



## 烟叶真菌感染的早期检测

### 简介

分析仪器的主要作用就是成为一种公平公正的产品质量控制工具，以满足政府制定的法律法规测定需求并在使用过程中使客户体验达到最好的效果。

要想获得优质的烟叶，农场需要有一套包括稳定存储条件在内的严格质量控制体系，若不对温度和湿度加以控制，像真菌污染的问题便会发生，进而影响烟叶的后续加工。从烟叶收获到香烟分销的整个产业链，烟叶是否存在真菌感染是早期质量检测关键环节。

G.A.S研发的FlavourSpec是一款高灵敏度与选择性的分析系统，可用在与烟叶真菌感染相关的质量控制分析中。

## 实验条件

表1: GC条件

色谱柱	FS-SE-54-CB-0.5 15m ID:0.53mm
温度	50 °C (恒温)
流速程序设置20分钟	直线控流 5 → 100 ml/min
载气	N <sub>2</sub>

表2: IMS条件

放射源	氚
温度	45 °C
流速	150 ml/min
载气	N <sub>2</sub>
模式	正离子模式

表3: 自动进样器条件

孵化状态	无
进样量	1 mL (无分流顶空进样)
进样针温度	80 °C
进样速度	0.5 ml/s

表4: 样品信息

样品	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 巴西烟叶---暗处晾干的烟叶</li> <li>2. 印度烟叶---阳光下晒干的烟叶</li> <li>3. 巴西烟叶---弗吉尼亚州烘干的烟叶</li> <li>4. 马拉维--伯莱芋叶（一种烟草的名称）</li> </ol>
样品制备	称取每种烟叶1g于20ml顶空进样瓶中，为对烟叶进行培养真菌，每种烟叶均被打湿(水份含量10% w/w)

Samples as-is



图1: 取少量的烟叶直接置于顶空进样瓶中，无需进一步的样品前处理

## 前言

烟草行业的价值所在是保证原材料（干烟叶）的质量。影响烟草原材料中一个最主要的因素是微生物或真菌引起的感染。如生物化学展示，烟叶的真菌感染在早期阶段几乎是看不出来的，然而后期人眼就可直接看出感染症状。为证明后者无需其他复杂的仪器：由专家的检查支持将从非感染批次分离烟叶样的任务。然而存在潜在感染的问题并不是容易回答的，也不是症状明显可见的。

对于生产企业而言必须快速的决定将可靠的原料投入到下一批生产中，数种MVOCs的存在表明样品已经被微生物污染，研究表明挥发性有机物是由烟草样本中的真菌产生（s.表1），Fiedler等人在不同的基质中培养出12种不同的真菌物质，随后用固相微萃取处理后对样品顶空进样分析，识别出150种挥发性有机物。每种被分析的真菌物质基于外部因素如使用的基质不同所释放的微生物挥发性有机物不同，但几乎所有的物种均会产生以下物质，我们将这些物质视为潜在的真菌标记物：

- 1-烯-3辛醇
- 2-甲基-1-丁醇
- 3-甲基-1-丁醇

表5：常规真菌物种中存在的潜在MVOC标识物<sup>1,2</sup>

潜在MVOC标记物
2-己酮
3-甲基-1-丁醇
2-戊酮
2-丁酮
2-甲基-1-丁醇
1-烯-3-辛醇
2-庚酮
2-烯-1-己醇

## 结论

首先将表5中列出的真菌标记物用标准物质分析后加入到G.A.S的GCxIMS数据库中，之后通过G.A.S提供的GCxIMS数据库搜索软件可快速便捷的识别未知样品中的这些化合物。

为方便诱导真菌生长，称取1g烟叶（表4），用10% w/w的水湿润放置，10天后可见菌丝长出（图2）



图2：湿润后的样品经10天孵育后，长出的菌丝清晰可见（红圈标记出）

[1] Meruva NK, Penn JM, Farthing DE. J Ind Microbiol Biotechnol. 2004;31(10):482-488

[2] Kaminski E, Stawicki S, Wasowicz E. Appl Microbiol. 1974;27(6):1001-1004

[3] Fiedler K, Schütz E, Geh S, International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2001;204(2-3):111-121

[4] Shannon U. Morath, Richard Hung, Joan W. Bennett. Fungal Biology Reviews, 2012;26(2-3):73-83

