酵母菌属(*Wickerhamomyces*)及酵母菌属(*Saccharomyces*)是优势菌群。云南和福建两地样品的细菌菌群组成明显多于广西,广西样品的霉菌菌群组成以及福建样品的酵母菌群组成均分别多于其余两地。反证试验结果显示,柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属、雷尔氏菌属和毕赤酵母属是引起烟用加料香精变质的主要腐败微生物。【结论】变质加料香精中污染微生物菌群组成及腐败微生物确定的研究将有助于我国湿热地区香精香料中污染微生物的控制和腐败变质的预防。

关键词: 烟用香精, 腐败微生物, 多样性, 群落结构, 反证试验

Foundation items: Key Project of China National Tobacco Corporation (110201502006); Key Project of China Tobacco Yunnan Industrial Co. Ltd. (2017CP04)

***Corresponding author:** E-mail: xmlikm@126.com

Received: 07-09-2018; **Accepted:** 13-02-2019; **Published online:** 18-03-2019

基金项目: 中国烟草总公司重点项目(110201502006); 云南中烟工业有限责任公司重点项目(2017CP04)

***通信作者:** E-mail: xmlikm@126.com

收稿日期: 2018-09-07; **接受日期:** 2019-02-13; **网络首发日期:** 2019-03-18

Diversity of spoilage microorganisms in tobacco flavor in the typical hot-humid areas in China

MI Qi-Li¹ ZHANG Jian-Ping² LOU Mu-Meng¹ HUANG Shi-Jie³ ZHU Kun⁴
LI Xue-Mei^{*1}

1 Technology Center, China Tobacco Yunnan Industrial Co. Ltd., Kunming, Yunnan 650231, China

2 Technology Center, China Tobacco Fujian Industrial Co. Ltd., Xiamen, Fujian 361022, China

3 China Tobacco Guangxi Industrial Co. Ltd., Nanning, Guangxi 530001, China

4 Yuxi Cigarette Factory, Hongta Tobacco Group Co. Ltd., Yuxi, Yunnan 653100, China

Abstract: [Background] Tobacco flavor is an important auxiliary material in cigarette production. Microbial contamination usually occurs in the processes of transportation and storage of tobacco flavor, especially the residual casing, which could cause spoilage of tobacco flavor. [Objective] To investigate the diversity of spoilage microorganisms in the deteriorated tobacco flavor and identify the main spoilage microorganisms causing the deterioration of tobacco flavor. [Methods] Dilution plate counting method was applied to monitor the microbial composition of the deteriorated tobacco flavor from Yunnan, Fujian and Guangxi of typical hot-humid areas in China, and then the 16S rRNA, ITS or 26S rRNA genes of the isolates were sequenced. Furthermore, verifiable experiments were used to identify the main spoilage microorganisms causing deterioration of the tobacco flavor. [Results] The tobacco flavor samples from the three typical hot-humid areas in China were with different degree of bacteria, molds or yeasts contamination, and the bacterial contamination was the most common. A total of 76 bacterial strains, 9 fungal strains and 42 yeast strains were isolated. The 76 bacterial strains were distributed in 2 phyla, 4 classes, 5 orders, 10 families and 15 genera. *Ralstonia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* and *Bacillus* were the dominant genera. The 9 fungal strains were distributed in 3 classes and 6 genera of the *Ascomycota* phyla, with 1–2 fungal strains belonging to each genus. The 42 yeast strains were distributed in 6 genera of *Ascomycota*. *Pichia*, *Wickerhamomyces* and *Saccharomyces* were the dominant genera. The bacterial composition of Yunnan and Fujian samples was obviously more than that in Guangxi. The fungal composition of Guangxi and yeasts' composition of Fujian were more than those in the other two sites, respectively. The verifiable experiment results showed *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Ralstonia* and *Pichia* were the main spoilage microorganisms in the tobacco flavor samples. [Conclusion] The study on the composition of contaminated microorganisms and the confirmation of spoilage microorganisms in the deteriorated tobacco flavors could help to control the contamination of microorganisms and the spoilage of tobacco flavors in hot-humid areas in China.

Keywords: Tobacco flavor, Spoilage microorganisms, Diversity, Community structure, Verifiable experiment

烟用香精由多种香料、适量溶剂和其他成分等调配而成^[1-3], 是卷烟生产加工过程中的重要辅料, 具有改进烟草气味、增加韧性、提高保润性、改善燃烧性和减少碎损等作用, 是构成卷烟产品品牌风格的重要因素^[4-6]。卷烟生产过程中, 有些烟用香精, 特别是加料香精因含有大量水分以及糖类物质^[7-9], 其质量稳定性较差且控制难度大^[10], 易污染微生物而产生发酸发臭等现象^[11], 保质期非常短, 变质香精作报废处理, 给企业造成了双重的经济损失。目前, 这类烟用加料香精主要采用现用现

配或浓缩处理的方法, 通过尽量缩短存放时间或降低水活度以减少变质发生。但在企业实际生产过程中, 因多地联营加工和生产计划调整等原因, 不可避免地存在烟用香精的剩余和储存等情况, 较长时间的存放过程中加料香精的腐败变质风险大。此外, 加料香精的加工使用量较大, 其变质防控成为企业急需解决的重要问题。

加料香精的腐败变质问题在我国湿热地区相对较为易发, 主要表现为变质发生较快。有关烟用香精变质原因的报道较少, 仅见张丽娜等考察了生

产退回烟用香精香料中菌落和霉菌总数变化^[11]及党立志等对变质香精香料浓缩液和烟用底料进行了细菌和霉菌等的分离鉴定^[12-13]。但果汁、奶制品、豆制品、酒类、食醋和酱油等食品的腐败微生物研究较多^[14-16]。例如, 黄宝莹研究表明枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等4种芽孢杆菌是引起绿豆黄豆浆变质的主要腐败菌^[17]; 刘文容等分析乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)是酸败黄酒中的主要污染微生物, 并进一步验证耐酸乳杆菌(*L. acetotolerans*)和食果糖乳杆菌(*L. fructivorans*)是导致黄酒酸败的主要微生物^[18]; Júnior 等研究发现地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)是原料奶中最常见的污染微生物^[19]。引起烟用香精变质的主要腐败微生物及其致腐败能力尚未见相关报道。本文以云南、福建和广西3个典型湿热地区企业变质烟用香精为研究对象, 采用选择性培养基分析了变质香精中微生物的菌群组成, 对分离纯化的细菌、霉菌和酵母进行了序列鉴定和系统发育分析, 并通过反证试验确定了引起加料香精变质的腐败微生物, 为烟用香精变质的原因分析及污染微生物的控制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 变质香精

我国南方地区的夏季雨量相对较多, 温度相对较高, 属于湿热地区。本文以广西、福建、云南三地作为我国的典型湿热地区。在该3个地区较为湿热的6月中旬, 自企业采集变质烟用加料香精, 这些变质香精均为生产剩余且存放时间较长、作报废处理的废液, 主要表现为表层有菌膜、产生气泡、有酸臭气味等, 其中自云南收集7个样品, 福建6个, 广西2个。

