

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(5) 624-630; 4 May 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

陈化烤烟叶面优势菌的筛选鉴定与其增香效应

赵铭钦¹, 刘云¹, 李芳芳¹, 王豹祥², 刘国顺^{1*}

(¹河南农业大学烟草学院, 郑州 450002)

(²湖北中烟工业有限责任公司, 武汉 430051)

摘要 【目的】筛选定位出陈化烤烟表面优势微生物, 研究其增香效应。【方法】以 NC89、中烟 100、中烟 101 三个烤烟品种烟叶为材料, 提取烟叶表面微生物总 DNA, 通过 PCR-DGGE 技术研究烟叶表面微生物的多样性, 筛选定位出优势增质菌。采用恒温恒湿发酵条件研究优势增质菌对发酵烤烟烟叶中香气物质含量的影响。【结果】1) 根据 PCR-DGGE 图谱显示, 3 个烤烟品种在不同陈化时期有 A、B、C、D、E 五条共有的条带, 通过进一步的聚类分析、序列测定和 Blast 分析, 筛选定位出一株可培养的优势菌株, 巨大芽孢杆菌。(2) 经过添加优势增质菌处理后的发酵烟叶中大多数香气成分含量与其对照相比表现为增加趋势, 从而验证了优势菌株的增香效应。【结论】由 PCR-DGGE 技术筛选定位出的陈化烟叶表面优势增质菌, 对陈化烤烟具有较为明显的增香效应, 为进一步工业化生产和应用提供了理论依据和技术支撑。

关键词: 微生物, 陈化烤烟, PCR-DGGE, 香气物质

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)05-0624-07

烟叶醇化和发酵是改进新烟不良品质缺陷, 增进和提高烟叶香吃味质量的有效途径和重要的环节。工程技术, 已日益受到卷烟企业的重视。长期以来, 由于烟叶发酵机理的研究在理论上没有取得实质性的突破, 致使烟叶发酵技术的创新与应用进展缓慢。目前, 国内几乎所有卷烟厂家都采用自然醇化的烟叶加工处理方法, 发酵周期长, 占用资金多, 消耗大, 成本高, 制约了烟草行业经济效益的提高。烟草微生物发酵技术是近几年来研究较为活跃的生物工程技术, 发达国家如美国、日本在烟草行业均有成功的实践应用经验。国内这方面研究近 10 年来进展较快, 但在增香菌种的筛选定位和制剂的工业添加利用方面仍然存在着尚未攻克的技术障碍。

微生物促进烟叶发酵技术的研究在国外开展较

早, 并取得了一些突破性的进展^[1-4]。国内关于微生物应用于烟草发酵技术的研究也有较多报道^[5-12], 在改善烟叶品质, 增进烟叶香气方面均取得一定效果。目前对陈化烟叶表面优势微生物的研究, 还是采用传统的平板分离后, 进行形态特征和生理生化试验等一系列繁琐的鉴定过程, 而且还存在一个极大的缺陷就是鉴定结果不够精确, 不能够获得微生物多样性的真正概貌^[13]。自从 Muyzer 等^[14]首次将 PCR-DGGE 技术用于研究微生物多样性以来, DGGE 已经被广泛应用于各种环境生态的研究中。本研究首次将 PCR-DGGE 分子生物学技术应用用于陈化烟叶表面微生物多样性的研究中, 克服了传统方法所存在的局限性, 准确筛选定位出烤烟叶面优势菌株, 将其应用于烟叶人工发酵, 对其增香效

基金项目: 国家烟草专卖局重大科技攻关资助项目(110200401014)

* 通信作者。Tel: +86-371-63558128; E-mail: liugsh@371.net

作者简介: 赵铭钦(1964-)教授, 博士, 主要从事烟草生物发酵与烟草加工工艺、烟草化学与香精香料等方面的研究。E-mail: mqzhao999@tom.com

收稿日期: 2008-10-29; 修回日期: 2009-02-06

应做了验证,为微生物发酵技术在烟叶发酵工艺上的推广应用,逐步形成产业化发展规模提供了技术支撑。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料:分别选用河南宜阳烟叶和襄城烟叶为供试材料,宜阳烟叶:品种为中烟100,等级为C₃F,襄城烟叶:品种为NC89和中烟101,等级均为C₃F。将上述放入纸箱内的烟叶样品放置于河南农业大学实验室内进行自然陈化,陈化条件为:温度10~35℃,相对湿度40%~70%。陈化过程中注意室内通风和防虫,分别在陈化0、3、6、9、12个月时分别取样用于菌种鉴定。

