酿酒酵母调控雪茄烟叶发酵酯类合成及风味优化

王 跃[1,2]，陈 冲[3]，郑召君[3]，李品鹤[1,2]，李东亮[1,2]，吉笑盈[1,2,*]
（1.四川中烟工业有限责任公司，四川 成都 610100；
2.国家烟草专卖局（中国烟草总公司）雪茄烟技术创新中心，四川 成都 610100；
3.江南大学食品学院，江苏 无锡 214122）

摘 要：以浓香型白酒、酿酒酵母悬菌液及上清液、乙醇作为发酵介质进行雪茄烟叶发酵。采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱技术测定不同介质发酵雪茄烟叶的挥发性风味物质，探究酿酒酵母合成酯类的具体路径。通过主成分分析、正交偏最小二乘判别分析及变量投影重要性值筛选非酯类差异挥发性风味物质，并对发酵烟叶进行感官评价。结果表明，酿酒酵母发酵上清液-乙醇协同发酵雪茄烟叶中酯类物质含量及种类较原烟叶显著提升（$P<0.05$）。其中，乙酸乙酯（0.002 5 μmol/g）、十六酸乙酯（0.002 5 μmol/g）等显著富集，其增效机制归因于外源酯酶催化、乙醇介导的底物迁移及疏水性保留效应。该发酵介质对雪茄烟叶中二氢猕猴桃内酯等关键香气成分无显著影响，共筛选出苯乙醇、正己醛等47种非酯类差异挥发性风味物质。感官评价结果表明，经酿酒酵母菌发酵上清液-乙醇协同发酵雪茄烟叶香气量、成熟度等感官指标均得到显著提升。本研究为开发基于原位微生物发酵的雪茄增香工艺提供了菌种资源与理论依据。

关键词：雪茄烟叶；酿酒酵母；发酵介质；酶促酯化；风味定向调控

Regulation of Ester Synthesis and Flavor Improvement in Cigar Tobacco Leaf through *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation

WANG Yue[1,2], CHEN Chong[3], ZHENG Zhaojun[3], LI Pinhe[1,2], LI Dongliang[1,2], JI Xiaoying[1,2,*]
(1. China Tobacco Sichuan Industrial Co. Ltd., Chengdu 610100, China;
2. STMA (CNTC) Cigar Technology Innovation Center, Chengdu 610100, China;
3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Cigar tobacco leaves were fermented using strong-flavor Baijiu, *Saccharomyces cerevisiae* cell suspension, its supernatant, and ethanol as fermentation media. The volatile flavor compounds in cigar tobacco leaves fermented with different media were determined with headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry, aiming to explore the specific pathways of ester synthesis by *S. cerevisiae*. Non-ester differential volatile flavor compounds were screened by principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), and variable importance in projection (VIP), and sensory evaluation of the fermented tobacco leaves was conducted. The results showed that the content and variety of ester compounds in cigar tobacco leaves fermented with *S. cerevisiae* fermentation supernatant combined with ethanol were significantly increased compared to the original tobacco leaves ($P < 0.05$). Among them, ethyl acetate (0.002 5 μmol/g) and ethyl hexadecanoate (0.002 5 μmol/g) were significantly enriched. The enhancement mechanism was attributed to exogenous esterase catalysis, ethanol-mediated substrate migration, and hydrophobic retention effects. This fermentation medium had no significant impact on key aroma components such as dihydroactinidiolide in cigar tobacco leaves. A total of 47 non-ester differential volatile flavor compounds, including phenethyl alcohol and *n*-hexanal, were screened. Sensory evaluation indicated that the aroma intensity, maturity, and other indicators of cigar tobacco leaves in the *S. cerevisiae* fermentation supernatant-ethanol co-fermentation group were

收稿日期：2025-08-11
基金项目：中国烟草总公司科技重大专项（110202101062（XJ-11））；
四川中烟工业有限责任公司科研项目（xj202205）
第一作者简介：王跃（1994—），男，工程师，硕士，研究方向为烟草原料与发酵。E-mail: wangyue1874@163.com
*通信作者简介：吉笑盈（1990—），女，高级工程师，博士，研究方向为材料科学。E-mail: 1192574596@qq.com

significantly improved. This study provides microbial resources for developing cigar flavor-enhancing technology based on *in-situ* microbial fermentation.

Keywords: cigar tobacco leaves; *Saccharomyces cerevisiae*; fermentation media; enzymatic esterification; directed flavor modulation

DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.05.034

中图分类号：TS453 文献标志码：A 文章编号：0254-5071（2026）05-0258-08

引文格式：

王跃, 陈冲, 郑召君, 等. 酿酒酵母调控雪茄烟叶发酵酯类合成及风味优化[J]. 中国酿造, 2026, 45(5): 258-265. DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.05.034. http://www.chinabrewing.net.cn

WANG Yue, CHEN Chong, ZHENG Zhaojun, et al. Regulation of ester synthesis and flavor improvement in cigar tobacco leaf through *Saccharomyces cerevisiae* fermentation[J]. China Brewing, 2026, 45(5): 258-265. (in Chinese with English abstract) DOI:10.11882/j.issn.0254-5071.2026.05.034. http://www.chinabrewing.net.cn

雪茄是以天然烟叶为原料的手工卷制烟草制品，其发酵过程中形成的独特理化特性将直接影响雪茄品质。雪茄烟叶发酵通过微生物代谢、酶促反应及非酶褐变等多重作用，促使烟叶中的淀粉、蛋白质等大分子物质降解，同时生物碱、多酚类化合物及挥发性致香成分发生定向转化，从而降低青杂气、氨类刺激性物质，并促进棕化反应，进而改善色泽均匀度[1]。因此，雪茄烟叶发酵流程的精准调控及微生物资源的合理利用是改善雪茄烟叶理化指标、提升感官品质的重要途径。

