

# 西瓜内生菌的挥发性成分分析及其发酵香料在卷烟中的应用

朱宇 郑琳<sup>①a</sup> 刘煜宇<sup>a</sup> 李仙<sup>a</sup> 包秀萍<sup>a</sup> 普兴伟<sup>a</sup>

(川渝中烟工业公司 成都市锦江区成龙大道一段 56 号 610066)

a[ 云南瑞升烟草技术集团(有限)公司香精香料产品中心 211 室 昆明市科医路 41 号 650106]

**摘要** 对新鲜西瓜内生菌进行分离纯化,共获得 3 株纯系微生物。通过筛选获得一株代谢产物香气优雅、甜润、生长迅速的菌株。利用 GC-MS 对其发酵产物进行分析,结果表明经该微生物代谢,种子液成分由苯、胺、酚等物质转化成了酸和醇等主要香气成分物质,苯含量从 58.65% 降到了 1.35%,其次酸类物质和醇类物质分别占峰面积的 55.06% 和 42.64%。利用该菌株发酵制备得到的发酵型烟用香料产品 FM XG-A 具有使烟香柔和、细腻、饱满的作用。

**关键词** 西瓜; 内生菌; 挥发性成分; 气相色谱-质谱法; 卷烟应用

**中图分类号:** O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8138(2012)04-2093-05

## 1 引言

植物内生菌是一个多样性十分丰富的微生物类群。分布在没有外部感染的植物组织内,并与宿主植物协同进化,可能与寄生植株生理生化特性存在着密切的相关性,能产生丰富多样的具有生物活性的代谢产物<sup>[1-3]</sup>。因此,对于植物内生菌资源的筛选及利用对于生物技术在烟用香精香料的发展中具有极为重要的意义<sup>[4-6]</sup>,目前将微生物发酵技术应用于烟用香精香料开发中的报道主要集中于陈化后烟叶表面微生物利用与开发<sup>[7-10]</sup>,而利用果类内生菌开发烟用香料的报道却比较少见。西瓜是一种双子叶开花植物,它所结出的果实是假果,气味其独特的果类甜香能够使烟香更加柔和、丰富、谐调。本文对西瓜内生菌进行分离纯化,并通过香气评定等手段进行筛选,所得微生物进一步开发,对生物型烟用香料的深入研究提供了参考。

## 2 实验部分

### 2.1 试剂

新鲜西瓜(市售);牛肉膏(BR,北京奥博星生物技术责任有限公司);蛋白胨(BR,上海中科昆虫生物技术开发有限公司);磷酸二氢钾、硫酸亚铁、硫酸铵、葡萄糖、酵母膏、无水硫酸钠(AR,广东汕头市西陇化工厂);琼脂粉(福建石狮市环球琼胶工业有限公司);二氯甲烷(AR,天津市博迪化工有限公司)。实验用水为无菌水。

① 联系人,手机:(0)15925188320;E-mail:zhenglin@reascend.com; zhenglin1006@126.com

作者简介:朱宇(1971—),男,四川省西昌市人,工程师,大专,主要从事卷烟产品设计开发和香精香料研究工作。

郑琳(1985—),女,昆明市人,助理工程师,本科,主要从事卷烟香精香料研究开发应用工作。

## 2.2 仪器

SKY-211B 大容量恒温培养摇床(上海苏坤实业有限公司); HXC576 血液冷藏箱(青岛海尔特种电器有限公司); SGSP-02 隔水式电热恒温培养箱(湖北黄石医疗器械厂); 同时蒸馏提取器(自制); BU CHIR-3000 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司); Agilent 6890N/5975 气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦公司); AL104 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); KTJC-1 超净工作台(昆明金京田科贸有限公司)。