1.1.2 培养基及主要试剂和仪器

平板计数琼脂(PCA)培养基和孟加拉红培养基, 北京陆桥技术股份有限公司; 胰蛋白大豆琼脂(TSA)培养基和沙氏葡萄糖琼脂(SDA)培养基, BD公司; 酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂(YPD)培养基, 青岛海博生物技术有限公司; 无菌磷酸缓冲液(pH

7.0-7.2), HyClone公司。超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 电子天平, Mettler Toledo公司; 隔水式恒温培养箱, 广州永程科学设备有限公司; 恒温水浴摇床, VIVO公司; 高压蒸汽灭菌锅, ALP公司。

1.2 实验方法

1.2.1 微生物的计数

准确量取10 mL变质香精样品, 置于盛有90 mL无菌磷酸缓冲液的无菌三角瓶内, 充分振荡混匀, 制成1:10的样品匀液, 然后吸取1 mL上述样品匀液, 依次配制成10倍比稀释样品匀液。参照食品微生物学检验标准方法^[20-21]进行烟用香精中细菌、霉菌及酵母的计数, 其中细菌计数采用PCA培养基参照GB 4789.2进行^[20], 霉菌和酵母计数采用孟加拉红培养基参照GB 4789.15进行^[21], 每个稀释度做两个平皿。

1.2.2 微生物的分离、纯化和鉴定

微生物的分离采用稀释涂布平板法进行, 香精菌悬液按照1.2.1制备。取上述不同稀释倍数的菌悬液100 μ L, 分别涂布于TSA、SDA和YPD培养基上, 每个稀释度做3个平皿。TSA平板置于36 $^{\circ}$ C条件下培养, 主要用于细菌的分离; SDA平板于28 $^{\circ}$ C培养, 主要用于霉菌的分离; YPD平板于30 $^{\circ}$ C培养, 主要用于酵母的分离。定期观察上述平板上微生物的生长状况, 根据菌落形态特征对菌株进行归类 and 数量统计, 确定优势菌群^[22-23]。

参照倪红梅等^[24]进行细菌、霉菌和酵母的纯化和形态类群划分, 每个形态类群提取1个单菌落进行序列测定。参照苗翠苹^[25]分别进行细菌、霉菌和酵母基因组DNA的提取, 送至深圳华大基因科技有限公司完成PCR扩增和测序。细菌16S rRNA基因序列的扩增引物是20F (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')和1500R (5'-GGTACCTTGTTACGACT-3')^[26]; 霉菌ITS基因序列的扩增引物是ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[27]; 酵母26S rRNA D1/D2基因序列的扩增引物是NL1 (5'-GCATATCA

ATAAGCGGAGGAAAAG-3')和NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')^[28]。

1.2.3 系统发育分析

测定的基因序列经过校正后,霉菌和酵母基因序列在国际核苷酸序列数据库 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)、细菌基因序列在 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)中分别进行同源性比对,获得相似性最高的菌株序列。将霉菌 ITS、酵母 26S rRNA 和细菌 16S rRNA 基因的校正序列和获得的同源序列采用 ClustalX 1.8 软件进行多重序列比对,然后采用 MEGA 6.0 软件基于 Neighbor-Joining 法构建系统发育树^[29-30]。

1.2.4 反证试验

参照史振霞等^[31]将分离获得的菌株接种至无菌烟用香精中开展反证试验,考察所分离菌株对烟用香精的致腐败能力。在超净工作台中,将新鲜调配的加料香精用 0.22 μm 一次性无菌滤膜过滤处理后获得无菌香精,分装至 500 mL 无菌试剂瓶内,300 mL/瓶。将分离纯化获得的菌株采用相应的液体培养基活化后,接种至含无菌香精的试剂瓶中,接种量 1% (体积比),每个菌株接种 3 个试剂瓶,接种后密封静置于 36 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱,每天观察一次,放置 10 d。以未接菌的香精为对照,参照 YC/T 164 评定接菌香精的色泽、香气、香味和形态 4 个感官指标^[4];参照模糊评价法计算得到香精样品的感官综合得分,低于 6 分时判定样品发生变质^[32]。

2 结果与分析

2.1 变质香精中微生物的菌群组成

所考察变质香精均为调配生产后的加料香精废液,含有大量水分及糖类营养物质,水活度 A_w 均为 1.0,含糖量在 0.05%–9.76%之间。采用 PCA 培养基和孟加拉红培养基对云南、福建和广西三地 15 个变质香精中微生物菌群组成分析结果显示,所考察变质香精存在不同程度的细菌、霉菌或酵母污染,污染微生物总量(细菌、霉菌和酵母三类污染微生物的总量)在 7.81–19.92 lgCFU/mL 之间。不同地区的变质香精间污染微生物的总量存在差异。云南

和广西两地变质香精中污染微生物总量均高于 10.00 lgCFU/mL,福建 6 个变质香精中有 3 个的微生物污染总量低于 10.00 lgCFU/mL。

所考察变质香精中污染微生物的菌群组成存在差异。所考察变质香精均存在细菌污染,污染量在 1.00–9.20 lgCFU/mL 之间,细菌污染最为普遍;其次是酵母,有 13 个变质香精存在酵母污染,占所考察样品总数的 86.67%,污染量在 3.54–8.07 lgCFU/mL 之间;存在霉菌污染的样品有 11 个,占所考察样品总数的 73.33%,污染量在 2.00–6.81 lgCFU/mL 之间。不同地区变质香精的污染微生物菌群组成也不同(表 1)。云南 7 个变质香精均存在细菌和酵母污染,除 1 个样品外其余均存在霉菌污染;福建变质香精有 1 个样品没有检出霉菌污染,2 个样品没有检出酵母污染;广西 2 个变质香精均没有检出霉菌污染。

2.2 污染细菌的分离鉴定和系统发育分析

采用 TSA 培养基从 15 个变质香精中分离并纯化得到 76 株细菌,这些细菌 16S rRNA 基因序列的测定和比对分析结果显示,云南、福建和广西三地变质香精中 76 株纯培养细菌分布在 2 门 4 纲 5 目 10 科 15 属(表 2),污染细菌的群落多样性比较丰富。其中,58 株细菌属于变形菌门(*Proteobacteria*),占分离细菌总数的 76.32%。变形菌门菌株在纲、目、科和属等分类水平上的多样性较为丰富,包括 3 纲 3 目 6 科 11 属。其余 18 株属于厚壁菌门(*Firmicutes*),占总数的 23.68%,分布在 1 纲 2 目 4 科 4 属。在纲分类水平上, γ -变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)有 34 株,占 44.74%; β -变形菌纲(*Betaproteobacteria*)有 22 株,占 28.95%;芽孢杆菌纲(*Bacilli*)有 18 株,占 23.68%; α -变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)有 2 株,占 2.63%。在目分类水平上,肠杆菌目(*Enterobacteriales*)和伯克氏菌目(*Burkholderiales*)为优势目,分别有 34 株和 22 株,分别占 44.74%和 28.95%;其次是芽孢杆菌目(*Bacillales*)、乳杆菌目(*Lactobacillales*),各有 9 株;仅有 2 株属于红螺菌目(*Rhodospirillales*)。在科分类水平上,肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)有

