

应用气味指纹技术检测猪肉假单胞菌

胡惠平, 潘迎捷, 刘 源, 孙晓红, 赵 勇*

(上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘 要: 研究从猪肉中分离的假单胞菌在胰酪胨大豆肉汤(TSB)纯培养条件下产生的挥发性代谢产物(MVOCs)及其气味指纹, 以为将来气味指纹技术应用于食品中微生物的快速无损检测提供理论依据。利用电子鼻(E-nose)和顶空-固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术(HS-SPME-GC-MS)对3株从猪肉中分离的假单胞菌在TSB中产生的挥发性代谢产物进行检测分析。结果显示: 通过主成分分析(PCA)和判别因子分析(DFA), E-nose能明显区分3株假单胞菌。进一步用HS-SPME-GC-MS对挥发性物质进行分析, 2-丁酮、氯二溴甲烷、异戊酸、2-甲基丁酸、2-甲基-5-(甲基硫)呋喃是铜绿假单胞菌(Pa)所产生的; 3,5-二甲基辛烷、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2-乙基己醇、十二烷烃、2,6,10-三甲基十二烷、(1E)-1-乙缩醛-1H-茚、1,5-二甲基萘是恶臭假单胞菌(Pp)所产生的; 2-戊酮、甲硫醚、乙酸丁酯、硫代丁酸甲酯、1-环十二烷烯、戊基环丙烷、3-丙酰吡啶、3-苯基呋喃是荧光假单胞菌(Pf)所产生的; 3株假单胞菌之间存在着差异。通过检测假单胞菌的挥发性代谢产物, E-nose和HS-SPME-GC-MS气味指纹技术能快速的将假单胞菌进行区分鉴别, 表明该技术可以应用于假单胞菌等食品中微生物的快速无损检测。

关键词: 电子鼻; 顶空-固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术; 假单胞菌; 微生物挥发性代谢产物

Application of Odor Fingerprint for the Detection of *Pseudomonas* spp. Isolated from Pork

HU Hui-ping, PAN Ying-jie, LIU Yuan, SUN Xiao-hong, ZHAO Yong*

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Microbial volatile metabolites (MVOCs) of three *Pseudomonas* species isolated from pork during pure culture fermentation in tryptic soy broth (TSB) were analyzed for chemical composition using headspace solid-phase micro extraction/gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME/GC-MS) and odor fingerprint using electronic nose (E-nose) for laying a theoretical basis for the rapid and non-destructive detection of microorganisms in foods using odor fingerprint technique. E-nose could clearly distinguish the three *Pseudomonas* species through principal component analysis (PCA) and discriminant function analysis (DFA). HS-SPME/GC-MS analysis indicated that the MVOCs of *Pseudomonas aeruginosa* consisted of 2-butanone, dibromochloromethane, isovaleric acid, 2-methylbutanoic acid, 2-methyl-5-(methylthio)furan, *Pseudomonas aeruginosa* 3,5-dimethyloctane, 6-methyl-5-heptene-2-one, 2-ethylhexanol, dodecane, 2,6,10-trimethyldodecane, (1E)-1-ethylidene-1H-indene, and 1,5-dimethylnaphthalene, and *Pseudomonas putida* 2-pentanone, methylthioacetate, butyl acetate, S-methyl butanethioate, 1-cycloundecene, pentylcyclopropane, 3-propionylpyridine, and 3-phenylfuran. The combination of E-nose and HS-SPME/GC-MS provides a rapid and non-destructive detection method of *Pseudomonas* spp. and other microorganisms in foods.

Key words: electronic nose (E-nose); headspace solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS); *Pseudomonas* spp.; microbial volatile metabolites (MVOCs)

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)18-0327-06

微生物挥发性代谢产物(microbial volatile organic compounds, MVOCs)是微生物代谢产物的重要组成部分, 携带有丰富的生化信息, 是人类了解微生物生命

活动本质规律的重要窗口^[1]。有些MVOCs具有微生物种属特异性^[2-3], 因此, 通过分析这些MVOCs及其它们所形成的气味指纹图谱, 可以对微生物进行鉴别和检测^[4-5]。