雪茄烟叶的品质优化高度依赖发酵过程中理化特性与感官特征的协同调控。近年来，外源功能微生物的定向接种为烟叶品质改良提供了新路径，其中酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）作为食品发酵领域的模式菌种，因其高效代谢特性及安全性优势，在烟叶增香提质中展现出显著潜力[2]。研究表明，酿酒酵母可通过多途径改善烟叶品质，其代谢产物可直接作为烟用香料，提升香气复杂度[3]；在再造烟叶加工中，酿酒酵母发酵烟草萃取液可显著增加酸类和酮类致香物质含量，优化吸食舒适度[4]。进一步研究发现，酿酒酵母与嗜麦芽寡养单胞菌（*Stenotrophomonas maltophilia*）协同发酵可降低烟叶杂气与刺激性，同时通过调控糖碱比，进而改善烟气协调性[5]。此外，基于酿酒酵母制备的生物活性制剂能显著提高烟叶总糖含量及醛类、酮类挥发性物质丰度，并降低烟碱残留，使余味纯净度与香气层次感同步提升[6]。然而目前研究多集中于酿酒酵母添加所引起的酸、醇及醛酮类致香物质的变化，而作为食品和烟草制品中重要的风味贡献者，酯类化合物的变化规律及其对雪茄品质的影响尚未可知。

酯类物质常赋予酒类、乳制品及烘焙食品以果香、花香和甜香等愉悦气息[7]。雪茄烟叶中的酯类物质可显著改善其烟气柔和度、降低刺激性，并赋予其坚果、焦糖等复合香气。因此，如何定向调控酯类合成已成为烟草发酵技术创新的新命题。本团队前期实验表明，白酒浸润可在短期内提升烟叶酯香，但单纯依赖外源添加酯类物质难以实现雪茄风味的长期稳定，而通过功能性微生物来源介质发酵雪茄烟叶，可能成为更具潜力的技术路径。基于此，本研究首先通过对比6种浓香型白酒的酯类组成差异，优选典型样本进行白酒发酵雪茄烟叶实验。随后，利用前期从浓香型酒曲中筛选出的一株高产酯类物质的酿酒酵母[8]进行酿酒酵母发酵烟叶实验。采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱（headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry，HS-SPME-GC-MS）技术测定不同介质发酵雪茄烟叶的挥发性风味物质，探究酿酒酵母合成酯类的具体路径与机理。通过主成分分析（principal components analysis，PCA）、正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA）及变量投影重要性（variable importance in projection，VIP）值筛选差异挥发性风味物质，并对发酵烟叶进行感官评价。以期为雪茄烟叶的微生物风味调控提供理论依据，同时拓展酿酒酵母在非酿酒领域的应用场景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

云雪39号雪茄烟叶 四川中烟工业有限责任公司；6款浓香型白酒（编号为1～6） 市售，其中2款来自四川省宜宾市，其他4款分别来自四川省泸州市、北京市顺义区、安徽省亳州市以及江苏省宿迁市。

2-辛醇（纯度＞99%） 北京百灵威科技有限公司；磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS） 北京索莱宝科技有限公司；酚酞（分析纯） 国药集团化学试剂有限公司；正己烷（分析纯） 阿拉丁试剂（上海）有限公司；乙醇（食品级、体积分数≥95%） 成都市科隆化学品有限公司；麦芽膏（malt extract，ME）培养基广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

HWS-250恒温恒湿培养箱 上海森信实验仪器有限公司；BDS-TX270台式恒温振荡器 上海博迅实业有限公司医疗设备厂；U-3900紫外-可见分光光度计 日本日立公司；50/30 μm SPME头DVB/Carbon WR/PDMS、TQ8040 NX GC-MS仪 日本岛津公司；DB-WAX色谱柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm） 美国安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 浓香型白酒中总酸及总酯含量测定

总酸、总酯含量：分别依据GB 12456—2021《食品安全国家标准 食品中总酸的测定》及GB/T 10345—2022《白酒分析方法》进行检测。

1.3.2 浓香型白酒及雪茄烟叶中挥发性风味物质分析

采用HS-SPME-GC-MS法[9]分析浓香型白酒及雪茄烟叶中的挥发性风味物质。

样品前处理：去除烟叶主脉，剪成大小为1 cm×1 cm的方片后混匀，备用；白酒样品无需前处理。

HS-SPME条件：取4.0 mL白酒样品（2 g烟叶样品）置于20 mL的顶空瓶中，加入4 mL去离子水、1 g NaCl和10 μL 0.1%（*V*/*V*）的2-辛醇作为内标物。将SPME头插入顶空瓶中，60 ℃恒温萃取30 min，迅速将萃取头插入GC进样口，250 ℃解吸5 min，进行GC-MS分析。

GC条件：使用DB-WAX色谱柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm）；载气为高纯氦气（纯度＞99.999%）；流速1.8 mL/min；分流进样，分流比为10∶1；进样口温度250 ℃；升温程序为50 ℃保持4 min，以3 ℃/min升至70 ℃保持2 min，以4 ℃/min升至170 ℃保持2 min，以10 ℃/min升至240 ℃保持11 min。

