

米其利,杨 娟,徐玉琼,等. 植物乳杆菌对卷烟品质的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(2):177-181.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.02.045

植物乳杆菌对卷烟品质的影响

米其利¹, 杨 娟², 徐玉琼¹, 刘 彪¹, 向 明¹, 天建华¹, 罗义勇²

(1. 云南中烟工业有限责任公司技术中心, 云南昆明 650106; 2. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南昆明 650500)

摘要:为了提升烟叶品质,从中国传统发酵食品酸萝卜中分离筛选到 1 株植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) L15。将菌体悬液发酵烟丝以及对发酵产香条件进行优化,感官评吸结果表明,L15 处理能有效提升烟叶的香气,降低卷烟的杂气、苦辣味和刺激性,改善余味,突显酸香味;最佳产香条件为:接菌量 1×10^9 CFU/mL、发酵温度 37 ℃、菌龄 20 h,烟叶产地贵州福泉。发酵后烟丝主要化学成分比例更加平衡。致香成分分析表明,L15 发酵使化合物数量从 46 个减少至 42 个,含量变化较大的化合物有乙酸、3-甲基丁醛和 2-己酮。表明植物乳杆菌 L15 能有效改善烟叶的内在质量,提升卷烟抽吸品质。

关键词:植物乳杆菌;陈化;卷烟品质;致香成分

中图分类号: TS44⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)02-0177-04

烟叶陈化是在一定温度和湿度条件下,烟叶理化特性发生深刻变化,烟叶香气、色泽和吸味品质明显改善的一个重要卷烟生产加工过程。烟叶陈化分为自然陈化和人工陈化。人工陈化速度快,但发酵后烟叶内各种成分比例不协调,至今已经很少采用。自然陈化发酵效果好,但耗时长,场地占用大,资金积压多,导致生产成本提高。在烟叶的陈化过程中,微生物扮演着重要角色。Reid 等率先发现,雪茄烟叶表面存在大量细菌、霉菌^[1]。朱大恒等从中国烤烟烟叶中成功分离到大量微生物,包括占绝对优势的细菌、少量放线菌和真菌^[2]。目前,随着高通量测序技术应用于烟草行业,陈化烟叶表面更多微生物种类得到了鉴定^[3-4]。

烟叶表面存在的复杂微生物群落不仅可以加速烟叶发酵,还可以降低烟叶中有害成分,如烟碱、亚硝酸盐等^[5-6],以及改善和提高烟叶的吸食品质^[7-9],所以在烟叶陈化过程中添加外源微生物进行发酵,以便快速改善烟叶品质是烟草科技开发的重要课题。Izquierdo 等在 19 世纪 60—70 年代发现,利用单种或多种微生物发酵烟叶,能使烟叶的香气质得到显著改善^[10-11]。黄静文等发现,经短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)发酵后的烟叶,烟香增加,刺激性降低,卷烟吸食味显著改善^[12]。陈兴等发现,西姆芽孢杆菌(*B. siamensis*)能有效改善烟叶内在质量,提升卷烟抽吸品质^[13]。此外,利用微生物发酵液改善烟叶品质和香气的报道较多。李雪梅等利用微生物菌株 Nic22 的发酵上清液处理烟叶,结果表明,处理后

卷烟的杂气和刺激性减轻,抽吸品质显著提高^[14]。

乳酸菌是公认的食品级安全微生物,广泛应用于酸奶、果汁、馒头等食品的风味塑造。目前,用于烟叶发酵的微生物大多分离自烟叶表面或土壤,有些是条件致病菌^[4],存在一定的安全隐患。食源性有益菌用于烟叶发酵的报道不多,而利用乳酸菌改善烟叶品质的报道较少。甄达文等在制备烟用香料时发现,烟叶碎片经酶处理以后,用德氏乳酸菌(*Lactobacillus debrueckii*)和生香酵母组合发酵制得的香料,增香效果明显^[15]。潘家华等研究表明,由植物乳杆菌(*L. plantarum*)和醋酸杆菌(*Clostridium thermoacidophilus*)组成的复合微生物制剂发酵烟叶后,卷烟的陈化酸香和柔和细腻烟气均增加,刺激性降低,吸食口感变好^[16]。