收稿日期: 2009-06-16

基金项目: 上海市青年科技启明星计划项目(07QA14047); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 2005 第 4-2 号; 沪农科攻字 2006 第 10-5 号); 上海市创新行动计划项目(08390513900)

作者简介: 胡惠平(1982—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全。E-mail: huhuiping0223112@126.com

* 通讯作者: 赵勇(1975—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术、食品安全。E-mail: yzhao@shou.edu.cn

常见的检测 MVOCs 气味指纹技术主要有气相色谱法(GC)、气质联用法(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)、液质联用法(LC-MS)和电子鼻法(E-nose)等。

Tracey 等^[6]较早用 GC-MS 分析 MVOCs 区分 3 个属的 18 株乳酸菌。Alugupalli 等^[7]用 GC-MS 通过检测 *Mycobacterium xenopi* 的特征性代谢产物 2-docosan-1-ol, 来做饮用水中 *Mycobacterium xenopi* 的检测。为了快速诊断菌血症, Allardye 等^[8]通过 MVOCs 检测了血平板上的铜绿假单胞菌、肺炎双球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、脑膜炎奈瑟氏菌。最近, Siripatrawan 等^[9]用固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术(SPME-GC-MS)检测了新鲜包装蔬菜中污染的鼠李沙门氏菌。这些研究结果表明, 通过 MVOCs 可以对微生物进行检测、区分。

随着气味指纹技术的发展, 电子鼻技术在这个领域逐渐成为研究热点。电子鼻技术是以样品的整体气味物质作为研究对象, 这就减少了样品的前处理过程。Dutta 等^[10]应用 Cyranose 320 电子鼻技术区分 6 株引起眼部感染的细菌。同样, Pavlou 等^[11]运用电子鼻技术区分了 14 株梭菌属(*Clostridium* spp.)细菌和 12 株 *Bacteroides fragilis* 细菌的气味指纹。可见, 电子鼻技术能快速无损检测微生物。电子鼻的检测对象是样品的整体气味信息, 不能对气味成分的单个物质进行检测, 因此, 把 GC-MS 联用技术和电子鼻技术结合起来能更全面更详细检测样品的挥发性物质成分。

假单胞菌是一种引起猪肉腐败的常见微生物, 为了确保食品品质, 快速检测假单胞菌很有必要。本研究利用顶空-固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术(HS-SPME-GC-MS)结合电子鼻技术分析从猪肉中分离的假单胞菌纯培养后的挥发性代谢产物气味指纹, 为气味指纹技术用于微生物快速无损检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种与培养基

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*, Pp)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*, Pf)、由本实验室从猪肉中分离。

胰酪胨大豆肉汤(TSB) 美国 BD 公司。

1.2 仪器与设备

GC6890-MS5975 气相色谱质谱联用仪 美国 Agilent Technologies 公司; 手动 SPME 进样器; DVB-CAR-PDMS(二乙烯苯-聚乙二醇二万-聚二甲基硅氧烷)高度交联萃取头(50 μ m \times 30 μ m) 美国 Supelco 公司; Fox-4000 气味指纹分析仪(电子鼻)、HS100 电子鼻配套设备自动进样器 法国 Alpha MOS 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌液的制备

将斜面保藏的菌种副溶血性弧菌接种到 10ml TSB 液体培养基中, 然后于 30℃、180r/min 的条件下摇床过夜培养备用。对备用的副溶血性弧菌菌液进行一系列的 10 倍梯度稀释, 取某一稀释度的稀释液 0.5ml 于装有 4.5ml 液体培养基的 15ml 顶空样品瓶中, 置于 30℃、180r/min 的条件下摇床培养 18h, 用于 HS-SPME-GC-MS 和 E-nose 对其气味的检测。每个样品做 3 个平行。

1.3.2 E-nose 实验

样品制备: 用分析天平称取菌液(2.0000 \pm 0.0001)g 于 10ml 小瓶中, 用于电子鼻顶空直接分析。顶空样品制备(由进样器自动完成): 加热箱温度 37℃, 振荡速度 500r/min, 每个样品加热 600s。

分析条件: 以合成的干燥空气为载气, 流速 150ml/min, 注射体积 2500 μ l, 注射针温度 47℃, 注射针总体积 2.5ml, 注射速度 2500 μ l/s, 获取时间 120s, 延滞时间 600s。每个待检测的菌样在上述条件下重复分析 6 次。