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 西瓜内生菌的分离纯化

按照常规无菌操作<sup>[11]</sup>, 取新鲜西瓜 5g, 放入已灭菌的研钵中进行研磨, 将充分研磨好的西瓜倒入无菌水中, 进行振荡培养 20min, 制成稀释培养母液, 并按照稀释涂平板分离纯化法<sup>[11]</sup> 反复进行分离纯化培养, 直至获得单一菌株进行常规保种。

### 2.3.2 产香内生菌的筛选

取所得纯系内生菌菌株, 在液体牛肉膏蛋白胨培养基中置于 30℃, 振荡频率为 150r/min 的环境下进行培养, 并对菌株的生长速度及发酵液的香气进行评价。

### 2.3.3 发酵液的同时蒸馏萃取

将发酵液 250g 放入同时蒸馏萃取装置一端的 500mL 圆底烧瓶中, 用电热套加热; 装置的另一端为盛 25mL 二氯甲烷的 100mL 圆底烧瓶, 在 60℃ 水浴条件加热, 同时蒸馏萃取 3h。二氯甲烷萃取液用无水硫酸钠干燥, 置于 4℃ 条件下过夜, 过滤, 滤液倒入浓缩瓶中用 Vigreux 柱浓缩至约 1mL, 浓缩液用于 GC-MS 分析。

### 2.3.4 GC/MS 分析条件

仪器检测: 毛细管柱: HP-5MS(30m × 0.25mm × 0.25μm); 进样口温度: 240℃; 载气: He, 恒压模式 70kPa; 程序升温: 50℃(1min) → 8℃/min → 160℃(2min) → 8℃/min → 260℃(15min); 进样量: 0.5μL; 分流比: 25:1; 传输线温度: 280℃; 电离方式: EI; 电离能量: 70eV; 离子源温度: 230℃; 四级杆温度: 160℃; 质量范围 35—455amu。溶剂延迟: 2min; 检测模式: SCAN 和 SIM 同步。

谱图检索: 所得图谱经计算机谱库(NIST 05, Wiley 275)检索, 并结合标准质谱图和有关文献<sup>[12]</sup>, 确定挥发性成分。并用色谱峰面积归一化法测定得各挥发性成分的峰面积。

### 2.3.5 发酵样品的制备及评价

将筛选所得纯系产香内生菌进行活化, 并接入种子液于 30℃, 150r/min 进行培养, 培养 24h 后按照  $V(\text{干果提取液}) : V(\text{种子液}) = 20 : 1$  的比例接入干果提取液中并于 30℃, 150r/min 进行发酵, 待发酵完成后进行发酵液的后处理, 完成发酵香料的小样制作, 组织专业评吸人员进行样品的抽吸品质评价<sup>[6]</sup>。

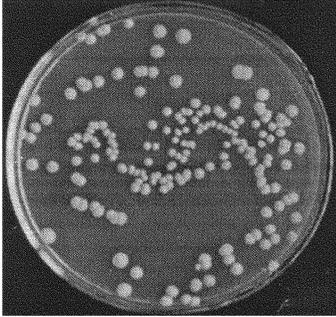
## 3 结果与讨论

### 3.1 西瓜产香内生菌的筛选

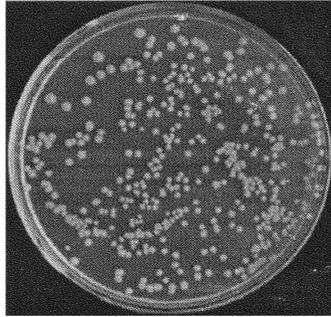
利用稀释涂平板法对新鲜西瓜的内生菌进行反复纯化分离后共获得纯系内生菌 3 株, 其中酵母 1 株, 细菌 2 株。通过发酵培养实验对其分类、菌落形态、显微观察形态、生长速度及发酵液香气特征进行观察统计。结果见表 1、图 1, 最终将生长迅速、发酵代谢产物香气优良的 XG-01 作为进一步深入研究的产香内生菌菌株。

