

谷物化学与品质分析

应用电子鼻技术对梗稻谷中霉菌定量分析*

宋 伟 谢同平 张美玲 马 宁

(南京财经大学食品科学与工程学院 江苏南京 210003)

摘 要 用德国 Airsense 公司生产的 PEN3 型便携式电子鼻系统分析检测不同储藏条件下梗稻谷的挥发性物质, 结果表明: 通过 PCA 分析, 不同储藏条件的梗稻谷样品可以很好的被区分; 利用 Loadings 分析传感器贡献率挑选 W1S、W2S、W5S、W3S、W1W、W2W 作为新传感器阵列, 对 15℃、25℃、30℃ 条件下的传感器响应值进行分析, 25℃、30℃ 条件下传感器响应值要明显高于 15℃ 条件下响应值, 水分含量对传感器的响应值影响也十分明显, 相同温度条件下, 水分含量越高, 传感器的响应值越大; 采用 SPSS18.0 数据分析软件对传感器响应值与霉菌菌落总数进行相关性分析可知两者在 0.01 水平上呈显著相关性; 在定性分析基础上利用 PLS 分析法对梗稻谷中霉菌数量进行预测, 结果表明该方法具有可行性。

关键词 电子鼻 梗稻谷 霉菌 定量分析

稻谷含有丰富的碳水化合物、蛋白质、脂肪及无机盐等营养物质, 是微生物良好的天然培养基, 一旦条件适宜, 稻谷上带有的多种微生物就会大量生长, 不仅影响稻谷本身的安全储藏, 导致稻谷品质劣变, 还会造成毒素污染, 危害人类健康^[1]。加强对粮情的检测和分析, 及早发现储粮初期的变质, 及时采取措施, 控制和改变环境条件, 抑制微生物代谢活动, 能有效地防止粮食霉变^[2]。有很多检测稻谷微生物手段, 如 DNA 探针、聚合酶链式反应 (PCR)、显微镜镜检、气相色谱法、高效液相色谱法 (HPLC) 及 GC-MS 联用法等, 然而这些方法受检测时间、灵敏度、选择性、样品前处理方法、样品基质干扰、价格等因素制约, 不能满足实际需要。

微生物挥发性代谢产物 (MVOCS) 是微生物代谢产物的重要组成部分, 是重要的信息素, 也是人类了解微生物生命活动本质规律的重要窗口^[3]。不同微生物个体的 MVOCS 往往不同, 它们一般具有种属特征, 因此这些气味物质以及气味指纹图谱可以潜在的作为微生物鉴定与检测的依据^[4~5]。稻谷储藏过程中, 霉菌挥发性代谢产物是其综合气味中的主要组成成分, 这使得通过研究稻谷综合气味信息来检测霉菌数量具有可行性。

本实验使用气味指纹技术的电子鼻检测方法, 针对梗稻谷中霉菌挥发性代谢产物进行检测, 对样品本身没有特殊要求, 并且利用电子鼻对梗稻谷样

品进行检测, 无需对样品进行预处理, 检测效率大大提高。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

2010 年当年产梗稻谷: 中央储备粮苏州直属库; PEN3 型便携式电子鼻: 德国 Airsense 公司; 孟加拉红培养基 (BR): 杭州生产。

1.2 实验方法

梗稻谷样品水分调节采用密闭增湿法, 通过测定梗稻谷原始样品的水分含量来确定所需喷洒去离子水的量, 密闭 2 周后检测水分含量的变化情况。水分分别调至 13.5%、15.5%、16.5%, 分别装在经过氮气调节, 氧气体积分别为 2%、10%、21% 的密封广口瓶中, 所有样品分别放置于 15℃、25℃、30℃ 的人工气候箱储藏, 每 30d 用电子鼻检测样品挥发性物质 1 次, 每个样品重复 6 次, 同时按 GB/T 4785.15-2003 方法对梗稻谷样品中霉菌菌落总数每 30d 测定 1 次。

