引用格式:

吕颖华, 张柯, 张齐, 王乐, 王爽, 李萌, 张峻松, 付丽丽, 梁森. 稠浆法再造烟叶霉变微生物的分离鉴定及生物学特性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(4): 9-14.

LYU Y H, ZHANG K, ZHANG Q, WANG L, WANG S, LI M, ZHANG J S, FU L L, LIANG M. Isolation, identification and biological characterization of mold species from slurry processed reconstituted tobacco[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(4): 9-14.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>

稠浆法再造烟叶霉变微生物的分离鉴定及生物学特性

吕颖华¹, 张柯², 张齐², 王乐², 王爽², 李萌¹, 张峻松¹, 付丽丽^{2*}, 梁森¹

(1. 郑州轻工业大学烟草科学与工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 中国烟草总公司郑州烟草研究院, 河南 郑州 450001)

摘要: 为明确引起稠浆法再造烟叶霉变的微生物种类及其生物学特性, 从霉变样品上分离得到2株致霉微生物, 采用形态学和分子生物学结合的方法对其进行种属鉴定和生物学特性分析。结果表明: 引起样品霉变的微生物为曲霉属, 得到的2株菌株分别为黑曲霉(*Aspergillus niger*)和黄曲霉(*Aspergillus flavus*); 黑曲霉在孟加拉红培养基、PDA培养基、CYA培养基和1%、5%、10%、20%自制烟叶培养基上的生长速度均大于黄曲霉的; 其适宜生长的温度均为30~35℃, 4℃低温和45℃以上的高温均能较好地抑制菌株的生长; 2株霉菌在pH为3~10时均能生长, pH为6时的生长量最高; 紫外线辐照处理对稠浆法再造烟叶霉菌有一定的抑制作用, 黄曲霉对紫外线的敏感性大于黑曲霉的。由此可见, 温度调控和紫外线处理可控制稠浆法再造烟叶微生物的生长。

关键词: 再造烟叶; 稠浆法; 黑曲霉; 黄曲霉; 生物学特性

中图分类号: TS414

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2025)04-0009-06

Isolation, identification and biological characterization of mold species from slurry processed reconstituted tobacco

LYU Yinghua¹, ZHANG Ke², ZHANG Qi², WANG Le², WANG Shuang²,

LI Meng¹, ZHANG Junsong¹, FU Lili^{2*}, LIANG Miao¹

(1. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou, Henan 450001, China; 2. Zhengzhou Tobacco Research Institute of China National Tobacco Corporation, Zhengzhou, Henan 450001, China)

Abstract: To identify the microbial species responsible for the spoilage of slurry processed reconstituted tobacco and to characterize their biological properties, two mold strains were isolated from the contaminated samples. Morphological and molecular biological methods were used to identify and analyze the species and the biological characteristics of these isolates. The results showed that the spoilage was caused by mold belonging to *Aspergillus*, and two strains were obtained and identified as *Aspergillus niger* (*A. niger*) and *Aspergillus flavus* (*A. flavus*). The growth rate of *A. niger* was higher than that of *A. flavus* on all culture media tested, including Bengal red media, PDA media, CYA media, and tobacco extract-based media at concentrations of 1%, 5%, 10% and 20%. The optimal growth temperature for both strains ranged from 30-35 °C, and growth was effectively inhibited at 4 °C and at temperatures ≥ 45 °C. Both strains were capable of growing over a wide pH range(3-10), with the maximum biomass accumulation observed at pH 6. Ultraviolet(UV) irradiation significantly inhibited fungal growth on the slurry processed reconstituted tobacco, and *A. flavus* was found to be more sensitive to UV treatment than *A. niger*. These findings indicate that temperature modulation and UV treatment

收稿日期: 2024-12-02

修回日期: 2025-06-18

基金项目: 国家烟草专卖局创新平台科研活动稳定支持专项(202023AWCX04); 河南省自然科学基金项目(222300420389)

作者简介: 吕颖华(2000—), 女, 河南鹤壁人, 硕士研究生, 主要从事烟草微生物学研究, 1750350855@qq.com; *通信作者, 付丽丽, 硕士, 高级工程师, 主要从事新型烟草制品开发研究, lili1101-fu@163.com

are effective measures for controlling microbial growth on slurry processed reconstituted tobacco.

