

# 苹果汁中鲁氏接合酵母早期污染的电子鼻识别研究

王虎玄 胡仲秋 龙芳羽 郭春锋 袁亚宏 岳田利

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 通过电子鼻(Electronic nose, EN)检测苹果汁气味,探索电子鼻识别苹果汁中鲁氏接合酵母早期污染的可行性。利用线性判别分析(LDA)研究电子鼻对不同污染时间苹果汁的区分能力。运用载荷分析研究各传感器对电子鼻早期识别鲁氏接合酵母污染的贡献。同时对苹果汁进行感官评定分析,作为验证电子鼻检测性能的参考。运用偏最小二乘回归(PLSR)分析电子鼻信号与酵母菌浓度之间的相关性,以期建立定量检测模型。结果表明实验菌株污染苹果汁12 h后,对应的酵母浓度小于200 CFU/mL,电子鼻能够识别污染样品,而感官评定人员在这个条件下无法区分污染样品与空白样品。载荷分析表明S1、S2、S6、S7和S8传感器在电子鼻识别鲁氏接合酵母早期污染中起到重要作用。PLS结果表明电子鼻信号与酵母浓度之间有很好的相关性,决定系数 $R^2$ 分别为0.97(校正集)和0.93(预测集),预测标准误差分别为0.28(校正集)和0.26(预测集)。上述结果表明利用电子鼻对苹果汁中鲁氏接合酵母早期污染进行识别预警是可行的,有望在食品微生物快速检测领域得到广泛应用。

**关键词:** 苹果汁; 电子鼻; 鲁氏接合酵母; 早期污染

**中图分类号:** TS251; TP212 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2016)01-0209-06

## Research on Identification of Spoilage in Apple Juice Caused by *Zygosaccharomyces rouxii* at Early Stage Using Electronic Nose

Wang Huxuan Hu Zhongqiu Long Fangyu Guo Chunfeng Yuan Yahong Yue Tianli  
(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Spoilage spawned by *Zygosaccharomyces rouxii* can cause sensory defect in apple juice, which could hardly be perceived at the early stage and therefore would lead to the serious economic loss. Thus, it is essential to detect the contamination earliest to avoid costly waste of products or recalls. The present work tried to explore the feasibility of detection of the spoilage in apple juice caused by *Zygosaccharomyces rouxii* (*Z. rouxii*) at early stage through determination of flavor of apple juice by using electronic nose (EN). The ability of EN to discriminate apple juices with different contamination time was analyzed by using linear discrimination analysis (LDA) method. The contribution of each sensor to the diagnosis of the *Z. rouxii*-contaminated apple juice by EN was studied using loadings analysis. Test panel evaluation was performed as a reference to validate the performance of EN technique. The correlation between electronic nose signals and yeast concentration was analyzed by partial least squares analysis (PLS) method. The results showed that EN was able to accurately identify the *Z. rouxii*-contaminated apple juice after incubation for 12 h, corresponding to the fungal number of less than 200 CFU/mL, the level at which the test panel could not yet identify the spoilage. Loadings analysis indicated that sensors S1, S2, S6, S7 and S8 had the most important effect on identification of apple juice contaminated at different levels. A good correlation between sensors response signals and yeast concentration was revealed by PLS algorithm, with correlation coefficient  $R^2$  of 0.97 and 0.93 in

收稿日期: 2015-06-04 修回日期: 2015-06-26

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD31B01)

作者简介: 王虎玄(1986—),男,博士生,主要从事食品中微生物污染快速检测及控制研究,E-mail: mn37bvexz@163.com

通信作者: 岳田利(1965—),男,教授,博士生导师,主要从事食品生物技术及食品安全控制技术研究,E-mail: yuetl@nwsuaf.edu.cn

calibration model and prediction model, respectively. The standard error of calibration and standard error of prediction were 0.28 and 0.26, respectively. These results indicate that it is feasible to detect the spoilage in apple juice caused by *Z. rouxii* at early stage using electronic nose, and this sensory technique is expected to be applied widely in the field of detection of foodborne microorganisms.

