

# 利用电子鼻检测 6 种商业果汁饮料中脂环酸芽孢杆菌的污染

钟武, 李二虎, 郭晓丽, 郭小, 王美玉, 张雨莎

(华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉 430070)

**摘要:** 脂环酸芽孢杆菌具有嗜酸耐热的特性和产芽孢的能力, 在果汁中萌发繁殖会使产品出现异味, 导致腐败。本文将筛选得到的分离菌株 XC-6 和购自德国菌种保藏中心的标准菌株 DSM 3922 分别等量接种到 6 种果汁饮料, 采用 FOX 4000 电子鼻结合主成分分析对接种植样品与正常样品进行对比分析, 发现电子鼻可快速有效鉴别出经不同处理的样品, 其中第一主成分累积方差贡献率均大于 95%。GC-MS 分析表明接种样品相较于正常样品, 挥发性物质图谱存在着差异, 特征表向物质含量的差异可以被电子鼻用来鉴别正常样品与污染样品。在水蜜桃乳饮料和水果牛奶混合饮料中均检出了脂环酸芽孢杆菌的特征代谢产物邻乙氧基苯酚和愈创木酚, 它们的含量显著高于正常样品。本实验表明电子鼻可以根据样品气味图谱的不同而对污染样品做出准确的鉴别, 是可以将电子鼻作为早期快速检测脂环酸芽孢杆菌污染的检测工具。

**关键词:** 脂环酸芽孢杆菌; 果汁饮料; 电子鼻; 主成分分析; GC-MS

文章编号: 1673-9078(2017)12-239-248

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.12.036

## Detection of *Alicyclobacillus* spp. Contamination in 6 Commercial Beverages by Electronic Nose

ZHONG Wu, LI Er-hu, GUO Xiao-li, GUO Xiao, WANG Mei-yu, ZHANG Yu-sha

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** *Alicyclobacillus* has the character of high tolerance to acid and heat and the ability of producing spore, which can germinate and propagate in the fruit juice and then make the products smell bad and cause corruption. In this study, the isolated strain XC-6 and standard strain DSM 3922 obtained from the German bacterial collection center were inoculated equally into 6 kinds of fruit juices, respectively. FOX 4000 electronic nose combined with principal component analysis was used for the analysis of inoculated samples and normal samples. The results showed that the electronic nose could identify the contaminated samples quickly and effectively from 6 kinds of fruit juices and the cumulative variance contribution rates of the first principal component were more than 95%. GC-MS analysis showed that the prints of volatile compounds between inoculated samples and normal samples were different. The difference of some typical substances content could be used to identify contaminated samples and normal samples by electronic nose. Adjacent ethoxy phenol and guaiacol, the characteristic metabolites of *Alicyclobacillus*, were detected in the peach beverage and fruit milk mixed drinks, of which the content was significantly higher than the normal samples. The experiments showed that the electronic nose could identify the contaminated samples accurately according to the difference of the juice samples smell maps, which could be used as a testing tool for early detection of *Alicyclobacillus* pollution.

**Key words:** *Alicyclobacillus*; fruit juices; electronic nose; principal component analysis; GC-MS

果汁饮料独特的气味不仅能给人以愉悦的感官享受, 还在一定程度上表征着产品的品质。脂环酸芽孢杆菌是果汁饮料中常见的污染性微生物, 革兰氏阳性细菌, 非致病菌, 可产芽孢<sup>[1]</sup>, 其细胞膜上特有的  $\omega$ -

收稿日期: 2017-06-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31201414); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划 (T201725)

作者简介: 钟武 (1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工

通讯作者: 李二虎 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品生物技术

脂环族脂肪酸使其具备了显著的耐热、耐酸特性<sup>[2]</sup>, 这些特性使其在 80 °C 的环境和在 pH 低于 4.0 的酸性条件下均可正常生长, 且能以芽孢的形式存活于经商业杀菌的果汁饮料产品中<sup>[2-7]</sup>。脂环酸芽孢杆菌污染的产品无明显气体生成, 在初期很难将其与正常产品分开, 在后期储存及销售过程中, 其芽孢萌发繁殖, 代谢产生愈创木酚和卤代酚等<sup>[6-8]</sup>, 使产品出现类似烟熏味、药水味或消毒剂的异味, 甚至形成白色沉淀<sup>[5,9]</sup>。当这样的产品出现在市场上时, 会对企业造成巨大的

