

雪茄烟叶淀粉与纤维素降解菌的筛选、鉴定及生长条件优化

张玉芹^{1*}, 包自超², 温亮³, 杨继琨³, 陈秀斋³, 程云吉³, 徐利⁴, 孔令民⁴, 吴佃军⁴, 门奎富⁵, 张丽⁵, 侯欣⁵

¹中国烟草总公司山东省公司, 山东 济南

²山东烟草研究院有限公司, 山东 济南

³山东临沂烟草有限公司, 山东 临沂

⁴山东烟叶复烤有限公司沂水复烤厂, 山东 临沂

⁵山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安

收稿日期: 2023年11月20日; 录用日期: 2023年12月20日; 发布日期: 2023年12月28日

摘要

为降低雪茄烟叶中淀粉和纤维素含量, 减少雪茄烟叶中的苦味, 改善烟叶品质, 从发酵雪茄烟叶中分离纯化得到18株细菌菌株, 通过对菌株的性质测定, 选出两种能够降解淀粉和纤维素的菌株SN-1与SN-2, 经鉴定该菌株分别为阿尔莱特葡萄球菌(*Staphylococcus arlettae*)和乳酸芽孢杆菌(*Paenibacillus lactis*), 并且筛选出最优生长条件分别为30℃、pH为6、碳源为蔗糖、氮源为胰蛋白胨和35℃、pH为6、碳源为蔗糖、氮源为胰蛋白胨。

关键词

雪茄烟叶, 微生物, 淀粉, 纤维素

Screening, Identification and Optimization of Growth Conditions of Starch and Cellulose Degrading Bacteria in Cigar Tobacco Leaves

Yuqin Zhang^{1*}, Zichao Bao², Liang Wen³, Jikun Yang³, Xiuzhai Chen³, Yunji Cheng³, Li Xu⁴, Lingmin Kong⁴, Dianjun Wu⁴, Kuifu Men⁵, Li Zhang⁵, Xin Hou⁵

¹Shandong Corporation of China National Tobacco Company, Jinan Shandong

*通讯作者。

文章引用: 张玉芹, 包自超, 温亮, 杨继琨, 陈秀斋, 程云吉, 徐利, 孔令民, 吴佃军, 门奎富, 张丽, 侯欣. 雪茄烟叶淀粉与纤维素降解菌的筛选、鉴定及生长条件优化[J]. 微生物前沿, 2023, 12(4): 154-163.

DOI: 10.12677/amb.2023.124017

²The Limited Company of Shandong Tobacco Research Institute, Jinan Shandong

³Shandong Linyi Tobacco Limited Company, Linyi Shandong

⁴Yishui Redrying Factory, Shandong Tobacco Redrying Limited Company, Linyi Shandong

⁵College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an Shandong

Received: Nov. 20th, 2023; accepted: Dec. 20th, 2023; published: Dec. 28th, 2023

Abstract

In order to reduce the content of starch and cellulose in cigar tobacco leaves, reduce the bitterness in cigar tobacco leaves and improve the quality of tobacco leaves, 18 bacterial strains were isolated from the surface of cigar tobacco leaves. Two strains, SN-1 and SN-2, which can degrade starch and cellulose, were screened through property identification. The two strains were identified as *Staphylococcus arlettae* and *Paenibacillus lactis*. The optimal growth conditions for SN-1 were 30°C, pH 6, carbon source was sucrose and nitrogen source was tryptone, while the optimal growth conditions for SN-2 were 35°C, pH 6, carbon source was sucrose and nitrogen source was tryptone.

Keywords

Cigar Tobacco, Microorganism, Starch, Cellulose

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

雪茄烟叶经过大田期的生长发育, 积累了大量的大分子物质, 过多的大分子物质会影响雪茄烟叶的感官品质, 产生抽吸时的不良气体, 影响燃烧性等。晾制过程可以初步分解部分大分子物质, 但晾制后的烟叶无法满足工业生产需求, 因而发酵过程是生产雪茄的必需的制造环节, 也是晾制过程的延续。良好的发酵能有效改善雪茄烟叶的外观质量、化学成分以及抽吸感官等方面。