1.1.2 主要试剂和仪器:试剂:柠檬酸钠,硫酸钠,70%冷乙醇,无菌水,7 mol/L的尿素,40%的去离子甲酰胺,浓度10%聚丙烯酰胺凝胶,超纯水,Taq聚合酶(TaKaRa公司),引物F357-GC、R518(上海生工公司合成)。仪器:平底烧瓶,电炉,鸡心瓶,水浴锅,日本岛津GC/MS-QP-5000色质联用仪,恒温恒湿箱,微量离心管,离心机,双层纱布,热循环仪PTC-200,Decode型梯度胶制备装置(Bio-Rad公司),PCR产物纯化试剂盒:大连宝生物公司,GeneQuant RNA/DNA测定仪:美国基因公司。

1.2 烤烟叶面菌体收集方法

将烟叶样品30 g分装到6瓶盛有300 mL的无菌水中,在27℃、21×g条件下摇动1 h,然后用双层纱布过滤,将滤液倒入50 mL离心管中,502×g离心15分钟,收集沉淀即为叶面菌体。

1.3 DNA提取

烤烟叶面细菌基因组DNA提取参照文献[15]方法,略作改进。

1.4 PCR扩增

以纯化后的基因组DNA为PCR反应的模板,采用上海生工公司合成的对大多数细菌和古细菌V3区具有特异性的引物对F₃₅₇-GC和R₅₁₈^[16]。它们各自序列分别为F357(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'),R518(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'),GC发卡结构为(5'-CGC CCGCCGCGCGCGCGGGCGGGGGCCACGGGGG-3'),在热循环仪PTC-200上进行扩增,扩增片段长度约为230 bp。PCR反应体系:50 ng的模板,引物F357-GC和R518各15 pmol,15 nmol dNTPs,5 μL的10×PCR缓冲液(含有25 mmol/L MgCl₂)、5 U的Taq聚合酶(TaKaRa公司),补加超纯

水至50 μL。PCR反应条件:PCR反应采用降落PCR策略,即:预变性条件为94℃ 5 min,前20个循环为94℃ 1 min,55℃~65℃ 1 min和72℃ 1 min(其中每个循环后复性温度下降0.5℃),后10个循环为94℃ 1 min,55℃ 1 min和72℃ 1 min,最后在72℃下延伸7 min。

1.5 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

采用Bio-Rad公司Dcode型梯度胶制备装置,变性剂梯度35%到55%(100%变性剂浓度为7 mol/L的尿素和40%的去离子甲酰胺的混合物),聚丙烯酰胺凝胶浓度10%,胶厚度1.0 mm,点样量为25 μL的PCR产物。电泳在62℃,1×TAE buffer,120 V电压下进行6 h,电泳结束后将凝胶放在SYBR Green I DNA染色液染色40 min。染色后的凝胶用Biocampt成像系统拍照。

1.6 DGGE条带分离测序

根据条带的位置和条带的强弱程度不同,用刀片切下含目标条带的凝胶块并转移至微量离心管中,用70%冷乙醇冲洗2~3次,然后将凝胶挤碎,加入无菌水20~30 μL,放置4℃过夜。以此DNA扩散液为模板,重做PCR,再次做DGGE,确认PCR产物跑出的条带与切割条带在同一位置。然后用不含GC夹子的引物对F357和R518扩增。扩增产物用Vitagen公司凝胶试剂盒纯化后酶连至pMD-18T载体(TaKaRa Co.LMD.),转化至大肠杆菌JM109中,由大连宝生物公司测序。酶连及转化方法见试剂盒说明及文献[17]。

1.7 烤烟叶面优势菌株增香效应试验

1.7.1 试验材料:烟叶原料:河南宜阳烟叶,品种为中烟100,等级为C₃F。试验菌株:由上述试验筛选定位得到的优势菌株。

1.7.2 试验方法:采取半叶法,即将一片烟叶去除主脉后分成两半,其中一半喷施每毫升含10¹²个优势增质菌的菌液进行处理,另一半喷施等量的无菌水处理,然后在温度为37℃,相对湿度为65%的恒温恒湿箱中,进行人工发酵,处理一个月后取样,进行香气物质的测定。

