

云南不同产区醇化烟叶微生物群落特征及其与化学成分的相关性分析

刘蓉¹, 唐游¹, 吕祥敏¹, 王鹏¹, 唐杰¹, 牛国清², 马明^{1*}

1 重庆中烟工业有限责任公司技术中心, 重庆

2 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆

刘蓉, 唐游, 吕祥敏, 王鹏, 唐杰, 牛国清, 马明. 云南不同产区醇化烟叶微生物群落特征及其与化学成分的相关性分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(1): 187-212.

LIU Rong, TANG You, LÜ Xiangmin, WANG Peng, TANG Jie, NIU Guoqing, MA Ming. Characteristics of microbial communities in aged tobacco leaves from diverse production areas in Yunnan and their correlations with chemical components[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(1): 187-212.

摘要: 【目的】探究云南不同产区醇化烟叶的微生物群落特征及其与化学成分的关系, 为烟草微生物资源的定向挖掘与烟草品质改良提供理论依据和支持。【方法】综合运用宏基因组学、气相色谱/液相色谱-质谱联用技术及斯皮尔曼相关性分析等方法, 系统分析大理、文山、红河、罗平、普洱、昭通和临沧共7个云南产区醇化烟叶的微生物群落、化学成分以及两者间的相关性。【结果】在各产区醇化烟叶中, 细菌以假单胞菌门(*Pseudomonadota*)为优势菌门, 优势细菌属呈现明显的地域差异。其中, 文山产区以盐水弧菌属(*Salinivibrio*)为核心菌属, 罗平产区以甲基杆菌属(*Methylobacterium*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)为典型代表; 真菌以子囊菌门(*Ascomycota*)和毛霉门(*Mucoromycota*)为主, 优势真菌属无地域差异。临沧产区的微生物丰富度和多样性最高, 文山产区最低。KEGG注释显示, 新陈代谢通路在各产区均具有较高丰度, 环境信息处理通路则在文山产区呈现较高丰度。CAZy结果显示, 被注释的糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)和糖基转移酶(glycosyl transferases, GTs)基因数目最多, 且二者在文山产区的丰度较低。化学分析结果显示, 大理产区烟叶的还原糖、总糖等常规成分含量较高, 普洱产区的糖碱比和钾氯比均较高; 文山产区含有较高含量的苯甲醇等多种中性致香成分, 罗平产区则含有较高含量的花青素等多酚物质。相关性分析表明, 微杆菌属(*Microbacterium*)与总氮呈显著正相关, 短柄霉属(*Aureobasidium*)与总氮呈显著负相关; 白冬孢酵母属(*Leucosporidium*)与钾离子和钾氯比呈显著正相关; 盐水弧菌属(*Salinivibrio*)与多种中性致香成分呈显著正相关, 甲基杆菌属(*Methylobacterium*)和弗莱德门氏菌属(*Friedmanniomyces*)则与多数中性致香成分呈显著负相关; 甲基杆菌属

资助项目: 重庆中烟工业有限责任公司科技项目(HX20230207); 中国烟草总公司重点研发项目(110202202023)

This work was supported by the Technology Project of China Tobacco Chongqing Industrial Co., Ltd. (HX20230207) and the Key Research and Development Project of China National Tobacco Corporation (110202202023).

*Corresponding author. E-mail: gracemaming5418@163.com

Received: 2025-06-17; Accepted: 2025-08-15; Published online: 2025-09-15

(*Methylobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、弗莱德门氏菌属(*Friedmanniomyces*)和梅奇酵母属(*Metschnikowia*)与大部分多酚物质呈显著正相关。【结论】云南不同产区醇化烟叶的微生物群落及化学成分均存在显著的地域差异，且醇化烟叶中的优势菌属与香气化合物存在显著关联，这为功能微生物的定向筛选和烟叶提质生物技术开发提供了理论支撑。

关键词：云南产区；醇化烟叶；宏基因组分析；微生物多样性；化学成分；相关性分析

Characteristics of microbial communities in aged tobacco leaves from diverse production areas in Yunnan and their correlations with chemical components

LIU Rong¹, TANG You¹, LÜ Xiangmin¹, WANG Peng¹, TANG Jie¹, NIU Guoqing², MA Ming^{1*}

¹ Technical Center of China Tobacco Chongqing Industrial Co., Ltd., Chongqing, China

² College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing, China

Abstract: [Objective] This study examined the characteristics of the microbial communities and their associations with chemical components in aged tobacco leaves from different production areas in Yunnan Province, aiming to provide a theoretical foundation for the targeted exploitation of tobacco microbial resources and quality improvement of tobacco. **[Methods]** A systematic approach integrating metagenomic sequencing, GC/LC-MS, and Spearman's correlation analysis was employed to investigate the microbial communities, chemical components, and their correlations of aged tobacco leaf samples collected from Dali, Wenshan, Honghe, Luoping, Pu'er, Zhaotong, and Lincang. **[Results]** The dominant bacterial phylum was *Pseudomonadota* in aged tobacco leaf samples. The dominant bacterial genera varied among different production areas. Specifically, *Salinivibrio* was identified as the core genus in the samples from Wenshan, while *Methylobacterium* and *Sphingomonas* exhibited significant enrichment in the samples from Luoping. For fungal communities, *Ascomycota* and *Mucoromycota* were the predominant phyla, and dominant fungal genera showed negligible variations. Alpha diversity analysis revealed the highest microbial richness and diversity in the samples from Lincang and the lowest in the samples from Wenshan. KEGG analysis revealed that metabolic pathways exhibited high relative abundance across samples from all regions, whereas environmental information processing pathways were more abundant in the samples from Wenshan. CAZy analysis showed that genes annotated as glycoside hydrolases (GHs) and glycosyl transferases (GTs) were the most prevalent, with both generally exhibiting lower abundance in the samples from Wenshan. Chemical profiling revealed that reducing sugar, total sugar and other conventional components were more concentrated in the samples from Dali, whereas total sugar-to-nicotine ratio and potassium-to-chloride ratio were elevated in the samples from Pu'er. Additionally, neutral aroma compounds, including benzyl alcohol, had significantly higher levels in the samples from Wenshan, while polyphenols such as

anthocyanins exhibited markedly higher concentrations in the samples from Luoping. Correlation analysis further disclosed that *Microbacterium* had a significantly positive correlation with total nitrogen, while *Aureobasidium* showed a significantly negative correlation with total nitrogen. *Leucosporidium* exhibited significantly positive correlations with potassium ions and potassium-to-chloride ratio. *Salinivibrio* had significantly positive correlations with multiple neutral aroma components. In contrast, *Methylobacterium* and *Friedmanniomyces* showed significantly negative correlations with the majority of neutral aroma components. Additionally, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Friedmanniomyces*, and *Metschnikowia* had significantly positive correlations with multiple polyphenols. **[Conclusion]** Microbial communities and chemical components of aged tobacco leaves exhibited marked differences across different production areas in Yunnan. Notably, dominant genera are strongly correlated with aroma compounds, which lays a theoretical basis for targeted screening of functional microbes and the development of biotechnologies to improve tobacco quality.

Keywords: production areas in Yunnan; aged tobacco leaves; metagenomic sequencing; microbial diversity; chemical component; correlation analysis

烟叶醇化是烟草品质提升的关键工艺环节, 通过微生物活动、酶促反应及化学变化的协同作用, 可促进纤维素、蛋白等大分子的降解与转化, 生成香味成分, 进而改善烟叶品质^[1]。近年来, 随着宏基因组学和高通量测序技术的发展, 烟叶表面微生物群落的结构特征、功能潜力以及有益菌株筛选研究成为热点^[2-5]。黄申等^[6]通过比较3种不同香型再造烟叶的微生物群落发现其菌群结构存在显著差异, 其中清香型烟叶的细菌多样性水平最高, 且芽孢杆菌属(*Bacillus*)为优势细菌属。前期研究发现泛菌属(*Pantoea*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)共同构成了不同醇化卷烟烟叶的主要核心菌属; 鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)等在醇化过程中可降解淀粉、蛋白质和果胶等大分子物质, 促进糖类和中性致香物质等的释放, 从而对烟叶风味的形成产生重要影响^[7-8]。此外, 已有研究表明不同产地醇化烟叶微生物群落的地域性差异是产区烟叶风格特色形成的重要驱动因素^[9-11]。

在农产品和食品风味塑造中, 微生物菌群通过代谢活动参与酯类和酚类等致香前体物质

的降解或合成, 赋予产品独特的香型风格与品质属性。微生物与化学成分间的相关性研究是深入解析“微生物-化学成分”互作机制的关键切入点。例如, Li等^[12]通过相关性分析发现罗河杆菌属(*Rhodanobacter*)和出芽单胞菌属(*Gemmatimonas*)与苯丙酮、2,3-丁二酮和香叶基丙酮等风味化合物呈显著正相关, 从而揭示了这些菌属在雪茄烟叶风味形成中的潜在促进作用。刘晓敏等^[13]通过探究不同香型醇化烟叶微生物与常规化学成分的关系, 从云南玉溪清香型烟叶中筛选到具有降解烟碱能力的假单胞菌属(*Pseudomonas*), 其菌群丰度与烟叶清甜香物质积累呈显著正相关。在发酵食品方面, Gao等^[14]指出虾酱中优势的四联球菌属(*Tetragenococcus*)与多种游离氨基酸正相关, 葡萄球菌属(*Staphylococcus*)与5'-核苷酸呈正相关, 二者构成影响非挥发性风味成分的核心菌属。Yang等^[15]通过相关性分析筛选出鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和盐单胞菌属(*Halomonas*)等陈香型铁观音的核心功能微生物, 并证实这些菌属具有通过积累代谢前体促进陈香风格形成的潜力。

现有研究多聚焦于大产区或不同香型烟叶

的微生物群落组成特征，却未关注到同一香型不同产区的微生物群落与多维度化学成分在香气风格细分及品质特色塑造中的关键作用，更缺乏对“微生物-化学品质”之间的潜在关系及核心菌属的代谢贡献的系统探究。因此，本研究以云南清香型典型烤烟产区 2 年醇化期的烟叶为研究对象，利用宏基因组学、色谱-质谱联用以及斯皮尔曼相关性分析等方法系统解析不同产区醇化烟叶微生物群落构成，深入探寻其与烟叶化学品质间的内在关联，以期为特定功能菌株的挖掘及烟叶提质生物技术的开发奠定研究基础，助力特色产区烟叶品质的高质量发展。

1 材料与方法

1.1 供试醇化烟叶

烟叶醇化是指经复烤的片烟装箱后，在温度 20–30 °C、湿度 60%–70%、含水率 10%–13% 的仓库条件下，经过 1–3 年储存所发生的缓慢发酵过程。在此过程中，需定期翻垛以保持堆垛烟包醇化的质量与均一性。为探究云南同一香型下不同产区醇化烟叶的微生物群落与化学成分特征及两者的内在联系，供试样品于

2024 年 8 月采集自重庆中烟工业有限责任公司醇化仓库，均为经过 2 年自然醇化的清香型烤烟，样本涵盖 7 个典型产区、4 个不同品种，其中临沧产区采集了 2 个品种，共计 8 个样品(表 1)。每个样品均从烟箱上、中、下三部分分别采样后混匀，总质量约 1 kg，于–80 °C超低温条件下保存备用。

1.2 基因组 DNA 提取、文库构建与测序

将采集的醇化烟叶用无菌剪刀剪切为小于 0.3 cm×0.3 cm 的碎片后混匀，采用十六烷基三甲基溴化铵法(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)提取样本基因组 DNA^[16]。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳方法检测 DNA 提取质量，再用无菌蒸馏水稀释至 1 ng/μL。取 1 μg 样本基因组 DNA，用超声波破碎仪(Covaris 公司)随机打断为约 350 bp 的片段，经末端修复、加 A 尾、测序接头、纯化和 PCR 扩增等步骤进行文库构建。构建好的文库先使用 AAT1 检测文库片段的完整性及插入片段大小，符合预期后，再采用 qPCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度>3 nmol/L)。库检合格后，依据有效浓度和

表1 云南不同产区醇化烟叶样品概况

Table 1 Overview of aged tobacco leaves from different production areas in Yunnan

产地 Production areas	Year	Variety	Grade	Warehouse
大理 Dali	2022	‘Honghuadajinyuan’	C2F	Core raw material
文山 Wenshan	2022	‘Yunyan 116’	C2F+C3F	Core raw material
红河 Honghe	2022	‘K326’	C2F+C3F	Tobacco leaf No. 4
罗平 Luoping	2022	‘K326’	C3F	Core raw material
普洱 Pu’er	2022	‘Yunyan 116’	C3F	Core raw material
昭通 Zhaotong	2022	‘K326’	C2F	Core raw material
临沧 K Lincang K	2022	‘K326’	C3F	Core raw material
临沧 Y Lincang Y	2022	‘Yunyan 87’	C3F	Core raw material

C2F: 中部橘黄二级; C3F: 中部橘黄三级。二者仅在色度、长度和残伤允许度上存在细微差异; 仓库均遵循统一标准, 对醇化过程中的工艺环节实施规范化管理。

C2F: Central orange grade 2; C3F: Central orange grade 3. The two grades differ only in minor aspects with respect to color intensity, length, and damage tolerance; All warehouses adhere to a unified standard and conduct standardized management of the process steps involved in the aging process.