**Key words:** apple juice; electronic nose; *Zygosaccharomyces rouxii*; early contamination

## 引言

鲁氏接合酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Z. rouxii*) 是一种重要的腐败高渗菌, 由于它具有耐酸、耐弱酸防腐剂、耐高浓度糖并能够适应高浓度糖环境、代谢己糖生成  $\text{CO}_2$  的生理特性, 是高糖食品及饮料的重要污染源<sup>[1-3]</sup>。苹果在加工过程中若被鲁氏接合酵母污染, 基于上述生理特性其能够在苹果加工最终产品(浓缩苹果汁)中存活。笔者曾从浓缩苹果汁(糖度  $70^\circ\text{Brix}$ , pH 值 3.5)中分离得到鲁氏接合酵母, 并证实其能够在浓缩苹果汁中生长, 使其品质下降<sup>[4]</sup>。由于浓缩苹果汁中高糖含量 ( $66 \sim 70^\circ\text{Brix}$ ) 及高可滴定酸含量 ( $2.2\% \sim 2.5\%$ , 以柠檬酸计; pH 值  $3.0 \sim 3.5$ ) 的联合抑制效应, 鲁氏接合酵母生长比较缓慢<sup>[3,5]</sup>, 但将浓缩苹果汁稀释到  $11.5 \sim 12^\circ\text{Brix}$  用于饮料调配时, 鲁氏接合酵母便能够快速增殖, 从而造成苹果汁气味的改变及营养成分的破坏, 给生产企业造成巨大的经济损失<sup>[6-7]</sup>。因此对鲁氏接合酵母在苹果汁中引起的早期污染实现识别预警是果汁加工与储藏工业中亟待解决的问题。

传统微生物检测方法主要依靠微生物的形态及生理生化实验, 费时费力, 且容易导致鉴定结果错误<sup>[8]</sup>。气质联用(GC-MS)、高效液相色谱(HPLC)及酶联免疫法(ELISA)等微生物检测方法已经被广泛应用<sup>[9-11]</sup>。但是, 从成本和耗费的实验时间方面考虑, 上述这些方法对于分析大量样品来说并不是很合适。同时这些方法主要是针对微生物的次级代谢产物实现快速检测, 而次级代谢产物生成时果汁已经被严重污染, 因此这些方法也并不适用于早期污染的识别<sup>[12]</sup>。近年来, 基于气味指纹技术的电子鼻技术被证明是一种有效的微生物污染识别方法<sup>[13-14]</sup>。其主要针对待测样品的气味, 检测迅速、灵敏度高, 而且最主要的优点是无需对样品本身进行任何处理, 因而在微生物快速无损检测方面具有良好的应用前景。国内外有关电子鼻对微生物检测的报道主要集中在细菌及霉菌方面<sup>[13-17]</sup>, 对苹果汁中鲁氏接合酵母污染的早期识别预警尚未见报道。

本文以从浓缩苹果汁(糖度  $70^\circ\text{Brix}$ , pH 值 3.5)中分离得到的鲁氏接合酵母为研究对象, 利用

电子鼻技术对其不同污染时间的苹果汁培养液进行检测, 研究电子鼻对鲁氏接合酵母早期污染的识别能力。以感官评定为参考, 揭示电子鼻识别鲁氏接合酵母污染的灵敏性。用化学计量学方法对电子鼻信号及酵母菌数量进行拟合研究电子鼻对鲁氏接合酵母的定量检测能力, 为发展电子鼻快速无损定量检测苹果汁中鲁氏接合酵母污染提供研究基础。

## 1 实验材料与与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂

浓缩苹果汁(糖度  $70^\circ\text{Brix}$ , pH 值 3.5)购买于陕西果汁加工厂。

$12^\circ\text{Brix}$  苹果汁: 浓缩苹果汁与去离子水按约 1.0:7.2 比例混合, 搅拌均匀。

YPD 培养基: 蛋白胨 20 g, 酵母浸粉 10 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 L。

YPGF 液体培养基: 葡萄糖 400 g, 果糖 400 g, 蛋白胨 20 g, 酵母浸粉 10 g, 少量蒸馏水溶解后补加蒸馏水至 1 L, 用柠檬酸将 pH 值调节至 3.5。

#### 1.1.2 实验仪器

PEN3 型便携式电子鼻系统, 德国 AIRSENSE 公司; 雷磁 PHS-3C 型 pH 计; 陆恒 LH-T32 型手持糖度仪。

本研究采用的德国 PEN3 型电子鼻测试系统是由气敏传感器阵列、信号处理系统和模式识别系统 3 部分组成。其工作原理是通过控制器将气味分子采集起来, 并在流经气敏传感器时与传感器单元表面的活性材料反应, 传感器单元将化学输入转换成电信号, 由多个传感器单元对气味的响应便构成了传感器阵列对该气味的响应谱。不同的气味有其对应的响应谱, 通过这些指纹响应谱可达到区分和判别的目的。PEN3 电子鼻具有由 10 个传感器单元组成的传感器阵列, 每个传感器单元都有其对应的敏感气体。

#### 1.1.3 实验菌株

来源于浓缩苹果汁的鲁氏接合酵母菌株 LB。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌液制备

从实验菌株平板上挑取一环单菌落, 接种于装

有 100 mL YPD 培养液的三角瓶中, 28℃ 条件下, 120 r/min 摇床培养 24 h。为了模拟适应浓缩苹果汁环境的鲁氏接合酵母细胞, 1 mL YPD 培养液接种于 100 mL YPGF 培养基中, 28℃ 条件下, 120 r/min 摇床培养 3 d 后作为种子液。用血球计数板对种子液计数, 根据计数结果将种子液调节到所需浓度后, 吸取 0.1 mL 分别接种到 7 个装有 700 mL 苹果汁的三角瓶中, 28℃ 条件下 120 r/min 摇床培养 42 h。每 6 h 取 1 瓶分别进行电子鼻、感官评定及酵母菌计数实验。另有 1 瓶苹果汁未接入菌液, 作为对照。