1.7.3 烟叶香气物质测定:烟叶样品前处理方法:采用同时蒸馏萃取法进行样品前处理,蒸馏萃取装置一端接盛有350 mL蒸馏水、10.0 g烟末、1.0 g柠檬酸钠及0.5 mL内标液的500 mL平底烧瓶,用可控电压的电炉加热;另一端接盛有60 mL二氯甲烷的100 mL烧瓶,55℃水浴锅加热,同时蒸馏萃取2 h。收集有机相,加入硫酸钠进行干燥至溶液澄清,

将溶液转移至 100 mL 鸡心瓶中, 60°C 水浴浓缩至 1 mL, 进行 GC/MS 分析。GC/MS 分析条件: 仪器: 日本岛津 GC/MS-QP-5000 色质联用仪, 色谱柱: CBP5-H50 m × 0.25 mm, 载气及流速: He 1 mL/min, 进样口温度: 280°C, 界面温度: 250°C, 分流比和进样量: 5:1 2 μL, 电离能: 70 eV, 质量数范围: 33 ~ 450 amu, MS 谱库: NIST62, 升温程序: 100°C (2 min) 10°C/min 180°C (2 min) 15°C/min 250°C (15 min)。

2 结果分析

2.1 烤烟叶面细菌基因组总 DNA 检测结果及 PCR 扩增产物的电泳分析

烟叶表面微生物的总 DNA 代表了烟叶表面整

个细菌区系的基因组成, 所以其提取与纯化是研究陈化烟叶表面微生物多样性的关键, 而产率的高低则直接影响着结果分析的准确性。由图可以看出, 从中烟 100、中烟 101、NC89 3 个烤烟品种烟叶中分别提取到片段长度约为 19kb 的细菌基因组的总 DNA。并且条带清晰明亮, 具备 PCR 扩增条件。

以纯化后的基因组 DNA 为模板, 采用对大多数细菌和古细菌的 16S rDNA 基因 V3 区具有特异性的引物对 F357GC 和 R518 进行扩增, 得到预期试验结果(图 2)。由图所示, 对 3 个烟叶品种中细菌基因组 DNA 的扩增产物的检测, 结果显示扩增条带清晰明亮, 达到了很好的扩增效果, 并且目的片段的量满足 DGGE 的进样要求。

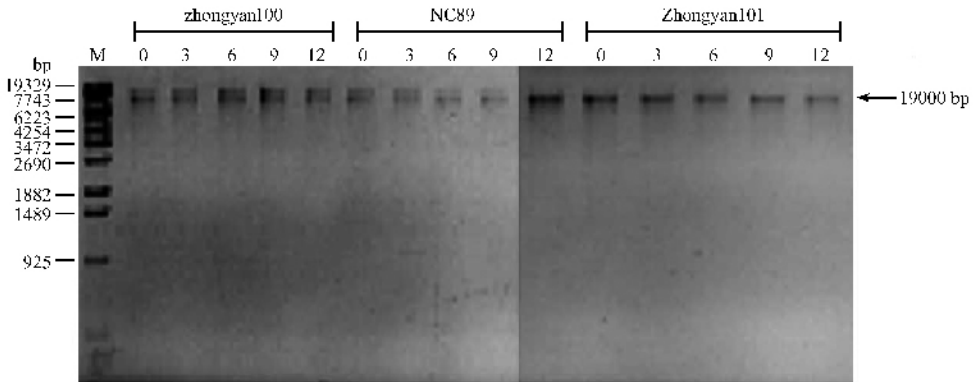


图 1 烤烟叶面微生物总 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA extracted from flue-cured tobacco surface. 0, 3, 6, 9, 12 indicate the month of aging time respectively, M, Marker-λEcoT14 I.