目标下机数据量的需求对不同文库进行 pooling 操作, 再使用 Illumina NovaSeq 6000 平台上机测序, 以上实验委托北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.3 测序数据质量控制

利用 fastp (<https://github.com/OpenGene/fastp>) 和 Bowtie 2 软件对 NovaSeq 测序平台产生的原始数据(raw data)进行预处理, 获得用于后续分析的有效数据(clean data)。通过 MEGAHIT 软件对 clean data 进行组装并从 N 连接处打断, 得到不含 N 的 scaffigs。随后经 MetaGeneMark (<http://topaz.gatech.edu/GeneMark>)的 ORF 预测过滤掉 100 nt 以下信息, 并利用 CD-HIT 软件去冗余后得到非冗余的初始 gene catalogue。使用 Bowtie 2 将各样品的 clean data 比对初始 gene catalogue, 统计基因在各样品中比对上的 reads 数目, 过滤掉 reads 数目 ≤ 2 的基因, 最终得到 unigenes。

1.4 测序数据处理与分析

采用 Diamond 软件将 unigenes 与 NCBI 非冗余蛋白质数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中抽提出的 Micro_NR 进行同源对比, 并结合 LCA 算法和 Krona 分析完成群落中物种注释、物种相对丰度量化以及基于丰度差异的样本聚类热图分析。基于物种注释 Absolute 表, 计算有效数据覆盖率(goods coverage)指数反映样本文库覆盖率; 计算 Shannon 指数、Simpson 指数分析样本中微生物群落多样性; 计算 Chao1 指数、ACE 指数分析样本中微生物丰富度。使用 Diamond 软件将 unigenes 与功能数据库(KEGG、eggNOG 和 CAZy)进行比对用于基因功能预测及其相对丰度分析。利用联川生物平台(<http://www.omicstudio.cn>)中云工具的斯皮尔曼(Spearman)相关性算法研究微生物与化学成分的相关性。

1.5 醇化烟叶的常规化学成分检测

将醇化烟叶在 25 °C 恒温平衡 12 h 后打成烟末, 用于测定烟叶常规化学成分。其测定采

用以下标准方法: YC/T 159—2019 《烟草及烟草制品 水溶性糖的测定 连续流动法》、YC/T 468—2021 《烟草及烟草制品 总植物碱的测定 连续流动(硫氰酸钾法)》、YC/T 162—2011 《烟草及烟草制品 氯的测定 连续流动法》、YC/T 217—2007 《烟草及烟草制品 钾的测定 连续流动法》、YC/T 161—2002 《烟草及烟草制品 总氮的测定 连续流动法》、YC/T 31—1996 《烟草及烟草制品试样的制备和水分测定 烘箱法》^[17-22]。

1.6 醇化烟叶的中性致香成分和多酚成分检测

将醇化烟叶在 25 °C 恒温平衡 12 h 后打成烟末备用。参照现有方法进行中性致香成分的样品前处理及气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)检测^[23]。称取约 2 g (精确至 0.01 g)烟末样品置于 50 mL 具盖离心管中, 加入 10 mL 水, 振荡直至样品充分浸润后静置 10 min。随后移取 10 mL 乙腈和 0.2 mL 乙酸苯乙酯(上海希格玛高技术有限公司)内标工作液至该离心管, 2 000 r/min 振荡 1 min, 冷冻 10 min。加入高色素样品萃取试剂包(河南嵩检标物科技有限公司)后, 立即 2 000 r/min 振荡 2 min 防止无水硫酸镁结块, 再以 4 000 r/min 离心 10 min。移取 1 mL 上清液于 1.5 mL 离心管, 加入香味成分净化包(河南嵩检标物科技有限公司), 2 000 r/min 振荡 2 min 后, 6 000 r/min 离心 2 min, 收集上清液待测。GC-MS 检测条件: 使用气相色谱-质谱仪(Agilent 公司), 色谱柱为 DB-5MS (60 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) 毛细管色谱柱, 载气为氦气, 流速 1.0 mL/min (恒流); 进样量为 1.0 μ L, 分流比为 10:1, 进样口温度为 250 °C。升温程序: 初始温度 50 °C 保持 2 min, 以 8 °C/min 升至 280 °C 并保持 25 min; 传输线温度为 280 °C, 离子源温度为 230 °C, 四极杆温度为 150 °C; EI 电离能量 70 eV; 溶剂延迟时间 5.7 min; 全扫描质量数范围为 33–400 amu。全扫描后定性分析采用 NIST 标准

谱库, 定量分析采用选择离子检测模式(selected ion monitoring, SIM)。

醇化烟叶中多酚成分的样品前处理及高效液相色谱-质谱联用仪(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)检测方法如下: 称取 0.5 g 烟末样品, 加入 20 mL 50% 甲醇-水溶液和 200 μ L 内标溶液(上海安谱实验科技股份有限公司), 以 1 500 r/min 涡旋萃取 30 min, 过 0.22 μ m 滤膜后待测^[24]。HPLC-MS 检测条件: 使用超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪(Agilent 公司), 色谱柱为 ZORBAX SB-C18 RRHD (2.1 mm \times 150 mm, 1.8 μ m); 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的乙腈, 流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液; 进样量 2 μ L, 流速 0.2 mL/min, 柱温: 30 $^{\circ}$ C。梯度洗脱流程: 0–1 min, 8% A; 1–15 min, 8%–45% A; 15–18 min, 45%–92% A; 18–19 min, 92%–8% A; 19–22 min, 8% A。质谱工作条件: 离子源为电喷雾离子源 Jet Stream ESI; 干燥气温度 325 $^{\circ}$ C, 流量 6 L/min; 雾化器压力 35 psi; 鞘气温度 300 $^{\circ}$ C, 流量 10 L/min; 毛细管电压 3 500 V; 四级杆温度 100 $^{\circ}$ C; 扫描方式为动态多反应监视(dynamic multiple reaction monitoring, dynamic MRM)。

2 结果与分析

2.1 不同产区醇化烟叶的微生物群落结构分析

2.1.1 不同产区醇化烟叶微生物群落组成及相对丰度分析

基于醇化烟叶的宏基因组学数据, 对界、门及属水平的微生物组成与相对丰度进行了分析。结果显示, 在界水平, 醇化烟叶中的微生物包括细菌(bacteria)、真菌(fungi)、古菌(archaea)、病毒(viruses)和其他类群(others)。各产区样品中, 细菌均为绝对优势菌群, 其相对丰度范围为 31.80%–59.28%; 真菌次之, 相对丰度在 0.71%–5.86% 之间(图 1A)。在门水平

和属水平, 细菌和真菌群落结构呈现出不同的特征。在细菌方面, 优势菌门构成基本一致, 主要包括假单胞菌门(*Pseudomonadota*, 相对丰度为 69.69%–89.22%)、放线菌门(*Actinomycetota*, 1.14%–6.79%)、拟杆菌门(*Bacteroidota*, 0.11%–2.99%)和芽孢杆菌门(*Bacillota*, 0.46%–2.99%) (图 1B)。优势细菌属的组成呈现明显的产区差异: 在大理、红河、普洱、昭通和临沧产区的 6 个样品中假单胞菌属(*Pseudomonas*, 12.19%–25.23%)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 7.29%–14.52%)均为核心菌属, 而第三优势菌属则有所不同, 大理、红河、普洱和昭通产区以泛菌属(*Pantoea*, 5.00%–11.46%)为主, 临沧产区的‘K326’和‘云烟 87’品种分别为不动杆菌属(*Acinetobacter*, 6.84%)和甲基杆菌属(*Methylobacterium*, 6.60%) (图 1C); 文山产区的特征菌属为盐水弧菌属(*Salinivibrio*, 12.60%)和不动杆菌属(*Acinetobacter*, 2.70%); 罗平产区则以鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 25.82%)和甲基杆菌属(*Methylobacterium*, 26.50%)为优势菌属。与细菌属水平的产区差异不同, 真菌在门及属水平上均表现出较高的相似性。在门水平上, 子囊菌门(*Ascomycota*, 相对丰度 21.50%–46.40%)为绝对优势类群, 其次是毛霉门(*Mucoromycota*, 5.50%–21.90%)和担子菌门(*Basidiomycota*, 6.20%–17.00%) (图 1D)。在属水平上, 弗莱德门氏菌属(*Friedmanniomyces*, 4.18%–28.92%)、根霉属(*Rhizopus*, 3.51%–18.27%)、硬皮地星属(*Astraeus*, 5.39%–10.81%)和短柄霉属(*Aureobasidium*, 2.66%–7.60%)为各产区共有的优势菌属(图 1E)。上述结果表明, 不同产区细菌属水平的群落结构地域差异显著, 这种细菌群落结构的地域特异性或可作为产区识别的微生物标志物, 为云南烟叶产区的精准筛选提供科学依据。

云南产区 8 个样本中, 属水平排名前 35 的物种相对丰度差异及其聚类情况如图 2 所示。

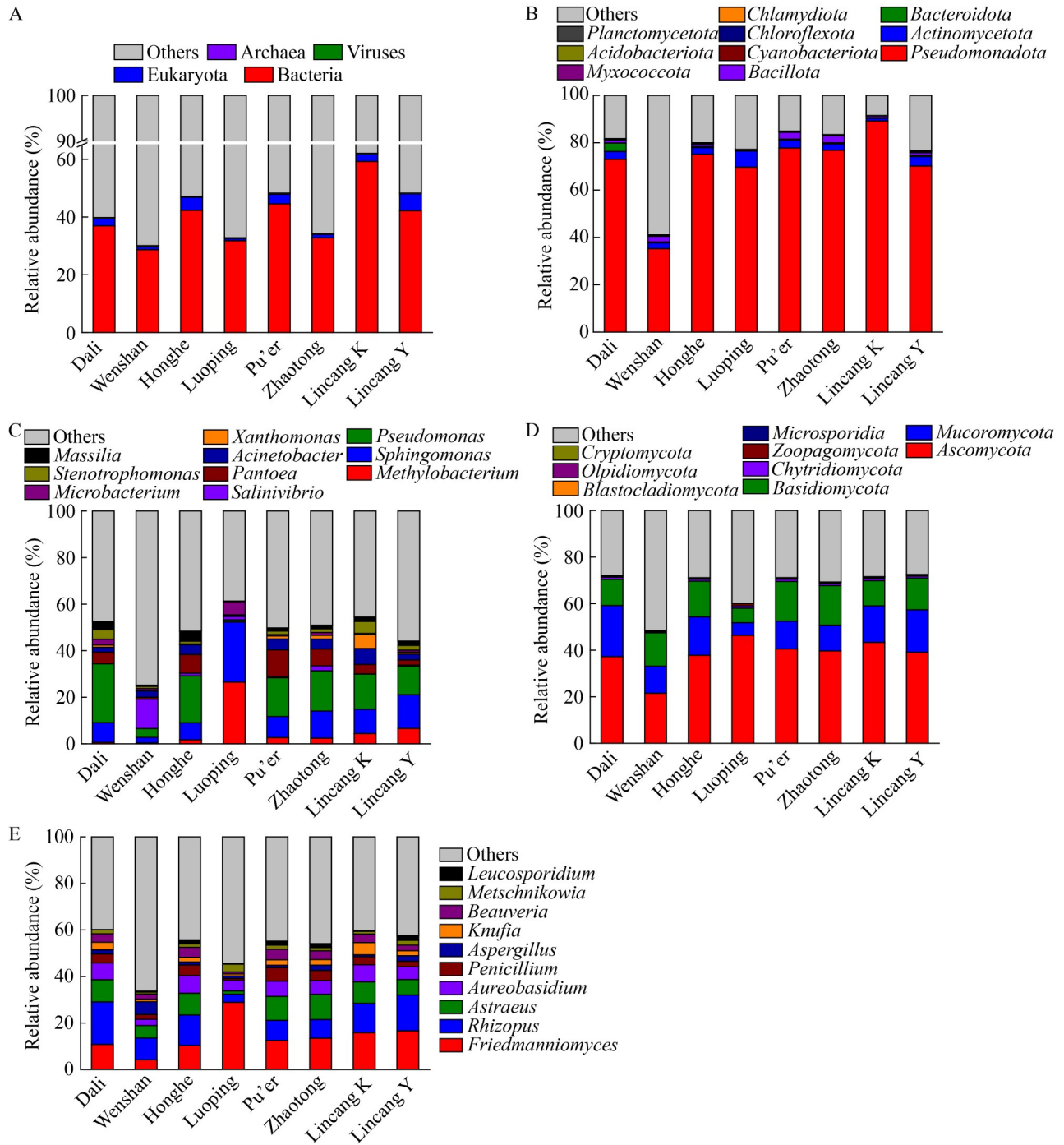
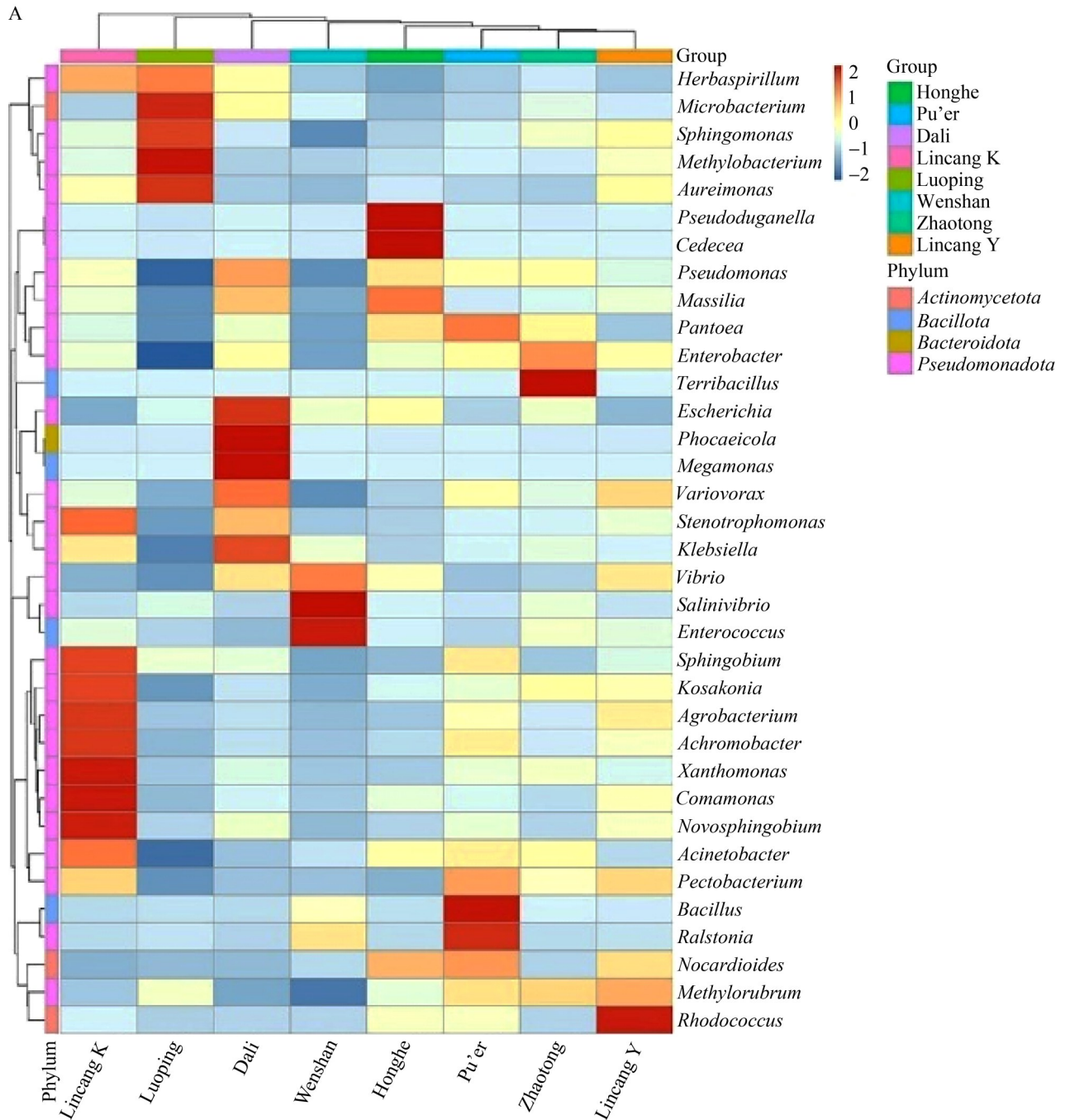


图1 云南不同产区醇化烟叶微生物群落的界、门及属水平分布特征。A: 界水平; B、C: 细菌的门和属水平; D、E: 真菌的门和属水平。门和属水平相对丰度前10个类群着色, 其余统一为others。

Figure 1 Distribution characteristics of microbial communities at domain, phylum, and genus levels in aged tobacco leaves from different production areas in Yunnan. A: Domain level; B and C: Bacterial phylum and genus levels, respectively; D and E: Fungal phylum and genus levels, respectively. The top 10 taxa in relative abundance at phylum and genus levels were color-coded, with the remaining taxa grouped as others.