Keywords: reconstituted tobacco; slurry processed; *Aspergillus niger*; *Aspergillus flavus*; biological characterization

卷烟原料富含大量糖类、有机酸和蛋白质等微生物生长繁殖所需的物质,同时具有较强的吸湿性,为微生物滋生和生长繁殖提供了适宜的环境^[1]。相关研究^[2-4]表明,真菌是引发烟草霉变的主要微生物,其中包括毛霉属(*Mucor*)、曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)和链格孢属(*Alternaria*)等。晏卫红等^[5]从烟叶仓库中鉴定出匍匐散囊菌原变种(*Eurotium repens* de Bary var. *repens*)、溜曲霉(*Aspergillus tamaritii*)、谢瓦散囊菌(*E. chevalieri*)等9种致霉真菌;吴阔等^[6]发现引起昆明烟叶库内霉变的真菌主要来自曲霉属和青霉属;刘琳琳等^[7]研究发现引起工业发酵雪茄烟叶霉变的主要微生物为烟曲霉(*A. fumigatus*)、黄曲霉(*A. flavus*)和蒙地曲霉(*A. montevideensis*)。

再造烟叶是重要的卷烟原料。相关研究^[8]表明,再造烟叶生产线上存在多种微生物。张登等^[9]对造纸法再造烟叶生产过程中各种物料(包括烟草物料、萃取液、涂布液、浆料等)微生物的分布特征进行了分析,共检测出393个细菌属和165个真菌属,其中优势菌属为乳杆菌属、芽孢杆菌属、假丝酵母属和曲霉属。王充等^[10]研究表明造纸法再造烟叶浓缩液中微生物群落的优势菌属为酿酒酵母属(*Saccharomyces*)、假丝酵母属(*Candida*)和绪方酵母属(*Ogataea*),细菌种群优势菌属为乳杆菌属(*Lactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)和气芽孢杆菌属(*Aeribacillus*)。这些功能性微生物在再造烟叶生产过程中有助于降低有机物质含量^[11],改善卷烟舒适性,提高卷烟品质^[12-13],但在再造烟叶的加工过程中一些微生物的异常增殖也会引发再造烟叶出现腐败、霉变等现象。薛长森等^[14]研究发现约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)可引起上网浆腐败。田海龙等^[15]从造纸法再造烟叶涂布液中鉴定出肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*),并确定其是引起腐败的主要致腐菌。

现有研究主要聚焦于造纸法再造烟叶加工过程中的微生物群落特征,而对稠浆法再造烟叶中的腐败菌属的研究较少。基于稠浆法再造烟叶中

发烟剂和糖料含量高、产品吸湿性强、霉变风险较高的特点,本研究采用形态学与分子生物学相结合的方法,对霉变的稠浆法再造烟叶中的微生物进行研究,以期稠浆法再造烟叶霉变的预防控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

烟叶样品:加热卷烟专用稠浆法再造烟叶正常样品和霉变样品取自国内某卷烟企业。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基;孟加拉红培养基;CYA培养基^[16];自制1%烟汁培养基(1 000 mL水、10 g稠浆法再造烟叶、20 g琼脂,后续同理);自制5%烟汁培养基;自制10%烟汁培养基;自制20%烟汁培养基。

试剂:真菌基因组DNA快速抽提试剂盒;无水乙醇;ddH₂O;香柏油;琼脂糖(生工生物工程(上海)股份有限公司);结晶紫染料; β -巯基乙醇;2 $\times$ Taq Plus Master Mix II(南京诺唯赞股份有限公司);异丙醇;溴化乙锭核酸染液(郑州翼增生物科技有限公司);Ca M5(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和Ca M6(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')通用引物。