经济损失<sup>[10]</sup>。在当今国际贸易中已严格要求进出口浓缩果汁中该菌的检出量不得超过 10 CFU/mL, 因此建立一种在污染初期能快速准确检测脂环酸芽孢杆菌的方法是果汁饮料行业亟待解决的问题。目前常用检测方法有微生物学方法、色谱分析技术<sup>[11-13]</sup>和生物分析技术<sup>[14,15]</sup>。微生物学方法操作最为简便, 但耗时长, 可能出现假阳性结果。色谱分析法对仪器要求较高, 样品前处理比较繁琐。生物分析技术是利用分子生物学技术手段如 16S rDNA 对产品中的目标菌进行检测, 成本较高<sup>[15,16]</sup>。

电子鼻通过模拟人类嗅觉系统来实现对检测对象的品质评价, 主要通过气味指纹信息对气体或挥发性成分做定性或定量的检测<sup>[17-19]</sup>, 脂环酸芽孢杆菌污染的样品相较于正常样品, 主要在挥发性物质图谱上存在着差异, 采用电子鼻对气味进行感知分析, 不需繁琐的样品预处理, 分析时间短<sup>[19]</sup>, 为果汁饮料中脂环酸芽孢杆菌的快速检测提供了可能。目前应用电子鼻

技术检测判别脂环酸芽孢杆菌仅在实验室中进行, 尚未推广到工厂实际应用中。本实验以六种市售商业无菌果汁饮料为实验原料, 采用 FOX4000 电子鼻对正常果汁样品和接种脂环酸芽孢杆菌果汁样品进行测定, 通过主成分分析进行鉴别, 并结合 GC-MS 技术检测样品中的特征气味物质, 分析电子鼻能鉴别样品的物质基础, 为其能对果汁饮料进行快速、准确的鉴定提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

#### 1.1.1 商业果汁饮料

选取外包装完好、无外漏, 在保质期内无防腐剂添加的 6 种果汁饮料, 详情见表 1。将果汁饮料在无菌条件下分装入灭菌后的玻璃瓶中密封保存。

表 1 6 种商业果汁饮料成分表

Table 1 Beverage ingredients of 6 kinds of commercial fruit juice beverages

编号	名称	厂商	pH	营养物质 (以 100 mL 计)	配料
1	水蜜桃味含乳饮料	湖北达利食品有限公司	4.10	蛋白质: 1.0 g; 脂肪: 1.3 g; 碳水化合物: 6.5 g; 钠: 67 mg; 维生素 D: 1.0 μg; 磷: 31 mg; 钾: 51 mg; 钙: 34 mg。	纯净水, 全脂乳粉, 白砂糖, 食品添加剂 (乳酸、柠檬酸、羟甲基纤维素钠、黄原胶、单硬脂酸甘油酯、瓜尔胶、蔗糖脂肪酸酯、氯化羟丙基淀粉、柠檬酸钠、阿斯巴甜 (含苯丙氨酸)、安赛蜜、苹果浓缩汁、膳食纤维、水蜜桃浓缩汁、维生素 D、食用香料。
2	混合果汁饮料	百事 (中国) 有限公司	3.43	蛋白质: 0 g; 脂肪: 0 g; 碳水化合物: 11.2 g; 钠: 26 mg。	水, 白砂糖, 混合浓缩果汁 (苹果、葡萄、西番莲 (热情果)、菠萝、芒果、番石榴), 食品添加剂 (柠檬酸、食用香精、羟甲基纤维素钠、果胶、柠檬酸钠、维生素 C、β-胡萝卜素)。
3	橙汁饮料	统一集团	3.38	蛋白质: 0 g; 脂肪: 0 g; 碳水化合物: 10.6 g; 钠: 10 mg; 维生素 C: 25.0 mg。	水、白砂糖水、白砂糖、橙浓缩汁、食品添加剂 [柠檬酸、苹果酸、柠檬酸钠、维生素 C、D-异抗坏血酸钠、阿拉伯胶、食用香精 (含 β-胡萝卜素)]
4	苹果汁饮料	汇源集团有限公司	3.20	蛋白质: 0 g; 脂肪: 0 g; 碳水化合物: 11.2 g; 钠: 25 mg	纯净水, 苹果浓缩汁
5	草莓复合果肉果汁饮料	加拿大拉松地工业有限公司	3.72	蛋白质: 0.2 g; 脂肪: 0.6 g; 碳水化合物: 13.5 g (糖 12.6 g); 维生素 C: 31.3 mg。	水, 草莓原浆, 白砂糖, 浓缩苹果汁, 食用香精, 维生素 C, 食品添加剂 (柠檬酸、紫胶红)。
6	水果牛奶饮料	可口可乐 (中国) 公司	4.17	蛋白质: 1.1 g; 脂肪: 0.6 g; 碳水化合物: 6.4 g (糖 6.4 g); 钠: 65.6 mg。	水, 白砂糖, 椰果粒, 果葡糖浆, 全脂奶粉, 果汁 (苹果浓缩汁、菠萝浓缩汁), 浓缩乳清蛋白, 食用添加剂 (羟甲基纤维素钠、柠檬酸、磷酸、柠檬酸钠、安赛蜜、果胶、阿斯巴甜 (含苯丙氨酸)、黄原胶), 食用淀粉, 食用香精, 氯化钠。

