

雪茄发酵过程中叶面微生物研究现状

包自超¹, 杨 帅², 代由庆³, 温 亮⁴, 杨继琨⁴, 张玉芹^{1*}

¹ 中国烟草总公司山东省公司, 山东 济南

² 玉溪中烟种子有限责任公司, 云南 玉溪

³ 山东中烟工业有限责任公司雪茄运营中心, 山东 济南

⁴ 山东临沂烟草有限公司, 山东 临沂

收稿日期: 2023年10月7日; 录用日期: 2023年11月9日; 发布日期: 2023年11月20日

摘 要

烟草是重要的经济作物之一。雪茄作为一种历史悠久的烟草制品, 在世界各地广受欢迎。发酵是雪茄调制过程中的重要环节, 影响着雪茄烟叶的质量和产品的品质, 而微生物在雪茄发酵过程中发挥着不可忽视的重要作用。近年来, 有关雪茄发酵与叶面微生物之间关系的研究有所增加, 然而, 我们对叶面微生物组结构的变化及雪茄制品中特殊香气形成的机制的了解仍不明了。本文旨在探讨雪茄发酵过程中叶面微生物的研究现状, 将多方面、多领域的研究进行整合梳理, 以加深对雪茄发酵过程的理解。

关键词

雪茄, 发酵, 叶面微生物

Current Status of Research on Foliar Microorganisms during Cigar Fermentation

Zichao Bao¹, Shuai Yang², Youqing Dai³, Liang Wen⁴, Jikun Yang⁴, Yuqin Zhang^{1*}

¹ Shandong Tobacco Corporation, Jinan Shandong

² Yuxi Zhongyan Tobacco Seed Co., Ltd., Yuxi Yunnan

³ Cigar Operating Center of China Tobacco Shandong Industrial Co., Ltd., Jinan Shandong

⁴ Shandong Linyi Tobacco Co., Ltd., Linyi Shandong

Received: Oct. 7th, 2023; accepted: Nov. 9th, 2023; published: Nov. 20th, 2023

文章引用: 包自超, 杨帅, 代由庆, 温亮, 杨继琨, 张玉芹. 雪茄发酵过程中叶面微生物研究现状[J]. 农业科学, 2023, 13(11): 1074-1079. DOI: 10.12677/hjas.2023.1311146

Abstract

Tobacco is one of the largest economic crops in the world. As a long-standing tobacco product, cigars are popular around the world. Fermentation is an important part of the cigar preparation process, which affects the quality of cigar leaves and the quality of products. Microorganisms play an important role in the cigar fermentation process. In recent years, studies on the relationship between cigar fermentation and foliar microorganisms have increased. However, our understanding of the changes in the structure of the foliar microbiome and the mechanism of the formation of special aromas in cigar products is still unclear. The purpose of this paper is to explore the research status of foliar microorganisms in the process of cigar fermentation, integrate and sort out the research in many aspects and fields, and comprehensively analyze the structural changes of microorganisms with metabolome, genotype and environmental conditions. The purpose of this paper is to discuss the current status of research on leaf microorganisms in the cigar fermentation process, and to integrate and sort out multifaceted and multidisciplinary studies in order to deepen the understanding of the cigar fermentation process.

Keywords

Cigar, Fermentation, Foliar Microorganisms

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

烟草是重要的经济作物之一。雪茄作为一种历史悠久的烟草制品，在世界各地广受欢迎[1]。雪茄由三部分组成，最外层的茄衣，中层的茄套以及内层的茄心[2]，这三部分在栽培条件和种植方法上也有所差异，如茄芯必须在光照下生长，而用于制作雪茄最外部茄衣的烟草通常在粗棉布覆盖物下种植，以确保烟叶质地和颜色均匀[3]。用于卷制雪茄的雪茄烟叶必须通过漫长的调制过程，包括晾晒、发酵、陈酿等，以此创造出独特而多样的风味[4]。