整体而言，细菌群落在产区间间的相似性远低于真菌群落，且临沧产区 2 个样本的聚类分支距离较远。在细菌菌群聚类结构中，普洱、昭通和临沧 Y 样本形成紧密的聚类分支，其余产区样本则分布于较远的聚类分支，呈现出明显的地域差异性特征。物种丰度分布显示：黄单胞

菌属(*Xanthomonas*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)和新鞘氨醇菌属(*Novosphingobium*)在临沧 K 样本中呈现较高分布；微杆菌属(*Microbacterium*)和甲基杆菌属(*Methylobacterium*)在罗平样本中呈现高丰度聚集；埃希氏菌属(*Escherichia*)、居海事城球杆菌属(*Phocaeicola*)和巨单胞菌属



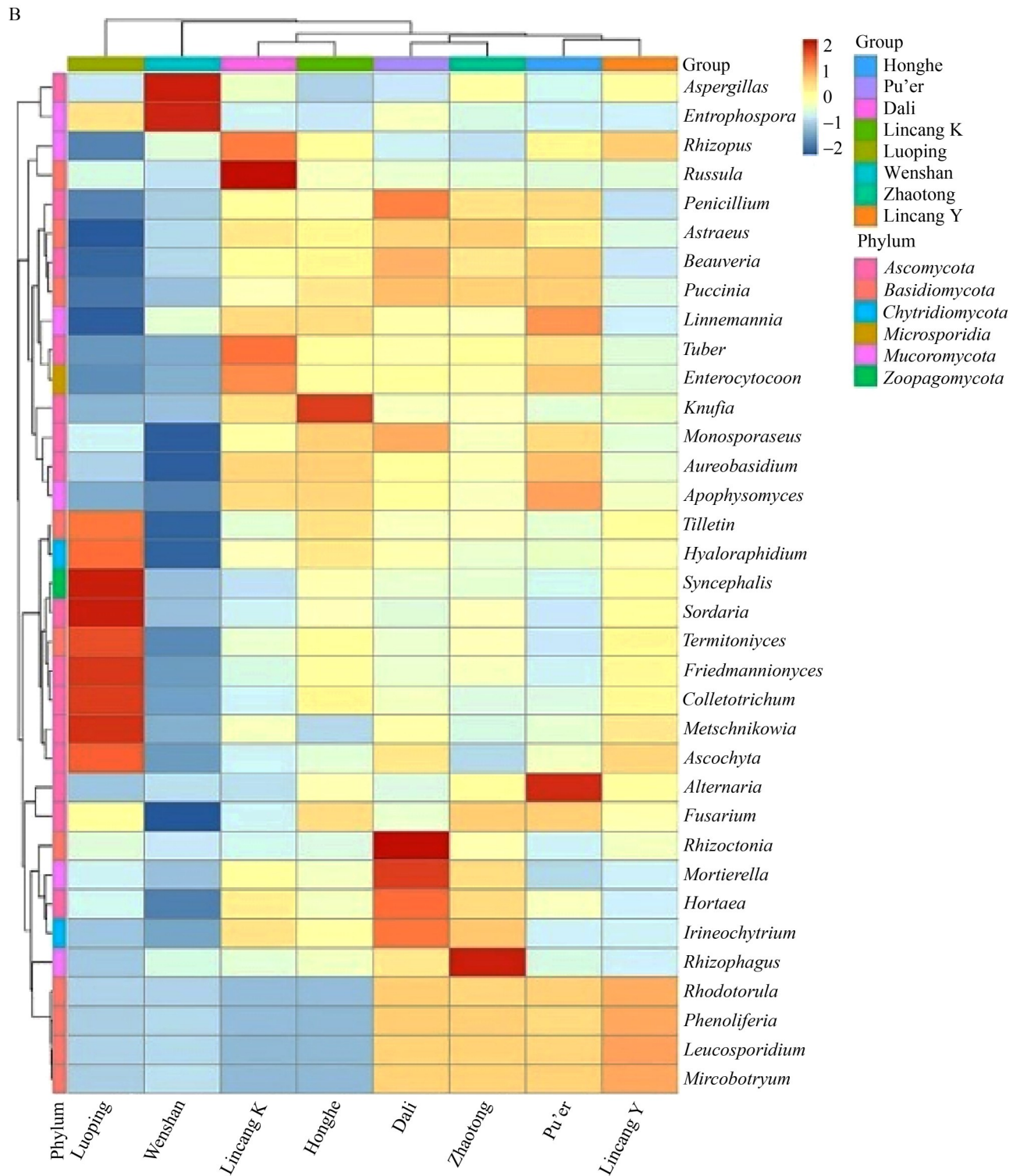


图2 细菌(A)和真菌(B)在属水平排名前35的物种相对丰度聚类热图

Figure 2 Clustered heatmap illustrating the relative abundances of the top 35 species at genus level for bacterial communities (A) and fungal communities (B), respectively.

(*Megamonas*)在大理样本中丰度较高；盐水弧菌属(*Salinivibrio*)和肠球菌属(*Enterococcus*)、假杜榭氏菌属(*Pseudoduganella*)和西地西菌属(*Cedecea*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)、土地芽孢杆菌属(*Terribacillus*)以及红球菌属(*Rhodococcus*)分别在文山、红河、普洱、昭通和临沧 Y 样本中呈现较高丰度。

对于真菌群落聚类而言，罗平和文山产区样本在聚类树中形成了距离较远的独立分支，其余产区样本则聚集于相近分支，反映出共有菌属的广泛分布及较高的群落组成相似性。然而，真菌核心菌属的丰度热图仍呈现出较明显的地域差异：罗平产区中合头霉属(*Syncephalis*)、粪壳菌属(*Sordaria*)、弗莱德门氏菌属(*Friedmanniomyces*)和梅奇酵母属(*Metschnikowia*)等丰度较高；曲霉属(*Aspergillus*)和内养孢囊菌属(*Entrophospora*)在文山产区呈现较高丰度；红菇属(*Russula*)、*Knufia*、青霉属(*Penicillium*)、根囊菌属(*Rhizophagus*)、链格孢属(*Alternaria*)和白冬孢酵母属(*Leucosporidium*)则分别在临沧 K、红河、大理、昭通、普洱和临沧 Y 样本中呈现高富集特征，与聚类分析结

果相呼应。

2.1.2 不同产区醇化烟叶微生物群落结构多样性分析

为明确不同产区醇化烟叶微生物群落的组成差异，采用花瓣图对细菌和真菌在属水平的物种组成进行了分析(图 3)。结果显示：在细菌方面共有属鉴定出 301 个，特有属以临沧 K 最为丰富，文山产区最低，其余样本按特有属数量递减依次为普洱、临沧 Y、红河、大理、昭通和罗平。真菌群落则以共有属为主，各产区醇化烟叶中共有真菌属高达 386 个，仅有临沧 K、普洱和红河 3 个样本存在少量特有真菌属，分别为 4、2、2 个。

基于 α 多样性指数对不同产区醇化烟叶微生物群落生态特征的解析结果显示(表 2)：各产区样品的测序覆盖度指数均达到 0.999 00 以上，表明该测序数据完整度高，能够真实反映微生物群落结构。此外，临沧 K 样本的丰富度指数(ACE 和 Chao1)与多样性指数(Shannon 和 Simpson)均为最高，表明该产区 K326 醇化烟叶的物种丰富度及多样性较高；文山产区样品各项指数均最低，说明其微生物群落结构相对单

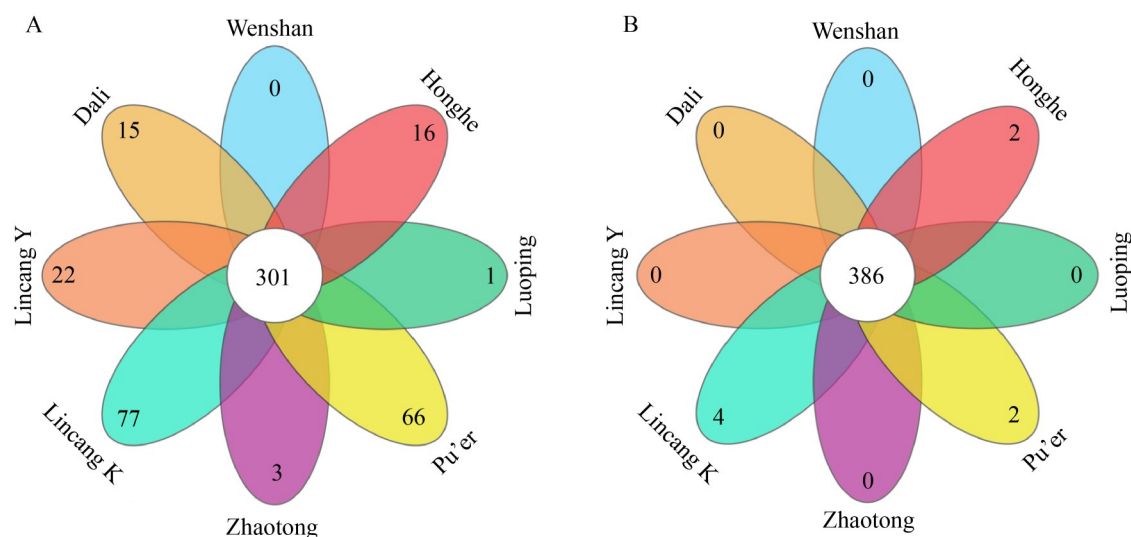


图3 不同产区醇化烟叶细菌(A)与真菌(B)属水平的物种花瓣图

Figure 3 Petal plot of bacterial (A) and fungal (B) genus-level community composition in aged tobacco leaves from different production areas.

表2 不同产区醇化烟叶微生物群落的 α 多样性指数

Table 2 Alpha diversity indexes of microbial communities in aged tobacco leaves from different production areas

Tobacco-growing areas	ACE index	Chao1 index	Shannon index	Simpson index	Goods coverage
Dali	7 178.787	7 272.460	6.11	0.93	0.999 91
Wenshan	4 060.777	4 091.862	5.54	0.92	0.999 94
Honghe	7 235.869	7 218.730	6.80	0.95	0.999 96
Luoping	4 086.294	4 133.105	5.51	0.91	0.999 96
Pu'er	9 029.868	9 109.404	7.03	0.95	0.999 92
Zhaotong	5 976.650	6 043.017	5.69	0.91	0.999 92
Lincang K	9 793.575	9 850.774	7.79	0.97	0.999 94
Lincang Y	8 803.751	8 899.127	6.91	0.95	0.999 92

一。进一步比较分析发现,各产区醇化烟叶微生物的丰富度和多样性指数呈现一致的递减趋势,依次为临沧 K、普洱、临沧 Y、红河、大理、昭通、罗平和文山,这表明微生物丰富度较高的产区其物种分布均匀性更佳。临沧产区特有的菌属优势与其显著的多样性特征相互印证,揭示了地理环境和烟叶品种对醇化烟叶微生物的双重塑造作用。

2.2 不同产区醇化烟叶的宏基因组功能注释

基于微生物群落结构解析结果,综合运用 KEGG (<https://www.genome.jp/kegg>)、eggNOG (<http://eggnogdb.embl.de>)及 CAZy (<https://www.cazy.org>)三大功能数据库开展功能注释及相对丰度分析,系统探寻不同产区醇化烟叶微生物群落的代谢功能潜力。