MS条件：电子电离源；电子能量70 eV；传输线温度230 ℃；离子源温度230 ℃；扫描范围*m*/*z* 35～650。

定性定量分析：根据色谱峰的保留时间计算保留指数，与NIST 20数据库中的化合物进行匹配，利用保留指数及保留时间对目标物进行定性分析。采用内标法进行定量分析。

1.3.3 酿酒酵母的活化与发酵介质制备

酿酒酵母活化：挑取酿酒酵母单菌落，加入ME培养基，30 ℃下扩大培养至对数生长期。参照Wu Xinying等[10]的方法，将发酵液在5 000 r/min条件下离心10 min，收集微生物细胞。收集到的菌体用PBS洗涤2～3次，重复离心步骤。最终菌体重新悬浮于无菌水中，测定$OD_{600\ nm}$值，并将$OD_{600\ nm}$值调整至0.8，得到种子液。

发酵液、上清液及悬菌液的制备：取上述1 mL种子液于100 mL ME培养基中，在30 ℃下培养48 h得到发酵液。取发酵液于5 000 r/min条件下离心10 min，获得上清液备用。随后收集菌体沉淀用PBS洗涤2～3次，重复离心步骤，最终菌体重新悬浮于无菌水中，测定其$OD_{600\ nm}$值，并将$OD_{600\ nm}$值调整至0.8，得到悬菌液。

1.3.4 酿酒酵母及白酒发酵雪茄烟叶

以未发酵的原烟为对照（R），选取1.3.3节中制备的发酵液作为雪茄烟叶发酵介质。发酵前将烟叶置于恒温（50 ℃）恒湿（85%）条件下排杂2 d[11]，烟叶发酵前水分25%，将2%的介质（基于雪茄烟叶质量）溶于水，采用喷雾的方式均匀添加到烟叶中，置于恒温（35 ℃）恒湿（85%）条件下进行第1阶段发酵，共计7 d；再将2%介质采用喷雾的方式均匀添加到烟叶中，置于恒温（18 ℃）恒湿（65%）条件下进行第2阶段发酵，共计1 d，发酵结束。

为加强酿酒酵母在雪茄酯类风味中的调控作用，并探究其对酯类风味调控的机理，考虑在发酵过程中外源添加乙醇，以激活酯化反应，在酯酶的催化作用下，发酵体系中发生酯化反应，生成一系列乙酯类化合物[12]。将酿酒酵母发酵液进一步制成悬菌液和上清液，同时外源添加乙醇，用于发酵雪茄烟叶。悬菌液和上清液于第1阶段添加（添加量为烟叶质量的2%），乙醇于第2阶段添加（添加量为烟叶质量的1%）。同时，比较额外添加乙醇组发酵样品KY、SY与原烟R组中非酯类风味物质的差异，探究外加酿酒酵母是否会对雪茄烟叶非酯类香气物质造成影响。酿酒酵母及白酒发酵雪茄烟叶实验组别设置见表1。

表 1 酿酒酵母及白酒发酵雪茄烟叶实验组别设置

Table 1 Group settings of cigar tobacco leaf samples fermented with *S. cerevisiae* and Baijiu

样品编号	第1阶段	第2阶段
K	无菌水	无菌水
BJ	白酒	白酒
Z	发酵液	发酵液
KY	无菌水	无菌水＋乙醇
XY	悬菌液	悬菌液＋乙醇
SY	上清液	上清液＋乙醇
KW	无菌水	无菌水＋无菌水
XW	悬菌液	悬菌液＋无菌水
SW	上清液	上清液＋无菌水

1.3.5 感官评价

将烟叶样品卷制成100 mm×45 mm的单料烟支，随后平衡烟支水分至（13±1）%，烟叶感官评价包含香气量、丰富度、成熟度、刺激性、绵柔感、细腻度、甜润度、干净度、回味感、燃烧性、灰色、凝灰度12个指标[13]，各指标由低到高得分依次为1～9分，由专业评吸人员组成评价小组进行评价。

1.4 数据处理

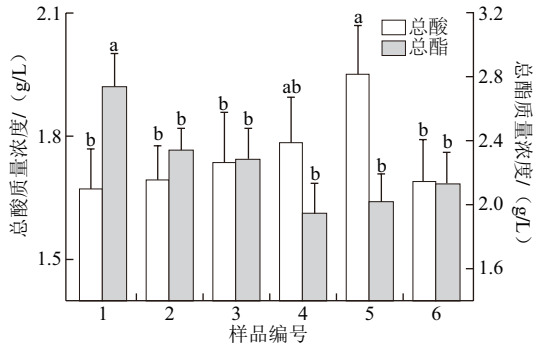
所有实验均重复3次，数据以$\bar{x}\pm s$表示。组间差异显著性经单因素方差分析及Duncan多重范围检验判定

（$P<0.05$认为差异显著），采用ImageGP在线平台绘图。

2　结果与分析

2.1　浓香型白酒总酸及总酯含量分析

总酸与总酯作为浓香型白酒品质的核心指标，其含量及动态平衡直接决定了酒体风味的协调性与香型特征。由图1可得，6款浓香型白酒的总酸（1.67～1.95 g/L）与总酯（1.95～2.73 g/L）质量浓度均符合GB/T 10781.1—2021《白酒质量要求 第1部分：浓香型白酒》要求[14]，其中5号样品的高酸特性（1.95 g/L）可能源于发酵过程中乳酸菌的代谢优势，而1号样品的高酯特性（2.73 g/L）则反映了其酯化反应效率或窖泥功能菌群的协同作用[15-16]。



小写字母不同表示差异显著（$P<0.05$）。

图1　6款浓香型白酒样品中总酸及总酯含量
Fig. 1　Total acids and esters contents in six types of strong-flavor Baijiu samples