仪器:Mini Bis Pro型凝胶成像分析系统(以色列DNR凝胶成像系统有限公司);C1000型PCR扩增仪(美国BioRad)。

1.2 方法

1.2.1 稠浆法再造烟叶霉变微生物的分离、纯化和致霉性验证

取具有典型霉变特征的稠浆法再造烟叶10 g置于灭菌后的250 mL锥形瓶中,加入90 mL无菌水和数粒灭菌后的玻璃珠,置于30 °C摇床中150 r/min振荡30 min,按10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶梯度稀释后均匀涂布于PDA平板培养基上,30 °C条件下恒温培养72 h。挑取生长状态良好且形态差异较大的菌落边缘菌丝转移至新的PDA平板上继续培养,重复纯化直至获得纯培养菌株。

将纯化得到的疑似致霉菌株分别接种于灭菌

处理后的稠浆法再造烟叶表面, 30 °C条件下恒温培养72 h, 观察菌株对稠浆法再造烟叶的致霉效果, 并从人工接种的霉变稠浆法再造烟叶样品上再次分离纯化得到霉变菌株, 将其与原菌株进行对比, 观察二者的形态特征是否一致。

1.2.2 霉菌的鉴定

菌株培养特征观察: 利用无菌接种针挑取纯化后的菌株, 点接于PDA平板中, 30 °C条件下恒温培养, 观察其生长情况、菌落颜色和形态特征, 并拍照记录。

镜检观察: 使用无菌接种针挑取少量菌落边缘的菌丝制作玻片, 利用结晶紫染料对菌丝进行均匀染色后, 置于光学显微镜下, 观察其菌丝形态和分生孢子形态。

分子生物学鉴定: 使用真菌基因组DNA快速抽提试剂盒提取分离得到的霉菌基因组DNA。参考刘琳琳等^[7]的扩增程序, 使用曲霉属Ca M5和Ca M6通用鉴定引物扩增Ca M序列。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序结果导入NCBI数据库, 选择BLAST比对同源性高的序列, 应用MEGA5软件构建系统发育树。

1.2.3 生物学特性研究

1) 培养基对致霉菌株生长的影响。选择孟加拉红培养基、PDA培养基、CYA培养基和1%、5%、10%、20%自制烟汁培养基, 使用点植法^[17]将菌株分别接种于不同培养基中央, 30 °C条件下恒温培养72 h, 采用交叉法^[18]分别测量不同处理的菌落直径, 每个处理设置3组重复, 下同。

2) 温度对致霉菌株生长的影响。使用点植法将菌株转接于PDA平板中央, 分别置于4、25、30、35、40、45、50 °C条件下恒温培养72 h, 测量菌落直径, 计算净生长量^[19]。

3) pH对致霉菌株生长的影响。以PDA培养基为基础培养基, 利用盐酸和氢氧化钠溶液将其酸碱度分别调至3、4、5、6、7、8、9和10。将菌株转接至相应平板中, 30 °C条件下恒温培养72 h, 测量菌落直径, 计算净生长量。

4) 紫外线辐照对致霉菌株孢子致死率的影响。以孟加拉红培养基为基础培养基, 挑取菌株的分生

孢子, 制备浓度为 1×10^7 cfu/mL的孢子悬浮液。取100 μ L孢子悬浮液均匀涂布于孟加拉红平板上, 将涂布后的培养皿开盖放置于灭菌后的超净工作台上, 使用20 W紫外灯分别照射0、5、10、15、20 min后, 移入恒温培养箱中, 30 °C条件下培养72 h, 记录菌落生长情况, 并计算不同照射时间下的致死率^[7]。

2 结果与分析

2.1 稠浆法再造烟叶霉变微生物的菌落形态分析和致霉性验证结果

对霉变的稠浆法再造烟叶样品上出现的霉菌进行分离纯化, 最终得到2株真菌(C1、C2)。将纯化后的菌株重新接种于PDA固体培养基中, 于30 °C恒温条件下培养72 h后, 观察菌株菌落特征及菌丝结构, 如图1所示。菌株C1菌落为圆形, 菌落整体稍厚, 中心突起, 呈灰黑色, 菌丝较长呈棉絮状; 置于100倍油镜下观察, 发现菌丝有隔膜, 分生孢子为球形、黑色。菌株C2菌落整体为圆形, 表面呈绒毛状, 中心为绿色, 边缘呈浅黄色; 置于100倍油镜下观察, 菌丝有隔膜, 孢子呈球形。