微生物在整个发酵过程中发挥了重要作用, 随着目前对微生物研究的增加, 微生物的应用也在雪茄发酵中表现良好[1] [2] [3] [4] [5]。烟草发酵过程中的微生物能够产生纤维素酶、淀粉酶等多种水解酶, 因此微生物的活动同时主导着物质降解与转化, 这些物质含量的改变也影响着烟叶品质和抽吸感官的变化[6]。例如淀粉和纤维素是烟叶的基本成分, 含有 50%左右的碳水化合物和 5~15%的蛋白质, 碳水化合物其中含有约 10~30%淀粉、10~25%纤维素、12%果胶, 这些指标的含量均影响着烟叶的品质[7]。燃烟时, 当烟叶中的成分暴露在燃烧环境中; 纤维素会导致刺激性烟雾的释放, 导致吸烟者感到口味苦涩。一些涉及分析烟叶中纤维素热解产物的研究表明, 烟草烟雾中已经鉴定出一些小分子醛和多环芳烃 (PAHs), 其中 PAHs 被认为具有致癌性和细胞毒性等毒性性质[8]。淀粉在燃烟时也会影响烟叶的燃烧速度和燃烧的完整程度, 并且由于淀粉燃烧时会产生不良的焦化气味而干扰成香反应。因此, 淀粉、纤维素的适当降解是提高烟叶品质的关键。为此, 以山东雪茄烟叶为材料, 通过平板涂布法从雪茄烟叶表面分离并筛选淀粉酶和纤维素酶活力最高的菌株并优化其产酶培养基, 旨在为利用微生物降解雪茄烟叶淀粉和纤维素, 改善雪茄烟品质提供依据。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

2.1.1. 供试材料

供试样品为 2023 年已晾晒完成的品质较均一的雪茄茄衣中部烟叶，品种为 QX-103，由山东临沂烟草有限公司提供。

2.1.2. 培养基配方

LB 液体培养基：胰蛋白胨 2.0 g/L，酵母粉 1.0 g/L，NaCl 2.0 g/L，pH 7.0；

LB 固体培养基：胰蛋白胨 2.0 g/L，酵母粉 1.0 g/L，NaCl 2.0 g/L，琼脂 20.0 g/L，pH 7.0；

淀粉酶筛选培养基：可溶性淀粉 10 g/L，蛋白胨 5.0 g/L，NaCl 5.0 g/L，牛肉膏 5.0 g/L，琼脂粉 20.0 g/L，pH 7.0；

纤维素酶筛选培养基：CMC-Na 10.0 g/L，蛋白胨 5.0 g/L，酵母膏 0.5 g/L，琼脂粉 20.0 g/L，pH 7.0；

基础生长培养基：牛肉粉 3 g/L，蛋白胨 10 g/L，NaCl 5 g/L，pH 7.2。

2.2. 性质鉴定方法

2.2.1. 雪茄烟叶中菌株的分离

参照于少藤等的方法[9]，将雪茄烟叶剪碎后，称取发酵过程中的烟叶 3 g 置于含有 300 ml 灭菌水的三角瓶内，瓶内加入适量灭菌玻璃珠，将三角瓶放于摇床中，转速为 150 r/min 振荡 30 min，制备得到细菌悬液，取 1 ml 细菌悬液加入 9 ml 的灭菌水进行稀释，得到 10^{-1} 的稀释液，并依次逐步稀释得到 10^{-2} ， 10^{-3} ， 10^{-4} 的稀释液。倒平板待 LB 培养基凝固后，按常规方法进行平板涂布分离，吸取适合浓度的菌悬液 0.1 ml 进行平板涂布，将不同浓度的稀释液涂布于 LB 平板，每个处理涂布五个平板，置于 37℃ 培养箱中培养 48 h，观察菌落的生长情况，挑选不同菌落形态的菌株进行分离纯化。

2.2.2. 雪茄烟叶中菌株的纯化

将培养后分离出的细菌继续在 LB 平板上划线，培养出单菌落，置于恒温箱进行培养，待菌落长出后，检查其特征是否一致，同时用显微镜检查是否为单一的微生物。若发现有杂菌，需再一次进行分离纯化，直至获得纯培养的单一菌落。

2.2.3. 雪茄烟叶中菌株的筛选

将上述分离获得的细菌参照陈伦旺的方法[10]，由单菌落取样依次接种到淀粉、纤维素降解菌选择培养基上，将菌株在恒温恒湿箱中 37℃ 培养。通过观察菌落周围是否存在透明圈来判断细菌是否能够降解相应大分子物质，观察透明圈明显程度，选择酶活力较高的菌株为对象，保存菌种并开展进一步测定。

2.2.4. 雪茄烟叶中菌株的鉴定

将挑取的单菌落经纯化后，采用快速提取试剂盒提取基因组 DNA，通过 PCR 扩增 16S rDNA 序列，扩增后的 DNA 序列由公司测定，从数据库中获得相关序列。用 MEGA11 软件对确定的 16S rRNA 基因序列和从 NCBI 数据库获得的参考序列进行比对。再利用 MEGA11 软件构建系统发育树。