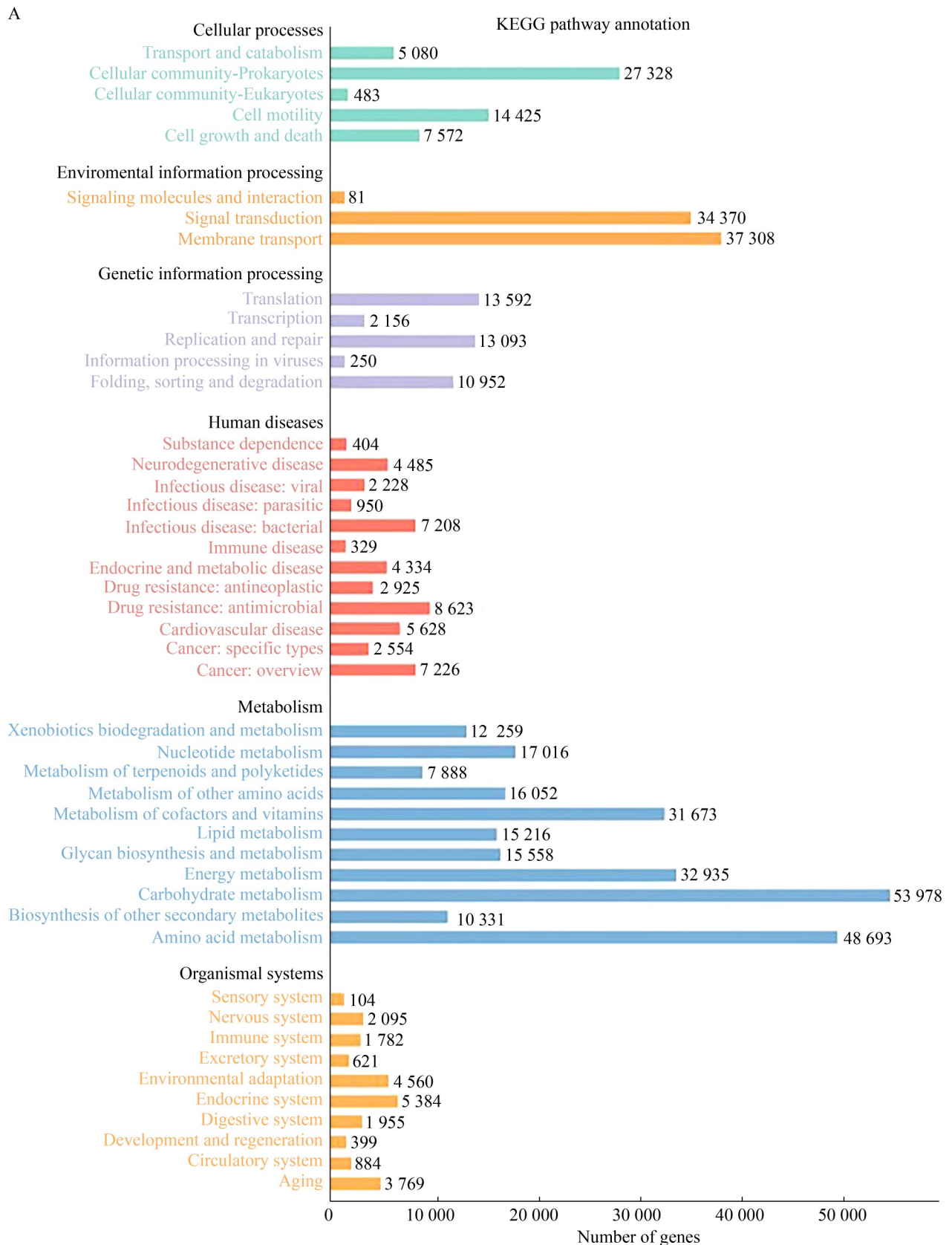
2.2.1 基于 KEGG 数据库的功能注释及相对丰度分析

基于 Diamoda 软件,将 496 735 条 unigenes 序列与 KEGG 数据库进行比对注释,对微生物群落的功能进行预测^[25-28]。KEGG 结果显示(图 4A),醇化烟叶的微生物群落中注释得到的总功能基因包含 6 个一级通路,分别为:细胞过程 (cellular processes)、环境信息处理 (environmental information processing)、遗传信息处理 (genetic information processing)、人类疾病

(human diseases)、新陈代谢 (metabolism) 和生物体系统 (organismal systems)。在已注释的总基因中,新陈代谢通路基因和环境信息处理通路基因占比合计超过 50%。在新陈代谢通路中,碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolism) 基因数量为 53 978 个,氨基酸代谢 (amino acid metabolism) 基因数量为 48 693 个,表明微生物群落中二者的功能基因储备更为丰富,无疑为烟叶醇化阶段风味物质的形成创造了有利条件。对于环境信息处理通路,膜转运 (membrane transport) 基因有 37 308 个,信号转导 (signal transduction) 基因 34 370 个,二者的高丰度富集在保障烟叶醇化中风味前体高效转化、调控菌群协同以促进风味物质定向积累,以及感知烟叶基质及仓储环境变化、调整代谢策略维持活性等方面具有巨大潜能。不同产区一级通路相对丰度分析结果显示(图 4B),新陈代谢和环境信息处理两大通路在所有样品中均有较高的相对丰度。其中,文山产区以环境信息处理通路为主,相对丰度高达 32%;其他产区样品则以新陈代谢通路为主导,其相对丰度介于 17%-19% 之间。

2.2.2 基于 eggNOG 数据库的功能注释及相对丰度分析

通过 eggNOG 数据库的功能注释分析共鉴定出 1 215 318 个基因(图 5A)。经过筛选去除未知功能(S 单元)后,成功定位到 23 个一级功能单元。



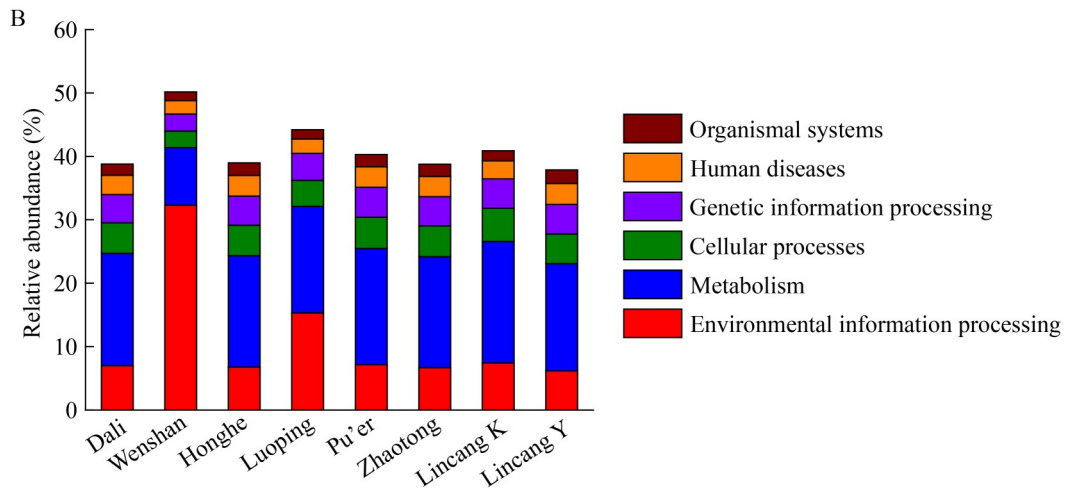


图4 不同产区醇化烟叶的KEGG数据库注释功能基因数目(A)及其相对丰度分析(B)

Figure 4 Characterization of KEGG-annotated genes (A) and functional annotation relative abundances (B) in microbial communities of aged tobacco leaves across diverse production areas.

其中, 注释功能基因数量居前6的功能单元依次为: 氨基酸转运和代谢(E单元)、无机离子转运和代谢(P单元)、细胞壁/膜/包膜生物发生(M单元)、碳水化合物转运和代谢(G单元)、转录(K单元)以及信号转导机制(T单元)。eggNOG一级功能单元相对丰度前10的分析结果显示(图5B), 除功能未知的S单元外, 其余9个功能单元在各样本间的相对丰度较为接近, 且氨基酸转运和代谢功能单元的相对丰度在各样本中始终最高。

2.2.3 基于CAZy数据库的功能注释及相对丰度分析

凭借CAZy数据库功能注释, 各产区醇化烟叶中共鉴定出85713个碳水化合物活性酶(CAZyme)编码基因, 分属6个一级功能分类(图6A), 分别是糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)、糖基转移酶(glycosyl transferases, GTs)、碳水化合物结合模块(carbohydrate binding modules, CBMs)、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CEs)、辅助氧化还原酶(auxiliary activities, AAs)和多糖裂解酶(polysaccharide lyases, PLs)。其中, GHs和GTs两大家族被注释到的基因数量最多, 分别占

已注释基因总数的41.61%和39.42%, 累计占比高达81.03%。GHs家族能够水解糖苷键, 促使单糖或寡糖生成, 在寡糖、芳香基糖苷的合成以及氨基酸和多样的糖基化进程中承担关键作用; GTs则主要负责催化糖分子与其他生物分子的共价连接, 因而高丰度的GHs和GTs可为醇化过程中风味物质合成提供关键前体。功能相对丰度分析结果显示(图6B), 所有产区样品中GHs和GTs是碳水化合物活性酶的主要组成。除文山产区的碳水化合物活性酶相对丰度偏低外, 其余产区样品的一级功能单元相对丰度则呈现出较高的一致性。

2.3 不同产区醇化烟叶的化学成分分析

2.3.1 不同产区醇化烟叶的常规化学物质分析

醇化烟叶的常规化学成分及其比值是决定烟叶品质的重要因素, 直接影响卷烟的感官品质、香气特征与燃烧性能。基于此, 对不同产区醇化烟叶的常规化学成分进行了测定, 结果如图7所示。不同产区烟叶的常规化学成分呈现显著差异, 大理产区的氯离子(chloride ion, Cl⁻)、还原糖(reducing sugar, RS)、总糖(total sugar, TS)

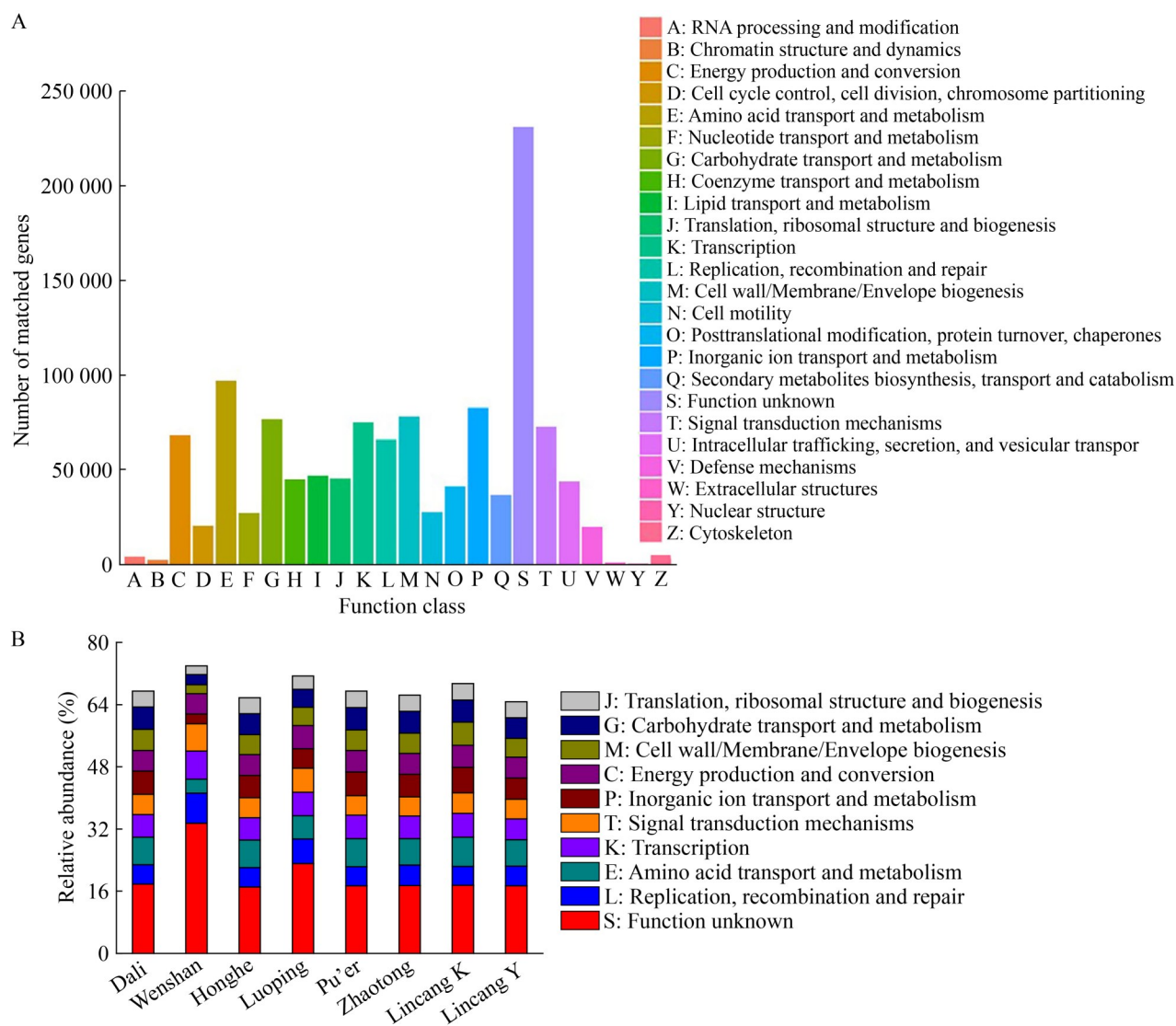


图5 不同产区醇化烟叶的eggNOG数据库注释功能基因数目(A)及其相对丰度分析(B)

Figure 5 Characterization of eggNOG-annotated genes (A) and functional annotation relative abundance of microbial communities (B) in aged tobacco leaves from different production areas.

及氯碱比(chloride ion/nicotine, Cl^-/NIC)含量显著高于其他产区, 而钾离子(potassium ion, K^+)和钾氯比(potassium ion/chloride ion, K^+/Cl^-)含量最低; 红河产区的烟碱(nicotine, NIC)含量明显高于其他产区; 临沧 Y 样品的钾离子(potassium ion, K^+)含量最高, 与其他产区存在显著差异; 罗平和昭通产区的总氮(total nitrogen, TN)含量比其他产区高, 但两者间无显著差异; 普洱产区

的糖碱比(total sugar/nicotine, TS/NIC)和钾氯比(potassium ion/chloride ion, K^+/Cl^-)显著高于其他产区, 氯离子含量则在所有产区中最低。

2.3.2 不同产区醇化烟叶的中性致香物质分析

中性致香物质是烟草品质的核心要素, 其种类、含量及相互作用直接决定了烟草的香气风格。为多维度解析云南不同产区醇化烟叶的

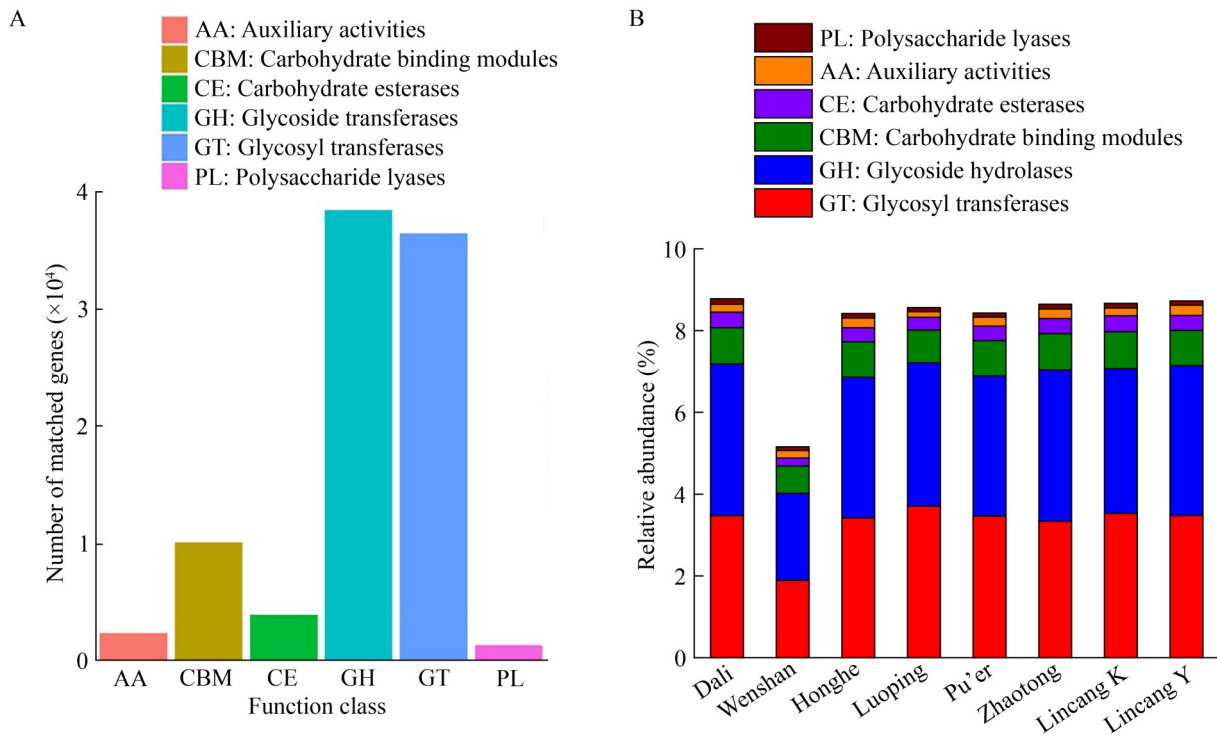


图6 不同产区醇化烟叶的CAZy数据库注释功能基因数目(A)及其相对丰度分析(B)

Figure 6 Characterization of CAZy-annotated genes (A) and functional annotation relative abundance of microbial communities (B) in aged tobacco leaves from different production areas.