本研究从中国传统发酵食品酸萝卜中筛选到 1 株植物乳杆菌,将其菌悬液用于烟叶发酵,优化其发酵产香条件,并检测发酵对烟叶化学成分和致香成分的影响,为利用食品级乳酸菌改善烟叶品质,提升卷烟吸食质量及塑造新型风味卷烟等方面提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 烟叶 由云南中烟有限责任公司原料部提供,品种为 K326,在仓库中已自然陈化 1 年。

1.1.2 MRS 培养基 蛋白胨 10 g/L、牛肉粉 8 g/L、酵母粉 4 g/L、葡萄糖 20 g/L、吐温 80 1 mL/L、 K_2HPO_4 2 g/L、NaAc 5 g/L、 $MgSO_4$ 0.2 g/L、 $MnSO_4$ 0.5 g/L、柠檬酸三铵 2 g/L,pH 值 6.2,灭菌条件为 115 ℃,20 min。如需配成固体,在液体培养基中添加 15 g/L 琼脂。

1.1.3 改良 MRS 固体培养基 MRS 液体培养基中添加 10 g/L $CaCO_3$ 、0.4 g/L 溴甲酚紫和 15 g/L 琼脂。

1.1.4 烟叶培养基 将 1 年陈化龄烟叶研磨成粉末,在 100 mL 培养基中加入 0.8 g 烟叶粉末和 1.5 g 琼脂,115 ℃高压蒸汽灭菌 20 min,用于筛选以烟叶为唯一营养源的乳酸菌。

收稿日期:2017-10-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31300068);云南省烟草化学重点实验室开放基金(编号:fw32104132-4)。

作者简介:米其利(1981—),女,山东费县人,博士研究生,助理研究员,从事烟草微生物资源与应用研究。E-mail: miqiliyn@126.com。

通信作者:天建华,博士,研究员,从事烟草微生物资源与应用研究,E-mail: jhyao_2007@126.com;罗义勇,博士,副教授,从事功能性食品微生物发掘与应用研究,E-mail: yyongluo168@163.com。

1.2 试验方法

1.2.1 乳酸菌的分离与鉴定 从湖南怀化采集酸萝卜样品若干份,利用改良 MRS 固体培养基筛选乳酸菌,单菌落保存在-80℃冰箱中。随机选取 6 株乳酸菌,在烟叶培养基中划线分离,37℃培养 48 h。将长势最好的 1 株乳酸菌在 MRS 固体培养基中培养 48 h,观察菌落形态,并按照常规细菌鉴定方法^[17]进行生理生化特性分析。利用细菌基因组提取试剂盒(百泰克,中国)提取 L15 基因组 DNA,用 16S rDNA 通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTACCTTGTACGACTT-3')扩增 L15 16S rDNA 基因,并送往昆明硕擎生物技术有限公司进行测序。PCR 扩增条件为:94℃ 4 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 90 s,32 个循环;72℃ 6 min。序列信息提交至 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行在线比对分析。综合形态、生理生化和分子鉴定结果确定菌株身份。

1.2.2 菌株生长曲线和产酸曲线 从-80℃冰箱中取出菌株保藏液,按 0.4% (体积比)接种至 5 mL MRS 液体培养基中进行活化。活化好的菌液按 0.4% (体积比)接种于 100 mL MRS 液体培养基中,30℃静止培养 40 h。每隔 2 h 取 4 mL 菌液,用于 $D_{600\text{ nm}}$ 、pH 值测定和活菌数分析。试验重复 3 次。

1.2.3 烟丝发酵和发酵条件优化 用切丝机将烟叶切成烟丝,称取含水率为 12% 的烟丝 30 g,喷施 6 mL 浓度为 1.0×10^9 CFU/mL、菌龄为 20 h 的乳酸菌菌悬液,对照样品喷施等量无菌水。将处理后的烟丝和对照装入无菌食品袋中,于温度为 37℃、60% 恒温恒湿培养箱中发酵 7 d。然后,将烟丝制成卷烟,用于后续感官评吸。为获得最佳发酵条件,基于感官评吸,通过正交试验进行优化。