表 1 西瓜内生菌筛选

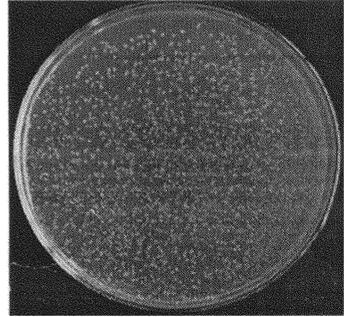
菌株编号	分类	菌落形态	显微观察形态	生长速度	发酵液嗅香
XG-1	酵母	光滑, 乳白色圆形, 体积较大	椭圆, 偏大	较快	清甜香
XG-2	细菌	光滑, 黄色湿润圆形, 体积中等	球状菌, 体积中等	中等	甜香
XG-3	细菌	光滑, 浅黄色湿润圆形, 体积较小	小球菌, 较小	中等	甜香



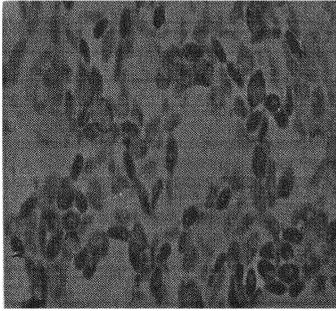
XG-1菌落



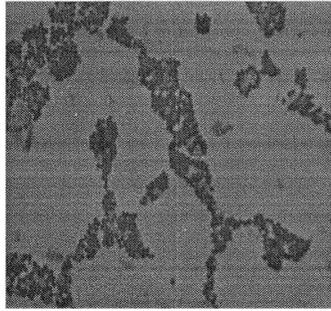
XG-2菌落



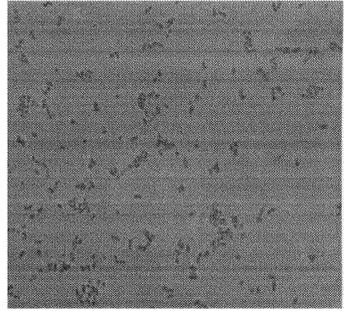
XG-3菌落



XG-01菌体



XG-2菌体



XG-3菌体

图 1 西瓜内生菌的菌落菌体形态

### 3.2 香气成分分析

将筛选所得的纯系菌株 XG-01 于平板上进行活化培养, 活化完成后将其接入基础液体培养基进行振荡培养, 培养 3 天后对发酵液进行收集并利用 GC/MS 对其进行香气成分分析, 对比发酵前后种子液的变化。分析结果见表 2、表 3, 总粒子流图见图 2、图 3。结果表明, 种子液经过菌株 XG-01 发酵之后, 空白种子液中的苯、胺、酚等物质转化成了酸和醇等主要香气成分物质, 苯含量从 58.65% 降到了 1.35%, 其次酸类物质和醇类物质分别占峰面积的 55.06% 和 42.64%, 另外还有酮类物质等常见致香成分, 由此说明 XG-01 菌株具有较好的产香能力, 可将常规 C、N 源物质转化为重要致香物质, 具有较好的开发利用价值。

表 2 空白种子液挥发性成分分析

保留时间( min)	中文名	英文名	峰面积(A·U)
2.23	苯	Benzene	58.65
2.92	甲苯	Toluene	6.36
4.68	苯酚	Phenol	6.04
4.87	癸烷	Decane	5.29
5.71	N,N-二甲苯胺	N,N-dimethyl-Benzenamine	6.27
6.49	十二烷	Dodecane	9.64
7.69	吡啶	Pyridine	7.77