1.3.3 HS-SPME-GC-MS 实验

顶空固相萃取操作条件: 把 15ml 装有 5ml 菌液的样品瓶于 37℃磁力搅拌器上加热平衡 15min 后, 使用 SPME 萃取头进行萃取。顶空吸附 30min 后, 将萃取头插入 GC 进样口, 解析 5min。

气相色谱条件: DB-35 MS 弹性毛细管柱(30m \times 0.25mm, 0.25 μ m); 载气: 氦气; 柱流量: 1ml/min; 不分流进样; 柱初温 30℃, 保持 3min, 以 5℃/min 升至 160℃, 以 13℃/min 升至 250℃; 进样口温度 250℃。

质谱条件: 传输线温度 280℃; 离子源温度 230℃; 四极杆温度 150℃; 电子能量 70eV; 质量扫描范围 m/z 30~400。

1.3.4 数据分析方法

1.3.4.1 电子鼻数据分析

将电子鼻获得的样品数据信息用 Alpha soft 11.0 软件进行统计学分析, 包括主成分分析(PCA)、判别因子分析(DFA)。

1.3.4.2 相似度计算

利用中南大学和香港理工大学研制开发的计算机辅助相似性评价系统软件(1.315 版), 计算样品色谱图之间的全谱相似性。

1.3.4.3 色谱图解谱

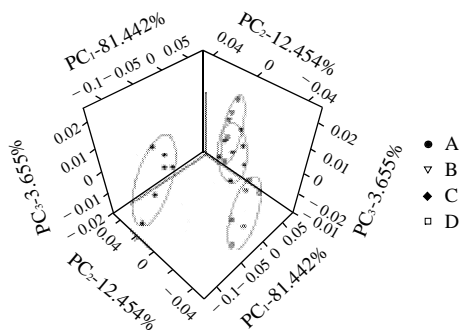
GC-MS 检测的化合物经计算机检索同时与 NIST05 Library 相匹配, 仅报道匹配度大于 80% 的鉴定结果。定量方法采用面积归一化法, 计算每种物质的相对百分含量。

2 结果与分析

2.1 电子鼻结果分析

2.1.1 主成分分析(PCA)

PCA 是将所提取的传感器多元指标信息进行线性转换和数据降维。它是一种重要的特征提取与无教师的模式识别方法。在分析过程中, 将前 2 个或 3 个主成分在 2 维或 3 维图上表示出来, 便可以直观地进行分析^[12]。本实验采取前 3 个主成分 PCA_1 、 PCA_2 和 PCA_3 作 3 维散点图进行分析。 PCA_1 、 PCA_2 和 PCA_3 显示了 PCA 分析时第 1 主成分、第 2 主成分和第 3 主成分的贡献率。贡献率越大, 越能反应原来多元指标的信息。一般主成分相加大于 70%~85% 即能采用 PCA。



A. 胰酪胨大豆肉汤(TSB); B. 铜绿假单胞菌(Pa);
C. 恶臭假单胞菌(Pp); D. 荧光假单胞菌(Pf)。

图1 3株假单胞菌的PCA图

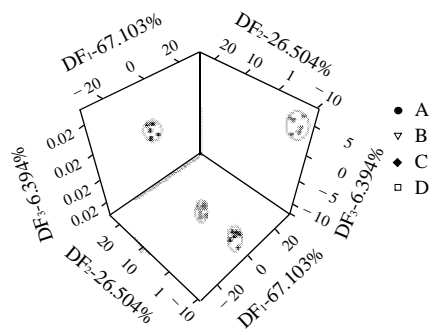
Fig.1 PCA three dimension scattering diagram of the three *Pseudomonas* species