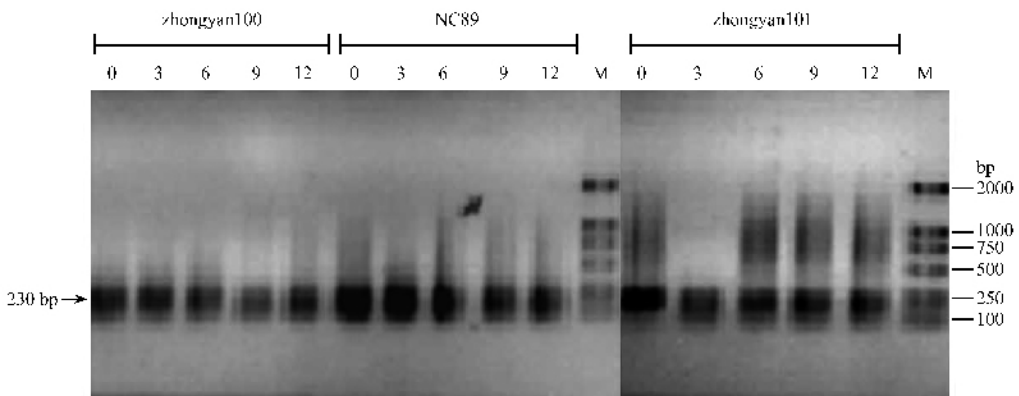


图 2 16S rDNA 目标片段 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 Amplification of target segment of 16S rDNA. 0, 3, 6, 9, 12 indicate the month of aging time respectively, M, DL2000 Marker.

2.2 不同陈化时期不同品种烟叶表面微生物 PCR-DGGE 图谱分析

不同陈化时期不同品种烟叶表面细菌基因组 DNA 经过变性梯度凝胶电泳后, DGGE 图谱清晰的显示了烟叶表面细菌种群的多样性。随着陈化时间的延长, 烟叶表面微生物部分种群的数量和条带的

亮度都发生改变, 主要表现在条带的增减以及灰度的增强或减弱上。由 DGGE 电泳图谱(图 3)可以看出, 在不同陈化时期, 相同品种烟叶表面微生物的数量和条带的亮度存在一定差异, 不同品种间条带的差异大, 但不同品种烟叶表面也存在较多共有优势菌群, 如条带 A、B、C、D、E。

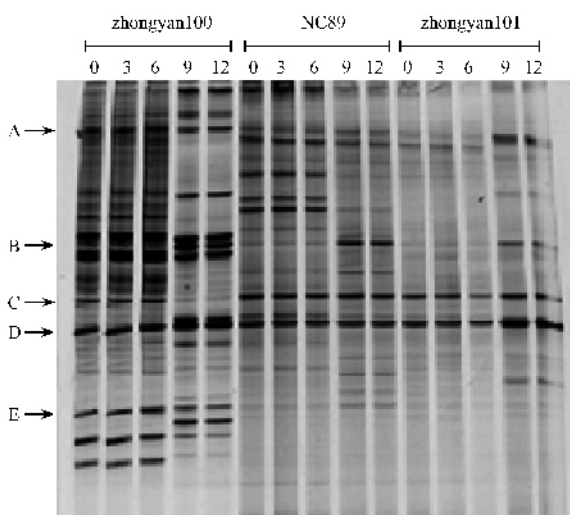


图3 不同陈化时期不同品种烤烟叶面微生物 PCR-DGGE 图谱

Fig.3 DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA Fragments microbial communities from flue-cured tobacco leaf of different periods of aging and different varieties. 0,3,6,9,12 indicate the month of aging time respectively.

2.3 不同陈化时期不同品种烟叶表面微生物种群多样性聚类分析

利用 Quantity One(Bio-Rad ,USA)软件对不同陈化时期的三个烤烟品种烟叶样品的 DGGE 图谱进行了分析,根据电泳条带的数量,质量及迁移率进行聚类分析。由图 4 看出,中烟 100 烟叶样品在陈化 0 个月与陈化 3 个月相比两者相似度极高,达到 98%,陈化 6 个月的样品与聚为一类的陈化 0 个月和 3 个月样品相比,相似度也较高,达到 88%,这表明烟叶经过 6 个月陈化后,烟叶表面的微生物种类变化不大。陈化 9 个月与陈化 12 个月的样品相似度为 78%,与陈化 0、3、6 个月的样品相比,相似度相对较低,达到 53%,说明陈化 9 个月后,烟叶表面的微生物种类和数量发生了较大幅度的变化,表现为烟叶表面的微生物种类和数量减少。以 NC89 和中烟 101 为试验样品的聚类分析结果与以中烟 100 为试验样品的聚类分析结果基本一致。