### 1.2.2 酵母菌计数

用灭菌后的苹果汁对各培养时间样品进行连续 10 倍梯度稀释, 再取适当梯度的稀释液 0.1 mL 涂布于 YPD 平板上并置于 28℃ 培养 3~4 d, 然后对菌落数量进行统计。每个稀释梯度样品作 3 次平行测定。

### 1.2.3 电子鼻实验

将上述 8 个苹果汁样品各吸取 200 mL 分装于 20 个专用的电子鼻进样瓶中, 每瓶 10 mL。也就是说每个取样时间点 20 个重复样品, 共构成 160 个样品。样品密封后室温下 (25℃) 平衡 30 min 后进行检测。电子鼻检测具体参数是: 信号频率 1 次/s, 信号获取总时间 60 s, 载气流速 300 mL/min, 载气为干燥空气, 清洗时间 300 s。电子鼻检测在室温下 (25℃) 进行。

### 1.2.4 感官评定

取 20 mL 苹果汁置于 50 mL 纸杯中, 双层保鲜膜密封后室温下 (25℃) 平衡 30 min 后进行感官评定。感官评定由 10 位评定人员执行 (5 男 5 女, 22~32 岁), 每位评定 7 组 (6、12、18、24、30、36、42 h, 共 7 组) 样品, 每组样品包含 2 个空白样品和 1 个污染样品。组间及组内样品随机提供给评定人员。评定人员打开保鲜膜, 对样品 3 次闻嗅后进行空白与污染样区分。每组样品评定完成后, 评定人员休息 10 min。每组样品重复测定 3 次。

### 1.2.5 数据处理

运用线性判别分析 (LDA) 研究电子鼻是否能够对鲁氏接合酵母在苹果汁中的早期污染进行识别。运用载荷分析 (Loadings analysis) 研究各传感器对鲁氏接合酵母污染识别的贡献。运用偏最小二乘回归 (PLSR) 对酵母菌浓度对数值 (lgCFU/mL) 与电子鼻信号响应值进行拟合, 以研究电子鼻对鲁氏接合酵母污染的定量检测能力, 并通过决定系数 ( $R^2$ )、校正集标准误差 (SEC) 及预测集标准误差 (SEP) 判断模型性能。SEC 及 SEP 的计算公式为

$$d_{\text{SEC}} = \sqrt{\frac{1}{I_c - 1} \sum_{i=1}^{I_c} (\hat{y}_i - y_i)^2}$$

$$d_{\text{SEP}} = \sqrt{\frac{1}{I_p - 1} \sum_{i=1}^{I_p} (\hat{y}_i - y_i)^2}$$

式中  $d_{\text{SEC}}$ ——校正集标准误差  
 $d_{\text{SEP}}$ ——预测集标准误差  
 $\hat{y}_i$ ——第  $i$  次观测的预测值  
 $y_i$ ——相应第  $i$  次观测的真实值  
 $I_c$ ——校正集的观测次数  
 $I_p$ ——预测集的观测次数<sup>[18]</sup>

使用 Win Muster v. 1. 6. 2 及 Minitab v. 16. 2. 3 执行上述数据分析。

## 2 实验结果

### 2.1 实验菌株在苹果汁中的生长曲线

图 1 为菌株 LB 在苹果汁中生长曲线, 可看出在 42 h 培养时间内 LB 细胞浓度从 1.70 lgCFU/mL 增加到 6.78 lgCFU/mL。实验菌株在苹果汁中的迟滞期为 18 h, 随后进入对数生长期, 培养时间内未能到达未稳定期。在前 30 h 的培养阶段, 苹果汁没有出现如浑浊、产气等典型微生物污染现象, 表明肉眼观察难以对鲁氏接合酵母的早期污染进行识别。

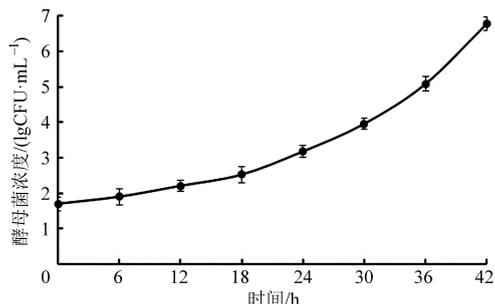


图 1 实验菌株在苹果汁中的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of test strain in apple juice

### 2.2 电子鼻检测信号分析

图 2 为电子鼻对鲁氏接合酵母污染苹果汁 24 h 的响应信号。可以看出在检测初期响应值大幅增加, 在 6~8 s 达到最高点, 然后缓慢降低, 最终在检测后期保持稳定。传感器平衡响应值一般用于电子鼻数据分析, 因此本研究选取各传感器