图1是3株假单胞菌的PCA图。传感器阵列进行主成分分析得到前3个主成分的贡献率分别为: 81.442%、12.454%、3.655%, 累积贡献率为: 97.551%(> 70%~85%), 已经包含了很大的信息量, 因此样品PCA分析结果图能够反映样品的整体信息。图1中, 3株假单胞菌菌液与空白TSB培养液有着明显的区分度, 说明3株假单胞菌经纯培养后都产生了明显不同于空白培养液的气味, 而铜绿假单胞菌(Pa)菌液与恶臭假单胞菌(Pp)菌液有一定的重叠, 表明铜绿假单胞菌(Pa)和恶臭假单胞菌(Pp)两者培养后产生了相似的气味, 还有荧光假单胞菌(Pf)菌液与恶臭假单胞菌(Pp)菌液挨得很近, 说明荧光假单胞菌(Pf)经培养后产生了与恶臭假单胞菌(Pp)相近的气味, 可见PCA分析并不能把所有样品区分开来, 这就需要对样品进行进一步的分析。

2.1.2 判别因子分析(DFA)

DFA 是一种通过重新组合传感器数据来优化区分性的分类技术, 它的目的是使各个组间的重心距离最大同时保证组内差异最小, 改变组的划分会改变其分布。

DFA 经过一系列数学变化, 在充分保存现有信息的前提下, 使同类数据间的差异性尽量缩小, 不同类数据间的差异尽量扩大^[13]。图2中横、纵坐标的含义与图1一样。



A. 胰酪胨大豆肉汤(TSB); B. 铜绿假单胞菌(Pa);
C. 恶臭假单胞菌(Pp); D. 荧光假单胞菌(Pf)。

图2 3株假单胞菌的DFA图

Fig.2 DFA three dimension scattering diagram of the three *Pseudomonas* species

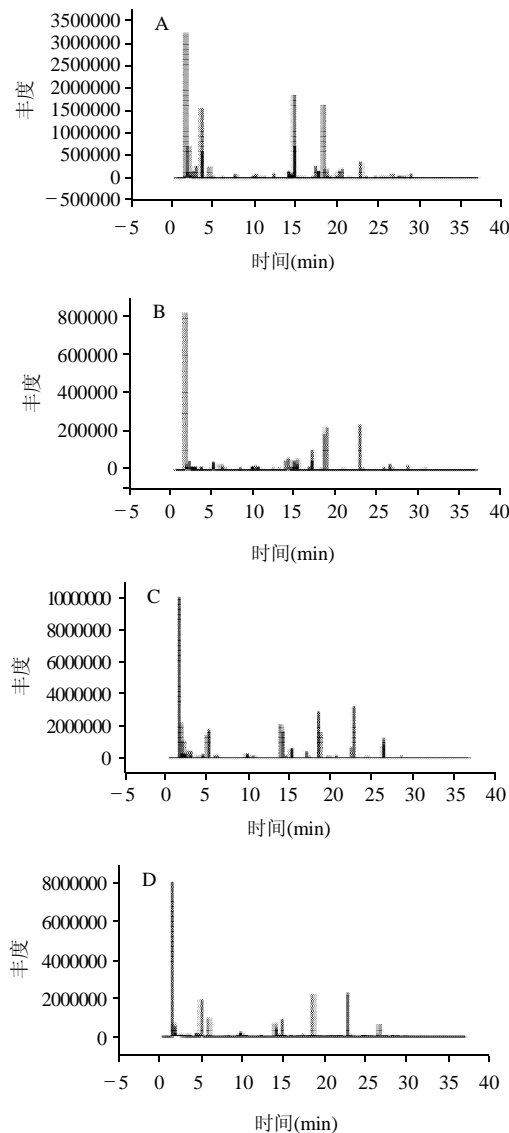
本实验对样品重新进行了DFA, 结果如图2所示。与图1相比, 4个样品有着很好的区分度, 把原本重叠的样品进行了很好的区分, 拉大了不重叠样品间的距离, 还缩小了平行样间的距离, 可见, 电子鼻技术不仅能对气味差别大的样品进行很好的区分, 而且也能很好的区分气味相似的样品, 该结果表明电子鼻技术能将铜绿假单胞菌(Pa)、恶臭假单胞菌(Pp)、荧光假单胞菌(Pf)和空白TSB培养液的气味指纹图谱完全区分开来, 可以用于微生物的区分与鉴定。