雪茄经过调制后能够具有各种香气，如坚果香，花香，果香和巧克力风味，这些复杂香气的产生与叶面微生物群落和酶密切相关。近年来，国内外有关雪茄堆垛发酵与叶面微生物群落组成的研究有所增加[7]，多项研究都发现，芽孢杆菌和葡萄球菌是雪茄发酵过程中的主要细菌属，曲霉菌是主要真菌属，鞘氨醇单胞菌属、不动杆菌属、链格孢属等也占据重要地位，它们都在发酵过程中发挥了重要作用[5]。然而，我们对叶面微生物组结构的变化及雪茄制品中特殊香气形成的机制的了解仍不明了。因此，有必要利用高通量测序技术研究雪茄叶面微生物群落组成的变化，挖掘发酵过程中的功能微生物，对微生物群落的变化机理进行分析，对雪茄发酵相关的生产工艺进行指导与改进。本文旨在探讨雪茄发酵过程中叶面微生物的研究现状，将多方面、多领域的研究进行整合梳理，将微生物的结构变化与代谢组、基因型以及环境条件等因素综合分析，以加深对雪茄发酵过程的理解。

2. 雪茄烟叶的发酵

2.1. 雪茄发酵的过程

雪茄发酵是通过各种手段处理经过晾晒后的雪茄烟叶，改善雪茄烟叶的香气和吸味，提高雪茄制品

的品质与性能的一种烟叶调制方法，是雪茄调制过程的核心。

在发酵方法上，雪茄烟叶与烤烟叶片大致相同，分为自然发酵与人工发酵。通常情况下，自然发酵得到的烟叶质量优于人工发酵，但自然发酵耗时更长，温湿度条件易受影响，烟叶容易受到霉菌和昆虫污染。人工发酵可以通过控制温湿度，将发酵周期缩短至 4~8 周，更加符合工业生产和市场的需求[6]。雪茄烟的人工发酵方法多样，目前国内主流的发酵方式有堆积发酵法、装箱发酵法，以及四川省特有的糊米发酵法以及红米发酵法[7]。组成雪茄的茄衣、茄套、茄心的发酵方法也存在不同，但各种方法的发酵原理基本一致，都分为一次发酵与二次发酵两个阶段进行，二次发酵的目的是对烟叶进行二次醇化，提高烟叶品质，以适应工业生产的需求[8]。

2.2. 雪茄发酵的机制

烟叶发酵的机制分为三部分：氧化作用、微生物作用、相关酶作用[9]。1950 年起，Frankenburg 和 Andersen 等[10]相继提出了烟叶发酵的酶作用假说，在各个发酵过程中，主要是过氧化物酶、过氧化氢酶和氧化酶共同进行作用，通过氧化还原反应，改善烟叶的理化性质，这也证明烟叶发酵机制中的氧化作用与酶作用息息相关。早在 19 世纪 80 年代，小什列晋格就提出了烟叶发酵的微生物作用假说，认为在发酵过程中微生物首先发挥作用。Reid 等[11]首先发现，在雪茄烟叶表面存在大量细菌和霉菌，并且随发酵过程的进行，他们的结构与组成也不断发生变化。近年来，探究雪茄发酵过程中微生物作用的研究越来越多，研究发现，整个发酵过程中都伴随着微生物的活动，其在发酵前期尤为活跃，在发酵中起主导作用[12]。同时，越来越多的研究证明发酵过程中的微生物作用与酶作用密切相关，这代表着微生物直接或间接的参与了烟叶的整个发酵过程[13]。

微生物通过参与代谢途径促进了烟叶内物质的转化，其改善香气和品质的主要机制就是通过酶促反应降解大分子物质并将其转化为小分子香气物质[14]。微生物的酶促作用和烟叶中的化学相互作用是烟叶发酵过程复杂的原因所在。

3. 叶面微生物的研究现状

3.1. 叶面微生物的定义和分类

植物的地上部分，包括作为生殖器官的花与作为营养组织的叶片，统称叶际，而这其中的叶片组织是植物进行光合作用和能量代谢的中心部位。与植物的根部类似，植物叶片表面存在细菌、真菌、酵母、原生生物和噬菌体等微生物，这些微生物就是叶面微生物，而雪茄叶面微生物主要由细菌和真菌组成[15]。

雪茄叶面微生物中，发酵的各个阶段中，细菌在整体上占据优势地位[16]，但二者在整个发酵过程中都发挥着重要作用。吴桥寅与刘芳等[17][18]通过分析得出烟叶发酵过程中，在门水平上，占据优势地位的细菌是厚壁菌门、变形菌门和放线菌门，占据优势地位的真菌是子囊菌门和担子菌门，这一点与后续刘甜甜等[19]的试验结果一致，在多个实验中都得到了证实与检验。但是，由于叶面是一个不稳定的环境，叶面微生物的组成结构也不是一成不变的，不同地区、不同品种的雪茄烟叶都具有共性与自己的特性。