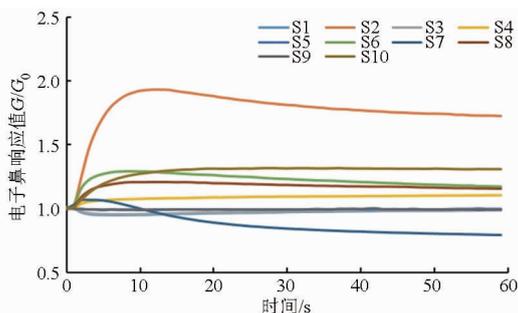


图 2 电子鼻对鲁氏接合酵母污染 24 h 苹果汁的响应信号

Fig. 2 Response of electronic nose to apple juice contaminated by *Z. rouxii* for 24 h

55 ~ 57 s 响应的平均值作为各传感器的特征值进行后续分析。

为了研究各传感器的稳定性,对每个取样时间点 20 次重复测定各个传感器响应值的相对标准偏差 (RSD) 进行分析。结果显示各传感器响应的 RSD 值介于 1.2% ~ 7.9% 之间,表明 PEN3 电子鼻的 10 个传感器对苹果汁的响应均具有较高的稳定

性。同时将各传感器对不同取样点样品的响应值进行方差分析,结果如表 1 所示。可以看出,培养时间对各传感器响应值具有显著影响 ( $p < 0.01$ )。传感器 S1、S2、S3、S6、S7 及 S8 对不同培养时间苹果汁的响应值具有较大差异,表明这些传感器对苹果汁气味变化比较敏感,对电子鼻能够识别鲁氏接合酵母早期污染起到重要作用。

表 1 10 个传感器对不同取样时间苹果汁的响应值

Tab. 1 Responses of ten electronic nose sensors (S1 to S10) to *Z. rouxii*-contaminated apple juice sampled at different time

传感器	时间/h									
	0	6	12	18	24	30	36	42		
S1	0.801 ± 0.026 <sup>c</sup>	0.810 ± 0.030 <sup>c</sup>	0.899 ± 0.025 <sup>a</sup>	0.942 ± 0.027 <sup>f</sup>	0.956 ± 0.028 <sup>f</sup>	0.865 ± 0.009 <sup>d</sup>	0.704 ± 0.024 <sup>b</sup>	0.471 ± 0.011 <sup>a</sup>		
S2	2.264 ± 0.228 <sup>c</sup>	2.181 ± 0.213 <sup>c</sup>	2.000 ± 0.188 <sup>b</sup>	1.861 ± 0.109 <sup>a</sup>	1.814 ± 0.132 <sup>a</sup>	1.896 ± 0.078 <sup>ab</sup>	2.638 ± 0.179 <sup>d</sup>	6.732 ± 0.318 <sup>e</sup>		
S3	0.847 ± 0.190 <sup>c</sup>	0.854 ± 0.022 <sup>c</sup>	0.923 ± 0.019 <sup>e</sup>	0.953 ± 0.021 <sup>f</sup>	0.965 ± 0.022 <sup>e</sup>	0.886 ± 0.006 <sup>d</sup>	0.750 ± 0.021 <sup>b</sup>	0.525 ± 0.009 <sup>a</sup>		
S4	1.150 ± 0.034 <sup>a</sup>	1.141 ± 0.040 <sup>cd</sup>	1.140 ± 0.024 <sup>cd</sup>	1.118 ± 0.020 <sup>ab</sup>	1.110 ± 0.008 <sup>a</sup>	1.111 ± 0.045 <sup>ab</sup>	1.141 ± 0.017 <sup>cd</sup>	1.129 ± 0.010 <sup>bc</sup>		
S5	0.898 ± 0.013 <sup>c</sup>	0.901 ± 0.016 <sup>c</sup>	0.959 ± 0.019 <sup>e</sup>	0.986 ± 0.014 <sup>f</sup>	0.990 ± 0.015 <sup>f</sup>	0.919 ± 0.006 <sup>d</sup>	0.814 ± 0.015 <sup>b</sup>	0.636 ± 0.011 <sup>a</sup>		
S6	1.921 ± 0.167 <sup>d</sup>	1.853 ± 0.184 <sup>d</sup>	1.517 ± 0.110 <sup>e</sup>	1.317 ± 0.094 <sup>ab</sup>	1.255 ± 0.088 <sup>a</sup>	1.400 ± 0.055 <sup>b</sup>	2.212 ± 0.161 <sup>e</sup>	3.663 ± 0.170 <sup>f</sup>		
S7	1.374 ± 0.153 <sup>cd</sup>	1.319 ± 0.146 <sup>c</sup>	1.017 ± 0.100 <sup>b</sup>	0.906 ± 0.072 <sup>a</sup>	0.861 ± 0.083 <sup>a</sup>	1.063 ± 0.034 <sup>b</sup>	1.395 ± 0.114 <sup>d</sup>	3.050 ± 0.149 <sup>e</sup>		
S8	1.651 ± 0.122 <sup>c</sup>	1.602 ± 0.134 <sup>c</sup>	1.355 ± 0.075 <sup>b</sup>	1.244 ± 0.058 <sup>a</sup>	1.220 ± 0.062 <sup>a</sup>	1.329 ± 0.042 <sup>b</sup>	1.957 ± 0.127 <sup>d</sup>	3.339 ± 0.154 <sup>e</sup>		
S9	0.979 ± 0.019 <sup>a</sup>	0.969 ± 0.026 <sup>a</sup>	0.968 ± 0.016 <sup>a</sup>	1.003 ± 0.011 <sup>b</sup>	1.010 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.970 ± 0.015 <sup>a</sup>	0.975 ± 0.021 <sup>a</sup>	0.971 ± 0.018 <sup>a</sup>		
S10	1.368 ± 0.053 <sup>d</sup>	1.343 ± 0.056 <sup>bc</sup>	1.341 ± 0.040 <sup>bc</sup>	1.320 ± 0.021 <sup>b</sup>	1.323 ± 0.024 <sup>b</sup>	1.273 ± 0.026 <sup>a</sup>	1.326 ± 0.034 <sup>b</sup>	1.360 ± 0.027 <sup>cd</sup>		