2.3. 菌株生长条件优化

2.3.1. 菌株生长最佳温度的优化

将 3 ml 液体 LB 培养基准备在三支培养管(10 毫升)中。在 121℃ 下高压灭菌 20 分钟后，接种 1% 的

新鲜细菌接种物(OD_{600} 为 0.8) [11]。菌株在广泛的温度范围内进行培养, 设立 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃ 温度梯度, pH 为 7, 220 r/min 振荡培养 24 h, 加入等量无菌水, 稀释 3 倍, 使吸光值读数范围在 0.2~0.7 [12], 测定 OD (600 nm) 值。

2.3.2. 菌株生长最佳 pH 的优化

将 3 ml 液体 LB 培养基准备在三支培养管(10 毫升)中。在 121℃ 下高压灭菌 20 分钟后, 接种 1% 的新鲜细菌接种物(OD_{600} 为 0.8)。菌株在广泛的温度范围内进行培养, 设立 pH 为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 的梯度, 在各菌株最佳生长温度条件下, 220 r/min 振荡培养 24 h, 加入等量无菌水, 稀释 3 倍后, 测定 OD (600 nm) 值。

2.3.3. 菌株生长最佳碳源的优化

参照洪鹏的研究方法[13], 配置基础生长培养基, 分别替换添加等量淀粉、蔗糖、葡萄糖作为唯一碳源, 其碳源量为 1.0%, 调节培养基 pH 至各菌株最佳生长 pH, 将前期活化的试验菌液以 1% 接种浓度(OD_{600} 为 0.8)接种于液体培养基中, 在各菌株最佳生长温度条件下, 220 r/min 振荡培养 24 h, 加入等量无菌水, 稀释 3 倍后, 测定 OD (600 nm) 值。

2.3.4. 菌株生长最佳氮源的优化

同上配置基础生长培养基, 分别替换添加等量硫酸铵、硝酸钾、硝酸铵作为唯一氮源, 其氮源含量为 1.5%, 调节培养基 pH 至各菌株最佳生长 pH, 将前期活化的试验菌液以 1% 接种浓度(OD_{600} 为 0.8)接种于液体培养基中, 在各菌株最佳生长温度条件下, 220 r/min 振荡培养 24 h, 加入等量无菌水, 稀释 3 倍后, 测定 OD (600 nm) 值。

2.4. 数据处理

试验数据用 SPSS 26.0 软件进行差异显著性分析, 用 Microsoft Excel 2019 软件作图并进行分析。

3. 结果与分析

3.1. 雪茄发酵烟叶优势菌株的分离与筛选

通过稀释涂布法, 从发酵雪茄烟叶中分离纯化得到 18 株细菌菌株, 由图 1、图 2 可见, 通过淀粉、纤维素降解菌选择培养基, 筛选得到 2 株产生透明圈的菌株, 分别命名为 SN-1 (图 1)、SN-2 (图 2)。由图观察可知 SN-1 对于淀粉和纤维素的降解透明圈相对于菌株 SN-2, 范围更大, 降解能力更高。SN-2 对于纤维素的降解透明圈范围偏小, 可见其对淀粉的降解能力高于对纤维素的降解。

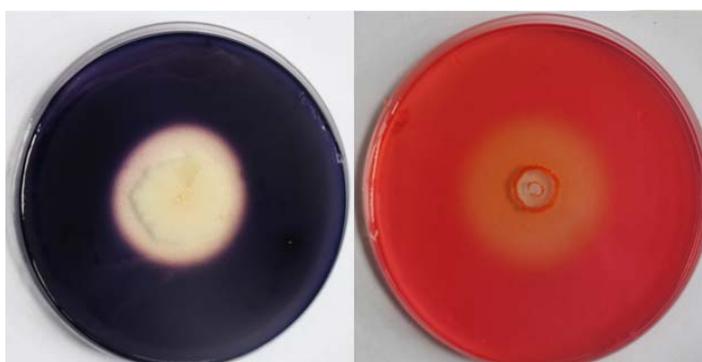


Figure 1. Growth of SN-1 strain cultured on amylase and cellulase producing screening medium for 48 h
图 1. SN-1 菌株在产淀粉酶、纤维素酶筛选培养基上培养 48 h 的生长情况

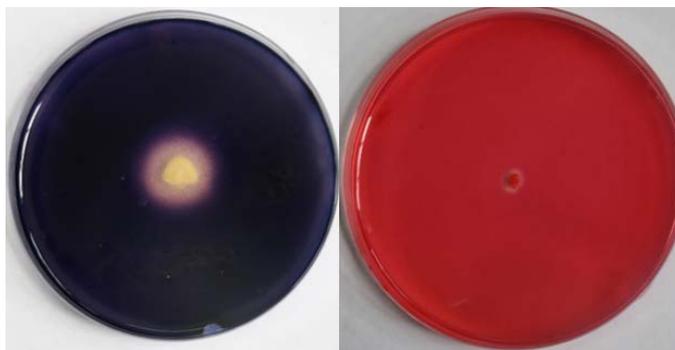


Figure 2. Growth of SN-1 strain cultured on amylase and cellulase producing screening medium for 48 h
图 2. SN-2 菌株在产淀粉酶、纤维素酶筛选培养基上培养 48 h 的生长情况