浓香型白酒中丰富的酯类物质（如乙酸乙酯、己酸乙酯等）可通过乙醇挥发迁移至雪茄烟叶微环境；同时，白酒中的有机酸（如乙酸、乳酸）及乙醇可在酯酶作用下进一步合成新酯类物质。因此，可以设计以白酒作为发酵介质进行雪茄烟叶发酵。

2.2　浓香型白酒酯类物质组成分析

由图2可知，1～6号浓香型白酒样品中共检测出酯类物质分别为47、47、40、30、44种及41种。其中1号与2号样品的酯类组成多样性及相对丰度显著优于其他样品。1号样品总酯含量最高，其酯类组成以乙酸乙酯、己酸乙酯、乳酸乙酯为核心骨架，同时富含庚酸乙酯、己酸己酯、己酸丁酯等中长链酯类，以及微量特征酯如3-甲基戊酸乙酯（坚果香）、十六烷酸乙酯（蜡质香）等，形成多层次香气协同效应[17]。

1号样品高总酯质量浓度（2.73 g/L）及丰富的酯类种类（47种）可提供充足底物，从而强化雪茄后熟风味的丰富度；并且1号样品中己酸乙酯、己酸异戊酯等支链酯的高占比可能通过疏水相互作用增强酯类在烟叶脂质层的渗透效率，促进风味物质与烟叶基质的结合[18]。因此，选择1号白酒样品用于雪茄烟叶发酵。

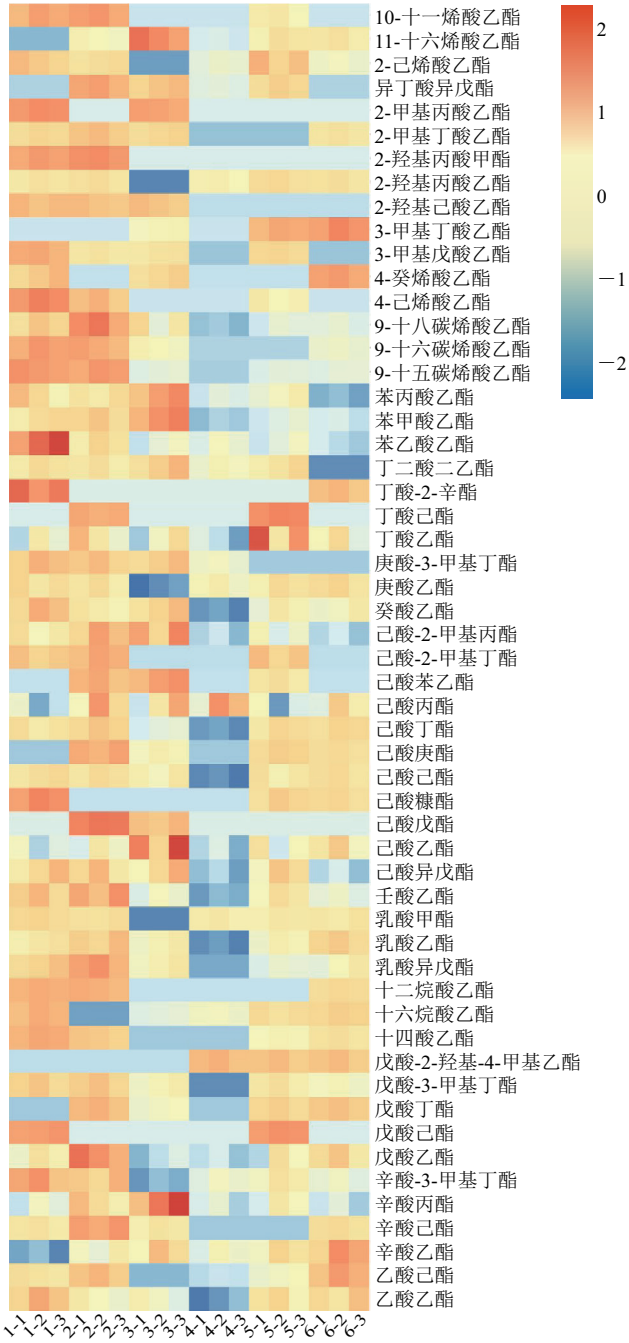


图2　6款浓香型白酒样品中酯类物质聚类分析热图
Fig. 2　Heatmaps of clustering analysis of ester substances in six types of strong-flavor Baijiu samples

2.3　酿酒酵母发酵液与白酒发酵对雪茄烟叶酯类合成的影响

聚焦酿酒酵母发酵液及白酒对雪茄烟叶酯类物质合成的动态影响，对比不同发酵介质（无菌水组、酿酒酵母发酵液组、白酒组）及发酵第1阶段（7 d）、第2阶段（1 d）所制得雪茄烟叶中醇、酸、酯类物质的含量，结

果见图3。K组因缺乏功能性介质，发酵后酸、醇、酯类物质总量较R组出现降低趋势。Z组与BJ组在第1阶段发酵后，尽管在发酵初期外源添加了高活性微生物以及高浓度白酒，其酸类、醇类、酯类总量仍与原烟无显著差异（$P>0.05$）。这一现象归因于酸类、醇类、酯类等低沸点物质在长周期发酵中的易挥发。



K1、Z1、BJ1.第1阶段样品，K2、Z2、BJ2.第2阶段样品。

图 3　不同发酵介质及发酵阶段雪茄烟叶的酸类、醇类及酯类物质含量聚类分析热图

Fig. 3　Heatmaps of clustering analysis of acid, alcohol and ester contents in cigar tobacco leaves at different fermentation media and stages