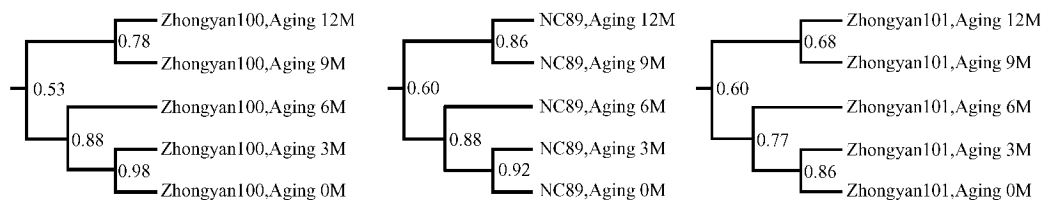


图 4 不同品种烤烟叶面微生物种群多样性聚类分析

Fig.4 Cluster analysis on the diversity of bacterial community of different varieties flue-cured tobacco leaf.

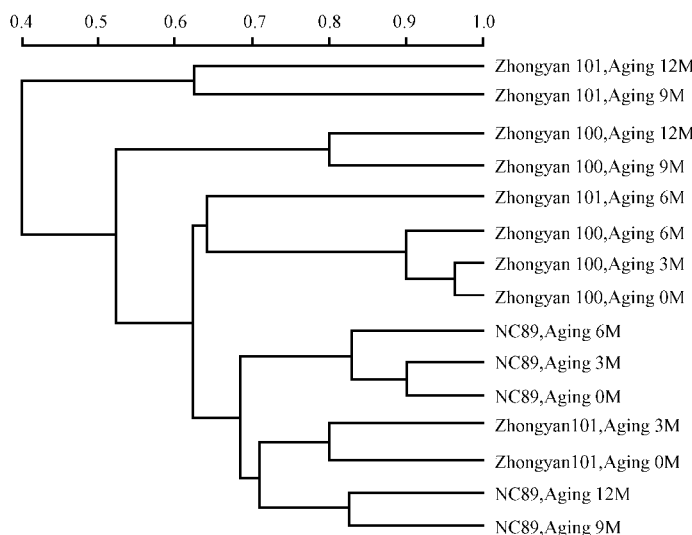


图 5 不同陈化时期不同品种间烤烟叶面微生物种群多样性聚类分析

Fig.5 Cluster analysis on the diversity of bacterial community of different periods of aging and different varieties flue-cured tobacco leaf.

对不同品种烟叶的 DGGE 图谱条带进行分析表明(图 5),不同品种烟叶间微生物菌群也存在一定

程度的相似性,在陈化 0~6 个月的过程中,中烟 100、NC89 和中烟 101 3 个烤烟品种间相似度达到了

63% 3个烤烟品种间微生物菌群的差异主要表现在条带的亮度不同,而菌种的种类差异较小;在陈化9~12个月的过程中,3个烤烟品种间的微生物菌群的相似度较低,仅达到40%,主要是各个菌种在数量上的存在较大差异,而在菌种的种类上差异相对较小。虽然不同品种间烟叶表面微生物菌群相似度相对较低,但不同品种烟叶表面存在的优势菌种(如优势条带A、B、C、D、E)在不同陈化时期的存在较强的相似性。

2.4 不同陈化时期不同品种烟叶表面优势菌株序列分析

分别对3个烤烟品种烟叶中共有的优势条带

A、B、C、D、E克隆,分别挑取多个白色单菌落进行DNA测序和Blast分析(表1),结果表明,克隆子A与GenBank的收录序列AY294222的相似率达到93%,克隆子B、C、D、E与GenBank的收录序列AJ880767、AY758563、AY939036、AY095384的同源性分别高达98%、100%、99%、100%,在这五个基因序列中仅有克隆子B是一种可培养细菌的16SrDNA V3片段,而克隆子A、C、D、E都是不可培养细菌的16SrDNA V3片段,表明3个烤烟品种烟叶表面共有的优势菌群大部分是不可培养的微生物菌群,可培养的细菌种类数量较少。