PEN3 型便携式电子鼻系统包括 W1C、W3C、W5C、W1S、W2S、W3S、W5S、W6S、W1W、W2W 10 个不同的金属氧化物半导体传感器。实验中取 40 g 梗稻谷样品放入顶空瓶中, 通过针头将样品挥发性气体吸到电子鼻传感器通道里, 然后将

* 基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2009BADA0B00-5), 南京财经大学科研基金项目 (C0620)

通讯地址: 南京市铁路北街 128 号

尾气排除出外,接着进行第二轮顶空采样。采样时间为 60 s,采样间隔时间 1 s,自动调零时间 10 s,清洗时间要视梗稻谷样品挥发性气味浓度而定,要使传感器回归到未与样品挥发性物质反应时的值。

1.3 数据分析

基于电子鼻检测所得梗稻谷气味指纹信息,利用 PCA 分析不同储藏条件传感器响应值;用 Loadings 分析不同传感器贡献率,结合传感器对梗稻谷样品响应值进行分析,以优化传感器阵列;用 SPSS18.0 数据分析软件对传感器信号与梗稻谷中霉菌菌落总数进行相关性分析验证传感器阵列的优化效果;在 PCA、Loadings 分析基础上,优化数据模型,利用 PEN3 电子鼻自带数据分析软件中偏最小二乘法 (PLS) 对梗稻谷样品中霉菌菌落数进行验证性预测。

1.3.1 主成分分析 (PCA) PCA 分析是一种多元统计方法,是对传感器多指标的信息进行数据转换和降维,对降维后的特征向量进行线性分类,在 PCA 分析图上显示主要的二维图^[6]。PCA 图谱中横、纵坐标分别表示在 PCA 转换中得到的第一主成分 (PC1) 和第二主成分 (PC2) 的贡献率 (或权重),贡献率 (或权重) 越大,说明主成分可以较好的反映原来多指标的信息,即如果 2 个样品在横坐标上的距离越大,说明它们的差异越大;而 2 个样品在纵坐标上的距离即使很大,由于第二主成分的贡献率 (或权重) 很小,2 个样品之间的实际差异不会很明显^[7]。

1.3.2 贡献率分析 (Loadings) Loadings 分析法主要用于识别传感器在模式识别中以及定量分析中的重要性^[8]。Loadings 分析方法与 PCA 分析法都是基于同一种算法。观察传感器在坐标轴上的响应,其位置距离 (0, 0) 点越远,即负载参数值越大,说明传感器对样品的响应值越大。如果某个传感器的负载参数近乎为零,则在实际分析中,可以忽略该传感器的作用^[9]。

1.3.3 偏最小二乘法 (PLS) PLS 运算用来通过传感器信号计算量化表达式,应用经过训练的模型可以对一个给定的变量计算向量,根据不同的需要,定义不同的量化变量。