### 1.1.2 菌株

本试验选取 2 株脂环酸芽孢杆菌, 一株为本实验室从玉米果汁饮料中分离得到的 XC-6, 经分子生物学鉴定为 *Alicyclobacillus* spp., NCBI 登陆号为 KJ158157; 一株为购自德国菌种保藏中心的标准菌株 *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922。

### 1.1.3 培养基

BAT 液体培养基 (g/L)<sup>[6]</sup>:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.50,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.25,  $(NH_4)_2SO_4$  0.20,  $KH_2PO_4$  3.0, 酵母膏 2.0, 葡萄糖 5.0, 痕量盐溶液 1 mL (痕量盐溶液 (g/L):  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.66、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.18、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.16、 $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.15、 $CoCl_2 \cdot 5H_2O$  0.18、 $H_3BO_3$  0.10、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.30), 蒸馏水 1000 mL。用 0.5 mol/L  $H_2SO_4$  调 pH 值至 3.7, 115 °C 灭菌 30 min, 冷却待用。

### 1.2 主要仪器设备

SW-CJ-1FD 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; HNY-200D 恒温培养振荡器, 天津市欧诺仪器仪表有限公司; SPX-250B 生化培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; YXQ-LS-30SLL 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; AR522CNOHAUS 电子天平, 奥豪斯仪器(上海)有

限公司; pH560 pH 计, 美国 Beckman Coulter 公司; FOX 4000 电子鼻, 法国 AlphaM.O.S. 公司; Agilent7890A 型气相色谱仪, Agilent 公司; Agilent 5975C 质谱仪, Agilent 公司; 50/30  $\mu m$  DVB/CAR/PDMS 的 SPME 萃取头, 美国 Supelco 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 菌种扩培与纯化

将 2 株脂环酸芽孢杆菌挑取少量接种于 250 mL BAT 液体培养基中, 于 45 °C、200 r/min 摇床中震荡培养 48 h, 无菌条件下以 4000 r/min 离心 15 min 获得菌体沉淀, 用无菌生理盐水冲洗沉淀得到菌悬液, 再对菌悬液以 4000 r/min 离心 15 min, 重复上述操作 3 次, 得到无异味的菌体沉淀。

#### 1.3.2 微生物接种与计数

将所获的两株菌的沉淀等量接种于 6 种商业果汁饮料中, 控制接种量为  $10^2$  CFU/mL, 对照组不接种任何菌株(不同处理的样品命名见表 2)。将接种组 and 对照组于 80 °C 水浴 30 min, 快速冷却至 45~65 °C, 让菌体以芽孢形式存在于饮料样品中。将经不同处理的样品置于 45 °C 恒温培养箱中培养 30 d, 并使用 BAT 平板计数测定样品中脂环酸芽孢杆菌的数量。