品质特征，对醇化烟叶中的 21 种中性致香成分进行了定量分析。结果显示(表 3)：文山产区的苯甲醇、苯乙醇、 β -大马酮、巨豆三烯酮和金合欢基丙酮等花香型成分含量显著高于其他产区；大理产区的糠醛、二氢猕猴桃内酯和新植二烯等烘烤香成分含量明显高于其他产区；昭通产区高含量的香叶基丙酮和 β -紫罗兰酮等脂香成分与其他产区存在显著差异；红河产区的氧化异佛尔酮、茄酮和苯甲酸苯甲酯含量最高，与其他产区差异性显著；普洱产区的十六酸甲酯含量显著高于其他产区；临沧产区整体中性致香成分含量较其他产区偏低。这种不同产区中性致香物质差异性分布特征表明产区种植环境可能在烟叶香气风格形成过程中发挥了重要作用。

2.3.3 不同产区醇化烟叶的多酚物质分析

多酚类物质是烟草中重要的次生代谢产物，

它们不仅影响烟草的香气和风味，还与烟草的燃烧特性与加工性能密切相关。为从多维度解析不同产区烟叶的品质特征，对醇化烟叶中的多酚类物质进行了定量分析。结果显示(表 4)：绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸及芸香苷 4 种核心成分含量之和占多酚类物质总量的 74.7%–88.4%。大理产区的绿原酸含量最高；红河产区的七叶亭含量高于其他产区；罗平产区的 3-O-阿魏酰奎宁酸、花青素、山柰酚-3-O-芸香糖苷、阿魏酸和二氢槲皮素含量显著高于其他产区；普洱产区的奎宁酸、咖啡酸和水仙苷含量明显更高；临沧 K 的槲皮素含量显著高于其他产区；临沧 Y 的东茛菪苷、异槲皮素苷和茛菪亭含量显著高于其他产区。在不同产区的醇化烟叶中，稳定且占比高的核心多酚组分构成了云南清甜香型烟叶的物质基础，差异化分布的非核心多酚则形成了各产区独特的化学指纹图谱。

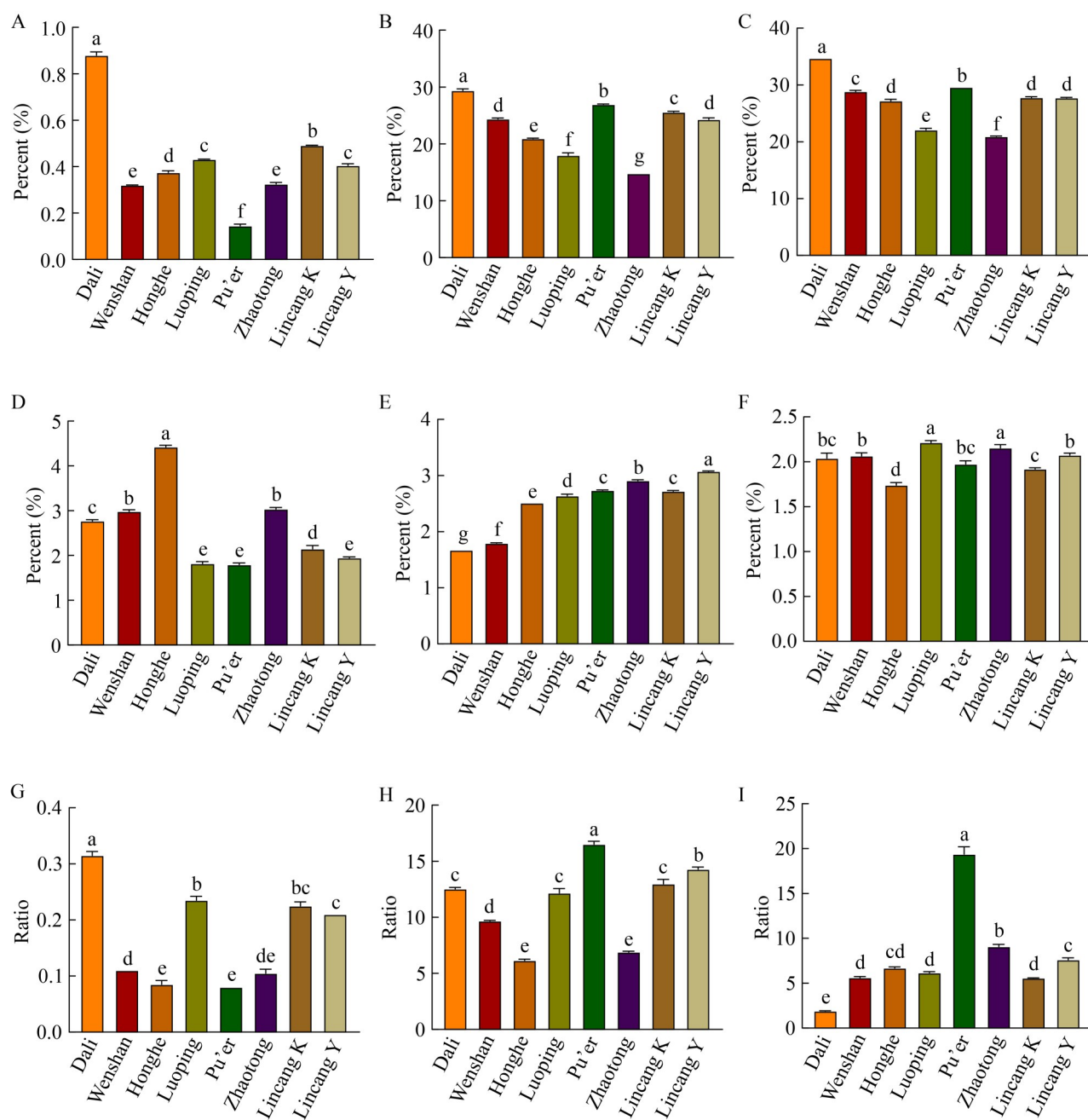


图7 不同产区醇化烟叶的常规化学成分分析。A: 氯离子; B: 还原糖; C: 总糖; D: 烟碱; E: 钾离子; F: 总氮; G: 氯碱比; H: 糖碱比; I: 钾氯比。不同小写字母表示不同产区间同一常规化学成分的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

Figure 7 Analysis of conventional chemical components in aged tobacco leaves from different production areas. A: Chloride ion; B: Reducing sugar; C: Total sugar; D: Nicotine; E: Potassium ion; F: Total nitrogen; G: Chloride ion/nicotine; H: Total sugar/nicotine; I: Potassium ion/chloride ion. Different lowercase letters indicate that there are statistically significant differences in the same conventional chemical component among different producing areas ($P < 0.05$).

表3 不同产区醇化烟叶中21种中性致香成分含量的测定结果

Table 3 Concentrations of 21 neutral aroma components in aged tobacco leaves from different production areas

化学物质名称 Compound names	Dali	Wenshan	Honghe	Luoping	Pu'er	Zhaotong	Lincang K	Lincang Y
糠醛 Furfural	102.52±0.15a	47.47±0.43c	73.79±0.86b	15.76±0.10f	17.27±0.09e	23.17±0.12d	8.54±0.12h	11.86±0.09g
糠醇 Furfuryl alcohol	16.58±0.03b	24.02±0.24a	15.74±0.36c	5.99±0.11e	5.37±0.08e	13.67±0.21d	2.35±0.03f	2.08±0.03f
苯甲醇 Benzyl alcohol	1.01±0.17h	26.69±0.12a	1.58±0.21g	5.57±0.15d	7.62±0.17c	14.00±0.20b	4.33±0.15e	3.33±0.21f
苯乙醛 Phenylacetaldehyde	4.78±0.29e	12.75±0.39b	11.22±1.07c	9.00±0.28d	4.55±0.37e	15.58±0.34a	3.45±0.39e	4.21±0.41e
芳樟醇 Linalool	2.59±0.08e	7.56±0.21b	2.55±0.20e	9.16±0.24a	8.76±0.10a	6.02±0.08d	7.62±0.14b	6.72±0.25c
氧化异佛尔酮 Isophorone oxide	0.65±0.02a	0.46±0.02b	0.69±0.03a	0.32±0.03c	0.21±0.02d	0.21±0.03d	0.22±0.01d	0.25±0.03cd
苯乙醇 Phenethyl alcohol	4.72±0.48cd	14.06±0.44a	5.58±0.20c	3.91±0.40cd	4.58±0.37d	12.39±0.47b	3.13±0.25de	2.40±0.31e
异佛尔酮 Isophorone	8.65±0.83f	63.42±0.82a	11.80±0.74e	63.49±0.80a	53.59±0.79b	34.40±0.83d	45.77±0.75c	55.04±0.77b
茄酮 Solanonesone	1 598.82±68.21b	1 630.89±106.47b	2 001.41±125.75a	468.80±95.18d	792.70±89.63c	1 807.66±118.53ab	427.12±72.35d	406.42±80.71d
β-大马酮 β-amascenone	1.01±0.00c	2.56±0.03a	0.80±0.04d	0.82±0.02d	1.07±0.02c	2.14±0.03b	0.79±0.01d	0.59±0.09e
α-大马酮 α-damascenone	0.81±0.01cd	2.20±0.02a	0.89±0.03b	0.94±0.02b	0.83±0.02c	2.16±0.02a	0.77±0.01d	0.70±0.01h
香叶基丙酮 Geranyl acetone	4.45±0.23b	4.15±0.38bc	4.46±0.41b	3.19±0.037c	2.33±0.34c	8.03±0.39a	3.16±0.29c	2.59±0.32c
β-紫罗兰酮 β-ionone	0.72±0.05d	1.00±0.05b	0.74±0.02d	0.90±0.04bc	0.86±0.03c	1.31±0.05a	0.60±0.03e	0.66±0.03de
二氢猕猴桃内酯 Dihydroactinidiolide	3.45±0.05a	2.92±0.07b	2.86±0.08b	1.46±0.07cd	1.55±0.08c	2.99±0.06b	1.39±0.06cd	1.28±0.06d
巨豆三烯酮 Megastigmatrienone	105.04±4.79e	416.02±4.67a	147.92±2.25c	165.06±4.36b	131.23±4.02d	407.20±3.69a	111.67±2.81e	107.41±3.21e
雪松醇 Cedrol	0.09±0.00bc	0.04±0.01c	0.14±0.01ab	0.15±0.00ab	0.09±0.00bc	0.04±0.01c	0.12±0.00b	0.19±0.01a
红没药醇 Bisabolol	0.10±0.01f	0.47±0.01a	0.12±0.01f	0.25±0.01d	0.28±0.01c	0.27±0.01cd	0.22±0.01e	0.32±0.01b
苯甲酸苯甲酯 Benzyl benzoate	1.80±0.00a	0.97±0.00c	1.81±0.05a	0.52±0.02de	0.60±0.03d	1.12±0.04b	0.42±0.01f	0.51±0.03e
新植二烯 Neophytadiene	104.38±0.18a	28.51±2.13d	69.93±4.36b	24.71±3.01d	44.72±4.11c	23.99±3.56d	26.42±3.82d	43.26±2.58c
金合欢基丙酮 Farnesyl acetone	2.33±0.09c	5.17±0.11a	2.52±0.11c	1.51±0.10d	1.34±0.11de	2.87±0.10b	1.15±0.10e	1.51±0.10d
十六酸甲酯 Methyl hexadecanoate	4.94±0.13f	10.52±0.11d	5.18±0.05f	9.51±0.10e	20.27±0.09a	10.56±0.12d	15.29±0.06b	13.25±0.08c

表中数字为平均值±标准差, 同行数据后的不同小写字母表示P<0.05水平上差异显著。

Numbers in the table represent mean±standard deviation (SD). Different lowercase letters following the data in the same row indicate statistically significant differences (P<0.05).