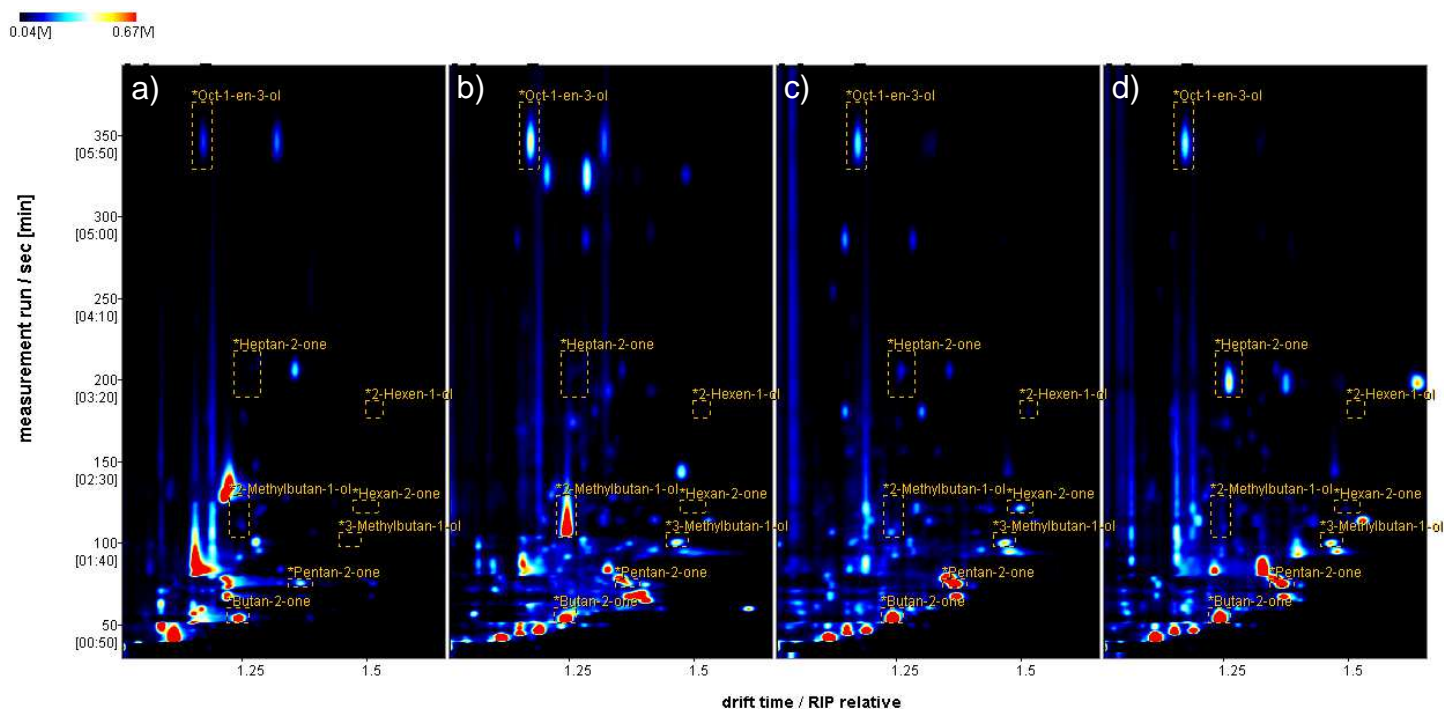


图3: GC-IMS顶空分析烟叶的色谱图, 潜在的菌类标记物清晰可见 (黄色虚线方框内). (a). 巴西烟叶---暗处晾干的烟叶, (b). 印度烟叶---阳光下晒干的烟叶, (c). 巴西烟叶---弗吉尼亚州烘干的烟叶, (d). 马拉维--伯莱芋叶

烟叶样品通过G.A.S的FlavourSpec进行测试, 整个实验时间仅需7分钟, 获得的二维GC-IMS谱图可以清楚的看出每种烟叶中复杂的指纹峰(图3) 这些指纹峰表示烟叶顶空分析中的各种组分。