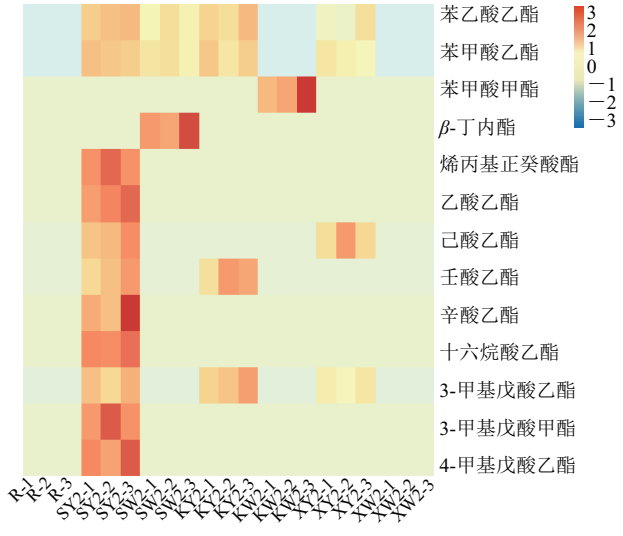
在第2阶段发酵后，相比于原烟，2类处理组均实现关键风味物质的显著富集：BJ2组雪茄烟叶中酸类、醇类、酯类物质含量分别为0.058 μmol/g（3种）、0.113 μmol/g（7种）以及0.033 μmol/g（15种），其中己酸、正丁醇、己酸乙酯等含量显著增加（$P<0.05$）；Z2组雪茄烟叶中酸类、醇类、酯类物质含量分别为0.013 μmol/g（1种）、0.020 μmol/g（7种）以及0.007 μmol/g（10种），与白酒组不同，发酵液组中γ-巴豆酰内酯、苯乙酸乙酯、丙酸呋喃甲酯、亚油酸乙酯的含量显著增加（$P<0.05$）。这一差异揭示了2种介质的潜在作用路径：白酒主要通过化学迁移-吸附机制，其高含量酯类（如己酸乙酯、乙酸乙酯）借助乙醇挥发形成气态载体，穿透烟叶蜡质层后通过疏水相互作用锚定脂质基质；而酿酒酵母发酵液则可能依赖微生物-烟叶跨界互作，活性酵母分泌的酯酶催化烟叶内源或外源添加脂肪酸与乙醇的酯化反应，同时可能激活烟叶附生菌群（如乳酸菌）的代谢网络，形成酯类合成正反馈[19]。值得注意的是，介质短周期的应用有效抑制了挥发损失，并可能通过提高微环境蒸汽压（依据亨利定律）延缓酯类逸散[20-21]。

白酒组与发酵液组均可在短期内促进雪茄烟叶中酸、醇及酯类物质的积累，但此类风味物质普遍易挥发，仅通过外源添加风味物质至烟叶表面的方式缺乏可持续性。与白酒组相比，发酵液组含有以酯酶为代表的多酶体系，后期具有持续催化酯类合成的潜力。此外，白酒中高含量乙醇可能抑制雪茄原有微生物群落的代谢活性，且采用白酒处理相比酵母发酵液成本更高，选择酿酒酵母更具经济性优势。因此继续以酿酒酵母发酵液为主进行后续研究。

2.4　酿酒酵母发酵液不同组分外加乙醇对雪茄烟叶酯类合成的影响

单纯采用白酒或酿酒酵母发酵液发酵雪茄烟叶时，虽能提高酯类物质含量，但效果并不显著，主要源于酸、醇类前体的挥发性逸散及内源酯酶活性不足。为加强酿酒酵母在雪茄酯类风味中的调控作用，进一步探究其在雪茄烟叶发酵中合成酯类的具体路径，基于雪茄烟叶富含脂肪酸的特性[22-23]，比较酿酒酵母发酵液不同组分及外加乙醇发酵雪茄烟叶第2阶段的酯类物质含量变化，结果见图4。

由图4可知，相较于KW、XW、SW组，KY、XY、SY组乙酸乙酯、己酸乙酯、苯乙酸乙酯、苯甲酸乙酯、3-甲基戊酸乙酯在内的酯类物质含量显著提升。在外加乙醇的3组中，与KY、XY组相比，SY组酯类物质的种类及含量都有显著提升，其中乙酸乙酯（0.002 5 μmol/g）、十六酸乙酯（0.002 5 μmol/g）、苯乙酸乙酯（0.000 5 μmol/g）、己酸乙酯（0.000 04 μmol/g）、苯酸乙酯（0.000 3 μmol/g）等乙酯类物质浓度显著增加。未添加乙醇的组别受限于底物供给，发酵后酯类物质的积累水平虽较R组有提升，但与乙醇添加组相比，其含量明显偏低。上述结果进一步验证猜测，这种现象可能是因为酿酒酵母菌体组胞内酯酶释放受限，无法有效催化反应，而上清液组通过外源补充酯酶（发酵液中产生大量酯酶）及乙醇，显著改善酯化效率。



SY2、SW2、KY2、KW2、XY2、XW2.第2阶段样品。下同。

图 4　不同介质及发酵阶段下雪茄烟叶中酯类物质含量聚类分析热图
Fig. 4　Heatmaps of clustering analysis of ester contents in cigar tobacco leaves under different media and fermentation stages

综上，上清液-乙醇发酵组的酯类物质合成优势可能源于以下协同机制：1）酶活性补充：上清液含游离酯酶，直接催化烟叶脂肪酸与乙醇的酯化反应；2）挥发性抑制：乙醇添加通过提高微环境蒸汽压，减少低沸点酯类（如乙酸乙酯）的逸散损失；3）底物迁移强化：乙醇作为共溶剂促进脂肪酸从烟叶脂质层向反应界面迁移。此外，长链酯类（如十六酸乙酯）因疏水作用优先吸附于烟叶蜡质层，保留率较高，形成长效风味锚定。尽管上清液-乙醇策略显著提升酯类合成，其长期稳定性仍受限于非酶促水解及物理逸散因素影响。此外，菌体组因细胞膜屏障导致酶利用效率低下[24]，而上清液的大规模制备成本较高。上述结果表明，当前工艺需进一步优化酶稳定性及底物控释技术，以实现酯类合成的高效性与持久性平衡。未来研究可结合分子模拟与代谢追踪，明确限速步骤并设计定向调控策略。