表4 不同产区醇化烟叶中20种多酚成分含量的检测结果

Table 4 Concentrations of 20 polyphenolic components in aged tobacco leaves from different production areas

化学物质名称 Compound names	Dali	Wenshan	Honghe	Luoping	Pu'er	Zhaotong	Lincang K	Lincang Y
奎宁酸 Quinic acid	2 529.72±23.51f	3 059.02±27.90d	2 385.77±35.29g	2 891.83±25.18e	5 512.80±30.46a	2 490.10±3.11f	4 204.28±33.88bb	3 601.82±28.54c
新绿原酸 NeIrgn acid	2 650.02±41.38d	2 474.26±12.10e	2 455.16±1.22e	3 151.08±15.73a	2 897.49±25.67b	3 088.25±33.13a	2 810.11±29.81c	3 157.77±18.46a
绿原酸	17 587.42±390.60a	12 345.51±56.39e	12 446.63±19.38e	14 000.43±45.28c	12 305.89±98.76e	14 818.52±21.57b	13 420.40±89.42d	14 881.11±52.11b
Chlorogenic acid								
东莨菪苷 Scopolin	162.93±15.63f	657.82±14.32d	500.13±4.56e	748.50±5.22c	816.54±8.45b	110.15±6.89g	685.41±12.79d	1 130.31±10.37a
隐绿原酸 Celrgn acid	2 864.60±125.94c	2 875.43±78.63c	2 779.37±48.60c	3 292.24±95.49b	3 034.41±52.18c	3 442.57±63.59ab	3 156.01±88.35bc	3 585.66±91.73a
咖啡酸 Caffeic acid	480.90±9.83c	384.47±7.25e	329.48±5.98f	407.07±8.64d	1 124.47±6.84a	221.76±6.32g	667.26±7.93b	472.96±9.11c
七叶亭 Esculetin	24.49±1.89d	28.20±1.41cd	43.60±1.13a	26.20±1.57cd	25.40±1.69d	29.03±1.39cd	35.98±1.76b	30.28±1.26c
3-O-阿魏酰奎宁酸	45.69±2.04g	138.14±1.51e	40.03±0.75h	202.15±1.83a	125.85±0.93f	159.24±1.34b	147.23±0.88c	145.51±1.18c
3-O-feruloylquinic acid								
花青素	5.47±0.23e	8.16±0.09d	4.19±0.01g	23.94±0.15a	5.49±0.03e	23.36±0.21b	5.60±0.11e	16.00±0.06c
Anthocyanidin								
芦丁 Rutin	7 651.41±5.92e	8 225.22±61.79c	9 032.14±67.03a	9 155.89±59.34a	8 224.05±63.22c	8 012.67±65.78d	7 708.60±58.62e	8 623.70±66.41b
异槲皮苷	61.34±0.57f	69.29±0.13d	73.20±0.07b	71.53±0.29c	71.90±0.56c	73.68±0.50b	68.00±0.36c	80.97±0.41a
Isoquercetin								
山奈酚-3-O-芸香糖苷	334.45±2.26f	352.08±1.87e	312.84±0.45g	643.07±2.02a	498.18±0.64c	402.73±1.24d	335.02±0.98f	559.24±1.57b
Kaem-3-O-rut								
水仙苷 Isor-3-O-rut	24.81±0.28g	53.16±0.17e	26.83±0.14f	65.64±0.27b	68.07±0.19a	63.94±0.22c	56.44±0.24d	66.19±0.25b
阿魏酸 Ferulic acid	21.52±0.05b	13.63±0.07e	11.24±0.15f	24.25±0.10a	19.84±0.12c	13.85±0.10e	18.28±0.13d	18.55±0.06d
苜蓿亭 Scopoletin	325.75±13.75e	423.89±11.47d	549.42±6.57c	526.33±9.61c	586.51±7.38b	169.60±10.23f	610.22±8.76ab	624.10±12.15a
二氢槲皮素 Taxifolin	0.24±0.01e	2.62±0.02c	0.43±0.02d	2.89±0.07a	2.72±0.03bc	2.84±0.06ab	2.74±0.04b	2.78±0.05ab
紫云英苷	6.93±0.05d	7.50±0.18d	7.91±0.01cd	8.43±0.09c	9.28±0.10b	8.09±0.23cd	8.27±0.43c	9.91±0.27a
Kaem-3-O-glu								
3,5-di-O-咖啡酰奎宁酸	82.18±0.19c	71.67±0.15d	73.57±1.77d	105.69±1.53a	84.40±0.45c	63.16±0.78f	66.81±1.02e	90.80±0.97b
3,5-di-O-caffeoylquinic acid								
槲皮素 Quercetin	1.63±0.06e	7.71±0.29c	4.04±1.21d	4.19±0.03d	7.43±0.75c	3.76±1.12d	12.69±0.90a	10.27±0.12b
异鼠李素	0.23±0.01c	0.56±0.09ab	0.23±0.04c	0.42±0.00b	0.59±0.00a	0.52±0.05ab	0.57±0.07a	0.56±0.02ab
Isorhamnetin								

表中数字为平均值±标准差，同行数据后的不同小写字母表示 $P < 0.05$ 水平上差异显著。

Numbers in the table represent mean±standard deviation (SD). Different lowercase letters following the data in the same row indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

2.4 不同产区醇化烟叶微生物菌群与其化学成分的相关性分析

2.4.1 醇化烟叶微生物菌群与常规化学成分的相关性分析

微生物是调控烟叶品质的核心因素, 为明确醇化过程中烟叶微生物与化学成分的潜在关联, 选取了相对丰度前 10 且兼具生物大分子降解功能及产区优势特征的细菌属和真菌属进行相关性分析, 结果如图 8 所示。细菌方面: 仅微杆菌属(*Microbacterium*)与总氮呈显著正相关, 其他细菌属与常规化学成分相关性不显著(图 8A); 真菌方面: 短柄霉属(*Aureobasidium*)与总氮呈显

著负相关; 白冬孢酵母属(*Leucosporidium*)与钾离子及钾氯比呈显著正相关(图 8B)。

2.4.2 醇化烟叶微生物菌群与中性致香成分的相关性分析

为解析醇化烟叶微生物关键菌属对中性致香物质的影响, 对两者的关联性进行分析。结果显示(图 9A), 在细菌关键菌属中。甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)均与多种中性致香成分呈负相关, 其中甲基杆菌属与二氢猕猴桃内酯、糠醛、糠醇、苯乙醇、金合欢基丙酮和香叶基

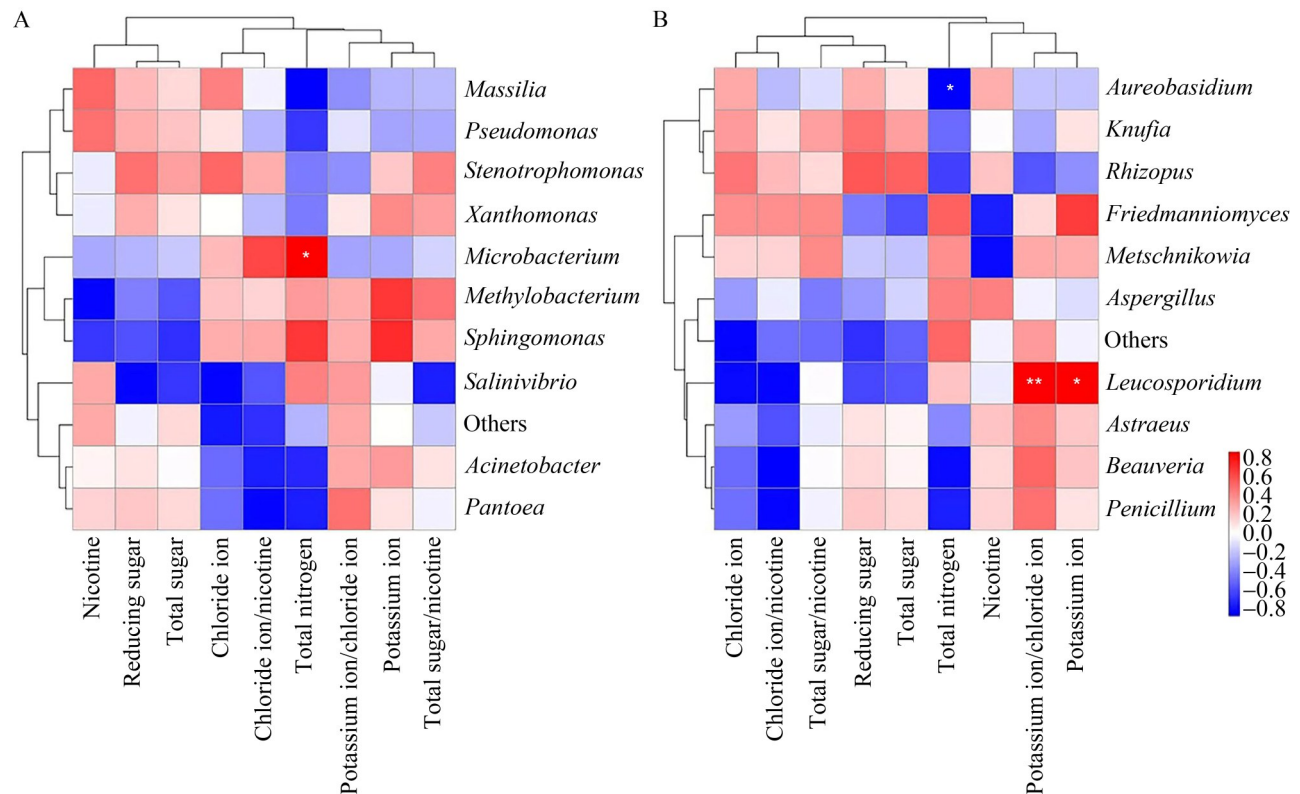


图8 醇化烟叶微生物菌群与常规化学成分的相关性分析。A: 细菌; B: 真菌。颜色深浅代表相关系数值, 颜色类型代表正相关(红色)或负相关(蓝色), *表示在 $P < 0.05$ 时具有统计学意义, **表示在 $P < 0.01$ 时具有统计学意义。下同。

Figure 8 Correlation between microbial flora and conventional chemical components in aged tobacco leaves. A: Bacteria; B: Fungi. The color intensity represents the correlation coefficient value, and the color type denotes positive correlation (red) or negative correlation (blue). * indicates statistical significance at $P < 0.05$, ** indicates statistical significance at $P < 0.01$. The same below.

丙酮呈显著性负相关；鞘氨醇单胞菌属与糠醇和氧化异佛尔酮的负相关性显著。盐水弧菌属(*Salinivibrio*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、泛菌属(*Pantoea*)则与绝大部分中性致香成分呈正相关,尤其是盐水弧菌属与苯甲醇、 α -大马酮、 β -紫罗兰酮和巨豆三烯酮呈现显著性正相关。此外,假单胞菌属(*Pseudomonas*)与香叶基丙酮呈显著正相关,与红没药醇、十六酸甲酯呈显著负相关;马赛菌属(*Massilia*)与芳樟醇、红没药醇和十六酸甲酯呈显著负相关。在真菌关键菌属中(图 9B),弗莱德门氏菌属(*Friedmanniomyces*)、梅奇酵母属(*Metschnikowia*)、短柄霉属(*Aureobasidium*)、根霉属(*Rhizopus*)则与多数中性致香成分呈负相关,其中弗莱德门氏菌属与氧化异佛尔酮、糠醇和金合欢丙酮呈显著负相关;短柄霉属与红没药醇的负相关性显著,根霉属与苯甲醇呈显著的负相关性。青霉属(*Penicillium*)与十六酸甲酯呈显著负相关性。该关联性分析揭示了与中性致香成分显著相关的核心菌属,为阐明微生物与烟草品质的互作机制和产香菌属定向筛选提供了有益参考。

2.4.3 醇化烟叶微生物菌群与多酚成分的相关性分析

烟叶中的多酚物质对醇化烟叶独特香味的形成有较大贡献,而关键微生物菌群在多酚化合物的转化与降解过程中起着关键作用。为此,本研究深入剖析了细菌/真菌群落在属水平的相对丰度与多酚化合物含量之间的潜在关系,如图 10 所示。在细菌关键菌属中,假单胞菌属(*Pseudomonas*)、马赛菌属(*Massilia*)、泛菌属(*Pantoea*)以及不动杆菌属(*Acinetobacter*)与 10 余种多酚呈现负相关,其中马赛菌属与花青素、山奈酚-3-O-芸香糖苷的负相关性显著;寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)均与芦丁呈显著负相关。甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)则与 15 种以上多酚呈较强正相关,具体表现为甲基杆菌属与新绿原酸、二氢

槲皮素和紫云英苷的正相关性显著;鞘氨醇单胞菌属与隐绿原酸、新绿原酸、3-O-阿魏酰奎宁酸、二氢槲皮素、花青素和山奈酚-3-O-芸香糖苷的正相关性显著。

在真菌关键菌属中,短柄霉属(*Aureobasidium*)、根霉属(*Rhizopus*)、*Knufia*、硬皮地星属(*Astraeus*)、白僵菌属(*Beauveria*)及青霉属(*Penicillium*)与多数多酚成分呈负相关,其中短柄霉属与花青素、*Knufia*与芦丁分别呈显著负相关。白冬孢酵母属(*Leucosporidium*)、弗莱德门氏菌属(*Friedmanniomyces*)及梅奇酵母属(*Metschnikowia*)则与多种多酚呈正相关,具体表现为:白冬孢酵母属与异槲皮苷呈显著正相关;弗莱德门氏菌属与 3-O-阿魏酰奎宁酸、二氢槲皮素、隐绿原酸、新绿原酸、紫云英苷呈现显著的正相关性;梅奇酵母属与阿魏酸和 3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸呈显著正相关。多项研究表明,上述提及的根霉属等真菌属与多酚成分的负相关性,与它们分泌的阿魏酸酯酶、漆酶、过氧化物酶等的直接降解能力密切相关^[29-32]。综上所述,烟叶关键菌群具有通过特定代谢酶调控多酚转化与降解的潜力,这为定向调控烟叶风味品质提供了重要依据。

3 讨论

通过宏基因组技术分析不同产区醇化烟叶的微生物群落组成及潜在功能,结果显示:在细菌群落中假单胞菌门是各产区的优势门,其相对丰度介于 69.69%–89.22% 之间,这表明假单胞菌门在烟叶醇化过程中发挥着关键作用^[33-34]。进一步分析优势细菌属发现,优势细菌属呈现出明显的产区特异性,如盐水弧菌属在文山产区丰度较高,甲基杆菌属和鞘氨醇单胞菌属则在罗平产区高度富集。在真菌群落中子囊菌门和毛霉门是主要优势类群,且各产区的优势真菌属组成较为一致,这可能与真菌代谢的普适性有关^[13]。KEGG 注释的新陈代谢通路在各产区的相对丰度较高,环境信息处理通