1.2.4 感官评吸 将发酵卷烟和对照随机编号,在恒温恒湿培养箱中平衡 24 h 后,由 6 名专家进行评吸。卷烟感官质量用香气质、香气量、浓度、劲头、刺激性、余味、杂气量、燃烧性和灰色等 9 个指标进行评价,得分越高,抽吸品质越好。每个样品重复评吸 3 次。

1.2.5 主要常规化学成分测定 采用连续流动分析法,参考行业标准 YC/T 159—2002、YC/T 468—2013、YC/T 468—2013,分别测定总糖含量、还原糖含量、总氮含量、总植物碱含量。

1.2.6 挥发性成分分析 利用顶空-固相微萃取技术分离挥发性化合物,每次萃取的烟样为 0.5 g,温度为 60℃,时间为 40 min。气相色谱条件:色谱柱为 DB-WAXetr 型毛细管柱(60 m×0.25 mm,0.25 μm)(Agilent,美国);程序升温为初始温度 60℃,保持 5 min,第 1 阶升温速率 2℃/min,终温 200℃,第 2 阶升温速率 10℃/min,终温 240℃,保持 10 min;进样口温度 180℃;载气为高纯氦气;恒流模式,柱流量 1.5 mL/min,分流比 10:1。质谱条件:电离方式为电子轰击源;电离能量 70 eV;传输线温度 180℃;离子源温度 200℃;溶剂延迟 4 min;质量范围 33~400 amu。对采集到的质谱图利用 Wiley 和 NIST 谱库进行串联检索,确定化合物身份,并利用峰面积归一化法计算各化学成分在样品中的相对含量。

1.3 数据分析

采用 SPSS 22 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 乳酸菌筛选和鉴定

在改良 MRS 固体平板上,菌落颜色为乳白色或淡黄色,菌落周围有明显溶钙圈,溴甲酚紫变为黄色,这些单菌落初步确定为乳酸菌。在 6 株乳酸菌中,4 株能在烟叶固体培养基上生长,将长势最好 1 株命名为 L15,作为后续试验菌株。L15 菌落形态规则,淡黄色,表面光滑、边缘整齐;菌株显微形态为短杆状、无鞭毛。生理生化测定结果见表 1。分子生物学鉴定结果显示,L15 与 *L. plantarum* 16S rDNA 序列具有 >99% 同源性。形态、生理生化和分子鉴定结果表明,L15 为植物乳杆菌。

表 1 菌株 L15 生理生化反应鉴定结果

测试项目	测试结果
革兰氏染色	+
鞭毛染色	-
芽孢染色	-
葡萄糖产酸	+
过氧化氢酶活性	-
β-半乳糖苷酶	+
细胞色素氧化酶活性	-
V-P	-
明胶液化	-
柠檬酸盐利用	-
蔗糖利用	+
蜜二糖利用	-
阿拉伯糖利用	+
甘露醇利用	+
鼠李糖利用	-

注:-为阴性;+为阳性。

2.2 菌株 L15 生长和产酸特性

生长曲线分析显示,L15 从 4 h 进入对数生长期,在 18 h 进入稳定生长期,30 h 后菌落数和 $D_{600\text{ nm}}$ 值开始下降,推测其可能开始进入衰亡期(图 1)。产酸曲线分析发现,在最初接菌到对数生长初期 pH 值维持 6 左右,然后在对数期急剧下降,最后从对数生长期末期到衰亡期维持在 3.4~3.5(图 1),说明 L15 具有很强的产酸能力。