2.2 HS-SPME-GC-MS 结果分析

2.2.1 样品间总离子图的相似性分析

利用计算机辅助相似性评价系统软件比较4个样品的总离子图, 样品的总离子图如图3所示。各取4个样品的2个平行样进行比较分析。结果显示, 空白TSB培养液的2个平行间的相似度为0.9907, 铜绿假单胞菌(Pa)的2个平行间的相似度为0.9803, 恶臭假单胞菌(Pp)的2个平行间的相似度为0.9862, 荧光假单胞菌(Pf)的2个平行间的相似度为0.9899, 表明各样品的平行样具有很好的重复性。

同时, 软件也对4个样品间的相似度进行了分析, 结果见表1。从表1可以得出, 3株假单胞菌菌液与空白培养液的相似度相差很大, 可见假单胞菌经培养后产生了明显不同于空白培养液的气味。铜绿假单胞菌(Pa)和恶臭假单胞菌(Pp)相似度达到了0.9886, 产生的气味较为相似。荧光假单胞菌(Pf)和恶臭假单胞菌(Pp)相似度为0.8433, 产生的气味相近。分析结果与电子鼻PCA分析结果相一致。



A.胰酪胨大豆肉汤(TSB); B.铜绿假单胞菌(Pa);
C.恶臭假单胞菌(Pp); D.荧光假单胞菌(Pf)。

图3 3株假单胞菌的总离子流图

Fig.3 Total ion chromatograms (TICs) of MVCOs of the three *Pseudomonas* species

表1 样品间的相似度

Table 1 Similarity of TIC of MVCOs of the three *Pseudomonas* species and TSB

样品名	相似度
空白 TSB 和铜绿假单胞菌(Pa)	0.7915
空白 TSB 和恶臭假单胞菌(Pp)	0.7618
空白 TSB 和荧光假单胞菌(Pf)	0.6915
铜绿假单胞菌(Pa)和恶臭假单胞菌(Pp)	0.9886
铜绿假单胞菌(Pa)和荧光假单胞菌(Pf)	0.7970
恶臭假单胞菌(Pp)和荧光假单胞菌(Pf)	0.8433

2.2.2 样品挥发性物质成分的鉴定

表2、3 分别列出了空白培养液 TSB 和 3 株假单胞菌的挥发性成分及相对百分含量。表2 可见，空白培养

液 TSB 中检测到 20 种挥发性成分物质，醛类 10 种，酮类 3 种，酯类 1 种及其他类化合物 6 种。主要的成分是醛类，占挥发性物质总量的 74.70%，其中异戊醛和苯甲醛是两种主要的物质，分别占挥发性物质总量的 26.70% 和 30.04%。

表2 空白 TSB 培养液挥发性成分及相对百分含量

Table 2 Volatile compounds and their relative contents in TSB

编号	保留时间(min)	化合物名称	相对含量(%)
1	1.73	2- 丙酮	5.80
2	2.047	异丁醛	1.59
3	2.428	丁醛	2.04
4	2.533	乙酸乙酯	4.78
5	2.593	三氯甲烷	0.86
6	3.287	异戊醛	26.70
7	3.438	2- 甲基丁醛	5.58
8	10.778	庚醛	0.45
9	12.001	2,5- 二甲基吡嗪	2.22
10	13.904	6- 甲基-5- 庚烯-2- 酮	1.40
11	14.099	辛醛	1.27
12	14.264	桉树脑	2.45
13	14.498	苯甲醛	30.04
14	16.752	2- 乙酰基噻唑	0.39
15	17.225	壬醛	4.01
16	17.428	苯乙醛	2.48
17	19.535	L- 樟脑	0.86
18	20.168	癸醛	3.02
19	27.222	(5Z)-6,10- 二甲基-5,9- 十一双烯-2- 酮	0.80
20	28.605	2,4- 二叔丁基苯酚	1.42