3.2. 菌株的鉴定

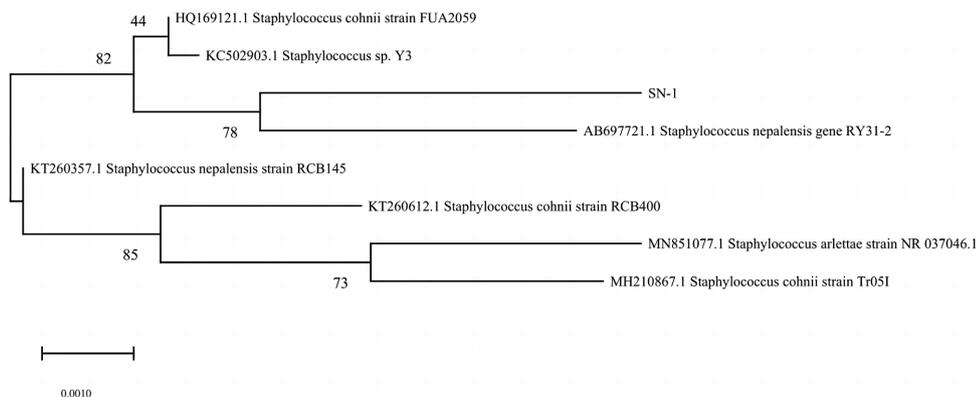


Figure 3. Phylogenetic tree of SN-1 strain
图 3. SN-1 菌株系统发育树

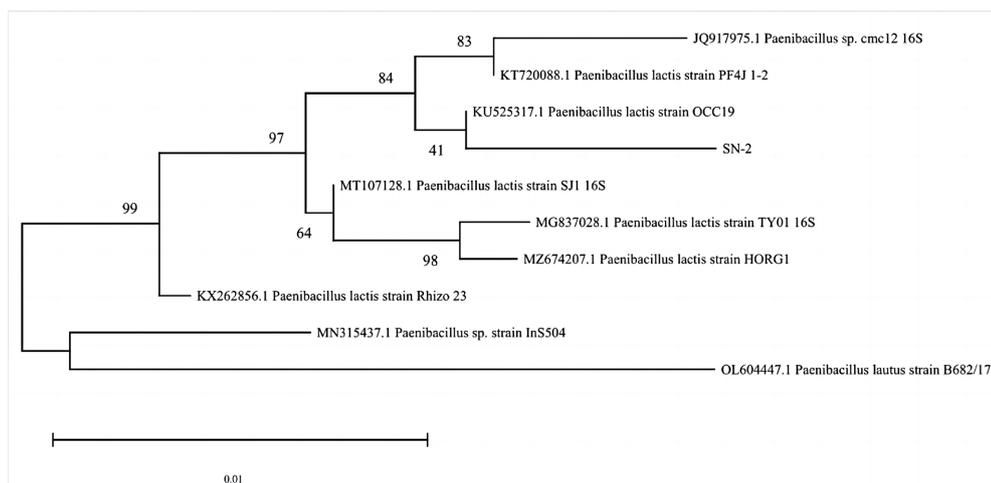


Figure 4. Phylogenetic tree of SN-2 strain
图 4. SN-2 菌株系统发育树

将两种菌株分别提取 16S rDNA 电泳后，将 PCR 产物测序，聚类在一起，用 MEGA11 软件对确定的 16S rRNA 基因序列和从 NCBI 数据库获得的参考序列进行比对。再利用 MEGA11 软件构建系统发育树(图

3、图 4)。结果显示, 菌株 SN-1 与 MN581178.1 *Staphylococcus arlettae* strain EE107-P1(3) 聚类在一起, 构成一个分支, 确定其为阿尔莱特葡萄球菌(*Staphylococcus arlettae*)。菌株 SN-2 与 KU525317.1 *Paenibacillus lactis* strain OCC19 聚类在一起, 构成一个分支, 确定其为乳酸芽孢杆菌(*Paenibacillus lactis*)。