注:不同小写字母表示样品间响应值具有显著差异(邓肯检验,  $p < 0.01$ )。

## 2.3 电子鼻对不同污染时间苹果汁的判别分析

利用线性判别方法(LDA)对 160 个苹果汁样品进行分析,研究电子鼻对不同污染时间苹果汁的识别能力。结果如图 3 所示,前 2 个判别成分(LD1 和 LD2)可以解释 95.43% 的样本总方差,足以充分揭示样本信息。除了 0、6 h 样品完全重叠外,电子鼻对其他样品能够较好地区分。0、6、12、18、24 h 样品沿着 LD2 正方向分布,表明 LD2 在电子鼻区分鲁氏接合酵母早期污染中起到重要作用。而 0 ~ 24、30、36、42 h 样品沿着 LD1 负方向分布,说明 LD1 主要包含电子鼻识别鲁氏接合酵母中后期污染的信息。

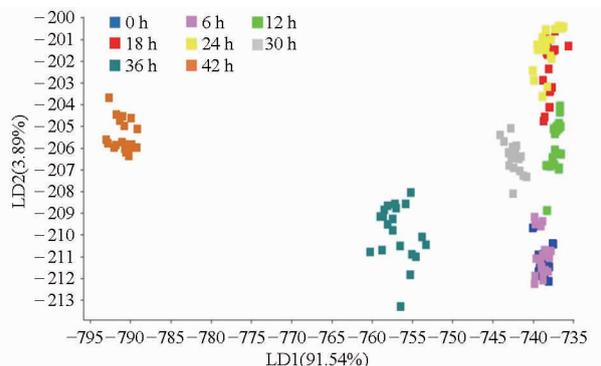


图 3 基于电子鼻的鲁氏接合酵母不同污染时间苹果汁 LDA 图

Fig. 3 LDA map of *Z. rouxii*-contaminated apple juices with different incubation time based on electronic nose

电子鼻能够识别鲁氏接合酵母污染 12 h 的苹果汁,对应的酵母菌浓度小于 200 CFU/mL,表明电子鼻的响应值可以作为鲁氏接合酵母污染苹果汁的早期预警信息。

## 2.4 载荷分析

利用载荷分析方法研究各传感器在电子鼻早期识别鲁氏接合酵母中的重要性。结果如图 4 所示,前 2 个主成分(LA1 和 LA2)可以解释 99.7% 的样本总方差,足以充分揭示样本信息。可以看出 S2、S6、S7 和 S8 传感器对 LA1 具有重要贡献,S1、S6、S7 和 S8 传感器在 LA2 中占有较大比重。这个结果与表 1 分析结果相一致,表明上述传感器是电子鼻能够识别鲁氏接合酵母污染苹果汁的重要传感器。