图1 菌株C1和C2菌落特征及菌丝结构

Fig.1 Colony characteristics and hyphal structure of strains C1 and C2

为验证分离出的真菌的致霉性, 分别将2株菌株接种至灭菌后的稠浆法再造烟叶表面, 其结果如图2所示。由图2可见, 菌株C1和C2在灭菌处理后的稠浆法再造烟叶表面培养3 d后, 在烟叶表面均可观察到大量致霉菌株的菌丝, 同时, 烟叶表面形成与霉变样品相似的霉层。从人工接种的霉变样品表面再次分离纯化, 得到菌株C1和C2, 且无其他杂菌, 进一步证明分离得到的2株菌株即为稠浆法再造烟叶致霉菌。

(a) C1菌株; (b) C2菌株

图2 菌株C1和C2致霉性验证结果

Fig.2 Verification of mold-producing ability of strains C1 and C2

2.2 霉变微生物的鉴定

经琼脂糖凝胶电泳检测,在500~750 bp PCR产物间观察到单一且明亮的条带。将得到的测序结果导入NCBI数据库中进行BLAST同源性比对分析,发现菌株C1与黑曲霉*Aspergillus niger*的序列相似度为99.32%,菌株C2与黄曲霉*Aspergillus flavus*的序列相似度为99.58%。利用MEGA 5软件构建系统发育树(图3和图4)。结合《真菌鉴定手册》中记

图3 菌株C1系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain C1

图4 菌株C2系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of strain C2

录的菌株形态特征和序列比对结果,可知菌株C1和C2均属于曲霉属,分别为黑曲霉(*Aspergillus niger*)和黄曲霉(*Aspergillus flavus*)。

2.3 稠浆法再造烟叶中致霉菌的生物学特性

2.3.1 不同培养基对致霉菌生长的影响

从图5和表1可以看出,霉菌C1和C2在7种培养基上均可生长。其中,霉菌C1在PDA培养基上菌落直径最大,平均值为35.53 mm,生长最快;其次是10%烟汁培养基和20%烟汁培养基;而1%和5%的烟汁培养基中菌株C1的菌落直径较小。可见烟汁浓度对霉菌生长影响显著。菌株C2在CYA培养基上菌落直径最大,平均值为32.67 mm;其次是20%烟汁培养基和PDA培养基;在1%和5%烟汁培养基中,菌株C2的菌落直径较小,生长速度较慢。菌株C1在不同培养基上的生长速度和适应性均优于C2的(CYA培养基的除外)。不同种类的霉菌在不同培养基上的适应性和生长速度存在一定差异,可根据需要选择合适的培养基。

图5 不同培养基上菌株的生长情况

Fig.5 Growth of strains on different media

表1 不同培养基上菌落的直径

培养基	菌落直径/mm	
	C1	C2
PDA培养基	(35.53±1.30)a	(26.60±0.79)c
CYA培养基	(23.97±1.39)d	(32.67±1.44)a
孟加拉红培养基	(28.50±1.26)c	(18.93±0.83)e
1%烟汁培养基	(14.07±0.53)f	(9.86±0.48)f
5%烟汁培养基	(17.00±0.57)e	(12.17±0.94)f
10%烟汁培养基	(31.97±1.19)b	(23.50±0.71)d
20%烟汁培养基	(30.10±0.70)bc	(29.97±1.88)b

注：同列不同字母表示处理间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3.2 不同温度对致霉菌生长的影响

如图6所示，菌株C1和菌株C2对温度的适应能力较强，在较大的温度范围内均能正常生长，随温度升高，2种霉菌的净生长量呈现先增加后急剧降低的趋势，且均在35℃时净生长量达到最高值，分别为43.5、33.5 mm，可见，2种霉菌适宜生长的温度为30~35℃。当温度为25~45℃时，菌株C1的生长速率大于菌株C2的；当温度为4℃或高于45℃时，2种霉菌均无法生长。因此，在低温条件下储藏稠浆法再造烟叶可以有效防止霉变。