3.3. 菌株生长条件优化

3.3.1. 不同温度对菌株生长的影响

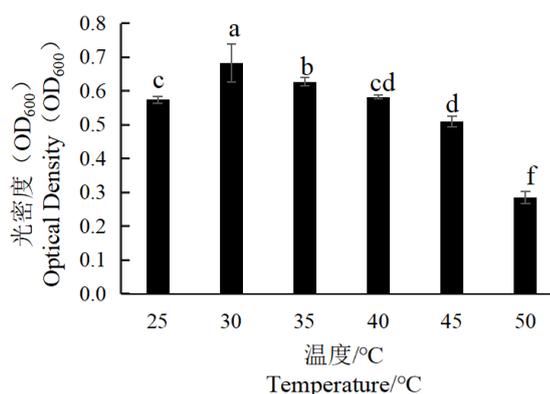


Figure 5. Effect of different temperatures on the growth of tobacco strain SN-1

图 5. 不同温度对烟叶菌株 SN-1 生长的影响

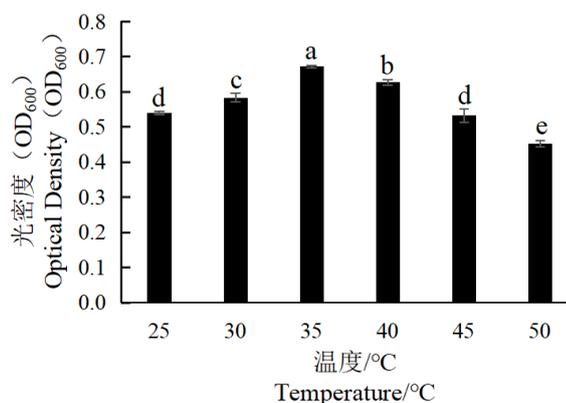


Figure 6. Effect of different temperatures on the growth of tobacco strain SN-2

图 6. 不同温度对烟叶菌株 SN-2 生长的影响

将 SN-1、SN-2 菌株分别在不同温度条件下培养, 加入等量无菌水, 稀释 3 倍后, 利用分光光度计测定其菌体生长量(OD₆₀₀), 结果显示, 由图 5 可见 SN-1 菌株在 30°C 时生长量达到最大, 之后随着温度升高, 其生长量逐渐降低, 在 50°C 时生长量最低。由图 6 可见 SN-2 菌株随着温度升高, 生长量升高, 35°C 时生长量最高, 温度再升高时, 其生长受到抑制, 生长量逐渐下降。综上可得, SN-1 的最佳生长温度为 30°C、SN-2 的最佳生长温度为 35°C。

3.3.2. 不同 pH 对菌株生长的影响

将 SN-1、SN-2 菌株分别在不同 pH 条件下培养, 加入等量无菌水, 稀释 3 倍后, 利用分光光度计测定其菌体生长量(OD₆₀₀), 结果显示, 由图 7 可知 SN-1 菌株在 pH 为 6 时, 生长量最高, 在 pH 为 5~8 时其生长量相近, 说明其对酸碱环境的适应性较高。由图 8 可知 SN-2 菌株在 pH 为 6 时, 生长量最高, 且

在 pH 为 9 是其仍可以生长, 并保持一定的生长量。综上可得, SN-1、SN-2 的最佳酸碱度均为 6, 说明这两种菌株在偏酸的环境下更适宜生长。

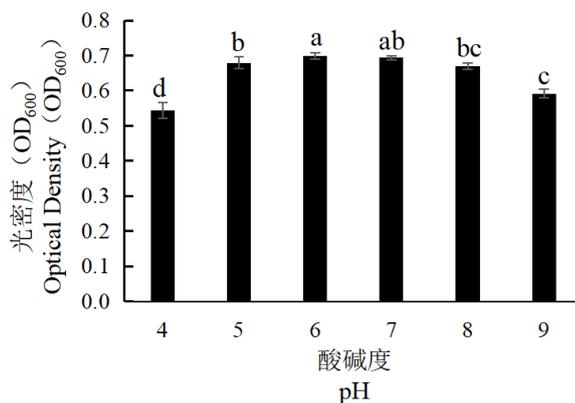


Figure 7. Effect of different pH on the growth of tobacco strain SN-1
图 7. 不同 pH 对烟叶菌株 SN-1 生长的影响

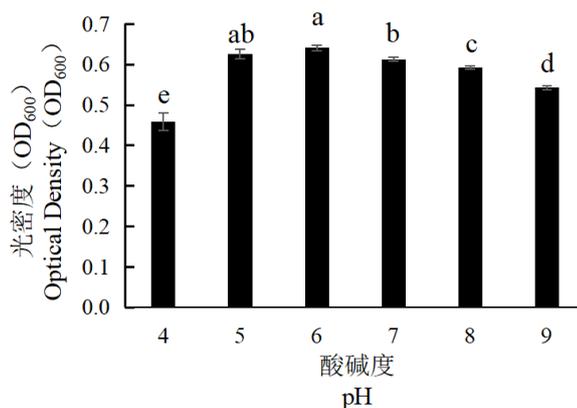


Figure 8. Effect of different pH on the growth of tobacco strain SN-2
图 8. 不同 pH 对烟叶菌株 SN-2 生长的影响