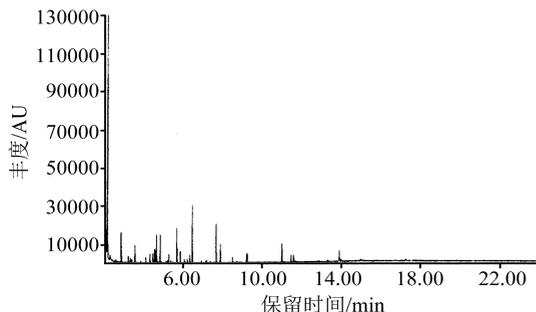


图 2 空白种子液的总粒子流图

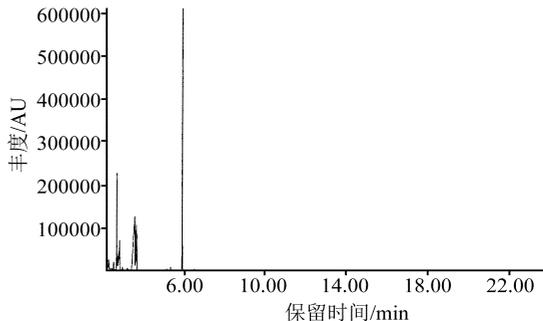


图 3 发酵种子液的总粒子流图

表 3 发酵种子液的香气成分分析

保留时间/min	中文名	英文名	峰面积
2.23	苯	Benzene	1.35
2.48	3-羟基-2-丁酮	3-hydroxy-2-Butanone	0.94
2.63	3-甲基-1-丁醇	3-methyl-1-Butanol	13.87
2.78	2-甲基-丙酸	2-methyl Propanoic acid	11.52
3.52	3-甲基-丁酸	3-methyl-Butanoic acid	30.88
3.61	2-甲基-丁酸	2-methyl-Butanoic acid	12.66
5.88	苯基乙醇	Phenylethyl Alcohol	28.77

### 3.3 发酵样品的制备及评价

将 XG-01 进行活化, 并接入种子液, 在 30℃, 150r/min 条件下进行培养 24h, 发酵后的种子液按 5% 接种量接入干果提取液中, 置入 30℃, 150r/min 摇床进行发酵, 待发酵完成后进行发酵液的后处理, 完成发酵香料的小样(FMXG-A) 制作, 将该样品以加料的方式, 按照 50g/BC 添加, 用微量喷雾器均匀地喷加于不同品牌卷烟的叶组上, 并分别以加入同样比例水的叶组作为对照, 经由 7 人组成的专业评吸小组对添加效果进行感官评价(评价结果见表 4)。由评吸结果可以看出, 该香料加入卷烟中具有柔和烟气、提高烟气细腻性、甜润感的作用。特别是用于紫云叶组, 在柔和烟气, 降低刺激等方面作用明显。

表 4 FMXG-A 卷烟添加评吸结果

试验烟	光泽	香气	谐调	杂气	刺激性	余味	
紫云叶组	对照	油润	丰满、细腻	谐调	无杂气	略有刺激	纯净、舒适
	FMXG-A	油润	柔和细腻、优雅、甜润	谐调	无杂气	无刺激	口感舒适、甜润
1956 叶组	对照	油润	烟草本香充足、稍粗糙	谐调	略有杂气	略有刺激	较净、较舒适
	FMXG-A	油润	柔和细腻、丰富、透发	谐调	略有杂气	略有刺激	较净、较舒适

## 4 结论

对新鲜西瓜内生菌进行分离纯化, 共获得 3 株纯系微生物, 其中细菌 2 株, 酵母 1 株。通过对菌株生长速度及代谢产物香气评价的评价分析最终筛选获得一株代谢产物香气优雅、甜润、生长迅速的细菌 XG-01。利用 GC-MS 对其发酵产物进行分析, 结果表明, 该产香内生菌代谢产物的酸类物质和醇类物质分别占峰面积的 55.06% 和 42.64%, 另外还有酮类物质等常见致香成分。通过液体发酵技术利用该 XG-01 进行发酵并制备得到的发酵型烟用香料产品 FMXG-A 具有使烟香柔和、细腻、饱满的作用。通过该项研究为植物内生菌资源的筛选分离及在烟用香精香料产品开发中的应用和开辟经济、高效且能定向生产特色风味烟用香原料的新途径提供了参考。