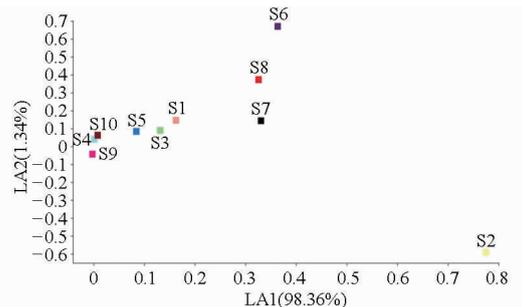


图 4 电子鼻各传感器的载荷分析图

Fig. 4 Loadings analysis map of all sensors in electronic nose

## 2.5 PLS 定量检测

为了利用电子鼻检测信号对苹果汁中鲁氏接合酵母污染数量进行预测,采用 PLS 方法将酵母浓度的对数值( $\lg\text{CFU}/\text{mL}$ )与电子鼻传感器信号值进行拟合。每个取样时间点 20 个重复样品中随机选择 14 个样品构成校正集( $14 \times 8$ )进行模型建立,剩余 6 个样品构成预测集( $6 \times 8$ )对模型进行外部预测。模型性能通过决定系数( $R^2$ )、校正标准误差(SEC)及预测标准误差(SEP)进行估计。为了提高模型的精度与准确性,利用留一交互验证法(LOOCV)对校正集进行建模。用于建模的最佳潜变量数(LVs)根据最小预测残差平方和(PRESS)确定。结果显示当潜变量数为 10 时,模型 PRESS 最小。校正集预测值与真实值间的相关系数为 0.97,预测标准误差为 0.28。模型性能不能仅取决于内部交互验证,还需要未参与建模的外部样品进行验证。结果如图 5 所示,预测集预测值与真实值间的相关系数为 0.93,预测标准误差为 0.26。得到的 PLS 公式为

$$Y = 16.1381 + 14.6534R_1 - 1.6614R_2 - 32.651R_3 + 3.5072R_4 - 2.2737R_5 - 9.9794R_6 + 0.0357R_7 + 11.108R_8 + 0.909R_9 + 3.3466R_{10}$$

式中  $Y$ ——鲁氏接合酵母菌浓度,  $\lg\text{CFU}/\text{mL}$   
 $R_1 \sim R_{10}$ ——10 个传感器 55 ~ 57 s 响应的平均值

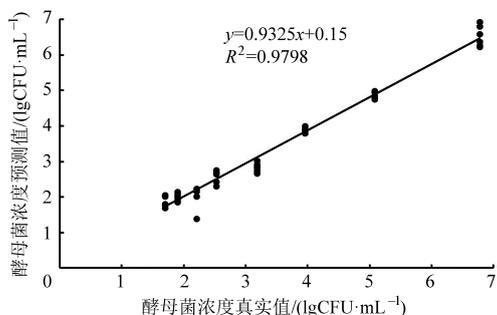


图 5 鲁氏接合酵母菌浓度外部预测值与真实值的分布

Fig. 5 Distribution between predicted and measured *Z. rouxii* count

建立的 PLS 模型不仅具有较高的相关系数,较低的预测标准误差,而且校正集与预测集之间的标准误差相差较小,表明 PLS 模型可以很好地揭示电子鼻响应信号值与酵母菌浓度对数值之间的关系,可以利用电子鼻技术对苹果汁中的鲁氏接合酵母进行定量检测。

## 2.6 感官分析

由于实用并且成本低,感官分析是检测食品质量最常用的方法。感官分析在本研究中作为参实验证电子鼻检测方法的灵敏性。分析结果如图 6 所

示:所有测试人员均能够识别鲁氏接合酵母污染 36 h 后的苹果汁但不能区分污染少于 18 h 的苹果汁。少数评定人员(1 ~ 3 人)能够识别污染 18 ~ 24 h 的苹果汁。对于污染 30 h 的苹果汁,超过半数的评定人员能够正确区分。

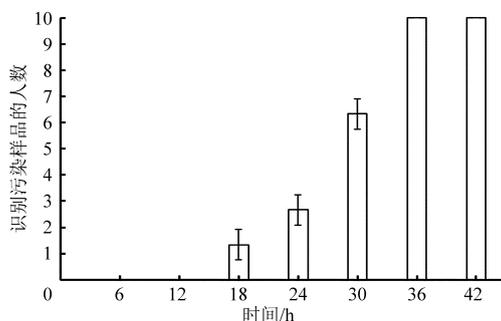


图 6 感官分析结果

Fig. 6 Result of test panel evaluation

## 3 讨论

(1) YPGF 培养基的糖度及酸度条件与浓缩苹果汁的条件比较相近。将鲁氏接合酵母接种于 YPGF 培养基中,模拟其在浓缩苹果汁中生长,然后将 YPGF 培养液作为种子液进行苹果汁接种。这样可以在一定程度上保持与自然条件下鲁氏接合酵母污染苹果汁相一致。作为微生物检测方法的研究,微生物接种量越低其实验结果越具有代表性和实用性。本文将接种量控制在 10 ~ 100 (50 CFU/mL),在一定程度上可以反映自然条件下鲁氏接合酵母的污染水平。总的来说,本文作为电子鼻检测鲁氏接合酵母早期污染苹果汁的可行性研究,较多关注电子鼻技术与工业常用食品质量检测方法(感官评定)的灵敏度比较以及电子鼻技术的定量检测能力。在后续研究中将会对电子鼻检测自然条件下苹果汁中鲁氏接合酵母污染进行探讨。