2.5　酿酒酵母发酵对雪茄烟叶非酯类风味轮廓的影响

为探究酿酒酵母是否会对雪茄烟叶重要非酯类香气物质造成影响，分析KY组、SY组以及R组中非酯类风味物质的代谢差异，结果见图5。由图5A可知，PC1方差贡献率为45.8%，PC2方差贡献率为30.8%，总方差贡献率达到76.6%，说明模型可靠，可反映大部分数据信息。3组样品

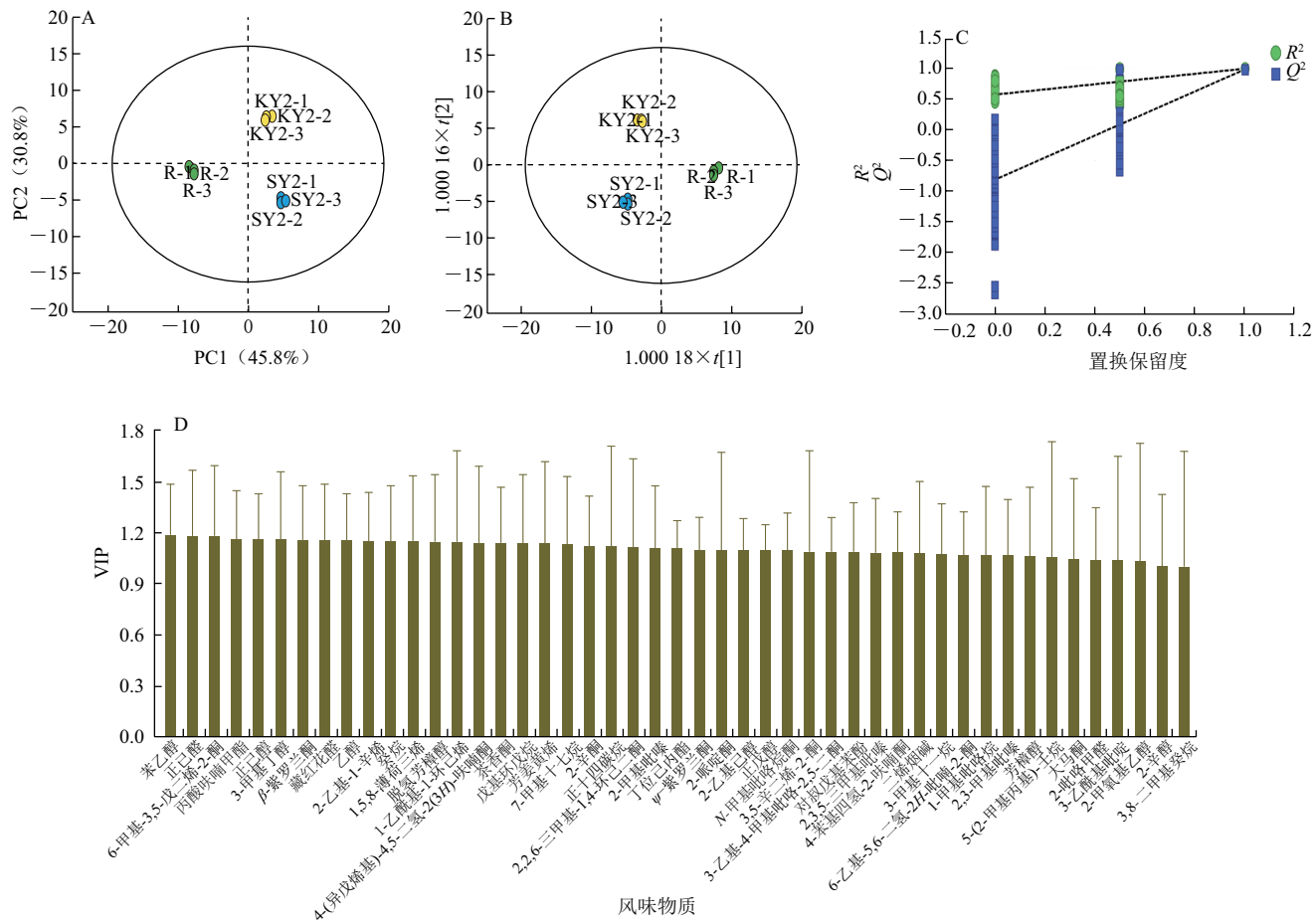


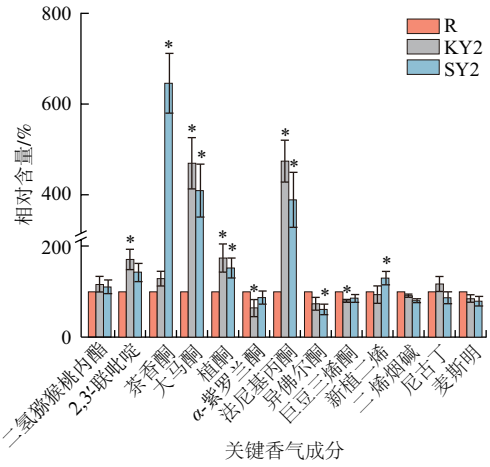
图5　不同介质发酵雪茄烟叶非酯类风味物质的PCA（A）、OPLS-DA（B）、200次置换检验结果（C）及VIP值（D）
Fig. 5　PCA score plot (A), OPLS-DA score plot (B), 200-permutation test (C), and VIP values (D) of non-ester flavor substances in cigar tobacco leaves fermented with different media