表 1 变质香精中微生物的菌群组成

Table 1 Microbial compositions of the deteriorated tobacco flavor samples

采样地 Sites	样品编号 Samples	细菌 Bacteria (lgCFU/mL)	霉菌 Molds (lgCFU/mL)	酵母 Yeasts (lgCFU/mL)	微生物总量 Microorganisms (lgCFU/mL)
云南 Yunnan	1#	5.60	6.34	6.48	18.42
	2#	6.59	6.28	6.15	19.02
	3#	7.42	0.00	7.04	14.46
	4#	7.72	6.72	5.48	19.92
	5#	8.00	2.00	7.00	17.00
	6#	4.49	2.85	3.54	10.88
	7#	9.20	2.30	3.92	15.42
福建 Fujian	8#	6.30	5.44	6.04	17.78
	9#	1.00	6.81	0.00	7.81
	10#	3.57	5.16	0.00	8.73
	11#	6.61	4.70	8.07	19.38
	12#	1.70	0.00	6.15	7.85
	13#	6.32	3.00	6.19	15.51
广西 Guangxi	14#	5.24	0.00	5.86	11.10
	15#	6.56	0.00	7.13	13.69

表 2 变质香精中细菌的菌群组成

Table 2 Composition of cultured bacteria isolated from the deteriorated tobacco flavor samples

门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	
变形菌门 <i>Proteobacteria</i> (58)	γ -变形菌纲 <i>Gammaproteobacteria</i> (34)	肠杆菌目 <i>Enterobacteriales</i> (34)	肠杆菌科 <i>Enterobacteriaceae</i> (33)	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> (14)	
				柠檬酸杆菌属 <i>Citrobacter</i> (15)	
				克雷伯氏菌属 <i>Klebsiella</i> (2)	
				勒克氏菌属 <i>Leclercia</i> (2)	
				耶尔辛氏菌科 <i>Yersiniaceae</i> (1)	
				沙雷氏菌属 <i>Serratia</i> (1)	
				雷尔氏菌属 <i>Ralstonia</i> (16)	
	β -变形菌纲 <i>Betaproteobacteria</i> (22)	伯克氏菌目 <i>Burkholderiales</i> (22)	伯克氏菌科 <i>Burkholderiaceae</i> (20)	伯克氏菌属 <i>Burkholderia</i> (3)	
				副伯克氏菌属 <i>Paraburkholderia</i> (1)	
				丛毛单胞菌科 <i>Comamonadaceae</i> (1)	
				草螺菌属 <i>Herbaspirillum</i> (1)	
				代尔夫特菌属 <i>Delftia</i> (1)	
				醋酸杆菌科 <i>Acetobacteraceae</i> (2)	
				葡萄糖杆菌属 <i>Gluconobacter</i> (2)	
厚壁菌门 <i>Firmicutes</i> (18)	芽孢杆菌纲 <i>Bacilli</i> (18)	芽孢杆菌目 <i>Bacillales</i> (9)	芽孢杆菌科 <i>Bacillaceae</i> (8)	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> (8)	
				类芽孢杆菌科 <i>Paenibacillaceae</i> (1)	
				类芽孢杆菌属 <i>Paenibacillus</i> (1)	
			乳杆菌目 <i>Lactobacillales</i> (9)	明串珠菌科 <i>Leuconostocaceae</i> (2)	明串珠菌属 <i>Leuconostoc</i> (2)
					链球菌科 <i>Streptococcaceae</i> (7)
					乳球菌属 <i>Lactococcus</i> (7)
					链球菌属 <i>Lactococcus</i> (7)

33 株；伯克氏菌科(*Burkholderiaceae*)有 20 株；芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)有 8 株；链球菌科(*Streptococcaceae*)有 7 株；属于耶尔辛氏菌科(*Yersiniaceae*)、丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*)、*Oxalobacteraceae*、醋酸杆菌科(*Acetobacteraceae*)、类芽孢杆菌科(*Paenibacillaceae*)及明串珠菌科(*Leuconostocaceae*)的较少, 仅各有 1-2 株。

76 株细菌在属分类水平上的分布见图 1, 主要分布在雷尔氏菌属(*Ralstonia*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、勒克氏菌属(*Leclercia*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、草螺菌属(*Herbaspirillum*)、副伯克氏菌属(*Paraburkholderia*)、代尔夫特菌属(*Delftia*)等 15 个属。其中雷尔氏菌属、柠檬酸杆菌属、肠杆菌属和芽孢杆菌属是优势菌群, 分别占分离细菌总数的 21.05%、19.74%、18.42%和 10.53%。

采用 ClustalX 1.8 软件对菌株 16S rRNA 基因序

列进行多重比对后, 用 MEGA 6.0 构建系统发育树, 进行 1 000 次 Bootstrap 统计学检验, 结果见图 2。系统发育分析结果显示, 三地变质香精中污染细菌聚类为 2 个大分支: I 分支和 II 分支。I 分支为变形菌门, 包括 I-1、I-2 和 I-3 亚分支, 分别为纲分类水平的 γ -变形菌纲、 β -变形菌纲和 α -变形菌纲。II 分支为厚壁菌门, 由纲分类水平的芽孢杆菌纲组成, 在目分类水平上由芽孢杆菌目和乳杆菌目组成。

2.3 污染霉菌的分离鉴定和系统发育分析

采用选择性培养基 SDA, 从变质香精中分离并纯化得到 9 株霉菌, 这些菌株 ITS 基因序列的测定和比对结果(图 3)显示, 9 株菌均分布在子囊菌门(*Ascomycota*), 其中粪壳菌纲(*Sordariomycetes*)有 3 株, 散囊菌纲(*Eurotiomycetes*) 5 株, 座囊菌纲(*Dothideomycetes*) 1 株。采用 ClustalX 1.8 软件进行菌株 ITS 序列的多重比对后, 用 MEGA 6.0 构建系统发育树的结果显示, 变质香精中污染真菌聚类为 3 个大分支: I、II 和 III 分支, 分别为粪壳菌纲、座囊菌纲和散囊菌纲。I 分支包括丽球壳菌目(*Calosphaeriales*) 2 株和毛孢壳目(*Coniochaetales*)