2 结果与分析

2.1 PCA 分析

图 1~图 6,是 PCA 分析的不同储藏条件下梗稻谷样品的气味信息。

2.1.1 不同温度条件下 PCA 分析 图 1 和图 2 中,15℃样品与 25℃、30℃样品距离较远,15℃条

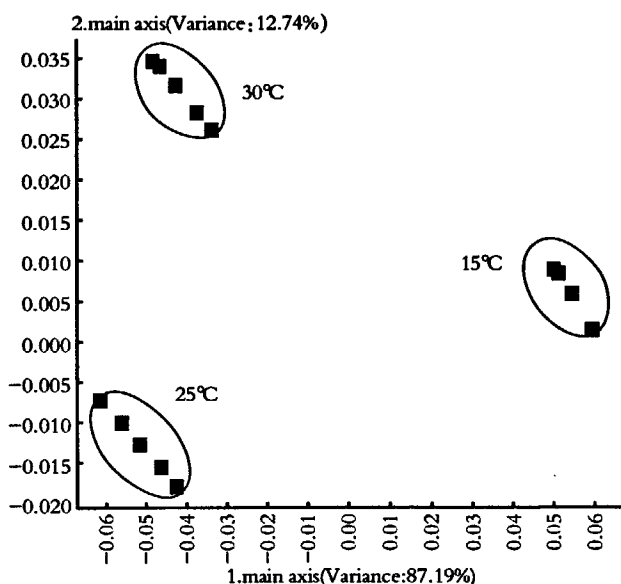


图 1 水分 13.5%, O₂ 含量 2% PCA 分析图

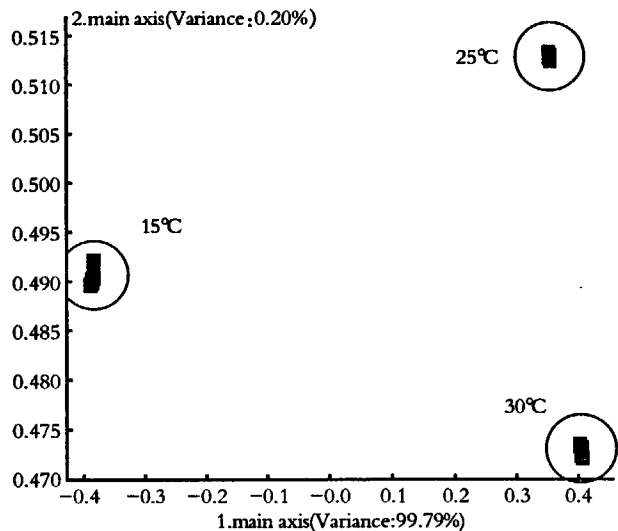
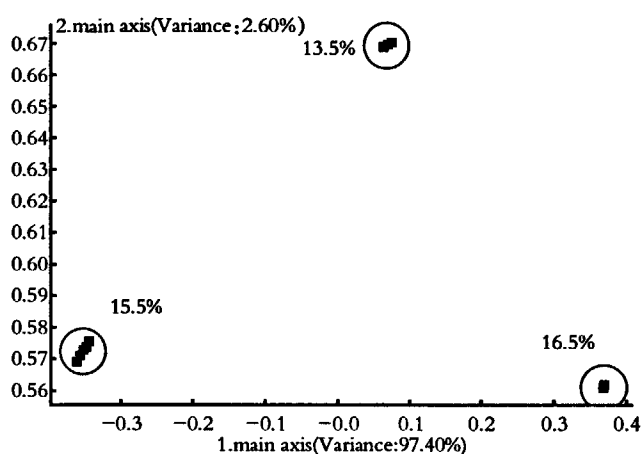
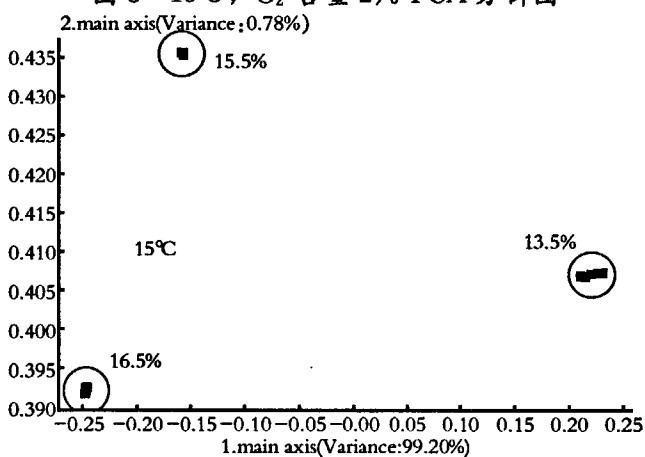
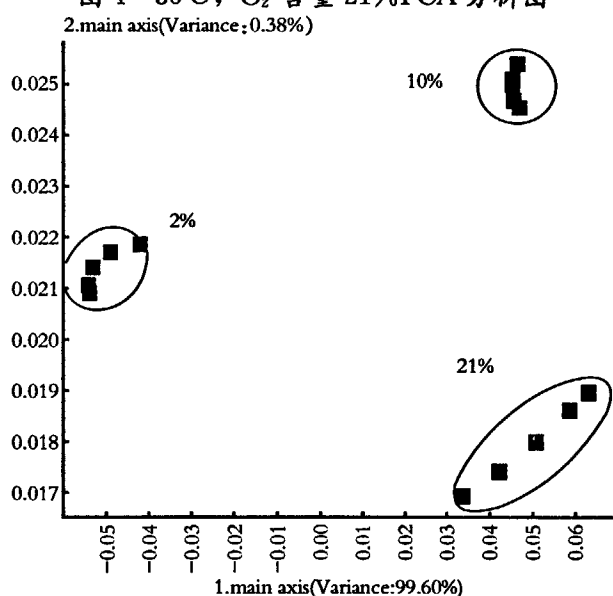