在图中呈现明显分离趋势：原烟组集中于PC1负半轴，而KY和SY组沿PC1正半轴分布，且两者在PC2方向进一步分离，表明3组不同的发酵介质显著重构了烟叶的非酯类风味物质。进一步构建OPLS-DA模型，由图5B可知，模型的自变量解释能力（R_X^2）为0.766，因变量解释能力（R_Y^2）为0.997，预测能力（Q^2）为0.978，表明该模型具有较好的准确性和预测能力，3组样品组内聚集，组间实现完全分离，说明不同介质发酵雪茄烟叶的非酯类风味物质存在明显差异。由图5C可知，200次置换检验结果左侧的R^2和Q^2值均低于右侧，且R^2截距为0.575，Q^2截距为−0.809，说明该OPLS-DA模型未发生过拟合。由图5D可知，通过VIP＞1筛选出包括苯乙醇、正己醛、6-甲基-3,5-戊二烯-2-酮等47种非酯类差异挥发性风味物质。

进一步研究KY、SY组以及原烟R组中非酯类风味物质的代谢差异，对比二氢猕猴桃内酯、巨豆三烯酮等烟叶中重要香气成分[25]的含量，各组相对R组的含量结果见图6。SY组中茶香酮、大马酮、植酮、法尼基丙酮和新植二烯5种关键香气成分的相对含量显著高于R组（P＜0.05），特别是茶香酮相对含量较原烟组显著提升，增幅达539.59%，推测其可能与酵母分泌的β-葡萄糖苷酶活性增强有关，该酶可水解糖苷键释放结合态萜烯前体（如芳樟醇氧化物），进而通过氧化重排途径生成茶香酮[26]。对比二氢猕猴桃内酯、巨豆三烯酮及尼古丁等，它们在组间未呈现显著变化（P＞0.05），表明酿酒酵母上清液的引入未干扰雪茄烟叶原有萜烯、生物碱类物质的代谢稳态。进一步结合前期酯类物质分析结果，本研究揭示了酿酒酵母上清液发酵的独特作用模式：一方面，其通过胞外酶系（如酯酶、糖苷水解酶）选择性激活酯类合成及特定萜烯转化路径（如茶香酮生成）；另一方面，对巨豆三烯酮（茄酮降解产物）、尼古丁（烟碱代谢标志物）等关键香气成分的代谢网络无明显扰动，从而在维持雪茄本体香韵的基础上实现香气修饰。这一发现凸显了酿酒酵母上清液作为发酵助剂的工艺优势——既能定向增强特定香型（如酯类花果香、茶香酮的木香底蕴），又可避免因过度代谢干预导致的原有风味损失。研究成果不仅揭示了微生物发酵对非酯类风味代谢网络的调控机制，还为开发低危害、高香质雪茄产品提供了理论依据和技术路径，后续需结合气相色谱-嗅闻分析明确关键气味活性物质以完善风味评价体系[27]。

2.6 不同介质发酵雪茄烟叶感官评价

参照感官评价标准对SY、R、K组和BJ组发酵雪茄烟叶进行感官评价，结果见图7。SY组香气量、成熟度、绵柔感、甜润度、干净度均为最佳，较原烟R组分别提升13%、20%、13%、9%、15%，说明酿酒酵母发酵上清液协同乙醇发酵对雪茄烟叶感官质量的提升效果最佳。



*.与R组相比，差异显著（P＜0.05）。

图 6 不同介质发酵雪茄烟叶中关键香气成分含量对比

Fig. 6 Comparison of key flavor compound contents in cigar tobacco leaves fermented with different media

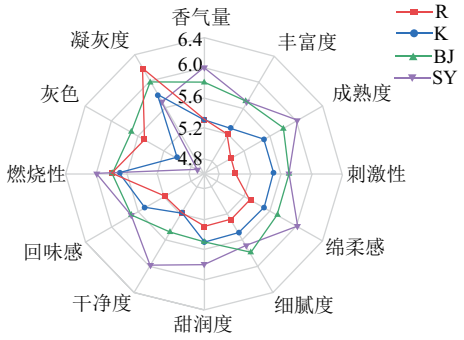


图 7 不同介质发酵雪茄烟叶感官评分雷达图

Fig. 7 Radar map of sensory score of cigar tobacco leaves fermented with different media

3 结 论

本研究通过多维度筛选（理化指标、风味组学）确定最优白酒发酵介质（1号样品，总酯质量浓度为2.73 g/L），并创新性融合微生物（酿酒酵母）上清液与化学介质（乙醇）构建协同发酵体系，聚焦外源微生物代谢产物及化学介质对雪茄烟叶酯类物质合成的协同作用，揭示了“酶-底物-环境”三元互作的潜在作用机制。结果表明，无细胞上清液因富含酯酶及有机酸，结合乙醇添加可突破烟叶内源底物（乙醇）不足的限制，显著提升雪茄烟叶中酯类物质多样性及含量，且长链酯类（如十六酸乙酯）因疏水作用选择性保留。然而，苯酸乙酯（0.000 3 μmol/g）和苯乙酸乙酯（0.000 5 μmol/g）等含量依旧较低，这也表明酯类物质的动态逸散与水解问题制约工艺长效性，需通过跨学科技术（如纳米载体固定化、智能环境监控）实现稳定增效。感官评价显示酿酒酵母发酵上清液-乙醇协同发酵组雪茄烟叶的香气量、成熟度、甜润度、绵

柔感、干净度等指标明显提升，较未发酵原烟组分别提升13%、20%、13%、9%、15%。研究成果为烟草后熟工艺的绿色升级提供了新思路，同时为食品风味工程领域的酶促反应调控研究提供了参考范式。

参考文献：

[1] 胡婉蓉, 蔡文, 郑召君, 等. 发酵介质和发酵过程对雪茄烟叶品质的影响[J]. 烟草科技, 2023, 56(2): 41-52.