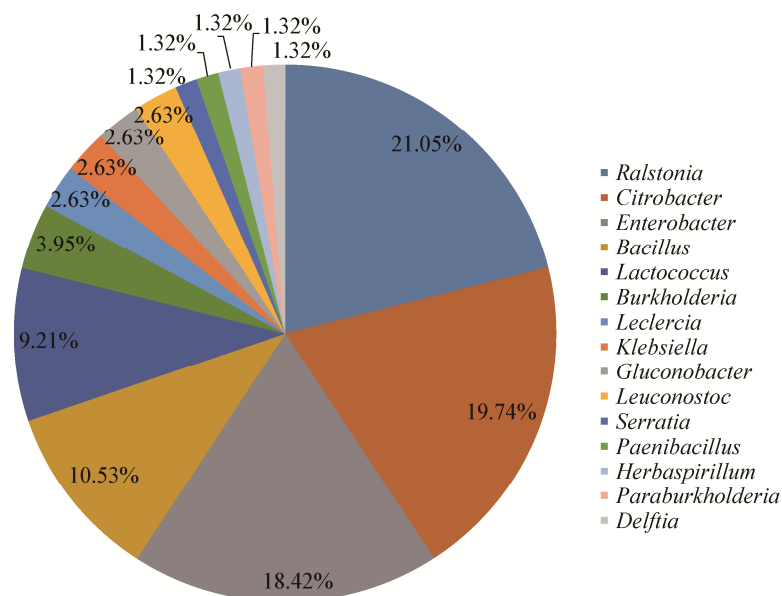


图 1 76 株细菌在属分类水平的分布

Figure 1 The distribution of 76 bacterial strains from tobacco flavor in genus

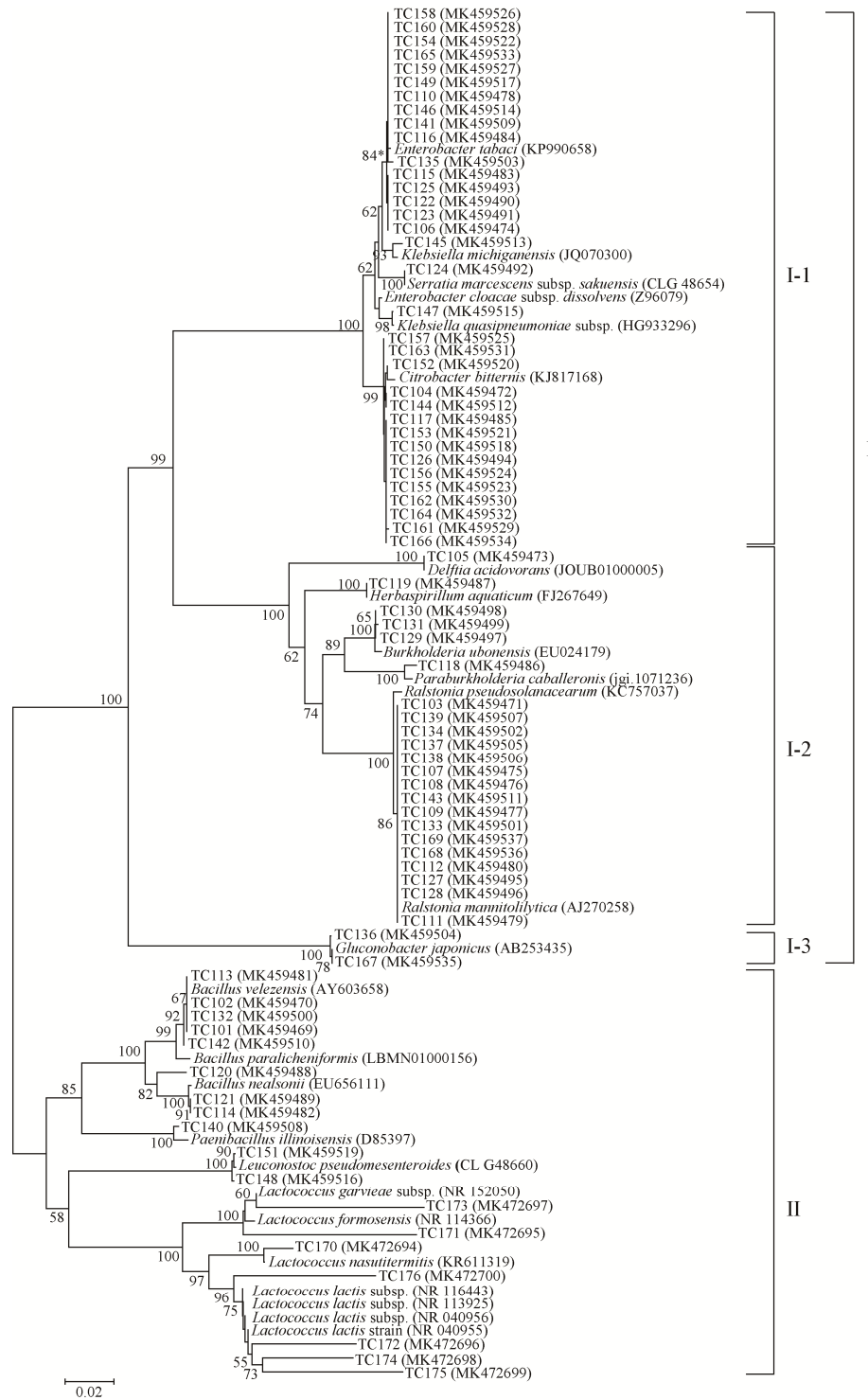


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的变质香精中污染细菌的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of bacteria from the deteriorated tobacco flavor samples based on 16S rRNA gene sequences

注: 括号内为 NCBI GenBank 登录号; 分支点上的数字为 Neighbor-Joining 法的 Bootstrap 值(1 000 次重复); 标尺表示每个核苷酸位置置换率. 下同.

Note: NCBI GenBank accession numbers are presented in parentheses. Numbers at nodes indicate the levels of bootstrap support based on Neighbor-Joining analysis of 1 000 replications. Bar: Substitutions per nucleotide position. The same below.

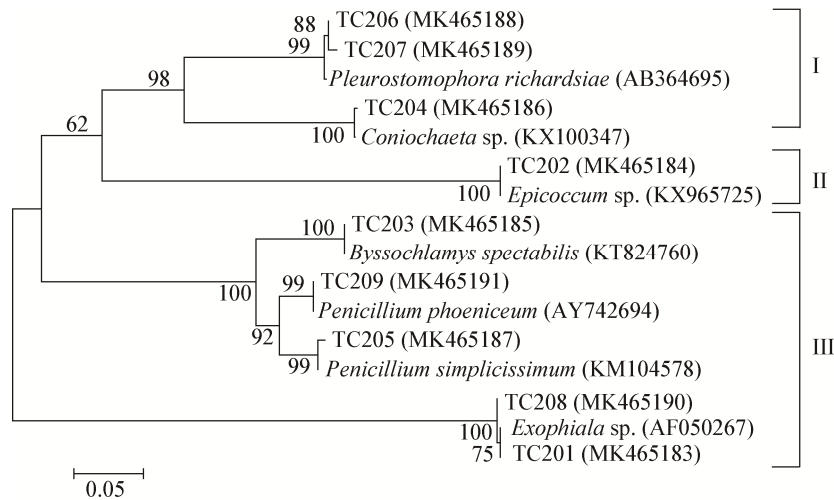


图3 基于 ITS 基因序列构建的变质香精中污染霉菌的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of molds from the deteriorated tobacco flavor samples based on ITS gene sequences