表1 DGGE优势条带序列分析结果

Table 1 Analysis on sequences of DGGE bands of domination microbe

| Band No. | Sequences Length | Landing No | ID / % | Closest relatives |
|----------|------------------|------------|--------|---|
| A | 195 | AY294222 | 93 | Bacteriovorax sp. EPC3 |
| B | 194 | AJ880767 | 98 | <i>Bacillus megaterium</i> |
| C | 169 | AY758563 | 100 | <i>Uncultured Sphingomonas</i> sp. |
| D | 194 | AY939036 | 99 | <i>Uncultured bacterium</i> |
| E | 174 | AY095384 | 100 | Uncultured yard-trimming-compost bacterium clone S-12 |

2.5 优势增质菌株对发酵烤烟香气物质含量的影响

香气物质是烟叶香味质量形成的重要因素,也是评价烟叶内在品质的重要指标之一^[18]。各种香气成分协同作用可以使烟叶具有不同的香味品质。其中,类胡萝卜素是烟叶中重要的香气前体物,烟叶经调制、醇化后95%的类胡萝卜素将分解形成不同的香味物质,对烟叶的香气起着重要的作用^[19]。萜烯类化合物的降解产物多数被认为是烟草香味的主要成分,通过一定的降解途径可以形成多种醛、酮等致香成分,主要包括茄酮等,茄酮是一种重要香气物质,赋予烟草醇和酮的特殊香气。烟草中苯丙氨酸的代谢转化是影响烟草香味的重要过程之一,其代谢产物如苯甲醇、苯乙醇都是烟草中的重要致香成分,可使烟草增加类似花香的香味^[18]。棕色化反应其实就是一种梅拉德反应,是指氨基化

合物与还原糖或其它羰基化合物之间所发生的反应,烟叶在调制、陈化、加工和燃吸期间都会不同程度的发生非酶棕色化反应,棕色化反应可以生成许多致香成分,其对改善卷烟的气味,增加香气,降低刺激性都具有重要的作用^[20]。

通过接种增质菌株对发酵烤烟烟叶中香气物质含量变化的测定结果表明(表2),处理后的烟叶中各种香气成分含量均明显高于对照,且不同香气物质含量的变化幅度有所不同。其中,类胡萝卜素类物质、棕色化反应产物的增加幅度较小,分别为1.94%、6.60%,萜烯类和苯丙氨酸类物质增加幅度比较明显,分别为19.24%、47.55%;与对照相比,处理后烟叶总的香气物质含量增加了22.64%。上述结果表明,添加外源优势增质菌株可以提高烟叶中挥发性香气物质含量,反映了良好的增香效应。

表2 优势增质菌处理对烟叶香气物质含量的影响(μg/g)

Table 2 Influence of domination microbe on the content of aroma substance(μg/g)

| Aroma component | Treatment | CK | Increasing scope/% |
|--|-----------|--------|--------------------|
| Total of carotenoids | 96.20 | 94.37 | 1.94 |
| Total of terpenoids chemicals | 571.63 | 479.40 | 19.24 |
| Total of phenylalanine | 9.62 | 6.52 | 47.55 |
| Total of products of browning reaction | 54.75 | 51.36 | 6.60 |
| Total of other specials | 415.28 | 303.98 | 36.61 |
| Total of aroma component | 1147.48 | 935.64 | 22.64 |

3 讨论

3.1 PCR-DGGE 技术对烤烟叶面微生物多样性分析及优势菌的筛选定位

本研究采用 PCR-DGGE 技术对不同陈化时期烟叶表面微生物多样性进行了分析,并通过分子克隆对优势菌种进行分离鉴定,结果表明,不同陈化时期不同品种烟叶表面细菌经过变性梯度凝胶电泳后, DGGE 图谱清晰地显示了烟叶表面细菌种群的多样性。在不同陈化时期,相同品种烟叶表面微生物的数量和条带的亮度存在着一定的差异性,但随着陈化时间的延长,烟叶表面的一部分细菌呈现增多趋势,而另一部分细菌则呈减少态势。从总量来看,细菌数量随着陈化时间的延长逐渐降低,同一品种烟叶在不同陈化时期拥有较多的共有优势条带;不同品种间条带的差异程度较大,但不同品种烟叶表面也存在较多共有优势菌群,如条带 A、B、C、D、E。经过测序分析结果显示,A、B、C、D、E 分别为 *Bacteriovorax* sp. EPC3、*Bacillus megaterium*、Uncultured *Sphingomonas* sp.、Uncultured bacterium、Uncultured yard-trimming-compost bacterium clone S-12,其中只有 B 是一种可以培养的微生物,菌种 A 的功能国内外很少有报道,C、D、E 均是不可培养的微生物。这五个菌种在各个陈化时期都是以优势微生物存在,表明这些微生物可能会对烟叶的品质产生重要影响。