图 2 水分 15.5%, O₂ 含量 10% PCA 分析图

件下,梗稻谷自身代谢活动慢,且霉菌生长被抑制,代谢缓慢,MVOCs 浓度低;较高温度下梗稻谷自身代谢活跃,且该温度适合霉菌快速生长,MVOCs 浓度高,梗稻谷中挥发性气味成分浓度增高。

2.1.2 不同水分条件下 PCA 分析 图 3 和图 4 中,不同水分样品被很好区分,较高水分条件下,梗稻谷籽粒中自由水含量高,自身呼吸代谢旺盛,霉菌可利用的水分多,导致霉菌生长迅速,MVOCs 浓度高,而低水分条件可以抑制梗稻谷籽粒自身代谢及霉菌生长,挥发性成分浓度不同。

2.1.3 不同 O₂ 含量条件下 PCA 分析 图 5 和图 6 中, O₂ 含量 2% 与 O₂ 含量 10%、21% 样品在横轴方向差异大,由于低氧能抑制梗稻籽粒自身有氧呼吸和霉菌数量的增长,但会导致梗稻籽粒无氧呼吸加强,一些厌氧、兼性厌氧微生物也会代谢加快,生成一些醇类、醛类及硫化物、氮氧化物等

图3 15℃, O₂含量2% PCA分析图图4 30℃, O₂含量21% PCA分析图图5 15℃, 水分13.5%条件下PCA分析
气味成分, 高氧含量样品中以有氧呼吸为主, 微生物构成也以好氧微生物占优, 两者代谢产物不同, 因此低氧样品与高氧样品能被很好的区分。

2.2 Loadings 分析和传感器响应分析

2.2.1 Loadings 分析 图7所示为27个梗稻谷样品储藏5个月后的电子鼻检测数据 Loadings 分

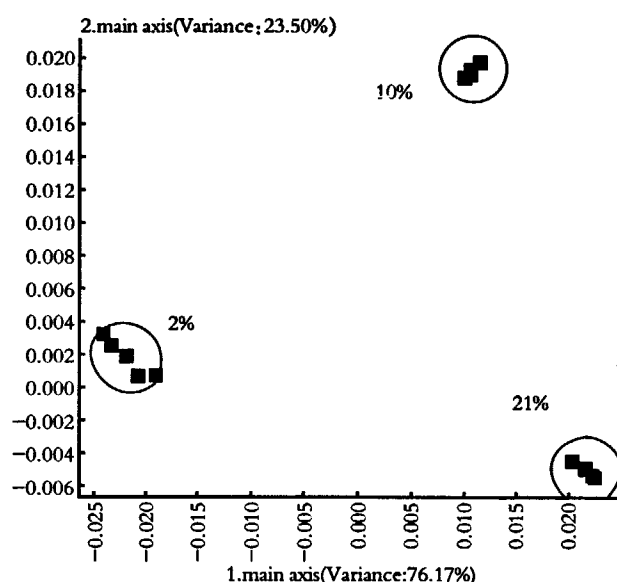
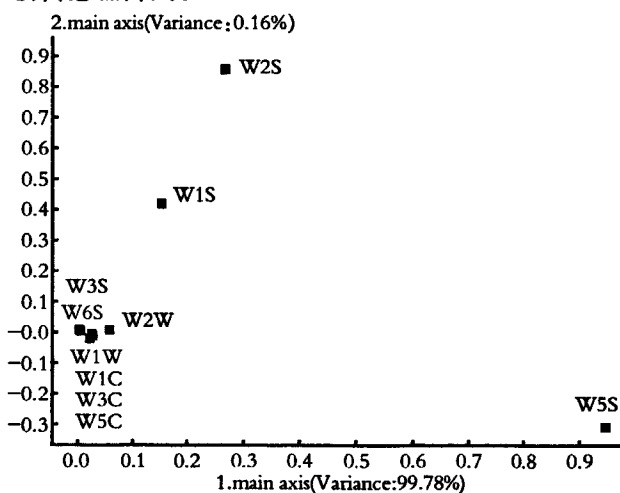
图6 30℃, 水分16.5%条件下PCA分析
析图, 实验中提取第50s响应值作为分析依据。由图7可知, 传感器W1S、W2S、W5S的贡献率比较高, 即这3个传感器在检测中起到的作用较大。因此, 将W1S、W2S、W5S组成新的传感器序列对样品进行定量分析, 但由图7可知除了这3个传感器外, 剩余7个传感器主要分布在3个位置, 为了全面提取梗稻谷样品的气味信息, 再选取W3S、W1W、W2W添加到传感器阵列中, 组成新传感器阵列。