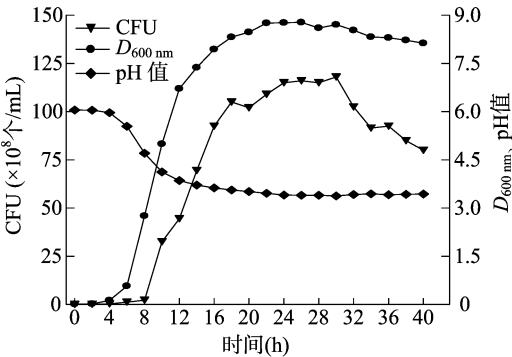


图1 菌株 L15 的生长和产酸曲线

2.3 感官评吸

按照试验方法所述进行感官评吸,试验结果,L15 处理能显著改善卷烟吸食品质,表现为对照样品的烟气质粗糙,杂气大,刺激感凸显,余味苦辣,化学味较强,而 L15 发酵卷烟的香

气质提升,烟气柔和,杂气、刺激性和苦辣味减轻,酸香味凸显,余味改善。在总评分为 50 分情况下,发酵卷烟的分值为 32.39 分,明显高于对照的 29.33 分。

2.4 产香发酵条件优化

基于感官评吸,对 L15 发酵条件进行优化。选取接菌量、发酵温度、菌龄、烟叶产地 4 个因素进行正交试验 [$L_8(3 \times 2^3)$](表 2)。正交试验结果见表 3。从表 3 可以看出,接菌量为 1×10^9 CFU/mL、发酵温度为 37 ℃、菌龄为 20 h、烟叶产地为贵州福泉时,发酵卷烟的感官评吸值最高,分别比未优化和对照高 0.42、3.48 分,表明 $A_2B_2C_2D_2$ 组合为 L15 的最适产香发酵条件。

表 2 L15 发酵条件正交试验因素水平

水平	因素			
	A:接菌量 (CFU/mL)	B:发酵温度 (℃)	C:菌龄 (h)	D:烟叶产地
1	1×10^8	30	10	云南保山
2	1×10^9	37	20	贵州福泉
3	1×10^{10}			

表 4 L15 处理对烟丝主要化学成分的影响

成分	总糖含量 (%)	还原糖含量 (%)	总氮含量 (%)	总植物碱含量 (%)	糖/氮	糖/总植物碱	氮/总植物碱
对照	21.38 ± 0.45	19.17 ± 0.34	2.12 ± 0.03	2.34 ± 0.06	10.11 ± 0.28	9.16 ± 0.32	0.91 ± 0.01
发酵烟丝	19.81 ± 0.57 **	18.23 ± 0.65 *	2.13 ± 0.02	2.30 ± 0.03	9.29 ± 0.33 **	8.63 ± 0.28 *	0.93 ± 0.01

注:“*、**”分别表示 L15 发酵烟丝与对照相比具有显著和极显著差异($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

化合物的种类来看,对照样品共鉴定出 46 个挥发性化合物,包括 4 个酸、13 个酮、9 个醛、8 个醇、2 个酯、2 个烯、2 个苯、2 个呋喃、4 个其他挥发性化合物,L15 发酵卷烟对应挥发性化合物数量分别为 5 个酸、14 个酮、9 个醛、6 个醇、1 个酯、烯和苯为 0、2 个呋喃和 5 个其他挥发性化合物。从化合物的含量来看,总酸、总醇和总酯含量增加,总醛、总酮、总烯、总苯和总呋喃含量减少;含量较多且变化很明显的化合物有乙酸、3-甲基丁醛和 2-己酮,其中乙酸含量增加了 18.5 百分点,3-甲基丁醛含量减少了 10.96 百分点,2-己酮从 7.33% 减少为 0。另外,有些化合物,例如丙酸、5-甲基呋喃醛、2-甲基呋喃等,它们的含量虽然较少,但处理与对照烟样间存在显著性差异。这些化合物的改变可能是 L15 改善烟叶吸食品质的主要原因。

3 讨论与结论

在烟叶陈化过程中,添加外源微生物进行发酵,能减轻卷烟杂气和刺激性,提高吃香味,改善烟叶品质^[9-11,17]。本研究结果,即植物乳杆菌 L15 发酵处理后的卷烟,香气质提升,烟气柔和,杂气、刺激性和苦辣味减弱,酸香味凸显,余味改善,说明植物乳杆菌能改善烟叶吸食品质。由于乳酸菌的安全性,利用乳酸菌塑造特征风格卷烟潜力巨大。