表3 中，铜绿假单胞菌(Pa)菌液中检测到 31 种挥发性物质，醛类 3 种，酮类 6 种，醇类 3 种，其他类化合物 19 种，其中 2- 壬酮是主要的成分物质，占挥发性物质总量的 18.78%。恶臭假单胞菌(Pp)菌液中检测到 34 种挥发性物质，醛类 4 种，酮类 6 种，醇类 4 种，酯类 2 种，其他类物质 18 种，其中异戊乙醇是主要的挥发性物质，占挥发性物质总量的 49.87%。荧光假单胞菌(Pf)菌液中检测到了 33 种物质，醛类 2 种，酮类 7 种，醇类 5 种，酯类 3 种，其他类挥发性物质 16 种，其中异戊乙醇、二甲基二硫和 1- 十一碳烯是主要的挥发性物质，分别占挥发性物质总量的 38.34%、15.95% 和 24.03%。与空白培养液相比，3 株假单胞菌菌液中产生了大量不同的挥发性物质，主要的物质成分也发生了改变，只有 2- 丙酮和 2,5- 二甲基吡嗪两种物质成分是空白培养液和 3 株假单胞菌菌液都含有的。初步判断，空白培养液中的挥发性物质成分在假单胞菌生长过程中被吸收代谢，转化成了大量不同的挥发性物质。

3 株假单胞菌菌液的挥发性成分对比，甲硫醇、1,4- 戊二烯、2- 丙酮、二甲基二硫、异戊腈、2- 庚酮、2,5- 二甲基吡嗪、2- 壬酮、苯乙酮是 3 株假单胞菌所共有的；2- 丁酮、氯二溴甲烷、异戊酸、2- 甲基丁酸、

表3 3株假单胞菌挥发性成分及相对百分含量
Table 3 Volatile compounds and their relative contents in MVCOs of the three *Pseudomonas* species

编号	保留时间(min)	化合物名称	相对含量(%)		
			铜绿假单胞菌(Pa)	恶臭假单胞菌(Pp)	荧光假单胞菌(Pf)
1	1.462	甲硫醇	2.11	2.15	3.35
2	1.531	乳酰胺	1.86	—	0.58
3	1.574	1,4-戊二烯	2.83	1.94	1.46
4	1.635	2-丙醇	3.51	—	1.82
5	1.73	2-丙酮	5.70	7.22	1.38
6	2.528	乙酸乙酯	—	6.68	—
7	2.268	2-丁醇	2.14	—	1.03
8	2.506	2-丁酮	2.45	—	—
9	2.589	三氯甲烷	0.96	—	0.53
10	3.204	丁醇	—	1.12	0.68
11	3.287	异戊醛	2.74	0.64	—
12	4.089	2-戊酮	—	—	0.38
13	4.579	甲硫醚	—	—	1.55
14	4.748	异戊乙醇	—	49.87	38.34
15	5.749	二甲基二硫	6.70	2.30	15.95
16	6.105	异戊腈	0.74	0.18	0.34
17	7.436	乙酸丁酯	—	—	0.16
18	7.93	氯二溴甲烷	2.08	—	—
19	8.138	异戊酸	3.56	—	—
20	8.324	2-甲基丁酸	0.44	—	—
21	9.378	乙酸异戊酯	—	0.76	1.22
22	9.746	甲基苯酚	6.84	—	0.98
23	10.384	2-庚酮	1.00	1.32	0.56
24	10.54	硫代丁酸甲酯	—	—	0.22
25	12.022	2,5-二甲基吡嗪	1.15	0.32	0.75
26	12.53	3,5-二甲基辛烷	—	0.38	—
27	12.642	2-甲基-5-(甲基硫)呋喃	0.82	—	—
28	13.704	柑橘烯	9.73	6.38	—
29	13.9	6-甲基-5-庚烯-2-酮	—	2.26	—
30	14.216	2-乙基乙醇	—	1.56	—
31	14.259	桉树脑	—	1.36	—
32	14.511	1-十一碳烯	9.56	—	24.03
33	14.754	1-环十二烷烯	—	—	1.61
34	15.742	戊基环丙烷	—	—	0.14
35	16.423	2-壬醛	2.82	0.38	0.22
36	16.752	1-(1,3-噻唑-2-基)乙醇	—	—	0.32
37	16.826	2-壬酮	18.78	4.56	0.42
38	17.225	壬醛	0.54	0.74	—
39	17.429	十二烷烃	—	0.47	—
40	18.061	苯乙酮	0.70	0.52	0.24
41	19.145	2,6,10-三甲基十二烷	—	0.47	—
42	19.531	L-樟脑	0.37	0.74	—
43	20.168	癸醛	—	0.32	0.18
44	20.32	十三烷烃	0.53	0.64	—
45	20.593	3-丙酰吡啶	—	—	0.20
46	21.257	1-亚甲基-1H-茚	0.68	0.54	0.18
47	22.358	3-苯基呋喃	—	—	0.24
48	23.047	十四烷烃	1.38	0.58	—
49	24.374	2-甲基萘	—	0.29	0.09
50	24.998	(1E)-1-乙缩醛-1H-茚	—	0.56	—
51	27.868	1,5-二甲基萘	—	0.25	—
52	28.54	二丁基羟基甲苯	4.30	0.82	0.44
53	28.609	4,6-二叔丁基酚	0.34	0.24	—
54	30.513	1-(3,5-二叔丁基-4-羟苯基)-1-丙酮	0.82	0.28	0.29