(2) 利用线性判别分析(LDA),电子鼻能够在鲁氏接合酵母污染苹果汁 12 h 后识别污染,对应的酵母浓度小于 200 CFU/mL,实现了其早期预警的目标。与一些已经发表的关于微生物污染快速检测的报道相比,电子鼻技术相对来说比较灵敏。Harrison 等<sup>[19]</sup>设计了一种具有种属特性的引物用于实现鲁氏接合酵母的快速检测,但这种方法需要对目标菌株进行富集才能得以实现。Wang 等<sup>[11]</sup>用酶联免疫吸附法(ELISA)对苹果汁中嗜酸耐热菌污染进行快速检测,这种方法的检测限为  $10^3$  CFU/mL。在苹果汁污染 12 h 后,感官评定人员无法区分污染样品与空白样品,表明电子鼻技术比感官评定方法灵敏。这一结果与 Huang 等<sup>[20]</sup>报道结果相一致,认为电子鼻在检测苹果汁中愈创木酚的灵敏度要高于感官评

定方法。综上所述,电子鼻响应信号能够作为鲁氏接合酵母污染苹果汁的早期预警信息,其在苹果汁中鲁氏接合酵母污染早期检测方面具有广阔的应用前景。

(3) 微生物污染食品气味的变化与微生物的种类、数量有关。对于腐败酵母来说,其细胞浓度一般超过  $10^4$  CFU/mL 时才会代谢产生如醇类、酮类、醛类等代谢产物从而改变食品气味<sup>[21]</sup>。本文表明在酵母菌浓度小于 200 CFU/mL 情况下(污染 12 h),电子鼻就能够对鲁氏接合酵母污染实现识别,这可能是由于鲁氏接合酵母繁殖导致苹果汁气味固有成分相对含量发生变化,从而使得电子鼻能够在未有挥发性代谢产物生成的条件下对污染样品进行正确识别。当鲁氏接合酵母污染时间达到 36 h 时(对应酵母菌浓度大于  $10^4$  CFU/mL),由于上述代谢产物的生成使得苹果汁气味发生巨大变化,相应地从 LDA 图可以看出,36 h 样品聚类与前 30 h 样品聚类相比发生较大迁移,这也是所有感官评定人员能够

在培养 36 h 后正确识别污染样品的原因。

## 4 结束语

研究了电子鼻技术对苹果汁中鲁氏接合酵母早期污染进行识别预警的可行性,结果表明利用线性判别分析(LDA),电子鼻能够在鲁氏接合酵母污染苹果汁 12 h 后识别污染,对应的酵母菌浓度小于 200 CFU/mL,在这个酵母浓度下感官评定未能正确识别污染果汁。载荷分析表明 S1、S2、S6、S7 和 S8 传感器在电子鼻早期识别鲁氏接合酵母污染中起到重要作用。利用 PLS 方法对苹果汁中酵母浓度与电子鼻响应信号进行拟合,结果表明两者之间具有良好的线性关系, $R^2$  分别为 0.97(校正集)和 0.93(预测集),预测标准误差分别为 0.28(校正集)和 0.26(预测集),预测效果良好,表明电子鼻技术在苹果汁中鲁氏接合酵母污染定量检测上具有一定的应用潜力。

## 参 考 文 献

- 1 Vermeulen A, Marvig C, Daelman J, et al. Strategies to increase the stability of intermediate moisture foods towards *Zygosaccharomyces rouxii*: the effect of temperature, ethanol, pH and water activity, with or without the influence of organic acids [J]. *Food Microbiology*, 2015, 45: 119 - 125.
- 2 Marvig C L, Kristiansen R M, Madsen M G, et al. Identification and characterisation of organisms associated with chocolate pralines and sugar syrups used for their production [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 185: 167 - 176.
- 3 Rojo M, Arroyo López F, Lerena M, et al. Effects of pH and sugar concentration in *Zygosaccharomyces rouxii* growth and time for spoilage in concentrated grape juice at isothermal and non-isothermal conditions [J]. *Food Microbiology*, 2013, 38: 143 - 150.
- 4 王虎玄,岳田利,胡仲秋,等. 陕西浓缩苹果汁中高渗酵母的分离鉴定[J]. *农业机械学报*, 2015, 46(4): 246 - 251.  
Wang Huxuan, Yue Tianli, Hu Zhongqiu, et al. Identification of osmotolerant yeast in apple juice concentrate from Shaanxi [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2015, 46(4): 246 - 251. (in Chinese)
- 5 王虎玄,胡仲秋,牛晨,等. 糖度与酸度对鲁氏接合酵母生长的影响[J]. *农业机械学报*, 2015, 46(10): 279 - 284.  
Wang Huxuan, Hu Zhongqiu, Niu Chen, et al. Effect of sugar content and acidity on the growth of *Zygosaccharomyces rouxii* [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2015, 46(10): 279 - 284. (in Chinese)
- 6 Steels H, James S A, Roberts I, et al. *Zygosaccharomyces lentus*: a significant new osmophilic, preservative-resistant spoilage yeast, capable of growth at low temperature [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87(4): 520 - 527.
- 7 Martorell P, Stratford M, Steels H, et al. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 114(2): 234 - 242.
- 8 Loureiro V, Querol A. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 1999, 10(11): 356 - 365.
- 9 Arroyo-Manzanares N, Huertas-Perez J F, Gamiz-Gracia L, et al. Simple and efficient methodology to determine mycotoxins in cereal syrups [J]. *Food Chemistry*, 2015, 177: 274 - 279.
- 10 Zhang J B, Yue T L, Yuan Y H. *Alicyclobacillus* contamination in the production line of kiwi products in China [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e67704.
- 11 Wang Z L, Yue T L, Yuan Y H. Development and evaluation of an immunomagnetic separation-ELISA for the detection of *Alicyclobacillus* spp. in apple juice [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(1): 28 - 33.
- 12 Ge B L, Meng J H. Advanced technologies for pathogen and toxin detection in foods: current applications and future directions [J]. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 2009, 14(4): 235 - 241.
- 13 Gobbi E, Falasconi M, Zambotti G, et al. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae* in vegetable soups by a metal oxide sensor based electronic nose [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 207: 1104 - 1113.