烟叶化学成分是卷烟吸食味的物质基础。微生物发酵会加速烟叶化学成分变化,缩短陈化时间。瞿娇娇等发现,食源性芽孢杆菌能明显改善烟叶品质,发酵处理后烟叶的总糖含量、糖氮比、糖碱比均下降^[18],本研究结果与其高度相似。由于乳酸菌是一类能利用可发酵碳水化合物产生大量乳酸的细菌,L15 处理造成总糖含量、总还原糖含量减低应该归因于

表 3 L15 发酵条件正交试验结果

试验号	A	B	C	D	评吸分值
1	3	2	1	2	32.49
2	2	2	2	2	32.81
3	2	1	1	1	31.04
4	1	1	2	2	32.75
5	1	2	1	1	31.79
6	3	2	2	1	31.67
7	3	1	2	1	32.50
8	3	1	1	2	31.85

2.5 烟丝主要常规化学成分分析

经 L15 处理后,烟丝中的总氮含量、总植物碱含量变化不明显,但总糖含量极显著降低,总还原糖含量显著减少,导致糖氮比由 10.11 降低至 9.29,糖碱比由 9.16 降低至 8.63(表 4)。

2.6 致香成分分析

从表 5 可以看出,L15 发酵卷烟致香成分的种类主要包括酸、酮、醛、醇等 4 个大类,它们的含量均超过了 10%。从

L15 发酵产酸。L15 发酵引起主要化合物含量的改变,可能使烟叶的糖、氮和碱等比值更趋于平衡,促进烟叶品质改善。

通过发酵,烟丝中致香物质种类由 46 个减少至 42 个,这些含量从无到有或有到无的化合物,除了 2-己酮外,含量均很少。发酵后烟丝的总酸含量尤其是乙酸含量、总醇含量和总酯含量增加,总醛含量尤其是 3-甲基丁醛含量、总酮含量尤其是 2-己酮含量、总烯含量、总苯含量、总呋喃含量减少,说明在 L15 的作用下,烟叶中的化合物可能进行了相互转化。酸类致香物质能去除杂气,改善口感,减轻刺激,醇类致香物质使卷烟香气细腻,酯类致香物质能掩盖焦苦气息,改善烟气吸味^[19-20]。这些致香物质含量变化可能是 L15 发酵卷烟吸食品味高于对照的重要原因之一。但烟叶品质的高低是多种因素综合作用的结果,L15 改善卷烟品质的机制还需要进一步研究阐明。

参考文献:

[1] Reid J J, Haley E E. Studies on the fermentation of tobacco I. The microflora of cured and fermenting cigar - leaf tobacco [J]. Pennsylvania Agricultural Experiment Station Bulletin, 1933, 356: 1 - 17.

[2] 朱大恒,陈 锐,陈再根,等. 烤烟自然醇化与人工发酵过程中微生物变化及其与酶活性关系的研究[J]. 中国烟草学报,2001,7 (2): 26 - 30.

[3] Ye J, Yan J, Zhang Z, et al. The effects of threshing and redrying on bacterial communities that inhabit the surface of tobacco leaves[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101 (10): 4279 - 4287.