1 株; II 分支仅有格孢腔菌目(*Pleosporales*) 1 株; III 分支刺盾食菌目(*Chaetothyriales*) 2 株和散囊菌目(*Eurotiales*) 3 株。

在属分类水平上, 9 株霉菌主要分布在歪嘴座壳属(*Pleurostoma*)、毛孢壳属(*Coniochaeta*)、外瓶霉菌属(*Exophiala*)、青霉属(*Penicillium*)、丝衣霉属(*Byssochlamys*)、附球菌属(*Epicoccum*)等 6 个属, 每个属分离到 1–2 株菌。

2.4 污染酵母的分离鉴定和系统发育分析

采用 YPD 培养基分离并纯化得到 42 株酵母, 26S rRNA D1/D2 基因序列的测定和比对结果(图 4)显示, 这些菌株分布在子囊菌门的 6 个属, 分别是假丝酵母菌属(*Candida*)、德巴利酵母属(*Debaryomyces*)、酵母菌属(*Saccharomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、欧伽塔酵母菌属(*Ogataea*)、细枝钩酵母菌属(*Wickerhamomyces*)。其中毕赤酵母属、细枝钩酵母菌属及酵母菌属是优势菌群, 毕赤酵母属有 14 株, 占分离酵母总数的 33.33%; 细枝钩酵母菌属 12 株, 占 28.57%; 酵母菌属 9 株, 占 21.43%。其余欧伽塔酵母菌属、假丝酵母菌属和德巴利酵母属 3 个属分别有 4、2 和 1 株。

菌株 26S rRNA D1/D2 序列经 ClustalX 1.8 软件多重比对和 MEGA 6.0 软件系统发育树分析结果显示,

变质香精中污染酵母聚类为 4 个大分支: I、II、III 和 VI 分支。I 分支为酵母菌科(*Saccharomycetaceae*), 包括酵母菌属; II 分支为德巴利酵母菌科(*Debaryomycetaceae*), 包括假丝酵母菌属和德巴利酵母属; III 分支为发夫酵母菌科(*Phaffomycetaceae*), 包括细枝钩酵母菌属; VI 分支为毕赤酵母菌科(*Pichiaceae*), 包括毕赤酵母属和欧伽塔酵母菌属。

2.5 变质香精中污染微生物的菌群差异

所考察的 15 个变质加料香精中, 2 个广西样品的含糖量分别是 9.76% 和 8.19%, 其余 7 个云南和 6 个福建样品的含糖量在 0.05%–1.99% 之间, 明显低于广西样品。进一步对三地变质香精中微生物的菌群组成分析结果(表 3)显示, 自云南样品分离到细菌 10 个属、霉菌 2 个属和酵母 3 个属, 福建样品细菌 11 个属、霉菌 1 个属和酵母 6 个属, 广西样品细菌 3 个属、霉菌 4 个属和酵母 3 个属。云南和福建两地变质香精样品中细菌的菌群组成(分别是 10、11 个属)明显多于广西(3 个属), 三地样品均分离到肠杆菌属、柠檬酸杆菌属、芽孢杆菌属菌株。自广西变质香精中分离到的霉菌菌群组成数量(4 个属)多于其余两地(分别是 2、1 个属), 福建样品中酵母菌群组成数量(6 个属)多于其余两地(分别均是 3 个属)。

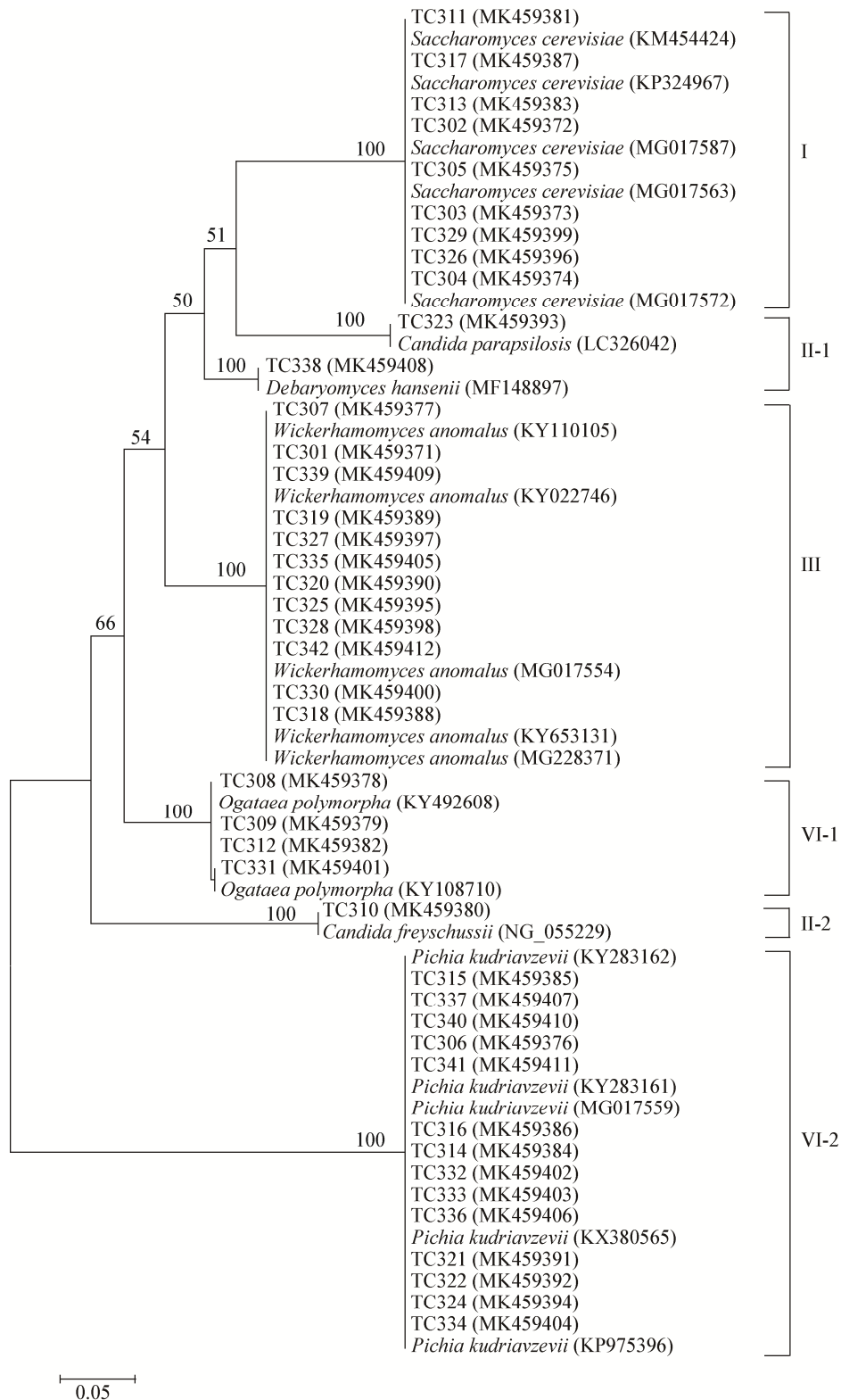


图 4 基于 26S rRNA D1/D2 基因序列构建的变质香精中污染酵母的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of yeasts from the deteriorated tobacco flavor samples based on 26S rRNA D1/D2 gene sequences