## 参考文献

- [1] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86—91.
- [2] Strobel C, Stierle D. Taxomyces Andreaeae, A Proposed New Taxon for a Bulbilliferous Hyphomycete Associated To Pacific Yew (*Taxus Brevifolia*)[J]. *Mycotaxon*, 1993, 47: 71—80.
- [3] Maldonado-Robledo G, Rodriguez-Bustamante E, Sanchez-Contreras A. Production of Tobacco Aroma from Lutein. Specific Role of the Microorganisms Involved in the Process[J]. *Appl Microbial Biotechnol*, 2003, 62: 484—488.
- [4] Romano P, Fiore C, Paraggio M *et al.* Function Of yeast Species and Strains in Wine Flavour[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 86(2): 169—180.
- [5] 林瑜, 徐若飞, 李祖红等. 发酵无花果香料的挥发性成分分析[J]. 生物技术, 2005, 15(2): 54.
- [6] 段继铭, 曾晓鹰, 刘煜宇等. 葡萄果渣发酵烟用香料的制备及挥发性成分分析[J]. 精细化工, 2009, 26(8): 781—783.
- [7] 张峻松, 贾春晓, 毛多斌等. 生物技术制备天然枣香料的香味化合物分析[J]. 精细化工, 2003, 20(2): 82—84.
- [8] 梅建凤, 陈虹. 生物转化法生产  $\beta$ -2 苯乙醇[J]. 微生物学通报, 2005, 32(2): 114—118.
- [9] Etschmann M M W, Sell D, Schrader J. Medium Optimization for the Production of the Aroma Compound 2-Phenylethanol Using a Genetic Algorithm[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, 29(1—6): 187—193.
- [10] 崔志峰, 车智博, 杨霄等. 2-苯乙醇耐受性高产酵母菌株的选育[J]. 浙江工业大学学报, 2008, 36(4): 427—430.
- [11] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [12] 施钧慧, 汪聪慧. 香料质谱图集[M]. 北京: 中国质谱学会, 1992.

## Analysis of Volatile Components from Watermelon Endophyte and Its Application in Fermentative Cigarette Spice

ZHU Yu ZHENG Lin<sup>a</sup> LIU Yu-Yu<sup>a</sup> LI Xian<sup>a</sup> BAO Xiu-Ping<sup>a</sup> PU Xing-Wei<sup>a</sup>  
 (Chongqing Tobacco Industry Company, Chengdu 610066, P. R. China)  
<sup>a</sup>Yunnan Ruisheng Tobacco Technology Group (Limited Company), Ltd., Kunming 650106, P. R. China]

**Abstract** The fresh watermelon endophyte was separated and purified to obtain three strains of pure microbe which screened for a strain with elegant aroma, sweet, rapidly growing plant metabolism product. The fermentative product was analyzed by GC-MS, and the results showed that with the microbial metabolism, seeds liquid ingredients by benzene, amine, phenolic substances transformed into material main with aroma compositions such as alcohol and acid. The content of benzene fell from 58.65% to 1.35%, and acid material and alcohol material accounted for 55.06% and 42.64% of the peak area. The spices products FMXG-A of fermentation type for cigarette obtained by fermentation of strains had the effect of making cigarette sweet soft, delicate, smoking full.

**Key words** Watermelon; Endophyte; Volatile Components; GC-MS; Utilization in Cigarette

### 过期《光谱实验室》期刊免费赠送启事

本部尚有一些过期(2007及以前)的期刊,凡同行中有需要者均可免费赠送,但邮费(含包扎费和人工费)自付,每6本(不同卷、期)为1个单元,约重2.0—2.5kg,收费(可用邮票支付)20元。

有意者来信告知收件人姓名及详细地址,同时将邮票放在信封中挂号寄来。

联系地址:北京市延庆石河营东街10号楼201室《光谱实验室》编辑部何霜,邮政编码:102100,电话:(010)52513126。