注：—，未检出。

2-甲基-5-(甲基硫)呋喃是铜绿假单胞菌(Pa)所新产生的；3,5-二甲基辛烷、6-甲基-5-庚烯-2-酮、2-乙基乙醇、十二烷烃、2,6,10-三甲基十二烷、(1E)-1-乙缩醛-1H-茚、1,5-二甲基萘是恶臭假单胞菌(Pp)所新产生的；2-戊酮、甲硫醚、乙酸丁酯、硫代丁酸甲酯、1-环十二烷烯、戊基环丙烷、3-丙酰吡啶、3-苯基呋喃是荧光假单胞菌(Pf)所新产生的。结果表明，3株假单胞菌在生长代谢过程中产生的挥发性物质有着明显的区别。

3 讨论

常见微生物检测方法有很多，传统意义上的方法主要依靠微生物形态上的生理生化鉴定，耗时长、敏感度低，很难及时检测出样品中的致病菌。免疫学检测方法利用抗原抗体的特异性反应，并结合一些生物化学或物理学方法来进行检测，特异性好、灵敏度高，但操作繁琐时间长，对实验技能要求较高。分子生物学方法主要针对核酸进行检测，与免疫学方法一样，特异性好、灵敏度高，但需要进行细胞破壁提取核酸。气味指纹技术用于微生物的检测，其主要针对于微生物的挥发性代谢产物，对样品没有特殊的要求，操作简单、费时短、灵敏度高，最重要的是在操作过程中不需对样品进行任何破坏性处理，因而在微生物的快速无损检测方面具有很好的应用前景。

Irmiler等^[14]用电子鼻结合MS检测器挑选能产生很好风味的乳酸菌。他们把乳酸菌接种于氨基酸液中，用顶空萃取其挥发性物质，然后注入以电子鼻为基础的MS检测器中，用PCA来区分不同的菌株，在这基础上挑选能产生很好风味的乳酸菌。Siripatrawan^[15]用金属氧化传感器结合模式识别快速区别了大肠杆菌和鼠李沙门氏菌。他把大肠杆菌和鼠李沙门氏菌分别培养于极好的肉汤中，于37℃培养，同时以空白培养液作为对照。培养所得的挥发性物质用GC-MS做鉴定，同时用电子鼻做监测。所得数据用PCA和人工神经网络进行分析。结果发现，大肠杆菌和鼠李沙门氏菌能被很好的进行区分。本实验采用了电子鼻和HS-SPME-GC-MS气味指纹技术对3株从猪肉中分离的假单胞菌在TSB中产生的挥发性代谢产物进行检测分析，结果发现，它们的挥发性物质有着差异，它们能够被很好的区分。

Miller等^[16]利用GC-MS技术检测细菌引起的肉类食品变质中发现，假单胞菌(*Pseudomonas perolens*)能够产生乙醇、乙醛、乙酸乙酯、丁酮、甲基硫醇、二甲基二硫醚等MVOCs。Freeman与Stanley分别在假单胞菌感染变质的鸡肉^[17]、牛肉^[18]中也得到类似的结果，所检测到的MVOCs主要为醇、醛、酮、酸、酯类化合物。与本实验中检测出醇类、醛类、酮类、酸类、酯类、含硫化合物结果较为类似，但也存在差异，比