3.2 优势菌种的增香机理与增香效应

不少研究认为^[8-12],微生物对烟叶陈化发酵具有一定的促进作用,是加速烟叶发酵进程,提高烟叶发酵质量的动力之一。有关微生物在烟草发酵中的作用机理还不十分清楚,但有研究表明,在烟草发酵过程中,微生物的变化与酶活性存在着明显的相关性,不同微生物的区系变化影响着不同酶活性的变化^[21-22]。我们前期的研究结果也证明^[23-25],烟草发酵生物增质剂中的微生物在增殖过程中可在烟叶表面产生庞大的高活性酶系,如淀粉酶类、多糖水解酶类、蛋白酶类、氧化还原酶类等,在酶促作用、化学作用及微生物体内生物氧化等复杂代谢的协同作用下,可使烟叶内多种有机物质迅速发生分解、降解、氧化、还原、聚合及转化等作用,形成大量的低分子化合物,使原烟中的潜在香气物质或香气前体物转化为醇类、醛类、酮类、酸类、吡咯类、吡嗪类、呋喃类、吡啶类和萜烯类等香气成分物质,从而显著地改善烟叶香吃味品质,使青杂气消除,香气显露,诱发出优良的烟叶品质。

本试验通过在烟叶表面添加优势微生物对发酵烟叶处理后进一步证实,增质菌株可以诱发一系列与香气物质变化有关的生化反应,并通过微生物及其分泌的酶与烟叶自身酶的协同作用,使香气成分含量在较短时间内得到较大幅度的提高,从而达到改善烟叶香吃味品质的目的。筛选出更多的优势菌株,掌握其生物特性,将这些优势增质菌株应用于烟叶人工发酵中,全面提高烟叶香吃味品质,将是今后研究的方向。

4 结论

本研究首次采用分子生物学技术对陈化烟叶表面微生物多样性进行分析,并准确鉴定出一种可培养的优势菌株,并将此优势菌株应用于烟叶人工发酵处理后,取得了令人满意的增香效果,这为微生物发酵技术在烟草中的推广应用奠定了理论基础。

参考文献

- [1] Reid JJ, Gibbons MF, Haley DE, et al. The fermentation of cigar-leaf tobacco as influenced by the addition of yeast. *Journal of Agricultural Research*, 1944, 69: 373-381.
- [2] Tamayo AI, Cancho FG. Microbiology of the fermentation of Spanish tobaccos. *International congress of Microbiology*, 1953, 6: 48-50.
- [3] Pounds JR, Lucas GB. Thermophilic Fungi of tobacco. North Carolina agricultural experiment station. *Technical Bulletin*, 1972, 211.
- [4] English CF, Bell EJ, Berter AJ, et al. Isolation of thermophiles from roadleaf tobacco and effect of pure culture inoculation on cigar aroma and mildness. *Applied Microbiology*, 1967, 15: 117-119.
- [5] 陈福星, 王磊. 烟叶微生物发酵的探讨. 湖南微生物学 (*Hunan Microbiology Communications*), 1990 (2): 37-39.
- [6] 谢和, 秦京, 王亮, 等. 优势微生物在烤烟人工发酵过程中的作用. 贵州农学院丛刊 (*Collectin of Guizhou Agricultural College*), 1990 (1): 95-107.
- [7] 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. 中国烟草科学 (*Chinese Tobacco Science*), 1997 (4): 13-14.
- [8] 罗家基, 朱子高, 罗毅, 等. 微生物在烟叶发酵过程中的作用. 烟草科技 (*Tobacco Science Technology*), 1998, (1): 6.
- [9] 赵铭钦, 岳雪梅, 邱立友, 等. 微生物发酵增制剂对卷烟酸性组分含量及品质效应的影响. 中国烟草科学 (*Chinese Tobacco Science*), 2000 (1): 11-14.
- [10] 徐洁, 张修国, 张天宇, 等. 微生物真菌菌剂对烟叶品质的影响. 西南农业大学学报 (*Journal of Southwest Agricultural University*), 2005 (2): 163-168.