表 3 三地变质香精中微生物的菌群组成

Table 3 Composition of cultured microorganisms isolated from the deteriorated tobacco flavor samples in the three areas

采样地 Sites	细菌 Bacteria	霉菌 Molds	酵母 Yeasts
云南 Yunnan	肠杆菌属、柠檬酸杆菌属、克雷伯氏菌属、勒克氏菌属、雷尔氏菌属、葡糖杆菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、明串珠菌属、乳球菌属(10个) <i>Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella, Leclercia, Ralstonia, Gluconobacter, Bacillus, Paenibacillus, Leuconostoc, Lactococcus</i> (10 strains)	毛孢壳属、青霉菌属(2个) <i>Coniochaeta, Penicillium</i> (2 strains)	假丝酵母菌属、酵母菌属、毕赤酵母属(3个) <i>Candida, Saccharomyces, Pichia</i> (3 strains)
福建 Fujian	肠杆菌属、柠檬酸杆菌属、勒克氏菌属、沙雷氏菌属、雷尔氏菌属、伯克氏菌属、副伯克氏菌属、代尔夫特菌属、草螺菌属、芽孢杆菌属、乳球菌属(11个) <i>Enterobacter, Citrobacter, Leclercia, Serratia, Ralstonia, Burkholderia, Paraburkholderia, Delftia, Herbaspirillum, Bacillus, Lactococcus</i> (11 strains)	歪嘴座壳属(1个) <i>Pleurostoma</i> (1 strain)	假丝酵母菌属、德巴利酵母属、酵母菌属、毕赤酵母属、欧伽塔酵母菌属、细枝钩酵母菌属(6个) <i>Candida, Debaryomyces, Saccharomyces, Pichia, Ogataea, Wickerhamomyces</i> (6 strains)
广西 Guangxi	肠杆菌属、柠檬酸杆菌属、芽孢杆菌属(3个) <i>Enterobacter, Citrobacter, Bacillus</i> (3 strains)	外瓶霉菌属、青霉菌属、附球菌属、丝衣霉菌属(4个) <i>Exophiala, Penicillium, Epicoccum, Byssochlamys</i> (4 strains)	德巴利酵母属、酵母菌属、毕赤酵母属(3个) <i>Debaryomyces, Saccharomyces, Pichia</i> (3 strains)

2.6 反证试验结果

将分离获得的 76 株细菌、9 株霉菌和 42 株酵母进行反证试验。图 5 结果显示, 在第 3 天时, 引起香精变质的细菌有 27 株, 酵母有 3 株, 其中芽孢杆菌属和柠檬酸杆菌属各 6 株, 肠杆菌属和乳球菌属各 5 株, 葡糖杆菌属、雷尔氏菌属、勒克氏菌属、沙雷氏菌属和明串珠菌属各 1 株, 细枝钩酵母菌属、酵母菌属和毕赤酵母属各 1 株; 至第 10 天时, 有 65 株菌引起香精变质, 其中细菌 44 株、霉菌 3 株和酵母 18 株, 主要分布是柠檬酸杆菌属 10 株, 肠杆菌属 9 株, 芽孢杆菌属和雷尔氏菌属各 6 株, 乳球菌属 5 株, 葡糖杆菌属 2 株, 伯克氏菌属、勒克氏菌属、克雷伯氏菌属、沙雷氏菌属、类芽孢杆菌属和明串珠菌属各 1 株, 附球菌属 1 株, 青霉菌属 2 株, 毕赤酵母属 7 株, 酵母菌属 5 株, 细枝钩酵母菌属 3 株, 假丝酵母菌属 2 株, 欧伽塔酵母菌属 1 株。因此, 引起所考察加料香精变质的腐败微生物主要是柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属、雷尔氏菌属和毕赤酵母属, 分别占香精腐败微生物总数(65 株)的 15.38%、13.85%、9.23%、9.23%和 10.77%。

3 讨论与结论

调配生产后的烟用香精不可避免地存在储存和运输等环节, 在这些过程中容易受到微生物的污染而引起变质, 其中细菌和霉菌是主要的污染微生物^[11-13]。本文选取云南、福建和广西 3 个典型湿热地区企业的变质香精, 较为深入、系统地分析了变质香精中微生物的菌群组成、菌群分布和主要腐败菌。结果表明, 所考察变质香精存在不同程度的细菌、霉菌或酵母污染, 细菌污染最为普遍, 其次是酵母和霉菌污染, 与张丽娜等对生产退回料液、党立志等对变质香精香料浓缩液和烟用底料的研究结果基本一致^[11-13]。食品等工业领域的大量研究结果显示, 细菌、霉菌和酵母等是主要污染微生物^[33-36]。本研究自变质香精中分离得到的 127 株污染微生物中, 细菌 76 株、霉菌 9 株、酵母 42 株。

所考察变质香精中, 污染细菌的菌群多样性较为丰富, 分布在 2 门 4 纲 5 目 10 科 15 属, 其中雷尔氏菌属、柠檬酸杆菌属、肠杆菌属及芽孢杆菌属是优势菌群。雷尔氏菌属是导致烟草等茄科植物青枯病的重要病原细菌之一^[37], 推测烟用香精中该属细菌可能来自烟叶。柠檬酸杆菌属、肠杆菌属和芽