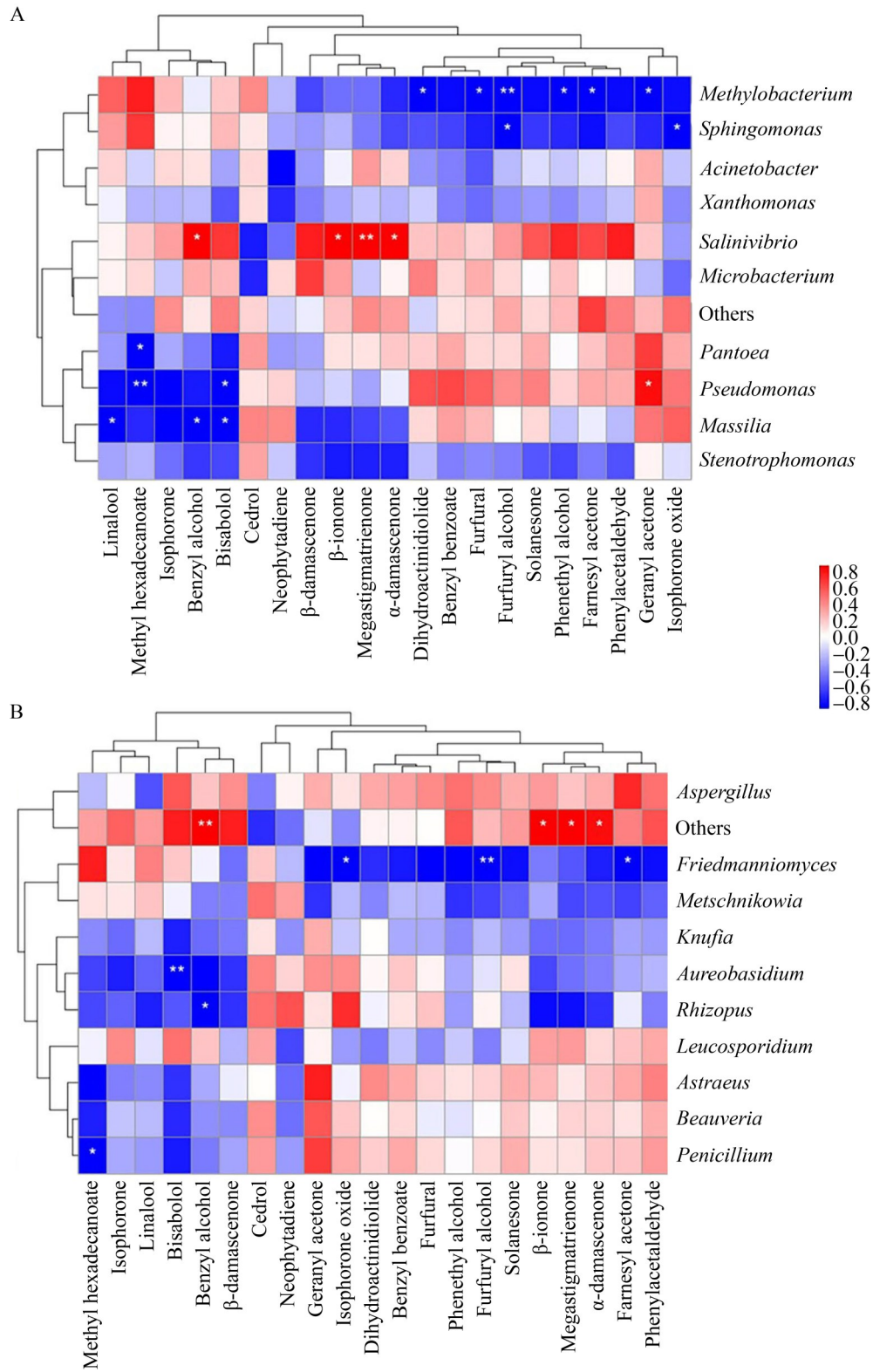


图9 醇化烟叶核心菌群与中性致香成分的相关性分析

Figure 9 Correlation between core microbial flora and neutral aroma components in aged tobacco leaves.

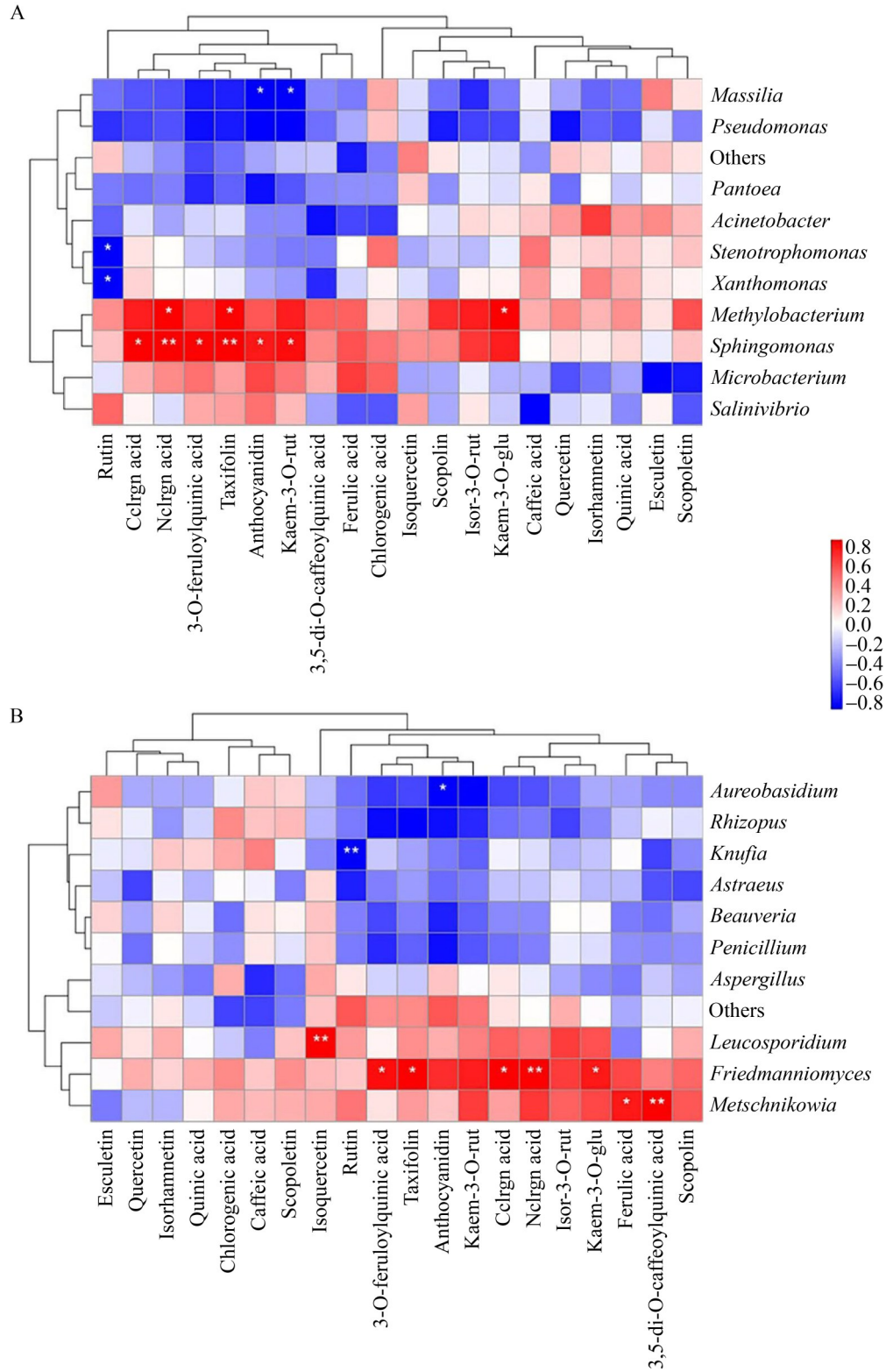


图10 醇化烟叶核心菌群与多酚成分的相关性分析

Figure 10 Correlation between core microbial flora and polyphenolic components in aged tobacco leaves.

路则在文山产区高度富集。CAZy 分析结果显示, 糖苷水解酶和糖基转移酶占碳水化合物活性酶总基因数量的 81.03%, 且二者在除文山外的其余产区相对丰度均较高, 这表明多糖等大分子的降解与转化是烟叶醇化过程中的核心要素^[8,35], 值得特别关注的是 GHs 家族。李石头等^[8]研究发现烟叶醇化特定阶段富集的糖苷酶和淀粉酶, 能高效催化纤维素、淀粉等大分子水解为葡萄糖等还原糖。王文婷等^[35]指出, 降解淀粉、纤维素和果胶的 GHs 家族在发酵中后期丰度显著升高, 且多数糖苷水解酶与中性致香成分呈正相关, 如 GH1 家族寡糖水解酶相对丰度与茄酮、巨豆三烯酮等呈显著正相关。后续研究将动态监测烟叶醇化过程中优势菌属与 GHs 等关键活性酶的表达谱, 围绕这些优势菌群以及具有多糖降解活性酶的有益菌属系统开展菌株分离、鉴定与开发利用工作, 进一步丰富烟草功能菌株资源, 拓展其在烟叶提质生物技术开发和工业烟叶原料品质改良中的应用。

在烟草品质形成过程中, 微生物与化学成分的相互作用是关键因素。之前的研究证实假单胞菌能以烟碱作为底物, 在发酵中降解烟碱以实现自身大量繁殖, 这与本文假单胞菌属与烟碱正相关的结果高度契合^[36-38]。王祯等^[34]发现假单胞菌属能分泌蛋白酶与纤维素酶, 促进醇化烟叶中蛋白质等大分子降解转化, 并且绿原酸等多酚含量显著提升。该发现合理解释了其总氮负相关、与绿原酸正相关的内在联系, 为筛选有益微生物提供了重要参考。本研究结果还显示盐水弧菌属和曲霉属与多种花香型物质呈较强正相关, 说明二者可能是产区特征香气形成的关键驱动因素^[39-40]。烟草微生物领域虽未报道过盐水弧菌属, 但其作为豆酱等发酵食品的重要嗜盐菌, 已证实对风味物质生成至关重要, 如与曲霉属协同分解蛋白质等大分子物质, 促进中性风味成分积累^[41-42]。这些研究佐证了盐水弧菌属和曲霉属在烟叶特征香气形成中的潜在功能, 为定向筛选产香有益菌株

提供了科学依据。关键菌属与多酚的相关性分析显示, 甲基杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、弗莱德门氏菌属以及梅奇酵母属与新绿原酸、花青素等多酚存在显著正相关, 这些核心菌属或许在多酚代谢的转化过程中发挥着正向调控作用。以梅奇酵母属为例, 它们分泌的 β -葡萄糖苷酶、纤维素酶等胞外水解酶可高效降解植物细胞壁多糖及糖苷, 释放出多酚等香气前体物质, 揭示了该类菌属在香味物质调控中的应用潜力^[43]。

通过解析云南不同产区醇化烟叶微生物群落特征及其与化学成分的潜在联系, 不仅揭示了各产区微生物群落组成及其化学成分的地域特性, 更基于相关性分析筛选出了与烟草风味成分密切相关的重要微生物菌属。这些研究为阐明烟草农产品风味形成的微生物驱动机制提供了关键靶点, 而功能菌株的定向筛选有望为精准调控发酵工艺与品质改良奠定技术支持^[44-47]。然而, 当前所发现的核心菌属功能基因及代谢通路与烟草风味物质生成的相互作用机制仍缺乏系统性解析。未来研究将综合利用微生物组、代谢组和转录组等多组学技术, 结合无菌发酵验证体系系统解析烟叶醇化过程中微生物群落的动态演替规律, 重点探究萜烯类、苯丙氨酸代谢产物等中性致香成分以及多酚类物质与关键微生物菌群的互作网络。通过上述研究为定向筛选具有产香能力的功能菌株, 实现烟叶提质生物技术开发与烟叶工业原料改良提供依据和支持。

4 结论

本文利用宏基因组学、色谱-质谱联用以及斯皮尔曼相关性分析等方法对云南不同产区醇化烟叶的微生物群落及其化学成分进行深入剖析, 并对其核心微生物菌属与化学成分的相关性进行研究, 得出以下重要结论: 微生物群落组成方面, 各产区醇化烟叶的优势细菌门均为假单胞菌门, 但优势细菌属存在显著的产区差异。例如, 文山产区以盐水弧菌属为特征菌属,

罗平产区以甲基杆菌属为优势菌属，其余产区多以假单胞菌属为主。各产区的优势真菌门均为子囊菌门，优势真菌属地域差异较小。多样性分析结果显示，临沧产区微生物丰富度和多样性最高，文山产区最低。地理环境与烟叶品种对微生物群落具有双重塑造作用。功能预测研究发现，新陈代谢通路在各产区丰度均较高，而环境信息处理通路在文山产区丰度较高；糖苷水解酶和糖基转移酶基因在碳水化合物活性酶基因数中占比最高，且二者仅在文山产区的丰度较低。化学成分检测结果表明，大理产区的还原糖、总糖和氯离子含量较高，而普洱产区的糖碱比和钾氯比均较高；文山产区的多种中性香型成分显著高于其余产区；所有产区的绿原酸及其异构体和芸香苷 4 种核心多酚构成稳定且占比高，多种非核心多酚含量在罗平产区烟叶中较高。相关性研究表明：微杆菌属与总氮呈显著正相关，短柄霉属与总氮呈显著负相关；白冬孢酵母属与钾离子、钾氯比呈现显著正相关；盐水弧菌属与多种中性致香物质呈显著性正相关，甲基杆菌属和弗莱德门氏菌属则与多数中性致香成分呈显著负相关；甲基杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、弗莱德门氏菌属及梅奇酵母属与新绿原酸、花青素等多酚存在显著性正相关。本研究系统阐述了云南不同产区醇化烟叶微生物群落与化学成分的差异性特征及两者间潜在互作关系，为烟草微生物资源挖掘、功能菌株定向筛选及烟叶品质提升提供了科学依据。