[4] Chopyk J, Chattopadhyay S, Kulkarni P, et al. Mentholation affects

表 5 L15 处理对烟丝挥发性成分的影响

类别	名称	相对含量(%)		类别	名称	相对含量(%)	
		对照	处理			对照	处理
酸	乙酸	21.35 ± 0.81	39.85 ± 1.1 **	酮	2-己酮	7.33 ± 2.58	— *
	丙酸	0.18 ± 0.01	0.29 ± 0.02 **		2,3-丁二酮	4.35 ± 0.14	4.56 ± 0.47
	2-甲基丙酸	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01 *		2,3-戊二酮	4.1 ± 0.27	3.81 ± 0.52
	丁酸	0.03 ± 0	—		2-丁酮	0.92 ± 0.08	0.81 ± 0.16
	2-甲基丁酸	—	0.36 ± 0.05 **		3-羟基-2-丁酮	0.59 ± 0.04	0.6 ± 0.02
	甲酸	—	0.33 ± 0.27 **		MD2K	0.59 ± 0.12	0.5 ± 0.06
	总含量	21.59 ± 0.8	40.9 ± 1.16 **		2-甲基四氢呋喃-3-酮	0.46 ± 0.02	0.42 ± 0.03
醛	3-甲基丁醛	22.81 ± 2.77	11.85 ± 0.52 **		2-环戊烯-1,4-二酮	0.31 ± 0.09	0.46 ± 0.06 *
	2-甲基丙醛	10.73 ± 0.33	10.7 ± 1.21		6-甲基-5-庚烯-2-酮	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.03
	糠醛	5.6 ± 0.88	6.03 ± 0.76		KB1K	0.06 ± 0	0.06 ± 0.01
	苯甲醛	0.68 ± 0.08	0.8 ± 0.11		6-甲基-2-庚酮	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01
	5-甲基呋喃醛	0.3 ± 0.02	0.55 ± 0.05 **		MP4K	0.04 ± 0.03	0.16 ± 0.08
	苯乙醛	0.27 ± 0.06	0.32 ± 0.17		2-环己烯-1-酮	0.04 ± 0.01	—
	2-甲基-2-丁烯醛	0.11 ± 0.04	0.12 ± 0.01		乙酰氧基-2-丙酮	—	0.27 ± 0.01 **
	壬醛	0.03 ± 0.01	—		1-羟基-2-丁酮	—	0.07 ± 0.03
	2-己烯醛	0.03 ± 0.019	—		1-戊烯-3-酮	—	0.16 ± 0.04 **
	2-甲基丁醛	—	0.4 ± 0.04 **		总含量	18.99 ± 2.39	12.07 ± 0.87 **
	3-羟基丁醛	—	2.09 ± 0.16 **	烯	苯乙烯	0.05 ± 0.01	—
醇	总含量	40.56 ± 2.16	32.87 ± 2.68 *		右旋萜二烯	0.02 ± 0	—
	糠醇	3.84 ± 0.32	3.99 ± 0.27		总含量	0.07 ± 0.01	—
	丙二醇	3.35 ± 0.61	6.88 ± 0.73 **	苯	甲苯	2.7 ± 0.69	— **
	丙酮醇	3.03 ± 0.30	3.61 ± 0.22		1,3-二甲苯	0.44 ± 0.01	— **
	3-甲基-1-丁醇	0.09 ± 0.01	0.1 ± 0.02		总含量	3.14 ± 0.69	— **
	异丙醇	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	呋喃	2-甲基呋喃	1.33 ± 0.2	0.48 ± 0.08 **
	5-甲基-2-呋喃甲醇	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.02		2-乙酰基呋喃	0.38 ± 0.08	0.48 ± 0.012
	1-戊烯-3-醇	0.02 ± 0.01	—		总含量	1.7 ± 0.28	0.97 ± 0.08 **
	3-戊醇	0.02 ± 0	—	其他	烟碱	0.7 ± 0.07	0.76 ± 0.16
	总含量	10.5 ± 1.16	14.74 ± 0.83 **		吡啶	0.19 ± 0.01	0.21 ± 0.14
酯	三乙酸甘油酯	0.03 ± 0.01	—		4-甲基苯酚	0.04 ± 0	0.06 ± 0.01
	异丁酸酐	0.04 ± 0	—		三氯甲烷	0.63 ± 0.08	— **
	1,2-丙二醇,2-乙酸酯	—	0.63 ± 0 **		FHTN	—	0.15 ± 0.03 **
	总含量	0.07 ± 0.01	0.63 ± 0 *		HMIHI	—	0.3 ± 0.01 **

注:相对含量指一种烟丝中单一化合物峰面积占总化合物峰面积的比例。—:未检测到;*、**:分别表示相比于对照在0.05和0.01水平具有显著性差异。MD2K:(E)-8-甲基-5-(1-甲基乙基)-6,8-壬二烯-2-酮;KB1K:(E)-1-(2,6,6-三甲基-1,3-环己二烯-1-基)-2-丁烯-1-酮;MP4K:2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-吡喃-4-酮;FHTN:1,2,3,4-四氢-1,1,6-三甲基萘;HMIHI:2,3-二氢1,1,5,6-四甲基-1H-茚。

the cigarette microbiota by selecting for bacteria resistant to harsh environmental conditions and selecting against potential bacterial pathogens[J]. Microbiome,2017,5(1):22.