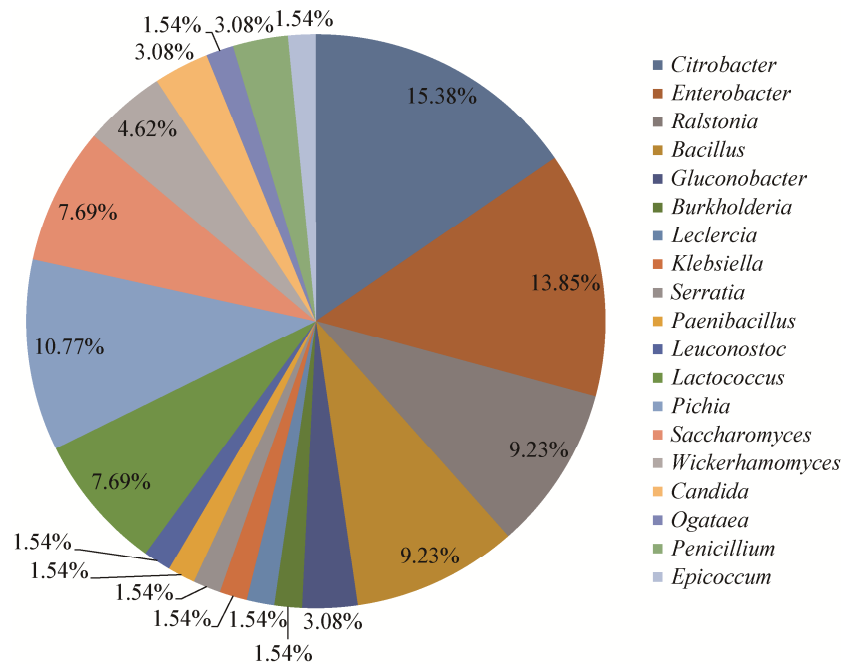


图 5 可引起香精变质的 65 株腐败微生物的分布

Figure 5 The distribution of 65 spoilage microorganisms in tobacco flavor samples

孢杆菌属细菌是水果、果汁、果酱、牛乳、鱼、肉和蛋类产品的主要污染菌^[38-41]。霉菌分布在子囊菌门的歪嘴座壳属、毛孢壳属等 6 个属, 每个属分离到 1-2 株; 酵母分布在子囊菌门的假丝酵母菌属、德巴利酵母属等 6 个属, 其中毕赤酵母属、细枝钩酵母菌属及酵母菌属是优势菌群。这些霉菌和酵母大多都是食品及其加工领域的主要污染或发酵真菌, 例如青霉属是番茄酱、月饼、水果等产品及其加工工业的主要污染菌^[33,42], 丝衣霉属是果汁的主要污染菌^[43], 毕赤酵母属、假丝酵母菌属及酵母菌属是奶制品、水果、蔬菜、饮料及高盐或糖浓度产品等的污染菌^[44], 附球菌属是绍兴黄酒的优势发酵菌^[45]。三地变质香精样品中微生物的菌群组成存在明显差异, 推测主要与样品成分、生产工艺及储存条件等有关。

烟用香精变质状况调研结果显示, 易变质香精主要集中在含水量较高且含糖等物质的生产剩余加料香精, 在湿热地区和季节的储运环节时有发生。柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属、雷尔

氏菌属和毕赤酵母属是引起加料香精变质的主要腐败微生物, 这些微生物也是导致果汁、乳制品、饮料、罐头及豆腐等食品及其加工领域的重要常见腐败菌^[33-44]。本研究结果将为企业进行腐败微生物的溯源分析和腐败变质的针对性防控提供参考。

REFERENCES

- [1] Lynn D, Lawrence BM. Flavor technology-casings, flavors and supplier assessment[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 1999, 5(4): 12-15 (in Chinese)
Lynn D, Lawrence BM. 加香技术-料液和香精[J]. *中国烟草学报*, 1999, 5(4): 12-15
- [2] Huang YF. Study on the analysis of flavor and flavor material for tobacco[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2007 (in Chinese)
黄映凤. 烟用香精香料的分析研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2007
- [3] Baker RR, da Silva JRP, Smith G. The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry. Part II: Casing ingredients[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42(S1): 39-52
- [4] State Tobacco Monopoly Administration. YC/T 164-2012 Tobacco flavor[S]. Beijing: China Standards Press, 2012 (in Chinese)
国家烟草专卖局. YC/T 164-2012 烟用香精[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012

- [5] Zhang YJ, Jin WB. Tobacco Flavor and Fragrance[M]. Beijing: University of Science and Technology of China Press, 1996 (in Chinese)
张悠金, 金闻博. 烟用香料香精[M]. 北京: 中国科学技术大学出版社, 1996
- [6] Baker RR, da Silva JRP, Smith G. The effect of tobacco ingredients on smoke chemistry. Part I: Flavourings and additives[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(S1): 3-37
- [7] Liu XJ, Qin YH, Zhang H, et al. Influence of HXD process on effects of tobacco casing application[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2016, 22(4): 23-29 (in Chinese)
刘献军, 秦艳华, 张华, 等. HXD 工序对料液施加效果的影响[J]. 中国烟草学报, 2016, 22(4): 23-29
- [8] Dong GF, Zhang Q, Wang HY, et al. Effects of different temperature and constant temperature time on content of carbohydrate compositions in tobacco material liquid[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2011, 23(10): 85-87 (in Chinese)
董高峰, 张强, 王浩雅, 等. 不同温度和恒温时间对卷烟料液中糖类成分含量的影响[J]. 江西农业学报, 2011, 23(10): 85-87
- [9] Xi A, Sun KJ, Li DG, et al. Research on the design of blend type tobacco casings and flavors[J]. Flavour Fragrance Cosmetics, 2015(6): 7-11,16 (in Chinese)
奚安, 孙凯健, 李德国, 等. 混合型卷烟料液、香精设计研究[J]. 香料香精化妆品, 2015(6): 7-11,16
- [10] Zhang TG, Liu ZC, Zhang F, et al. Application of pH value in evaluation of quality stability for tobacco liquid[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2014(6): 61-63 (in Chinese)
张廷贵, 刘泽春, 张峰, 等. pH 值在烟用料液质量稳定性评价中的应用[J]. 湖南农业科学, 2014(6): 61-63
- [11] Zhang LN, Xu LP, Xu SQ, et al. Study on storage of extra tobacco flavor returned from factory[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2013, 19(16): 143-146 (in Chinese)
张丽娜, 许利平, 许式强, 等. 生产退回烟用香精香料保质期研究[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(16): 143-146
- [12] Dang LZ, Zhang ZY, Zhang J, et al. Analysis of microbial populations of metamorphic flavors and fragrances have been prepared[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2016, 31(4): 707-712 (in Chinese)
党立志, 张正禹, 张健, 等. 已制备变质香精香料中微生物种群分析[J]. 云南农业大学学报: 自然科学, 2016, 31(4): 707-712
- [13] Dang LZ, Yue R, Dong WH, et al. Deterioration of tobacco base casing materials: causes and aroma component variation[J]. Tobacco Science & Technology, 2018, 51(2): 16-24 (in Chinese)
党立志, 岳蕊, 董文汉, 等. 烟用底料变质原因及致香成分变化分析[J]. 烟草科技, 2018, 51(2): 16-24
- [14] Snyder AB, Worobo RW. Fungal spoilage in food processing[J]. Journal of Food Protection, 2018, 81(6): 1035-1040
- [15] Pinu FR. Early detection of food pathogens and food spoilage microorganisms: Application of metabolomics[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 54: 213-215
- [16] André S, Vallaëys T, Planchon S. Spore-forming bacteria responsible for food spoilage[J]. Research in Microbiology, 2016, 168(4): 379-387
- [17] Huang BY. Study on the separation and control of spoilage microorganisms in soy-mung bean milk[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2011 (in Chinese)
黄宝莹. 绿豆黄豆浆腐败微生物的分离与控制研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2011
- [18] Liu WR, Chen S, Xu Y. Identification and characterization of spoilage microorganisms in aging Chinese rice wine by culture-independent and culture-dependent technologies[J]. Microbiology China, 2018, 45(1): 120-128 (in Chinese)
刘文容, 陈双, 徐岩. 黄酒贮存酸败关键微生物的分离鉴定[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 120-128
- [19] Júnior JCR, Tamanini R, de Oliveira ALM, et al. Genetic diversity of thermophilic spoilage microorganisms of milk from Brazilian dairy farms[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(8): 6927-6936
- [20] State Health and Family Planning Commission, State Food and Drug Administration. GB 4789.2-2016 National food safety standard Food microbiological examination: Aerobic plate count[S]. Beijing: China Standards Press, 2016 (in Chinese)
国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.2-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016
- [21] National Health and Family Planning Commission. GB 4789.15-2016 National food safety standard Food microbiological examination: Enumeration of moulds and yeasts[S]. Beijing: China Standards Press, 2016 (in Chinese)
国家卫生和计划生育委员会. GB 4789.15-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016
- [22] Li WJ. Establishment and preliminary application of the method for isolation of intestinal aerobic dominant microorganisms[J]. Chinese Journal of Microecology, 1999, 11(5): 315-316 (in Chinese)
李文建. 肠道需氧优势菌群分离方法的建立及初步应用[J]. 中国微生态学杂志, 1999, 11(5): 315-316
- [23] Yan YW, Zhang H, Liu L, et al. Isolation and identification of dominant microorganisms in rhizosphere of continuous cropping with peanut[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(6): 835-842 (in Chinese)
颜艳伟, 张红, 刘露, 等. 连作花生田根际土壤优势微生物的分离和鉴定[J]. 微生物学报, 2011, 51(6): 835-842
- [24] Ni HM, Li XM, Xie LH, et al. Diversity analysis of cultivable bacteria on leaf surface of yellow sun-cured tobacco during curing[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2015, 21(1): 95-99 (in Chinese)
倪红梅, 李雪梅, 谢丽华, 等. 晒黄烟调制期叶面可培养细菌的多样性研究[J]. 中国烟草学报, 2015, 21(1): 95-99
- [25] Miao CP. Microbial community characteristics in rhizosphere soil of panax notoginseng[D]. Kunming: Doctoral Dissertation of Yunnan University, 2015 (in Chinese)
苗翠苹. 三七根际土壤微生物的群落特征[D]. 昆明: 云南大学博士学位论文, 2015