作者贡献声明

刘蓉：数据收集与分析、论文撰写和修改；唐游：样本收集、论文讨论及提供技术支持；吕祥敏：化学检测；王鹏：常规化学成分分析；唐杰：检测方法建立；牛国清：论文框架设计与审阅；马明：论文构思、框架设计和审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 李秀妮, 李猛, 万德建, 李林林, 陈栋, 丁松爽, 时向东. 烟叶微生物及其在烟叶发酵和醇化中的作用研究进展[J]. 微生物学通报, 2019, 46(6): 1520-1529.
LI XN, LI M, WAN DJ, LI LL, CHEN D, DING SS, SHI XD. Role of microorganisms in tobacco fermentation and alcoholization: a review[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(6): 1520-1529 (in Chinese).
- [2] CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, BITTINGER K, BUSHMAN FD, COSTELLO EK, FIERER N, PEÑA AG, GOODRICH JK, GORDON JI, HUTTLEY GA, KELLEY ST, KNIGHTS D, KOENIG JE, LEY RE, LOZUPONE CA, McDONALD D, MUEGGE BD, PIRRUNG M, REEDER J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336.
- [3] MAGOČ T, SALZBERG SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [4] HU BB, GU KY, GONG J, ZHANG K, CHEN D, HE X, CHEN Y, GAO KX, JIN Y, HUANG K, ZHU YM, ZOU CM. The effect of flue-curing procedure on the dynamic change of microbial diversity of tobaccos[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 5354.
- [5] YANG Y, XU RY, YANG MM, XU Q, MIAO CL, GUO JH, MOU WJ, DU H, WEI G, HU LW, HU ZY. Characterization of bacterial community in tobacco leaves at flue-curing and redrying processing stages[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 13333.
- [6] 黄申, 闫美玲, 芦尧, 田洪源, 毛多斌, 芦昶彤, 陈芝飞, 冯颖杰. 不同香型再造烟叶浓缩液化学成分和微生物组差异性研究[J]. 轻工学报, 2021, 36(5): 51-58.
HUANG S, YAN ML, LU Y, TIAN YY, MAO DB, LU CT, CHEN ZF, FENG YJ. Study on the difference of chemical composition and microbiome of different flavor types of reconstituted tobacco leaf concentrate[J]. *Journal of Light Industry*, 2021, 36(5): 51-58 (in Chinese).
- [7] 陈善义, 陈千思, 刘金燕, 陈义强, 范坚强, 邓小华, 李菁菁, 陶界锰. 不同醇化卷烟原料表面微生物的群落结构及对大分子物质的降解功能[J]. 烟草科技, 2024, 57(3): 34-42.
CHEN SY, CHEN QS, LIU JY, CHEN YQ, FAN JQ, DENG XH, LI JJ, TAO JM. Community structure and macromolecular substance degrading function of surface microorganisms on different aged cigarette raw materials[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2024, 57(3): 34-42 (in Chinese).
- [8] 李石头, 潘凡达, 黄晓玉, 闫茗熠, 田雨衣, 廖付, 王辉, 吴继忠. 基于宏基因组学的不同陈化时间烟草源功能微生物筛选[J]. 轻工学报, 2023, 38(1): 101-109.
LI ST, PAN FD, HUANG XY, YAN MY, TIAN YN, LIAO F, WANG H, WU JZ. Screening of tobacco-derived functional microorganisms with different aging time based on metagenomics[J]. *Journal of Light Industry*, 2023, 38(1): 101-109 (in Chinese).
- [9] LI ZF, QIN T, XIA YZ, ZHOU L, WANG LP, DUAN K, LEI J, YAO JH, XIA JJ, LI J. Similarity in the microbial community structure of tobacco from geographically similar regions[J]. *Scientific Reports*, 2024, 14: 30933.

- [10] 王洪云, 刘洪祥, 徐发华, 陈刚, 王新中, 陈爱国, 李再光, 王树声, 杨德海. 大理特色烟叶与不同生态烟区烤烟香型风格的差异研究[J]. 中国烟草科学, 2015, 36(3): 8-12. WANG HY, LIU HX, XU FH, CHEN G, WANG XZ, CHEN AG, LI ZG, WANG SS, YANG DH. The difference of scent styles between tobacco grown in Yunnan Dali and in other ecological areas[J]. Chinese Tobacco Science, 2015, 36(3): 8-12 (in Chinese).
- [11] 宋学茹, 张立猛, 卜令铎, 黄智华, 瞿兴, 陈文华, 张继来, 苏友波. 云南不同产地醇化雪茄烟叶微生物群落差异研究[J]. 中国烟草科学, 2022, 43(5): 87-93. SONG XR, ZHANG LM, BU LD, HUANG ZH, QU X, CHEN WH, ZHANG JL, SU YB. Study on microbial community of alcoholized cigar leaves from different producing areas of Yunnan Province[J]. Chinese Tobacco Science, 2022, 43(5): 87-93 (in Chinese).
- [12] LI WL, YU J, LI H, YANG CL, PENG Z, ZHANG J. The dynamics of microbial community structure and metabolic function in different parts of cigar tobacco leaves during air-curing[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1438566.
- [13] 刘晓敏, 黄晓杰, 蔡昊城, 何沛, 朱志扬, 朱益, 彭光爵, 秦天, 马婷婷, 雷佳, 黎娟. 醇化烟叶关键微生物类群与风格特色的相关性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(1): 23-30. LIU XM, HUANG XJ, CAI HC, HE P, ZHU ZY, ZHU Y, PENG GJ, QIN T, MA TT, LEI J, LI J. Key microbial groups are closely related to the formation of aroma characteristics in aged tobacco leaves[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences Edition)*, 2024, 50(1): 23-30 (in Chinese).
- [14] GAO RC, LIU HJ, LI Y, LIU HY, ZHOU Y, YUAN L. Correlation between dominant bacterial community and non-volatile organic compounds during the fermentation of shrimp sauces[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2023, 12(1): 233-241.
- [15] YANG XX, PENG Z, ZHU Q, CHEN CC, LIU JH, FU ST, ZHANG J. Analysis of Tieguanyin aged aroma compounds and their correlation with microbial communities[J]. *LWT*, 2023, 185: 115205.
- [16] WILSON K. Preparation of genomic DNA from bacteria[J]. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2001, 56(1): 2.4.1-2.4.5.
- [17] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 水溶性糖的测定连续流动法: YC/T 159—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019. State Tobacco Monopoly Bureau of the People's Republic of China. Determination of water-soluble sugars in tobacco and tobacco products by continuous flow method: YC/T 159—2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019 (in Chinese).
- [18] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 总植物碱的测定连续流动(硫氰酸钾)法: YC/T 468—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021. State Tobacco Monopoly Bureau of the People's Republic of China. Tobacco and tobacco products—determination of total alkaloids—continuous flow (potassium thiocyanate) method: YC/T 468—2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021 (in Chinese).
- [19] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 氯的测定连续流动法: YC/T 162—2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011. State Tobacco Monopoly Bureau of the People's Republic of China. Tobacco and tobacco products—determination of chloride—continuous flow method: YC/T 162—2011[S]. Beijing: Standards Press of China, 2011 (in Chinese).
- [20] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 钾的测定连续流动法: YC/T 217—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007. State Tobacco Monopoly Bureau of the People's Republic of China. Tobacco and tobacco products—determination of potassium—continuous flow method: YC/T 217—2007[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007 (in Chinese).
- [21] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 总氮的测定连续流动法: YC/T 161—2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004. State Tobacco Monopoly Bureau of the People's Republic of China. Tobacco and tobacco products—determination of total nitrogen—continuous flow method: YC/T 161—2002[S]. Beijing: Standards Press of China, 2004 (in Chinese).
- [22] 国家烟草专卖局. 烟草及烟草制品 试样的制备和水分测定 烘箱法: YC/T 31—1996[S]. 北京: 中国标准出版社, 1996. State Tobacco Monopoly Administration. Tobacco and tobacco products—preparation of test sample and determination of water content—oven method: YC/T 31—1996[S]. Beijing: Standards Press of China, 1996 (in Chinese).
- [23] 史天彩, 潘立宁, 王晓瑜, 秦亚琼, 郭琼, 谢飞, 谢复伟, 刘惠民. 分析保护剂对烟草香味成分的基质效应补偿[J]. 烟草科技, 2021, 54(9): 27-39. SHI TC, PAN LN, WANG XY, QIN YQ, GUO Q, XIE F, XIE FW, LIU HM. Matrix effect compensation for analyte protectants during aroma component analysis of tobacco[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2021, 54(9): 27-39 (in Chinese).
- [24] 欧阳璐斯, 赖燕华, 王予, 陶红, 黄翼飞. 高效液相色谱-分段检测法同时测定烟草中14种多酚类化合物[J]. 分析测试学报, 2021, 40(3): 411-416. OUYANG LS, LAI YH, WANG Y, TAO H, HUANG YF. Simultaneous determination of fourteen polyphenols in tobacco by piecewise detection based on liquid chromatography[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2021, 40(3): 411-416 (in Chinese).
- [25] LI JH, JIA HJ, CAI XH, ZHONG HZ, FENG Q, SUNAGAWA S, ARUMUGAM M, KULTIMA JR, PRIFTI E, NIELSEN T, JUNCKER AS, MANICHANH C, CHEN B, ZHANG WW, LEVENEZ F, WANG J, XU X, XIAO L, LIANG SS, ZHANG DY, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(8): 834-841.
- [26] FENG Q, LIANG SS, JIA HJ, STADLMAYR A, TANG LQ, LAN Z, ZHANG DY, XIA HH, XU XY, JIE ZY, SU LL, LI XP, LI X, LI JH, XIAO L, HUBER-SCHÖNAUER U, NIEDERSEER D, XU X, AL-AAMA JY, YANG HM, et al. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6528.
- [27] QIN JJ, LI YR, CAI ZM, LI SH, ZHU JF, ZHANG F,

- LIANG SS, ZHANG WW, GUAN YL, SHEN DQ, PENG YQ, ZHANG DY, JIE ZY, WU WX, QIN YW, XUE WB, LI JH, HAN LC, LU DH, WU PX, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 55-60.
- [28] BUCHFINK B, XIE C, HUSON DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. *Nature Methods*, 2014, 12(1): 59-60.
- [29] HOU RR, HU JJ, WANG YZ, WEI HR, GAO MT. Simultaneous production of cellulase and ferulic acid esterase by *Penicillium decumbens* with rice straw as the sole carbon source[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 129(3): 276-283.
- [30] GARCÍA-CALVO L, RODRÍGUEZ-CASTRO R, ULLÁN RV, ALBILLOS SM, FERNÁNDEZ-AGUADO M, VICENTE CM, DEGNES KF, SLETTA H, BARREIRO C. *Penicillium chrysogenum* as a fungal factory for feruloyl esterases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(2): 691-717.
- [31] SHANKER KS, KISHORE KH, KANJILAL S, MISRA S, NARAYANA MURTY US, PRASAD RBN. Biotransformation of ferulic acid to acetovanillone using *Rhizopus oryzae*[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2007, 25(1): 109-112.
- [32] Dos SANTOS VL, de SOUZA MONTEIRO A, BRAGA DT, SANTORO MM. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 161(2/3): 1413-1420.
- [33] WANG HH, YIN B, PENG XX, WANG JY, XIE ZH, GAO J, TANG XK. Biodegradation of nicotine by newly isolated *Pseudomonas* sp. CS3 and its metabolites[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 112(2): 258-268.
- [34] 王祯, 刘晨, 王文婷, 张霞, 朱先约, 朱萍, 宋凯. 醇化烟叶表面细菌筛选及增香效应研究[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(22): 151-156.
- WANG Z, LIU C, WANG WT, ZHANG X, ZHU XY, ZHU P, SONG K. Screening and application of aroma-enhancing bacteria on the surface of aging tobacco leaf[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(22): 151-156 (in Chinese).
- [35] 王文婷, 宋凯, 杨晨, 臧志鹏, 王祯, 陈梦月, 刘晨, 翟玉俊. 基于宏基因组学的霍氏肠杆菌发酵解析及其烟叶品质提升机制研究[J]. *轻工学报*, 2023, 38(1): 79-89.
- WANG WT, SONG K, YANG C, ZANG ZP, WANG Z, CHEN MY, LIU C, ZHAI YJ. Macrogenomics-based investigation of the mechanism underlying tobacco fermentation by *Enterobacter hormaechei*[J]. *Journal of Light Industry*, 2023, 38(1): 79-89 (in Chinese).
- [36] WANG SN, XU P, TANG HZ, MENG J, LIU XL, HUANG J, CHEN H, DU Y, BLANKESPOOR HD. Biodegradation and detoxification of nicotine in tobacco solid waste by a *Pseudomonas* sp.[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(19): 1493-1496.
- [37] ZHONG WH, ZHU CJ, SHU M, SUN KD, ZHAO L, WANG C, YE ZJ, CHEN JM. Degradation of nicotine in tobacco waste extract by newly isolated *Pseudomonas* sp. ZUTSKD[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(18): 6935-6941.
- [38] CHEN CM, LI XM, YANG JK, GONG XW, LI B, ZHANG KQ. Isolation of nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. Nic22, and its potential application in tobacco processing[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, 62(3): 226-231.
- [39] WANG HQ, GUO DF, ZHANG MZ, WU GL, SHI YQ, ZHOU JL, DING NH, CHEN XS, LI XJ. Correlation study on microbial communities and volatile flavor compounds in cigar tobacco leaves of diverse origins[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, 108(1): 236.
- [40] MASUO S, OSADA L, ZHOU SM, FUJITA T, TAKAYA N. *Aspergillus oryzae* pathways that convert phenylalanine into the flavor volatile 2-phenylethanol[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 77: 22-30.
- [41] LIM JY, CHOI YJ, YU H, CHOI JY, YANG JH, CHUNG YB, PARK SH, MIN SG, LEE MA. Investigation of metabolite differences in salted shrimp varieties during fermentation[J]. *ACS Omega*, 2023, 8(50): 47735-47745.
- [42] CAI J, HAN YT, WU W, WU XF, MU DD, JIANG ST, LI XJ. Correlation analysis of microbiota and volatile flavor compounds of caishiji soybean paste[J]. *Fermentation*, 2022, 8(5): 196.
- [43] MORATA A, LOIRA I, ESCOTT C, del FRESNO JM, BAÑUELOS MA, SUÁREZ-LEPE JA. Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in wine biotechnology[J]. *Fermentation*, 2019, 5(3): 63.
- [44] 黄贺敏, 吴丽香, 邓梅忠, 王雨晴, 张雯, 陈善义, 张恩仁, 詹仁锋, 方璟, 倪莉, 李菁菁. 不同品质烟叶微生物群落与其挥发性成分的关联研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2022, 41(12): 85-95.
- HUANG HM, WU LX, DENG MZ, WANG YQ, ZHANG W, CHEN SY, ZHANG ER, ZHAN RF, FANG J, NI L, LI JJ. Study on the correlation between microbial communities and volatile aroma compounds in tobacco leaves of different qualities[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2022, 41(12): 85-95 (in Chinese).
- [45] WU QY, PENG Z, PAN Y, LIU LP, LI LL, ZHANG J, WANG J. Interaction analysis of tobacco leaf microbial community structure and volatiles flavor compounds during cigar stacking fermentation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1168122.
- [46] 王维亚, 刘玉婷, 万汉坤, 骆瑜, 林智超, 刘杰, 李金林. 腐乳中细菌群落结构与生物胺的相关性分析[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(22): 181-188.
- WANG WY, LIU YT, WAN HK, LUO Y, LIN ZC, LIU J, LI JL. Correlation analysis of bacterial community structure and biogenic amines in sufu[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(22): 181-188 (in Chinese).
- [47] WU XY, CAI W, ZHU PC, PENG Z, ZHENG TF, LI DL, LI JH, ZHOU GY, DU GC, ZHANG J. Profiling the role of microorganisms in quality improvement of the aged flue-cured tobacco[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1): 197.