3.2. 研究方法和技术

以往对叶面微生物的研究是依靠以培养为基础的传统平板培养法。张鸽等[20]通过分离纯化鉴定出雪茄叶面中的芽孢杆菌、葡萄球菌与曲霉菌和青霉菌，但未能检测到其余在发酵过程中发挥重要作用的菌类，如鞘氨醇单胞菌。这是因为自然界中能够进行培养的微生物不到 1%，这种鉴定方法忽视了这些菌的作用，致使实验无法深入研究。

区别与传统培养法，高通量组学技术能够提供大量数据及解释，成本相对可控，能够广泛普及。随

着新一代测序技术不断进步,能够从基因组和宏基因组学、表观基因组、转录组、元蛋白质组和代谢组等多个生物层并行探测,深入研究微生物基因的表达、活动、和代谢组的相互作用[21]。这些基于核酸和蛋白质的新一代方法已经逐渐取代了传统的基于培养的微生物群落分析方法,是详细了解发酵过程的基础,并为干预和调节微生物群落组成提供了机会。综合多组学分析在烟叶发酵的这一领域同样占据着重要地位,特别是近年来在雪茄发酵这一研究领域也被广泛使用。

在技术方法上,通常对样品使用滤膜法或棉球擦取法采集叶面微生物,或通过离心直接获取微生物,进行 Illumina 高通量测序,通过 16srRNA 测序或宏基因组测序,将测序后的数据使用 RStudio 进行处理并绘图,将微生物的组成及动态变化与化学成分或代谢联系起来进行综合分析。

3.3. 雪茄叶面微生物的多样性

雪茄烟叶表面微生物的结构会随环境条件发生变化,但在门水平上相对稳定,细菌中的优势菌门是厚壁菌门、变形菌门和放线菌门,真菌中的优势菌门是子囊菌门。在属水平上虽然有所差异,但整体上具有共性。所以实验中共有的优势菌属有葡萄球菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属、鞘氨醇单胞菌,同时红球菌属也广泛存在,同样占据重要地位。在真菌的属水平上,曲霉属占据绝对优势地位,除此之外,链格孢属也是重要的优势菌属。

叶面微生物的组成存在一定程度上的共性,但它们之间仍存在较大的差异。地域对雪茄叶表微生物的结构组成有很大影响。郑天飞等[22]对来自多米尼加、巴西、印度尼西亚和中国的不同雪茄品种进行检测,发现不同地区 CTL 的微生物差异显著。厚壁菌门在美洲地区 CTL 中占据绝对优势,而亚洲地区的样品中,放线菌门和变形菌门的占比显著高于美洲样本,这可能因为美洲与亚洲的气候差异导致的。

微生物对温湿度的变化非常敏感,任梦娟等[23]发现随环境温度升高,变形菌门的相对丰度先降低后增加,厚壁菌门随环境温度的升高先增加后降低;在属水平上,微生物受温湿度的影响更加直观,在 20℃下,假单胞菌属占据绝对优势;25℃下假单胞菌与葡萄球菌相对丰度接近;60℃下青枯菌占据绝对优势,其次是假单胞菌属,试验表明,假单胞菌的相对丰度随温度升高而降低,葡萄球菌属随温度升高先增加后降低。

在整个发酵过程中,微生物的结构也是不断变化的,姚兰等[24]发现发酵前雪茄叶表的优势细菌属是假单胞菌、葡萄球菌和鞘氨醇单胞菌,但在发酵三个月后葡萄球菌的丰度大幅增加,成为绝对的优势菌属。任梦娟等的研究中发现,在 20℃环境下发酵 28 天后,雪茄叶表中假单胞菌属的相对丰富由 85.2%降低至 26.33%。贾云等[25]研究发现,假单胞菌属在发酵过程中呈现出先升高后降低的趋势,这一点与张晴等[26]的结果一致。