[5]Gong X W,Yang J K,Duan Y Q,et al. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. Y22 and its potential application to tobacco processing[J]. Research in Microbiology,2009,160(3):200-204.

[6]Wei X,Deng X,Cai D,et al. Decreased tobacco-specific nitrosamines by microbial treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* DA9 during the air-curing process of burley tobacco[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2014,62(52):12701-12706.

[7]Maldonado-Robledo G,Rodríguez-Bustamante E,Sánchez-Contreras A,et al. Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2003,62(5/6):484-488.

[8]Rodríguez-Bustamante E,Maldonado-Robledo G,Ortiz M A,et al.

Bioconversion of lutein using a microbial mixture-maximizing the production of tobacco aroma compounds by manipulation of culture medium[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2005,68(2):174-182.

[9]赵铭钦,李晓强. 烟叶微生物发酵机理及生物制剂应用研究进展[J]. 甘肃农业大学学报,2007,42(6):84-91.

[10]Izquierdo T A. Bacteria in tobacco fermentation[J]. Coresta,1958(2):2146.

[11]English C F,Bell E J,Berger A J. Isolation of thermophiles from broadleaf tobacco and effect of pure culture inoculation on cigar aroma and mildness[J]. Applied Microbiology,1967,15(1):117-119.

[12]黄静文,段焰青,者为,等. 短小芽孢杆菌改善烟叶品质的研究[J]. 烟草科技,2010,43(8):61-64.

[13]陈兴,张天栋,党立志,等. 利用西姆芽孢杆菌改善烟叶品质的研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学版),2016,30(2):

赵小云, 谢德芳. 超高效液相色谱-串联质谱对香蕉中苯醚甲环唑和噻呋酰胺农药残留的检测[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(2): 181-185.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.02.046

超高效液相色谱-串联质谱对香蕉中苯醚甲环唑和噻呋酰胺农药残留的检测

赵小云¹, 谢德芳²

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430000; 2. 中国热带农业科学院分析测试中心, 海南海口 570100)

摘要:分散固相萃取(QuEChERS)为样品前处理方法,建立超高效液相色谱-串联质谱同时检测香蕉中苯醚甲环唑和噻呋酰胺农药残留的分析方法。样品经乙腈提取, *N*-丙基乙二胺净化,超高效液相色谱分离,电喷雾电离、正负离子扫描,单四极杆串联质谱以多反应监测扫描方式对样品进行检测,采用基质匹配标准品外标法进行定量分析。结果表明,苯醚甲环唑和噻呋酰胺在 0.05~0.50 μg/L 时呈良好的线性关系,基质标准曲线分别为 $y = 3.17 \times 10^4 x + 1.18 \times 10^6$ ($r = 0.9994$)、 $y = 6.04 \times 10^3 x + 8.3 \times 10^5$ ($r = 0.9993$)。在 0.1、1.0、10.0 mg/kg 3 个添加水平下,苯醚甲环唑和噻呋酰胺的平均回收率分别为 94.9%~107.5%、93.6%~102.3%;相对标准偏差分别为 7.2%~9.0%、3.2%~9.3%;苯醚甲环唑的检出限和定量限分别为 1.0、3.3 μg/kg,噻呋酰胺的检出限和定量限分别为 0.5、3.3 μg/kg。样品经测定,发现不套袋处理下,苯醚甲环唑和噻呋酰胺的半衰期分别为 11.0、14.7 d;套袋前施药,苯醚甲环唑和噻呋酰胺的半衰期分别为 23.1、16.1 d;2 种农药的安全间隔期都是 35 d。