图7 Loadings 传感器贡献率分析

2.2.2 传感器响应分析 由图8~图10可以明显看出: 在15℃、25℃、和30℃条件下, 均为2号传感器的响应值最高, 其次分别是8号和6号传感器, 这与Loadings分析结果相契合。在15℃条件下, 除16.5%水分含量两个样品的传感器响应值较高外, 其余样品的均较低, 说明在低温低水分条件下, 梗稻谷的品质劣变缓慢, 霉菌生长被抑制, 梗稻谷中的挥发性气味成分浓度较低。25℃和30℃条件下梗稻谷样品的传感器响应值明显高于15℃样品, 主要

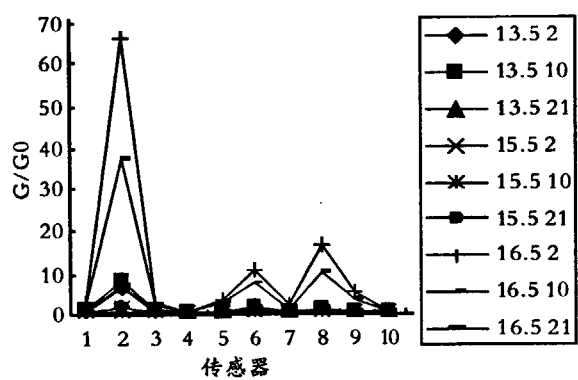


图 8 传感器对 15℃条件下梗稻谷的响应图

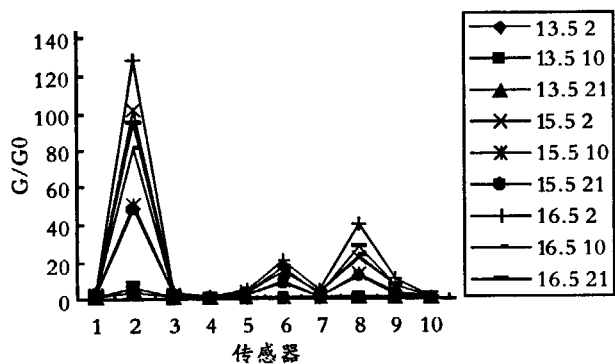


图 9 传感器对 25℃条件下梗稻谷的响应图

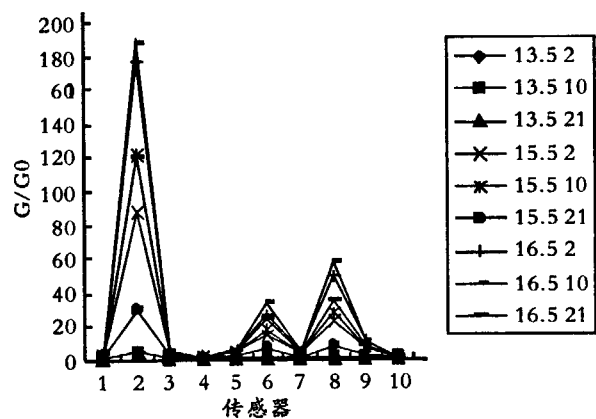


图 10 传感器对 30℃条件下梗稻谷的响应图

注：图 8~图 10 中横坐标为传感器的编号：1—W1C；2—W5S；3—W3C；4—W6S；5—W5C；6—W1S；7—W1W；8—W2S；9—W2W；10—W3S。