表 2 不同处理的 6 种商业果汁饮料命名

Table 2 The names of 6 kinds of commercial fruit juice beverages with different treatments

	果汁名称	未接种	接种标准菌株	接种分离菌株
1	水蜜桃乳饮料	WTR	BZTR	FLTR
2	混合果汁饮料	WGZ	BZGZ	FLGZ
3	橙汁饮料	WCZ	BZCZ	FLCZ
4	苹果汁饮料	WPG	BZPG	FLPG
5	草莓复合果汁饮料	WCM	BZCM	FLCM
6	水果牛奶混合饮料	WNN	BZNN	FLNN

### 1.3.3 电子鼻分析

法国 Alpha M.O.S FOX4000 电子鼻, 配有 18 种金属氧化物传感器 (LY2/LG, LY2/G, LY2/AA, LY2/GH, LY2/gCTL, LY2/gCT, T30/1, P10/1, P10/2, P40/1, T70/2, PA2, P30/1, P40/2, P30/2, T40/2, T40/1, TA/2)、自动进样器 HS100 和 SOFTV12.3 软件<sup>[18]</sup>。

在 10 mL 旋口顶空瓶中加入 1 mL 待测样品, 加盖密封静置 1 h, 使其气-液平衡, 然后置于进样器上自动进样分析。以载气为合成干燥空气, 流速为 150 mL/min, 注射体积 2.5 mL (注射针总体积 5.0 mL),

注射针温度 50 °C, 注射速度 2.5 mL/s, 获取时间 90 s, 延滞时间 300 s。每个样品重复分析 4 次, 并将由电子鼻获得的数据进行主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA)<sup>[18]</sup>。

### 1.3.4 GC-MS 分析

分别准确量取 5 mL 经不同处理的果汁样品于 10 mL 钳口样品瓶中, 加入 2.60 g NaCl, 20  $\mu L$  内标物环己酮, 环己酮的浓度为 0.946 mg/mL, 密封后于磁力搅拌器上 60 °C 平衡 30 min, 采用 50/30  $\mu m$  DVB/CAR/PDMS 萃取头在 60 °C 下顶空吸附 40 min, 插入 GC 进样口解析 5 min 进行 GC-MS 分析<sup>[18]</sup>。

采用 Agilent 7890 型气相色谱仪, 毛细管柱为 DB-WAX (30 m×320 μm×0.25 μm)。升温程序: 40 °C 保持 3 min, 以 3 °C/min 升至 160 °C, 保持 2 min, 再以 8 °C/min 升至 220 °C, 保持 3 min, 进样口温度 250 °C。质谱条件: 离子源温度 230 °C, 四极杆温度 150 °C, 离子化方式 EI, 电子能量 70 eV, 质量扫描范围为 30~550 u/sec<sup>[18]</sup>。

定性分析: 应用气相色谱-质谱联用仪进行分析鉴定, 分析结果运用计算机谱库 (NIST05a) 进行初步检索及资料分析, 再结合文献的保留指数进行比对并进行人工谱图解析, 确认挥发性物质的各个化学组成。

定量分析: 用内标法进行定量, 内标物为环己酮。

计算公式为:

各挥发性成分的含量(μg/mL)=各组分的峰面积×内标物质量(μg)/[内标物峰面积×样品量(mL)]

将由 GC-MS 获得的挥发性物质含量进行主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 确定各指标反映物质。

### 1.3.5 数据分析

试验结果以平均值±标准误差(Mean±SE)表示, 所有试验均进行 3 次重复。用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行方差分析和主成分分析, Origin 8.5 软件画图。

## 2 结果与讨论

表 3 不同处理果汁饮料中脂环酸芽孢杆菌菌落总数 (CFU/mL)

果汁编号	果汁名称	未接种	接种标准菌株	接种分离菌株
1	水蜜桃乳饮料	-	8.5±0.71×10 <sup>6</sup>	5.5±0.71×10 <sup>6</sup>
2	混合果汁饮料	-	9.0±1.41×10 <sup>2</sup>	1.5±0.71×10 <sup>2</sup>
3	橙汁饮料	-	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>
4	苹果汁饮料	-	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>
5	草莓复合果汁饮料	-	2.5±0.71×10 <sup>3</sup>	3.5±0.71×10 <sup>3</sup>
6	水果牛奶混合饮料	-	2.5±0.71×10 <sup>4</sup>	7.0±1.41×10 <sup>5</sup>