3.3.3. 不同碳源对菌株生长的影响

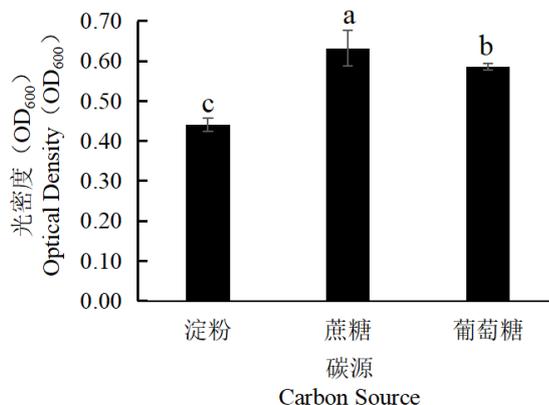


Figure 9. Effect of different carbon sources on the growth of tobacco strain SN-1
图 9. 不同碳源对烟叶菌株 SN-1 生长的影响

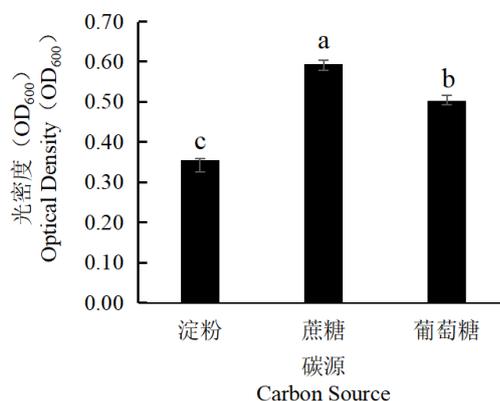


Figure 10. Effect of different carbon sources on the growth of tobacco strain SN-2
图 10. 不同碳源对烟叶菌株 SN-2 生长的影响

将菌株 SN-1、菌株 SN-2 分别在不同碳源培养基下培养，加入等量无菌水，稀释 3 倍后，利用分光光度计测定其菌体生长量(OD₆₀₀)，结果显示，由图 9 可见，菌株 SN-1 最适碳源为蔗糖，其次为葡萄糖，淀粉。由图 10 可见，菌株 SN-2 最适碳源为蔗糖，其次为葡萄糖，淀粉。

3.3.4. 不同氮源对菌株生长的影响

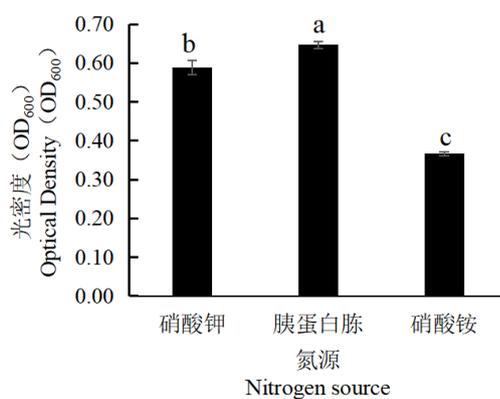


Figure 11. Effect of different nitrogen sources on the growth of tobacco strain SN-1
图 11. 不同氮源对烟叶菌株 SN-1 生长的影响

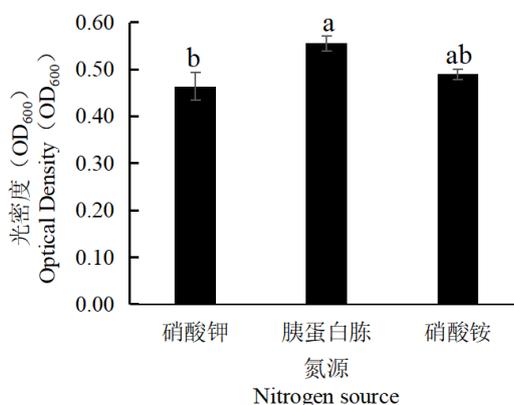


Figure 12. Effect of different nitrogen sources on the growth of *Nicotiana tabacum* strain SN-2
图 12. 不同氮源对烟叶菌株 SN-2 生长的影响