为方便找到代表烟叶霉变的信号峰, 我们通过手工标记多个观察到的指纹信号峰 (图3: 用虚线方框标出)。

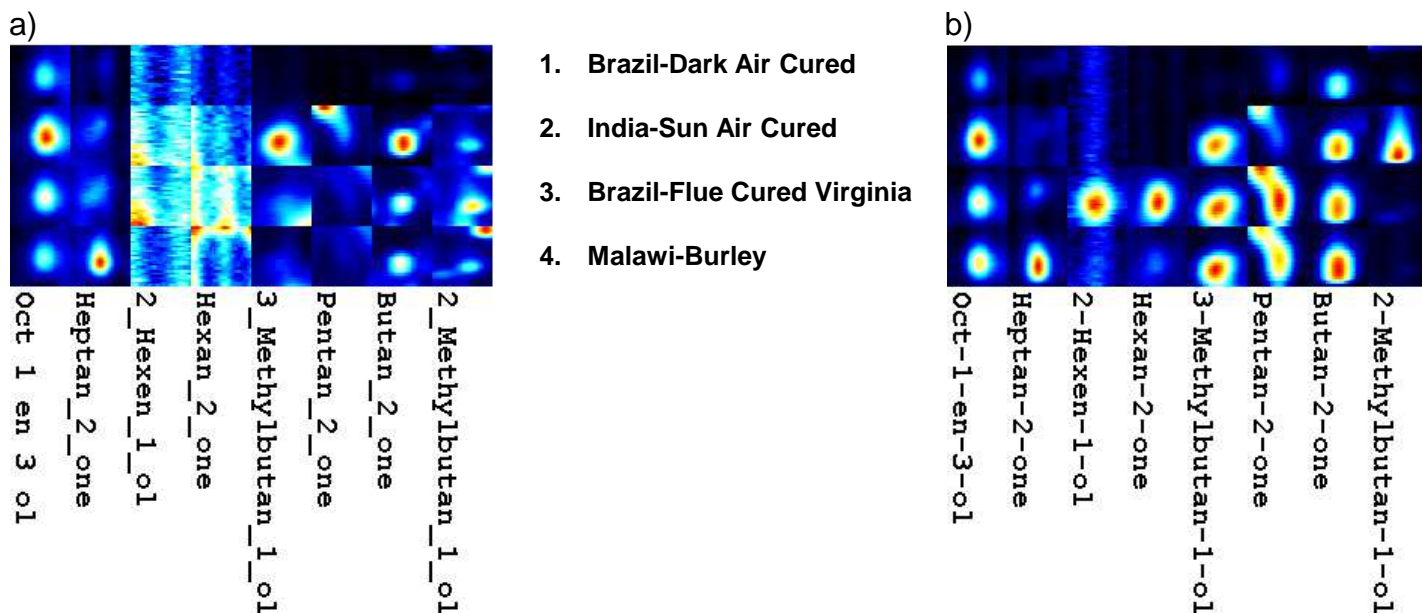


图4: 潮湿的烟叶经1天 (a) 和10天 (b) 培养后潜在真菌标记物的集锦图

从图4b可以得知，并不是每一种真菌标记物均存在于四种烟叶中，经潮湿培养的烟叶中检测到潜在的真菌标记物，经过10天的培养后仅有1-烯-3-辛醇和2-丁酮出现在每种样品中。原因可能为真菌物种根据其所在的基质及其他外部环境的不同会产生不同的化合物。在培养一天后各种烟叶均存在真菌标记物（图4a）。

此外，经图谱还会发现很多未被定性的信号峰，这些信号峰也只在样品培养后才出现，这些信号峰的出现亦可表明烟叶发生了潮湿培养。

## 总结

使用G.A.S生产的FlavourSpec，我们建立了一种无需样品前处理通过顶空进样的方式即可快速分析烟叶的方法。此外我们将多种MVOCs作为真菌侵袭的标记物加入到GC-IMS数据库中，用于检测未知样品真菌感染的鉴定。通过顶空分析各种烟草均可分析出多种挥发性有机物组分，根据真菌标记物的出现可快速鉴别被感染的烟叶。

在感染初期，人类的感官虽不能发现这些感染样品，仪器却能检测出样品中真菌标记物的存在。

仪器不仅可以检测出真菌标记物，经潮湿培养后出现或消失的信号峰亦可检测出来，故该仪器可用于与烟叶质量控制相关的分析中。



图5: G.A.S生产的FlavourSpec 经气相色谱和离子迁移谱的二维分离后，离子迁移谱同时作为检测器使用，内置孵化振荡器及自动进样器使得实验过程快速简便。

## 相关信息

有关此应用程序的更多信息材料，请单击下面的链接：

- [FlavourSpec](#)
- [实验室分析软件\(LAV\)](#)
- [GCxIMS库搜索软件](#)