注: “-”表示未检出。

### 2.2 电子鼻分析

从经不同处理的 6 种果汁饮料中随机抽样 4 次进行电子鼻分析, 将被测样品的数据进行主成分分析, 建立二维坐标图, 横纵坐标为提取的前两个主成分, 6 种果汁饮料样品的主成分分析图如图 1 所示。

其中, 6 种样品的第一主成分均解释了原始数据矩阵 95% 以上的信息, 说明 PC1 包含了大量信息, 两个主成分的累计贡献率均达 98% 以上, 可有效解释原

### 2.1 微生物计数结果

将 6 种商业果汁饮料分别接种等量的标准菌株 DSM 3922 和分离菌株 XC-6, 与未经接种处理的空白对照组共同置于 45 °C 培养箱中厌氧培养, 将培养 30 d 后的果汁饮料在 BAT 平板上进行计数培养, 菌落总数见表 3, 结果表明在未接种的果汁饮料中均未检测出脂环酸芽孢杆菌, 而经过接种处理的果汁饮料则有不同数量的菌落生长。

以水蜜桃乳饮料样品中检出量最大, 菌落总数达到了 10<sup>6</sup> CFU/mL, 与初始接种量 10<sup>2</sup> CFU/mL 相比有显著的增长, 其次是水果牛奶混合饮料样品, 菌落总数达到了 10<sup>4</sup> CFU/mL, 脂环酸芽孢杆菌在这两种果汁饮料中生长更为显著, 可能与这两种饮料的 pH 稍高于其他饮料有关, 更接近其最适生长 pH。混合果汁饮料和草莓复合果汁饮料的菌落总数稍大于初始接种量, 菌落总数分别达到了 10<sup>2</sup> CFU/mL 和 10<sup>3</sup> CFU/mL, 而在橙汁饮料样品和苹果汁饮料样品中, 菌落总数的检出量反而小于初始接种量, 表明该环境下脂环酸芽孢杆菌可以生长, 但可能缺乏菌种大量繁殖的营养物质。对于水蜜桃乳饮料样品和混合果汁饮料样品, 标准菌株的菌落总数大于分离菌株, 而在草莓复合果汁饮料样品和水果牛奶混合饮料样品中, 前者的菌落总数小于后者。

始矩阵的绝大部分信息。由图中可以看出, 经不同处理的果汁饮料可被明显区分开, 除了 WCZ 和 BZCM 的样品组内间距稍大, 其它同一处理样品的组内间距在 PC1 方向上距离均很小, 在 PCA 图中分布得较为紧密。WTR、WGZ、WCZ 和 WNN 偏向于第一主成分增大的方向, WPG 和 WCM 则偏向于第一主成分减小的方向。在 6 种果汁饮料中, 接种了标准菌株的样品相较于接种了分离菌株的样品均偏向于第二主成分增大的方向。