由于在较高温度条件下，梗稻谷籽粒体内各种酶活性增强，代谢活跃，有氧、无氧呼吸都比较旺盛，使得梗稻谷样品中挥发性气味成分浓度增高；霉菌的最佳生长温度为 28℃±1℃，在 25℃和 30℃储藏条件下，均适宜霉菌的生长，霉菌在生长代谢过程中，会生产羟基类、醛基类、硫化物等化合物，进而产生霉味、哈败味、酸败味等气味^[10]，增加了梗稻谷样品中的挥发性气味成分的浓度。

2.3 传感器响应与霉菌菌落总数相关性分析

表 1 为优化后传感器阵列响应值与梗稻谷样品

中霉菌菌落总数的相关性分析结果，分析结果表明 W5S、W2S、W1S、W3S、W1W、W2W 响应值与菌落总数在 0.01 水平上显著相关，即电子鼻检测获得的梗稻谷气味指纹信息与霉菌的数量是显著相关的，因此可以通过检测梗稻谷样品的气味信息对梗稻谷中霉菌菌落总数进行预测。

表 1 传感器响应值与菌落总数相关性分析

		W5S	W2S	W1S	W3S	W1W	W2W
菌落总数	Pearson 相关性	0.778	0.804	0.834	0.794	0.781	0.792
	显著性 (双侧)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	N	27	27	27	27	27	27

注：* * 在 0.01 水平 (双侧) 上显著相关。

2.4 PLS 法预计菌落总数

从 4 月、5 月各 27 个样品数据中各选 18 个训练数据库，用已测得菌落总数建立 PLS 数据模型，然后对剩余 9 个梗稻谷样品中霉菌菌落总数进行验证性预测，结果如表 2 和表 3 所示。

表 2 PLS 对霉菌菌落总数的预测值与实际值对照表

4 月份样品			霉菌菌落总数 (cfu/g)		相对偏差 (%)
			实际值	预测值	
15℃	13.5%	2%	11500	6289	45.3
15℃	15.5%	10%	15000	11304	24.6
15℃	16.5%	21%	20000	19502	2.4
25℃	13.5%	10%	13000	8492	34.7
25℃	15.5%	21%	280000	272545	2.7
25℃	16.5%	2%	170000	127330	25.1
30℃	13.5%	21%	29000	13314	54.0
30℃	15.5%	2%	270000	262386	2.8
30℃	16.5%	10%	400000	386486	3.4

由表 2 和表 3 可以看出，利用 PLS 分析法对霉菌菌落总数进行预测时，大多数样品的预测值跟实际值的相对偏差低于 20%，其中 25℃ 16.5% 2% 样品的相对偏差仅为 0.3%，说明基于电子鼻的 PLS 分析法对梗稻谷中霉菌数量进行预测是具有可行性的，但是本实验中，某些样品的预测值跟实际值相对偏差过大，如 30℃ 13.5% 21% 样品相对偏差达到 54.5%，显然不能满足对霉菌进行定量分析的准确度要求。

表 3 PLS 对霉菌菌落总数的预测值与实际值对照表

5 月份样品			霉菌菌落总数 (cfu/g)		相对偏差 (%)
			实际值	预测值	
15℃	13.5%	2%	15000	11262	24.9
15℃	15.5%	10%	26000	21324	18.0
15℃	16.5%	21%	35000	34041	2.7
25℃	13.5%	10%	49000	42251	13.8
25℃	15.5%	21%	320000	309432	3.3
25℃	16.5%	2%	480000	478761	0.3
30℃	13.5%	21%	69000	31397	54.5
30℃	15.5%	2%	290000	243578	16.0
30℃	16.5%	10%	690000	650353	5.7