图6 不同温度下菌株的净生长量

Fig.6 Net growth of strains at different temperatures

2.3.3 不同pH对致霉菌生长的影响

如图7所示，当pH为3~10时，2种霉菌菌株均能生长。其中菌株C1具有较好的耐碱性，当pH低于5时，霉菌C1的生长受一定程度的抑制。霉菌C2随pH增加，净生长量呈现先增加后降低的趋势，当pH低于4或高于8时，其生长也受到一定的抑制；当pH为6时，霉菌C1、C2的净生长量均达到最大，表现出

较好的耐酸性。

图7 不同pH下菌株的净生长量

Fig.7 Net growth of strains at different pH levels

2.3.4 紫外线辐照对致霉菌孢子致死率的影响

从表2可以看出，2种霉菌孢子致死率均随紫外线辐照时间的增加而增加，但同一辐照时间下，黑曲霉C1的孢子致死率均低于黄曲霉C2的；菌株C2经紫外线处理15 min后致死率可达50%以上，而菌株C1经紫外线处理20 min后孢子的致死率达50%以上。以上结果表明菌株C1孢子对紫外线的敏感性相对较弱。在稠浆法再造烟叶生产与储存过程中，可以考虑引入紫外线杀菌技术对浆料和烟叶表面进行微生物控制。

表2 紫外线辐照下2种菌株的致死率

菌株	致死率/%				
	0 min	5 min	10 min	15 min	20 min
C1	0	30.80	37.40	45.20	53.70
C2	0	35.10	40.00	52.30	68.80

3 结论与讨论

本研究中，从霉变的稠浆法再造烟叶上分离得到2株致霉微生物，经鉴定分别为黑曲霉*Aspergillus niger*和黄曲霉*Aspergillus flavus*，2株霉菌菌株对稠浆法再造烟叶均有较强的致霉性。生物学特性研究结果表明，不同培养条件对2株致霉菌生长影响较大，黑曲霉在孟加拉红培养基、PDA培养基和1%、5%、10%、20%自制烟汁培养基上的生长速度均大于黄曲霉的；当温度为25~45℃时，黑曲霉菌株的生长速率大于黄曲霉菌株的；2株致霉菌在pH为3~10时均能生长，最适生长pH均为6；紫外线处理

对2株霉菌生长有一定的抑制作用,黄曲霉对紫外线的敏感性大于黑曲霉的。

目前关于烤烟烟叶中曲霉属微生物的报道较多。吴阔等^[6]研究发现引起昆明当地烟叶霉变的真菌主要来自曲霉属和青霉属;陈乾丽等^[20]研究发现霉变重烟叶叶片、霉变轻烟叶叶片中的优势菌属均为曲霉属真菌;雷声等^[21]从成品卷烟中也发现曲霉属是主要致霉菌之一;张登等^[9]从造纸法再造烟叶生产过程物料中检测出包括曲霉属在内的优势菌属;王充等^[10]发现造纸法再造烟叶浓缩液中的曲霉属不是优势菌群。这表明不同的加工工艺、生产环境和原料来源导致再造烟叶霉变的菌株不同。

培养条件对微生物的生长代谢至关重要。张鸽等^[22]研究发现不同温度和pH条件对云南玉溪雪茄烟产区不同晾制阶段的雪茄烟叶中主要霉菌的生长有影响;朱贝贝等^[23]发现在DG18培养基上,聚多曲霉、产黄青霉生长速率最大。本研究结果表明,黑曲霉在PDA培养基上生长最快,黄曲霉在CYA培养基上生长最快,2株霉菌在1%烟汁培养基上生长较慢;2株霉菌适宜生长的温度均为30~35℃,且4℃低温及45℃以上的高温均抑制霉菌的生长;2株霉菌在pH为3~10时均能生长,最适pH均为6。上述结论说明,控制培养条件可以对稠浆法再造烟叶致霉菌的生长进行有效调控。