将 SN-1、SN-2 菌株分别在不同氮源培养基下培养, 加入等量无菌水, 稀释 3 倍后, 利用分光光度计测定其菌体生长量(OD_{600}), 结果显示, 由图 11 可见, 菌株 SN-1 最适氮源为胰蛋白胨, 其次为硝酸钾。由图 12 可见, 菌株 SN-2 最适氮源为胰蛋白胨, 其次为硝酸铵, 且该菌株在硝酸铵与硝酸钾的培养基中生长量相近。

4. 讨论

烟叶中淀粉含量过高在燃吸时会有焦糊气味出现, 可使烟叶的抽吸感官品质下降。淀粉降解产物中水溶还原糖还能够促进烟叶抽吸时的感官品质的改善, 当淀粉降解不充分时会导致还原糖含量较低, 造成烟叶糖碱比不协调[14]。目前, 已研究出的能够降解淀粉微生物有苏云金芽孢杆菌[15]、解淀粉芽孢杆菌[16]、巨大芽孢杆菌[17]等。纤维素也是烟叶中的主要大分子物质之一, 它在烟叶内是构成细胞骨架的基本物质, 低等级的烟叶纤维素含量较多[18] [19] [20]。当烟叶中纤维素含量过高时, 会导致烟草在热解过程中产生有害物质, 这些化合物其中部分还具有致癌性, 会影响到烟草制品的安全性[21]。同时, 过多的纤维素在燃吸时产生青杂气会掩盖烟叶的烟草本香, 影响烟草的感官品质[22]。

越来越多的研究表明烟叶微生物可以促进雪茄烟叶中大分子物质的降解。在本研究中, 获得了两株具有降解淀粉和纤维素能力的菌株 SN-1、SN-2 分别为阿尔莱特葡萄球菌(*Staphylococcus arlettae*)和乳酸芽孢杆菌(*Paenibacillus lactis*)。在部分有关发酵雪茄烟叶微生物变化规律的试验中, 也有多个研究指出葡萄球菌属[23]、芽孢杆菌属[24]等属于雪茄烟叶的主要优势菌属。芽孢杆菌在烟叶发酵上增香的应用已有部分研究[25], 关于葡萄球菌在烟叶中应用的报道较少, 在食品应用上, 有研究使用葡萄球菌发酵制作香肠来进一步提升香肠的清晰味、甜香味、果香味和花香味[26]。

5. 结论

本研究从 QX-103 雪茄烟叶中分离得到 18 种菌株, 经过纯化和筛选得到 2 种能够进行降解纤维素和降解淀粉的菌株, 并命名为 SN-1 与 SN-2, 通过形态学和生理生化鉴定, 这两种菌株分别为阿尔莱特葡萄球菌(*Staphylococcus arlettae*)和乳酸芽孢杆菌(*Paenibacillus lactis*)。通过对这 2 种菌株的最佳温度、最佳 pH、最佳碳源和最佳氮源的生长条件进行优化, 筛选出 SN-1 最优生长条件为 30℃、pH 为 6、碳源为蔗糖、氮源为胰蛋白胨, SN-2 最优生长条件为 35℃、pH 为 6、碳源为蔗糖、氮源为胰蛋白胨。为进一步改善烟叶品质, 后期应通过研究这两种菌株在雪茄烟叶发酵过程中的应用, 探究菌株的最佳发酵条件, 优化发酵工艺。

基金项目

中国烟草总公司山东省公司重点项目(KN294)。

参考文献

- [1] 顾金刚, 刘好宝, 杨明川, 等. 一株高地芽孢杆菌及其在防控雪茄发酵霉变中应用[P]. 中国专利, CN112342169A. 2021-02-09.
- [2] 李志豪, 张鸽, 甄志杰, 等. 一株产木聚糖酶的蜡样芽孢杆菌对雪茄烟叶成分及发酵产物的影响[J]. 生物技术通报, 2022, 38(2): 105-112.
- [3] 张锐新, 苏谦, 杨昌鹤, 等. 堆积发酵时间对五指山茄衣烟叶品质的影响[J]. 山东农业科学, 2020, 52(4): 57-61.
- [4] 帅瑶, 陶菡, 田运霞, 等. 复合菌种发酵烟叶产酶及挥发性风味物质变化[J]. 河南农业科学, 2020, 49(10): 162-175.
- [5] Zheng, T.F., Zhang, Q.Y., Wu, Q.Y., Li, D.L., Wu, X.Y., Li, P.H., Zhou, Q.W., Cai, W., Zhang, J. and Du, G.C. (2022) Effects of Inoculation with *Acinetobacter* on Fermentation of Cigar Tobacco Leaves. *Frontiers in Microbiology*, **13**,