- [11] 谢和, 韩忠礼, 赵维娜. 微生物发酵对烤烟内在质量的影响. 山地农业生物学报(*Journal of Mountain Agriculture and Biology*), 1999, 18(4): 227-230.
- [12] 赵铭钦, 齐伟城, 邱立友, 等. 烟草发酵增质剂对烤烟发酵质量的影响. 河南农业科学(*Journal of HeNan Agricultural Sciences*), 1998, 12: 7-9.
- [13] Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR, et al. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180: 4765-4774.
- [14] Muzer G, Wall DE. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(3): 695-700.
- [15] 林菊生, 冯作化. 现代细胞分子生物学技术. 北京: 科学出版社, 2004.
- [16] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. 在 PCR-DGGE 研究土壤微生物多样性中应用 GC 发卡结构的效应. 生态学报(*Acta Ecologica Sinica*) 2003, 23(10): 2172-2173.
- [17] Atlas RM, Bartha R. *Microbial Ecology*, 2nd edn. The Benjamin Cummings Publishing Co., Menlo Park, CA 1986.
- [18] 史宏志, 刘国顺. 烟草香味学. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [19] 韦凤杰, 刘国顺, 杨永峰, 等. 烤烟成熟过程中类胡萝卜素变化与其降解香气物质关系. 中国农业科学(*Scientia Agricultura Sinica*) 2005, 38(9): 1882-1889.
- [20] 吴冬梅, 殷广明. 棕色化反应产物的制备研究在烟草方面的应用. 克山师专学报(*Journal of Keshan Junior Teachers College*) 2000(3): 40-42.
- [21] 韩锦峰, 朱大恒, 杨素勤, 等. 不同陈化期烤烟几种酶活性及相关化学成分的分析. 中国烟草科学(*Chinese Tobacco Science*), 1999(1): 1-2.
- [22] 朱大恒, 陈锐, 陈再根, 等. 烤烟自然醇化与人工发酵过程中微生物变化及其与酶活性关系的研究. 中国烟草学报(*Acta Tobacaria Sinica*) 2001, 7(2): 26-30.
- [23] 赵铭钦, 邱立友, 张维群, 等. 陈化期间烤烟叶片中生物活性变化的研究. 华中农业大学学报(*Journal of Huazhong Agricultural University*) 2000, 19(6): 537-542.
- [24] 赵铭钦, 王豹祥, 邱立友, 等. 不同陈化时期的烟叶酶活性变化及其同工酶酶谱分析. 烟草科技(*Tobacco Science Technology*) 2006, 3: 52-54.
- [25] 赵铭钦, 王豹祥, 邱立友, 等. 不同陈化时期烤烟叶片中酶活性及其相关化学成分分析. 中国农业大学学报(*Journal of China Agricultural University*), 2006, 11(4): 7-10.

Identification of dominant and fragrance-enhancing microorganisms of tobacco leaves during ripening

Mingqin Zhao¹, Yun Liu¹, Fangfang Li¹, Baoxiang Wang², Guoshun Liu^{1*}

(¹ Tobacco College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

(² Hubei China Tobacco Industry Co., Ltd., Wuhan 430051, China)

Abstract 【Objective】 We screened dominating microbial species isolated from aging flue-cured tobacco and studied their aroma improving effect. 【Methods】 Total DNA of microorganisms from the fermentation flue-cured tobacco surface of NC89, ZhongYan 100 and ZhongYan 101 were extracted. Under the PCR-DGGE, the diversity of microorganisms on fermentation tobacco leaves were studied and dominating microbial species were screened. We further studied the influence of dominating microbial species on the content of aroma components of the fermentation flue-cured tobacco. 【Results】 1) By using DGGE analysis, there were 5 dominant bands A, B, C, D and E in all tobacco leaves samples of the three varieties; In further studies, five dominant DGGE bands were isolated, cloned and sequenced. From them we screened a dominant microorganism. 2) The content of most aroma components in tobacco leaves increased when they were sprayed with the dominant microorganism, comparing with the control. 【Conclusion】 The dominant microorganism can improve the flavor of tobacco leaves during ripening.

Keywords: Microorganism; tobacco leaf ripening; PCR-DGGE; aroma component

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)