据报道,由致霉菌引起的霉变在烟叶原料及烟草制品中均有发生,霉变通常会影响到烟草品质,造成巨大的经济损失^[24],因此,寻找安全有效的霉变防治方法已成为近年来的研究热点^[25]。本研究采用紫外线辐照技术处理再造烟叶致霉菌孢子,结果显示紫外线光照对2株霉菌具有一定的抑制效果,同一辐照时间下,黑曲霉的孢子致死率均低于黄曲霉的,表明黄曲霉对紫外线辐照更为敏感。综上所述,在对稠浆法再造烟叶进行霉变预防控制时,结合其致霉菌株的生物学特性,综合考虑温度调控及紫外线辐照处理可实现更有效的霉变防控。

参考文献:

[1] 宋嘉宝,王明锋,罗昭标,等.海南雪茄烟叶霉变微生物鉴定及拮抗菌株筛选[J].烟草科技,2022,55(11):7-13.
[2] KORTEKAMP A, SCHMIDTKE M, SERR A. Infection and decay of tobacco caused by *Rhizopus oryzae*[J].

Journal of Plant Diseases and Protection, 2003, 110(6): 535-543.

- [3] KORTEKAMP A. Effectiveness of calcium salts, hydrogen peroxide, azoxystrobin, and antagonistic bacteria to control post-harvest rot on tobacco caused by *Rhizopus oryzae*[J]. International Journal of Pest Management, 2006, 52(2): 109-115.
[4] WELTY R E, NELSON L A. Growth of *Aspergillus repens* in flue-cured tobacco[J]. Applied Microbiology, 1971, 21(5): 854-859.
[5] 晏卫红,黄思良,朱桂宁,等.广西仓储烟叶霉变微生物的分类鉴定[J].烟草科技,2008,41(2):50-56.
[6] 吴阔,罗华元,林昆,等.基于rDNA-ITS法鉴定的霉变烟叶真菌种类[J].贵州农业科学,2014,42(6):98-100.
[7] 刘琳琳,芦柯,胡延奇,等.工业发酵雪茄烟叶霉变微生物的分离鉴定及生物学特性研究[J].中国烟草科学,2023,44(6):100-105.
[8] LIU H G, HE H L, CHENG C H, et al. Diversity analysis of the bacterial community in tobacco waste extract during reconstituted tobacco process[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(1): 469-476.
[9] 张登,杨春雪,马慧,等.再造烟叶生产过程物料微生物群落结构分析[J].烟草科技,2022,55(8):1-9.
[10] 王充,龙章德,孟丹丹,等.造纸法再造烟叶浓缩液中微生物群落结构分析及应用[J].烟草科技,2019,52(3):33-38.
[11] 刘蓓.微生物发酵降解造纸法烟草薄片有害前体物的研究[D].广州:华南理工大学,2013:50-68.
[12] 左满兴,薛磊,崔洪亮,等.增香复合微生物对造纸法再造烟叶香味成分的影响[J].安徽农业科学,2020,48(19):194-197,234.
[13] 周乐,周桂园,胡巍耀,等.利用酶与微生物降低梗膏中果胶和蛋白质的研究[J].中国烟草学报,2025,31(1):123-134.
[14] 薛长森,迟建国,高颖,等.造纸法再造薄片浆料中腐败菌的分离鉴定与抑菌研究[J].食品与生物技术学报,2015,34(10):1089-1094.
[15] 田海龙,孙伟,高颖,等.造纸法再造烟叶涂布液中腐败菌的分离鉴定与抑菌[J].食品与生物技术学报,2015,34(11):1219-1224.
[16] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].5版.北京:高等教育出版社,2018.
[17] 李跃锋,王锐亮,陈河祥,等.烟支霉变微生物的鉴定及其生物学特性分析[J].烟草科技,2017,50(6):9-15.
[18] 毕司进,宋峰惠,张燕南,等.黑核桃腐烂病菌主要生物学特性及室内药剂筛选[J].新疆农业科学,2019,56(4):714-723.

(下转第47页)