雪茄的基因型也是影响叶面微生物结构的重要因素,吴桥寅等选取了十个优质雪茄品种,研究发现虽然葡萄球菌、棒状杆菌和气球菌在不同品种雪茄烟叶中都是细菌群落的主要组成部分,但在堆积发酵过程中,相对丰度的变化不存在规律,在发酵 35 天后,各优势属的相对丰度相差较大;同样的,曲霉菌虽然在大多数品种中都占绝对优势,但它们之间的相对丰度依然相差较大。

微生物间的相互作用也是影响微生物多样性和丰度的重要因素。在细菌间的相互作用方面,葡萄球菌是“细菌拮抗中心”,与大多数变形菌门和放线菌门中的细菌呈负相关,这也能解释葡萄球菌在发酵过程中丰度的大量增加与细菌多样性的降低。红球菌和产碱菌(Alcaligenaceae)是“细菌共生中心”,与大多数细菌具有较强的正相关关系。在细菌-真菌的相互作用方面,曲霉与葡萄球菌呈正相关,与其他的优势微生物呈负相关[27]。

3.4. 研究挑战

当前国内外有关雪茄叶面微生物的研究仍然较少,同时也面临着许多挑战。由于叶面是一个复杂多

变的环境, 微生物的组成结构极易受到外界环境影响而发生变化, 在样本的采集和处理过程中, 微生物易受到外界菌种的污染, 各种因素影响下, 难以做到维持叶面原有的生态。与此同时, 不同基因型、不同地域间的雪茄叶面微生物虽然存在共性, 但差异仍然很大, 发酵过程中微生物多样性和丰度的变化没有一个普遍的规律, 前人研究中可供参考的相关信息较少, 在分析上存在许多困难。

4. 总结

多项研究都表明, 雪茄叶面微生物在雪茄的发酵过程中占据着重要地位, 厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、子囊菌门是发酵中的优势菌门; 葡萄球菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属、曲霉属、链格孢属是发酵中广泛存在的优势菌属, 这些叶面微生物通过分泌酶或影响相关酶的活性参与代谢途径, 将大分子物质分解为小分子香气物质, 以此提高发酵后烟叶的品质和质量。

然而, 雪茄发酵领域中对叶面微生物的深入研究仍有不足。今后的研究应着眼于深入了解叶面微生物的多样性和功能, 开发利用新的研究方法和技术如基因编辑技术研究叶面微生物的功能基因, 进一步明确微生物在代谢过程中发挥的作用, 将叶面微生物与挥发性香气物质直接联系起来, 寻找并控制雪茄叶面中与香气物质有重要关联的微生物。另一方面, 还可以通过添加外源菌或者产香菌如产香酵母与酿酒酵母等, 人为干涉参与发酵过程中微生物的演替过程, 不断开发新的发酵技术并应用于雪茄工业中, 提高雪茄质量和口感的可控性, 为雪茄行业提供科学依据和技术支持。

基金项目

中国烟草总公司山东省公司重点项目(202312)。

参考文献

- [1] Ferreira, H.S., *et al.* (2019) Characterisation of the Mineral Composition of Tobacco Products (Cigar, Shredded and Rope). *Microchemical Journal*, **151**, Article ID: 104196. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104196>
- [2] Gushgari-Doyle, S., Schicklberger, M., Li, Y.V., Walker, R. and Chakraborty, R. (2021) Plant Growth Promotion Diversity in Switchgrass-Colonizing, Diazotrophic Endophytes. *Frontiers in Microbiology*, **12**, Article 730440. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.730440>
- [3] 刘峰峰, 方欣, 李林林, 等, 雪茄茄衣深度发酵过程中挥发性成分的变化[J]. 广东农业科学, 2022, 49(2): 158-164.
- [4] Zheng, T., *et al.* (2022) Effects of Inoculation with *Acinetobacter* on Fermentation of Cigar Tobacco Leaves. *Frontiers in Microbiology*, **13**, Article 911791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.911791>
- [5] Xue, F., *et al.* (2023) Metagenomic Insight into the Biodegradation of Biomass and Alkaloids in the Aging Process of Cigar. *Bioresources and Bioprocessing*, **10**, Article No. 45. <https://doi.org/10.1186/s40643-023-00667-y>
- [6] 刘方玉, 高强, 付沙, 等. 雪茄烟叶发酵工艺及其微生物技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2023, 51(14): 18-21, 24.
- [7] 周锦龙, 汤珍瑶. 雪茄烟发酵技术进展与展望[J]. 农技服务, 2009, 26(11): 119-120, 127.
- [8] 郑霖霖, 赵亮, 蔡兴华, 等. 雪茄茄芯烟叶工业二次发酵过程中细菌与真菌群落多样性变化分析[J]. 中国烟草学报, 2022, 28(5): 121-128.
- [9] 张磊, 罗泽华, 杨明川, 等. 雪茄烟叶原料发酵微生物多样性及酶活变化研究[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(10): 171-180.
- [10] 姜宇, 周文, 周康, 等. 雪茄烟叶发酵技术研究进展[J]. 乡村科技, 2022, 13(18): 64-67.
- [11] 牛浩, 周中宇, 白金莹, 等. 雪茄烟发酵的研究进展[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版), 2020, 32(4): 60-63+68.
- [12] Wang, Y., *et al.* (2023) Cultivation and Application of Nicotine-Degrading Bacteria and Environmental Functioning in Tobacco Planting Soil. *Bioresources and Bioprocessing*, **10**, Article No. 10. <https://doi.org/10.1186/s40643-023-00630-x>
- [13] 赵铭钦, 李芳芳. 微生物和酶学技术在烟草发酵中的应用及展望[J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 314-318.