PLS 定量分析的准确度不稳定,可能由以下几方面造成:一是本实验设置不同储藏条件,在不同条件下,梗稻谷自身代谢及微生物组成不相同,导致气味组成差异大,在运用同一模型定量分析时必然会造成较大误差;二是由于电子鼻提取的是样品的综合气味信息,跟样品中的某一具体指标很难建立精确的数学量化关系;三是可能在模型的选择优化以及具体的定量分析方法的选择不够合理,需要在以后研究中做进一步的完善。

3 结论

3.1 PCA 分析可以区分不同储藏条件下梗稻谷样品的气味信息,对不同温度、水分及 O_2 含量条件下的梗稻谷样品区分效果较好。

3.2 利用 Loadings 分析选取 W1S、W2S、W5S、W3S、W1W、W2W 传感器组成新传感器阵列。

对传感器响应值进行分析可知 2 号传感器响应值最高,其次为 8 号和 6 号传感器;对传感器响应值和霉菌菌落总数进行相关性分析可知两者在 0.01 水平上呈显著相关性。

3.3 PLS 分析法对霉菌数量进行定量预测,结果表明该法具有可行性,但存在准确度不够稳定的问题,个别样品的相对偏差过高,不能满足进行定量分析的要求,在后续研究中还需进行进一步的完善。

参 考 文 献

- 1 吴莉莉,林爱英,郑宝周等. 电子鼻检测技术在粮食霉变识别中的应用研究 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (21): 10133~10135
- 2 周建新. 论粮食霉变中的生物化学 [J]. 粮食储藏, 2004, 32 (1): 9~12
- 3 梁正华,饶军等. 微生物挥发性代谢产物的产生途径及其质谱检测技术 [J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28 (1): 124~133
- 4 Anthony PF, Turner, Naresh M. Electronic Nose and Disease Diagnostics [J]. Nature Reviews, 2004, 2: 161~166
- 5 Schnürer J, Olsson J, Boörjesson T. Fungal Volatiles as Indicators of Food and Feeds Spoilage [J]. Fungal Genetics and Bidogy, 1999, 27: 209~217
- 6 Dutta R, Kashwan K R, et al. Electronic nose based tea quality standardization [J]. Neural Networks, 2003, 16 (5/6): 847~853
- 7 朱先约,宗永立,李炎强等. 利用电子鼻区分不同国家的烤烟 [J]. 烟草科技, 2008, 15 (3): 27~30
- 8 Antihus Hernández Gómez, Jun Wang, Guixian Hu, Annia Garða Pereira. Electronic nose technique potential monitoring mandarin maturity [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 113 (1): 347~153
- 9 胡桂仙,王俊,海铮等. 不同储藏时间柑橘电子鼻检测研究 [J]. 浙江农业学报, 2006, 18 (6): 458~461
- 10 王肇慈,孙明. 国内外粮食储藏品质评价与技术状况 [J]. 南京经济学院学报, 1997, (4): 64~66

(收稿日期: 2011 10 09)

QUANTITATIVE ANALYSIS OF MOLDS IN RICE BY THE TECHNOLOGY OF ELECTRONIC NOSE

Song Wei Xie Tongping Zhang Meiling Ma Ning

(College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics 210003)

Rice stored at different conditions was analyzed by using an electronic nose (PEN 3) from Airsense Company in Germany. Through the PCA analysis, rice sample in different storage conditions were distinguished well, according to loadings analysis on the contribution rate of sensors, selected W1S, W2S, W5S, W3S, W1W, W2W as the new sensor array, results of analyzing the sensor response the values at 15°C, 25°C, 30°C showed that values at 30°C and 25°C were evidently higher than values at 15°C, moisture content also affected the response values of sensors evidently, at the same temperature, the higher moisture content was, the greater sensor's response value was. By Bivariate Dependency Analysis on the values of sensors response and the total number of mold colonies with the SPSS18.0, there were significant correlation at the 0.01 level between them. Based on qualitative analysis, results of making quantitative analysis of molds in rice with PLS method indicated that this way was feasible.

Keywords: electronic nose, rice, mold, quantitative analysis