- 2011,32(2):134-139.
- Shi Jiyong, Zou Xiaobo, Zhao Jiewen, et al. Measurement of chlorophyll content in cucumber leaves based on GA-ICA and hyper-spectral imaging technique [J]. Journal of Jiangsu University: Natural Science Edition, 2011, 32(2): 134-139. (in Chinese)
- 16 牛晓颖. 基于傅立叶变换近红外光谱的绍兴黄酒风味成分定量分析及其酒龄鉴别的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2009.  
Niu Xiaoying. Flavor components quantitative evaluation and age discrimination of Shaoxing rice wine based on Fourier transform near infrared spectroscopy [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2009. (in Chinese)
- 17 江辉. 基于近红外光谱和电子鼻技术的固态发酵过程检测研究及应用[D]. 镇江:江苏大学, 2013.  
Jiang Hui. Research and application on process measurement of solid-state fermentation (SSF) based on near-infrared spectroscopy (NIRS) and electronic nose techniques [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2013. (in Chinese)
- 18 张筱蕾, 刘飞, 聂鹏程, 等. 高光谱成像技术的油菜叶片氮含量及分布快速检测 [J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(9): 2513-2518.  
Zhang Xiaolei, Liu Fei, Nie Pengcheng, et al. Rapid detection of nitrogen content and distribution in oilseed rape leaves based on hyperspectral imaging [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2014, 34(9): 2513-2518. (in Chinese)
- 

(上接第 214 页)

- 14 Fujioka K, Arakawa E, Kita J, et al. Detection of *aeromonashydrophila* in liquid media by volatile production similarity patterns, using a ff-2a electronic nose [J]. Sensors, 2013, 13(1): 736-745.
- 15 Sberveglieri V, Comini E, Zappa D, et al. Electronic nose for the early detection of different types of indigenous mold contamination in green coffee [C]//2013 Seventh International Conference on Sensing Technology, 2013:461-465.
- 16 喻勇新, 孙晓红, 潘迎捷, 等. 应用电子鼻检测食源性致病菌的研究 [J]. 化学通报, 2010(2):154-159.  
Yu Yongxin, Sun Xiaohong, Pan Yingjie, et al. Research on food-borne pathogen detection based on electronic nose [J]. Chemistry Online, 2010(2):154-159. (in Chinese)
- 17 张红梅, 王俊, 叶盛, 等. 电子鼻传感器阵列优化与谷物霉变程度的检测 [J]. 传感技术学报, 2007, 20(6):1207-1210.  
Zhang Hongmei, Wang Jun, Ye Sheng, et al. Optimized of sensor array and detection of moldy degree for grain by electronic nose [J]. Chinese Journal of Sensors and Actuators, 2007, 20(6): 1207-1210. (in Chinese)
- 18 Zhang H M, Wang J, Ye S, et al. Application of electronic nose and statistical analysis to predict quality indices of peach [J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(1): 65-72.
- 19 Harrison E, Muir A, Stratford M, et al. Species-specific PCR primers for the rapid identification of yeasts of the genus *Zygosaccharomyces* [J]. Fems Yeast Research, 2011, 11(4): 356-365.
- 20 Huang X C, Guo C F, Yuan Y H, et al. Detection of medicinal off-flavor in apple juice with artificial sensing system and comparison with test panel evaluation and GC-MS [J]. Food Control, 2015, 51:270-277.
- 21 Lima Tribst A A, de Souza Sant' Ana A, de Massaguer P R. Review: microbiological quality and safety of fruit juices-past, present and future perspectives [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2009, 35(4): 310-339.