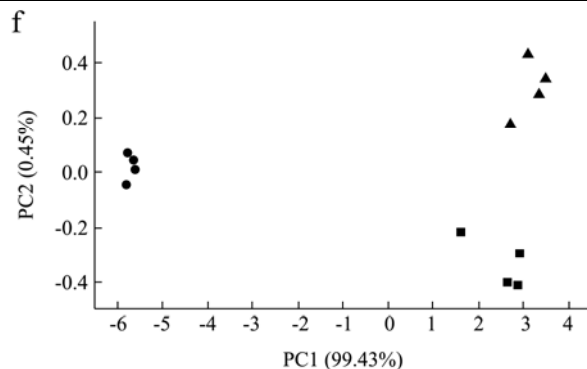
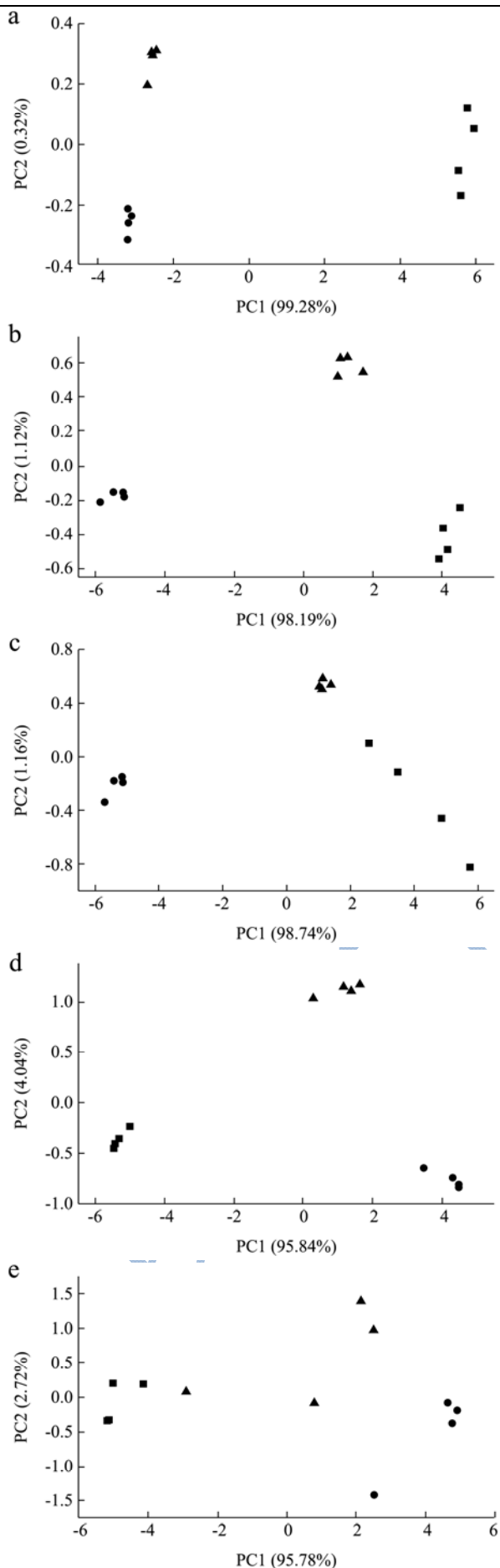


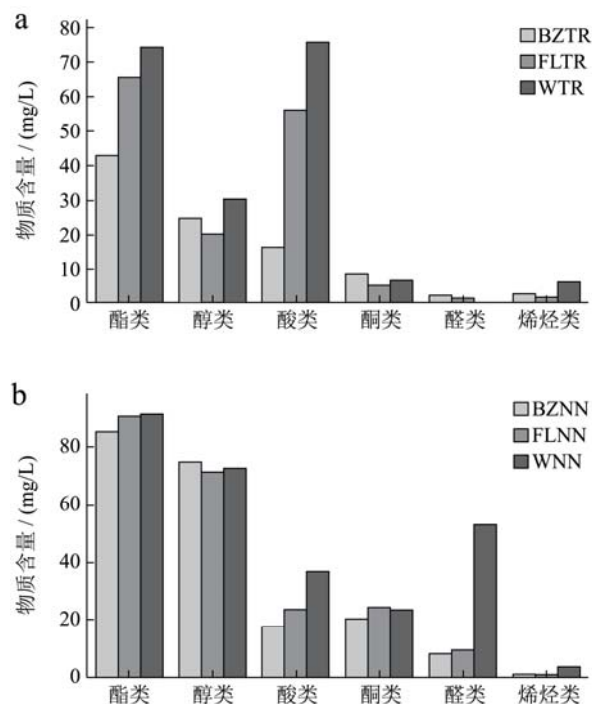
图1 电子鼻对不同处理的6种果汁饮料样品的主成分分析图  
**Fig.1 Principal components analysis of 6 kinds of commercial fruit juice beverages with different treatments by electronic nose**

注: a, 水蜜桃乳饮料; b, 混合果汁饮料; c, 橙汁饮料; d, 苹果汁饮料; e, 草莓复合果汁饮料; f, 水果牛奶混合饮料。  
 ■, 对照 (未接种); ●, 接种分离菌株; ▲, 接种标准菌株。