- [26] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703
- [27] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*[M]. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322
- [28] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1998, 73(4): 331-371
- [29] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882
- [30] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729
- [31] Shi ZX, Du HL, Ou X, et al. Isolation and identification of spoilage bacteria in canned peaches[J]. *Food Science*, 2009, 30(21): 278-282 (in Chinese)
史振霞, 杜洪利, 欧旭, 等. 桃罐头中腐败微生物的分离纯化及鉴定研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(21): 278-282
- [32] Li XM, Mi QL, Zhang T, et al. Tobacco flavor deterioration determining method: CN, 107782854A[P]. 2018-03-09 (in Chinese)
李雪梅, 米其利, 张涛, 等. 一种烟用香精香料变质的判定方法: 中国, 107782854A[P]. 2018-03-09
- [33] Chen YC, Xie XB, Shi QS, et al. Species identification of industry spoilage microorganism and the resistance analysis[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(10): 1558-1565 (in Chinese)
陈艺彩, 谢小保, 施庆珊, 等. 工业腐败微生物种属特性及抗药性分析[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(10): 1558-1565
- [34] Tanveer A, Farooq U, Akram K, et al. Pomegranate extracts: a natural preventive measure against spoilage and pathogenic microorganisms[J]. *Food Reviews International*, 2015, 31(1): 29-51
- [35] Pinto L, Baruzzi F, Ippolito A. Recent advances to control spoilage microorganisms in washing water of fruits and vegetables: the use of electrolyzed water[J]. *Acta Horticulturae*, 2016, 1144: 379-384
- [36] Zaragoza J, Bendiks Z, Tyler C, et al. Effects of exogenous yeast and bacteria on the microbial population dynamics and outcomes of olive fermentations[J]. *mSphere*, 2017, 2(1): e00315-16
- [37] Hu LW, Mu WJ, Guo JH, et al. Locked nucleic acid-enhanced quantitative real-time PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in tobacco planting soil[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2017, 50(12): 14-21 (in Chinese)
胡利伟, 牟文君, 郭建华, 等. 基于锁核苷酸(LNA)增敏的植烟土壤青枯雷尔氏菌定量 PCR 检测[J]. *烟草科技*, 2017, 50(12): 14-21
- [38] Feng JR. Bacteriological quality and safety evaluation of raw milk and the source of harmful bacteria in Gansu province of China[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University, 2017 (in Chinese)
冯疆蓉. 甘肃省生鲜乳微生物质量安全评价及有害细菌来源分析[D]. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2017
- [39] Rawat S. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention[J]. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2015, 5(4): 47-56
- [40] Cai RK. Study on the quality and microbial diversity during the fermentation of large yellow croaker with sweet rice wine[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Gongshang University, 2017 (in Chinese)
蔡瑞康. 糟制大黄鱼品质及微生物菌群多样性变化研究[D]. 杭州: 浙江工商大学硕士学位论文, 2017
- [41] Ledenbach LH, Marshall RT. Microbiological spoilage of dairy products[A]//Doyle M. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*[M]. New York: Springer, 2009: 41-67
- [42] Yang HH, Chen GG, Liu Y, et al. Study on isolation and identification of the spoilage microbes in bottled tomato sauce and their characteristics[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(1): 164-167,173 (in Chinese)
杨红红, 陈国刚, 刘娅, 等. 瓶装胀罐番茄酱中腐败菌分离纯化及鉴定研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(1): 164-167,173
- [43] de Souza Sant'Ana A, Dantigny P, Tahara AC, et al. Use of a logistic model to assess spoilage by *Byssoschlamys fulva* in clarified apple juice[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 137(2/3): 299-302
- [44] Rao Y, Chang W, Tang J, et al. Study progress on spoilage yeast in food products[J]. *Food and Fermentation Technology*, 2013, 49(4): 61-64 (in Chinese)
饶瑜, 常伟, 唐洁, 等. 食品中腐败酵母的研究进展[J]. *食品与发酵科技*, 2013, 49(4): 61-64
- [45] Liu YY. Characterization of microflora and their functions on flavor compounds in Shaoxing rice wine[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 (in Chinese)
刘芸雅. 绍兴黄酒发酵中微生物群落结构及其对风味物质影响研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2015