[2] 成瑜. 酿酒酵母对初烤上部烟叶微生物群落及品质的影响[D]. 贵阳: 贵州大学, 2023.

[3] 杜飞. 烟用酒香型发酵料液研制[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021.

[4] 张晨, 许赣荣, 严新龙, 等. 利用酿酒酵母改进烟草萃取液的香气特性[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 137-141.

[5] 马琛瑜, 陈森林, 彭琛, 等. 添加有机酸协同酿酒酵母发酵改善上部烟叶品质研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2022, 37(4): 630-637.

[6] 齐晓娜. 基于烟草浸提液的活性生物制剂制备及应用研究[D]. 郑州: 郑州轻工业大学, 2022.

[7] XU L, ZANG E, SUN S, et al. Main flavor compounds and molecular regulation mechanisms in fruits and vegetables[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023, 63(33): 11859-11879.

[8] CHEN C, ZHENG Z, WANG Y, et al. Function-driven high-throughput screening and isolation of ester-producing strains for glutinous rice wine fermentation[J]. Food Rese Int, 2025, 199: 115193.

[9] LIU J, CHEN Y, FU G, et al. Improvement of the flavor of major ethyl ester compounds during Chinese Te-flavor Baijiu brewing by *Wickerhamomyces anomalus*[J]. Food Biosci, 2022, 50: 102022.

[10] WU X Y, ZHU P C, LI D L, et al. Bioaugmentation of *Bacillus amyloliquefaciens-Bacillus kochii* co-cultivation to improve sensory quality of flue-cured tobacco[J]. Arch Microbiol, 2021, 203(9): 5723-5733.

[11] 胡婉蓉, 李东亮, 刘路路, 等. 一种提高雪茄烟叶甜润感的发酵方法: CN202410105830.4[P]. 2025-12-26.

[12] 马琛瑜. 添加有机酸对微生物发酵上部烟叶品质的影响及贮藏工艺研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2022.

[13] 吕晋雄, 安鸿汐, 刘路路, 等. 国产雪茄烟叶原料感官品质评价方法的建立与应用[J]. 轻工学报, 2024, 39(4): 64-71; 79.

[14] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 白酒质量要求第1部分: 浓香型白酒: GB/T 10781.1—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.

[15] YAN S, JIA Y, ZHANG Q, et al. Bacterial diversity associated with volatile compound accumulation in pit mud of Chinese strong-flavor Baijiu pit[J]. AMB Express, 2023, 13(1): 1-13.

[16] NING X, LAN L, LI H, et al. Research progress on quality evaluation of strong-flavor Baijiu pit mud[J]. J Food Compos Anal, 2025, 137: 106889.

[17] 田文静, 武亚帅, 王硕, 等. 多元化学计量学结合分子感官组学探究长链脂肪酸乙酯对不同白酒馏段品质的影响[J]. 中国酿造, 2024, 43(12): 116-123.

[18] SHAHBAZI S, NATEGHI L, AGHABABYAN A. Effect of fatty acids on hydrophobicity of the cell membrane of *Lactobacillus* species[J]. Appl Food Biotechnol , 2016, 3(3): 194-200.

[19] PRADAL L, WECKX S, VUYST L. The production of esters by specific sourdough lactic acid bacteria species is limited by the precursor concentrations[J]. Appl Environ Microbiol, 2025, 91(3): e0221624.

[20] WU S, KIM E, VETHANAYAGAM D, et al. Indoor partitioning and potential thirdhand exposure to carbonyl flavoring agents added in e-cigarettes and hookah tobacco[J]. Environ Sci: Proc Impacts, 2022, 24(12): 2294-2309.

[21] STRAVER E, LOOS T. Determination of henry's law constants and activity coefficients at infinite dilution of flavor compounds in water at 298 K with a gas-chromatographic method[J]. J Chem Eng Data, 2005, 50(4): 1171-1176.

[22] 杜佳, 徐世杰, 徐丽芬, 等. 海南茄衣人工发酵过程中非挥发性有机酸的变化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(6): 83-88.

[23] 朱玲, 郑健, 杨涓, 等. 微波辅助甲酯化-快速GC法测定烟草中的多元酸和高级脂肪酸[J]. 烟草科技, 2015, 45(9): 56-61; 74.

[24] YADAV B, ROOPESH M. In-package atmospheric cold plasma treatment and storage effects on membrane integrity, oxidative stress, and esterase activity of *Listeria monocytogenes*[J]. Microorganisms, 2023, 11(3): 682.

[25] 钟仙韵, 叶为民, 陈群明, 等. 雪茄烟叶发酵及其与风味形成关系研究进展[J]. 中国酿造, 2024, 43(6): 27-31.

[26] 覃秋杏, 韩小雨, 黄卫东, 等. 非酿酒酵母产生的β-葡萄糖苷酶在发酵酒中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(3): 3306-3314.

[27] 李培, 倪斌, 郑佳, 等. 色谱技术在中国白酒风味物质检测中的研究进展[J]. 中国酿造, 2024, 43(7): 14-20.