Article ID: 911791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.911791>

- [6] Liu, A., Yuan, K., Li, Q., Liu, S., Li, Y., Tao, M., Xu, H., Tian, J., Guan, S. and Zhu, W. (2022) Metabolomics and Proteomics Revealed the Synthesis Difference of Aroma Precursors in Tobacco Leaves at Various Growth Stages. *Plant Physiology and Biochemistry*, **192**, 308-319. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.10.016>
- [7] Reid, J.J., Mckinstry, D.W. and Haley, D.E. (1937) The Fermentation of Cigar-Leaf Tobacco. *Science*, **86**, 404.
- [8] Yang, Z., Feng, Y., Longfei, L.I., Zhang, Y., Jiamei, L.I., Liu, C. and Center, T. (2018) Study on Screening and Application of an Efficient Cellulose-Degrading Strain from Tobacco Leaf. *Journal of Henan Agricultural University*, **52**, 418-423.
- [9] 于少藤, 毛淑蕊, 胡安妥, 陆兆新, 朱怀远, 孔梁宇, 别小妹. 改善烟叶品质微生物的筛选及其作用效果研究[J]. 南京农业大学学报, 2021, 44(4): 766-777.
- [10] 陈伦旺. 陈化烟叶微生物的分离鉴定及其在烟叶发酵中的应用[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2020.
- [11] Dai, J., Dong, A., Xiong, G., Liu, Y. and Qiu, D. (2020) Production of Highly Active Extracellular Amylase and Cellulase from *Bacillus subtilis* ZIM3 and a Recombinant Strain with a Potential Application in Tobacco Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, **11**, Article 1539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01539>
- [12] 李菡, 郭兴启. 生物化学实验技术原理和方法[M]. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- [13] 洪鹏, 安国栋, 胡美英, 耿鹏, 桑松. 解淀粉芽孢杆菌 HF-01 发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(4): 569-578.
- [14] 高玉珍, 李伟, 王运锋, 宋朝鹏, 景延秋, 宫长荣. 影响烤烟烟叶糖和淀粉含量的因素研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(6): 70-75.
- [15] 冯颖杰, 王鹏飞, 陈芝飞, 杨宗灿, 李家美, 张展, 王根发. 烟叶中 1 株可高效降解淀粉的菌株筛选与作用效果研究[J]. 河南农业科学, 2018, 47(1): 150-154.
- [16] 李士林, 王宜君, 汤朝起, 许赣荣. 耐高温菌的分离及在固态发酵上部烟叶中的应用[J]. 生物加工过程, 2015, 13(1): 35-41.
- [17] 赵铭钦, 李晓强, 王豹祥, 邱立友, 李芳芳, 郑艳燕. α -淀粉酶和蛋白酶高产菌株的诱变选育[J]. 烟草科技, 2008(8): 53-57.
- [18] 闫克玉, 闫洪洋, 李兴波, 毛文龙, 薄云川. 烤烟烟叶细胞壁物质的对比分析[J]. 烟草科技, 2005(10): 6-11.
- [19] 刘春奎, 贾琳, 王国良, 等. 河南烤烟标准样品中细胞壁物质总量分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2013, 28(6): 834-838.
- [20] 刘春奎, 蔡佳, 杨靖, 等. 烤烟细胞壁物质与烟叶质量的关系研究[J]. 广东农业科学, 2012, 39(12): 33-35.
- [21] 郭松. 我国烤烟烟叶果胶、纤维素含量分布特点及对评吸品质的影响[D]: [硕士学位论文]. 郑州: 河南农业大学, 2011.
- [22] 蒲俊, 刘彦岭. 烤烟纤维素含量与烟叶品质的相关性研究[J]. 中国农业文摘-农业工程, 2019, 31(2): 67-70.
- [23] 陈音, 孙贤, 郑召君, 蔡文, 薛芳, 刘元法, 李东亮, 刘路路. 加料发酵对茄芯烟叶化学成分及表面细菌多样性的影响[J]. 中国烟草学报, 2023, 29(1): 106-115.
- [24] 张晓娟. 雪茄外包皮烟人工发酵工艺及叶表微生物区系研究[D]: [硕士学位论文]. 郑州: 河南农业大学, 2006.
- [25] 李宁, 汪长国, 曾代龙, 刘一兵, 杨军, 雷金山, 贾玉红, 赵敏, 吴艳, 寇明钰, 刘林, 戴亚, 张燕. 蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 筛选鉴定及在雪茄烟叶发酵中的应用研究[J]. 中国烟草学报, 2012, 18(2): 65-69.
- [26] 荣良燕, 杨娟春, 赵拎玉, 钟桂霞, 杨鹏, 李儒仁. 发酵剂对发酵香肠食用品质的影响及其在不同直径香肠中的应用[J]. 肉类研究, 2020, 34(10): 33-39.