关键词:苯醚甲环唑;噻呋酰胺;高效液相色谱-串联质谱;香蕉;农残检测

中图分类号: S482.2; TQ450.2⁺63

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2019)02-0181-05

苯醚甲环唑和噻呋酰胺都是新型的广谱、低毒、内吸性强、环境友好型的高效杀菌剂^[1-3],对真菌引起的叶斑病、炭疽病和立枯病等有较好的治疗和防治作用^[4-6],是防治香蕉叶斑病的主要农药品种。

目前已报到的苯醚甲环唑的检测方法有气相色谱-电子捕获检测器(GC-ECD)^[7]、表面增强拉曼光谱的快速检测^[8]、直接酶联免疫^[9]、气相色谱-串联质谱^[10-11]、超高效液相色谱-串联质谱^[12-14]等,噻呋酰胺的检测方法有高效液相色谱^[15]、GC-ECD^[16]、气相色谱-离子阱质谱^[17]、超高效液相色谱-串联质谱^[18]等。但同时检测这 2 种农药的方法还未见报道,其中气相色谱检测时间较长,不适合大量样品的使用,拉曼光谱和酶联免疫等快速检测技术的灵敏度较低,尚不能普遍使用。

随着串联质谱的发展,超高效液相色谱-串联质谱也越来越多地出现在农药残留分析中,其具有灵敏度高、检测时间短、准确度高等特点。农药前处理方法使用最广的当属分散固相萃取(QuEChERS),因其具有快速、简单、廉价、有效、可靠及安全的特点,成为国内外的研究热点,QuEChERS 起初是高水分含量的果蔬中农药残留分析的前处理方法,后来在固相微萃取和盐溶缓冲的提取和净化过程中得到应用,现可以用在大量样品的广谱分析中。林涛等使用 QuEChERS 前处理方法和超高效液相色谱-串联质谱技术测定蔬菜中的 41 种农药残留,检出限为 0.003~1.000 μg/kg,该方法的回收率为 74.1%~120.4%,相对标准偏差为 2.8%~11.9%,该方法快速、简便、灵敏度高、净化效果好^[18]。王连珠等采用 QuEChERS-液相色谱-串联质谱技术测定蔬菜中 66 种有机磷农药的残留量,该方法的回收率为 55%~122%,相对标准偏差为 1.6%~18.0%,定量限为 0.1~8.0 μg/kg,该方法灵敏简便,符合法规残留限量检测要求^[19]。

本研究采用 QuEChERS 为样品前处理方法,建立超高效液相色谱-串联质谱检测方法同时对香蕉中的苯醚甲环唑和噻呋酰胺进行检测,以期对农药残留检测提供参考。

收稿日期:2017-08-28

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201203092-4-2)。

作者简介:赵小云(1993—),女,河南焦作人,硕士研究生,主要从事食品质量与安全研究。E-mail:76305052@qq.com。

通信作者:谢德芳,副研究员,主要从事农药残留分析研究。E-mail:xdfangl@163.com。

322-327.

- [14] 李雪梅,杨伟祖,祝明亮,等. 烟碱降解菌的选育及改善上部烟叶品质研究[J]. 工业微生物, 2006, 36(1): 16-22.
- [15] 甄达文,于铁妹,朱珊珊,等. 利用酶法与微生物发酵法制备天然烟用香料[J]. 食品工业科技, 2009, 30(12): 268-272.
- [16] 潘家华,黄龙,庞登红. 加速烟叶陈化和提升烟叶品质的复合微生物制剂及其应用:CN103202533A[P]. 2013-07-17.
- [17] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版

社, 2001.

- [18] 瞿娇娇,施鸣,张庆明,等. 食品微生物对发酵烟叶品质的影响[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(3): 136-138.
- [19] 黄静文,段焰青,杨金奎,等. 烟叶主要致香成分和烟叶等级以及醇化时间的对比分析[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(3): 440-445.
- [20] 王涛,张强,吴雨松,等. 云南省烟梗微波膨胀后致香物质差异性分析[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(14): 2694-2699.