- [14] Costa, O.Y.A., *et al.* (2020) Cultivation-Independent and Cultivation-Dependent Metagenomes Reveal Genetic and Enzymatic Potential of Microbial Community Involved in the Degradation of a Complex Microbial Polymer. *Microbiome*, **8**, Article No. 76. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00836-7>
- [15] 韩锦峰, 朱大恒, 刘卫群, 等. 陈化发酵期间烤烟叶面微生物活性及其应用研究[J]. 中国烟草科学, 1997(4): 15-16.
- [16] 杜佳, 张晓娟, 吴钢, 等. 雪茄茄衣人工发酵过程中叶面微生物区系研究[J]. 生物技术进展, 2016, 6(3): 188-192, 230.
- [17] Wu, Q., *et al.* (2023) Interaction Analysis of Tobacco Leaf Microbial Community Structure and Volatiles Flavor Compounds during Cigar Stacking Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, **14**, Article 1168122. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1168122>
- [18] Liu, F., *et al.* (2021) Microbial Community and Metabolic Function Analysis of Cigar Tobacco Leaves during Fermentation. *Microbiology Open*, **10**, e1171. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1171>
- [19] Liu, T., *et al.* (2022) Phyllosphere Microbial Community of Cigar Tobacco and Its Corresponding Metabolites. *Frontiers in Microbiology*, **13**, Article 1025881. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1025881>
- [20] 张鸽, 李志豪, 邓帅军, 等. 海南 H382 雪茄烟叶不同发酵周期细菌群落多样性表征及演替分析[J]. 中国烟草学报, 2021, 27(2): 117-126.
- [21] Hao, T., *et al.* (2018) The Genome-Scale Integrated Networks in Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, **9**, Article 344946. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00296>
- [22] Zheng, T., *et al.* (2022) Analysis of Microbial Community, Volatile Flavor Compounds, and Flavor of Cigar Tobacco Leaves from Different Regions. *Frontiers in Microbiology*, **13**, Article 907270. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.907270>
- [23] Ren, M., *et al.* (2023) Effects of Fermentation Chamber Temperature on Microbes and Quality of Cigar Wrapper Tobacco Leaves. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **107**, 6469-6485. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12750-7>
- [24] Yao, L., *et al.* (2023) Heterogeneity Changes of Active Bacterial Community on Cigar Filler Leaves after Fermentation Based on Metagenome. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **87**, 1056-1067. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbad071>
- [25] Jia, Y., *et al.* (2023) Development of Candida Autochthonous Starter for Cigar Fermentation via Dissecting the Microbiome. *Frontiers in Microbiology*, **14**, Article 1138877. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1138877>
- [26] Zhang, Q., *et al.* (2023) Microbial and Enzymatic Changes in Cigar Tobacco Leaves during Air-Curing and Fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **107**, 5789-5801. <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12663-5>
- [27] 姚芳. 海南茄衣叶面微生物鉴定及其在人工发酵过程对雪茄烟叶品质的影响[D]: [硕士学位论文]. 郑州: 河南农业大学, 2020.