如烯烃类物质的检出,造成的原因可能是底物不同所引起的。本实验着重分析3株假单胞菌经纯培养后的挥发性物质,并用空白培养液作为对照,结果发现,3株假单胞菌纯培养后产生了明显不同于空白培养液的气味成分物质,3株假单胞菌之间也产生了一些不同的挥发性物质成分如:与其他2株假单胞菌相比,铜绿假单胞菌(Pa)新产生了2-丁酮、异戊酸、2-甲基丁酸、2-甲基-5-(甲基硫)呋喃。至于这些物质是不是铜绿假单胞菌(Pa)所特有的,尚缺乏与其他大量菌(包括不同属的、不同种的、同种不同株的)的比较。因此若在后期能够进一步分析更多的细菌挥发性代谢产物,很有可能得到不同细菌的特异性挥发性产物,从而建立不同细菌的气味指纹特征图谱库,为将来利用气味指纹技术检测微生物奠定坚实的基础。

参考文献:

- [1] 梁华正,张燮,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.
- [2] LABOWS J N, MCGINLEY K J, LEYDEN J J. Characteristic γ -lactone odor production of the genus *pitrosporium*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1979, 38(3): 412-415.
- [3] GALLOISI A, GRIMONT P D. Responsible for the potato like odor produced by some serratia and cedecea strains[J]. Appling and Environmental Microbiology, 1985, 50(4):1048-1051.
- [4] SCHNURER J, OLSSON J, BOORJESSON T. Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage[J]. Fungal Genetics and Biology, 1999, 27: 209-217.
- [5] SIRIPATRAWAN U, LINZ J E, HARTE B R. Electronic sensor array coupled with articial neural network for detection of *Salmonella typhimurium*[J]. Sensors and Actuators B, 2006, 119: 64-69.
- [6] TRACEY R P, BRITZ T J. Freon 11 extraction of volatile metabolites formed by certain lactic acid bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(6): 1617-1623.
- [7] ALUGUPALLI S, LARSSON I, SLOSAREK M, et al. Application of gas chromatography-mass spectrometry for rapid detection of *Mycobacterium xenopi* in drinking water[J]. Appling and Environmental Microbiology, 1992, 58(11): 3538-3541.
- [8] ALLARDYCE R A, LANGFORE V S, HILL A L. Detection of volatile metabolites produced by bacterial growth in blood culture media by selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS)[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 65: 361-365.
- [9] SIRIPATRAWAN U, HARTE B R. Solid phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry integrated with chemometrics for detection of *Salmonella typhimurium* contamination in a packaged fresh vegetable[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 581: 63-70.
- [10] DUTTA R, HINES E L, GARDNER J W, et al. Bacteria classification using Cyranose 320 electronic nose[J]. Bio Medical Engineering OnLine, 2002, 1(4): 1-4.
- [11] PAVLOU A, TURNER A R F, MAGAN N. Recognition of anaerobic bacterial isolates *in vitro* using electronic nose technology[J]. Letters in Applied Microbiology, 2002, 35: 366-369.
- [12] 鲁小利,海铮,王俊.可乐饮料的电子鼻检测研究[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2006,32(6):677-682.
- [13] 张晓敏,朱丽敏,张捷,等.采用电子鼻评价肉制品中的香精质量[J].农业工程学报,2008,24(9):175-178.
- [14] IRMLER S, HEUSLER M L, RABOUD S, et al. Rapid volatile metabolite profiling of *Lactobacillus casei* strains: selection of flavour producing cultures[J]. Australian Journal of Dairy Technology, 2006, 61(2): 123-127.
- [15] SIRIPATRAWAN U. Rapid differentiation between *E. coli* and *Salmonella typhimurium* using metal oxide sensors integrated with pattern recognition[J]. Sensors and Actuators B, 2008, 133: 414-419.
- [16] MILLER A, SCANLAN R A, LEE J S, et al. Volatile compounds produced in sterile fish muscle by *Pseudomonas perolens*[J]. Applied Environmental Microbiology, 1973, 25(2): 257-261.
- [17] FREEMAN L R, SILVERMAN G L, ANGELINI P, et al. Volatiles produced by microorganisms isolated from refrigerated chicken at spoilage [J]. Applied Environmental Microbiology, 1976, 32(2): 222-231.
- [18] STANLEY G, SHAW K J, EGAN A F. Volatile compounds associated with spoilage of vacuum-packaged sliced luncheon meat by *Brochothrix thermosphacta*[J]. Applied Environmental Microbiology, 1981, 41(3): 816-818.