### 2.3 GC-MS 分析

在电子鼻判别分析的同时, 采用 GC-MS 检测经不同处理的6种商业果汁饮料样品挥发性成分的种类及数量, 分析脂环酸芽孢杆菌污染果汁饮料的挥发性图谱, 从而将其与正常样品进行鉴别区分, 为利用电子鼻能快速有效对该菌污染进行鉴定提供理论依据。

根据脂环酸芽孢杆菌在果汁饮料中的生长情况, 将其分为三类, 水蜜桃乳饮料和水果牛奶混合饮料的大量繁殖组, 混合果汁饮料和草莓复合果汁饮料的少量繁殖组, 橙汁饮料和苹果汁饮料的基本生长组。



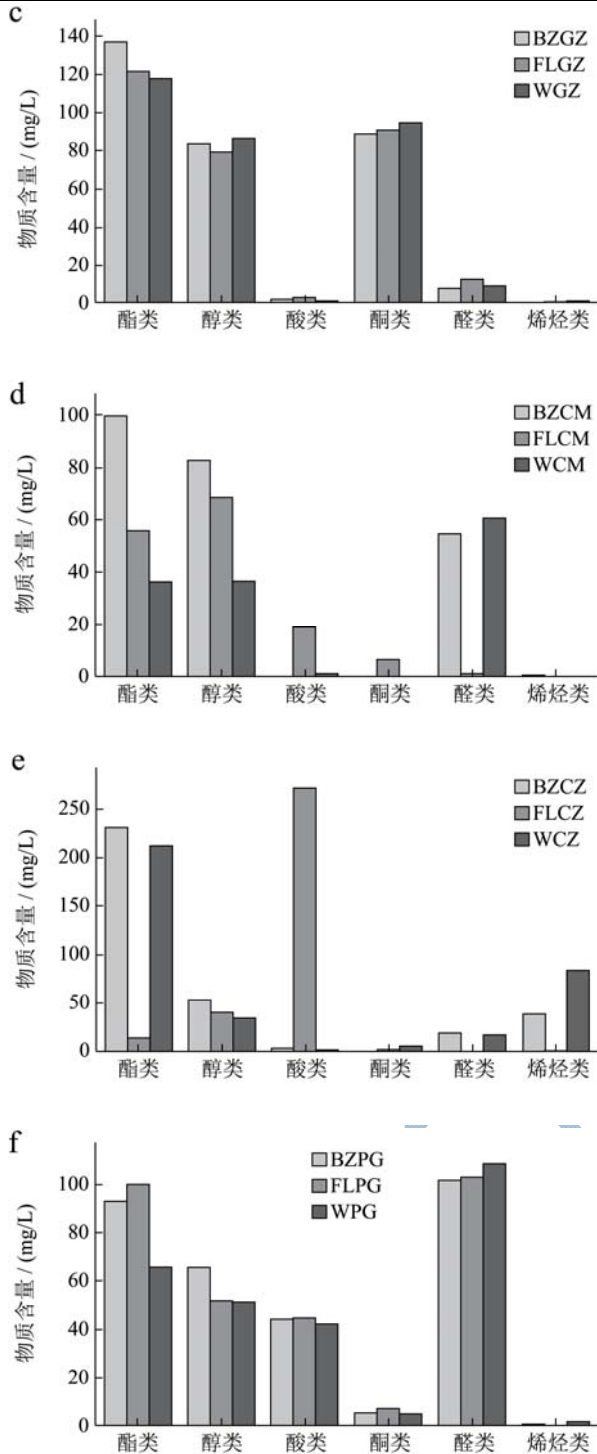


图2 不同处理的6种果汁饮料样品中挥发性物质含量

Fig.2 The volatile matter contents of 6 kinds of commercial fruit juice beverages with different treatments

注：a，水蜜桃乳饮料；b，水果牛奶混合饮料；c，混合果汁饮料；d，草莓复合果汁饮料；e，橙汁饮料；f，苹果汁饮料。

经 GC-MS 分析，在水蜜桃饮料样品中，BZTR 检测出 50 种挥发性物质，FLTR 检测出 50 种挥发性物质，WTR 检测出 46 种挥发性物质，挥发性物质的

种类及含量见图 2a，由图可知，相较于 WTR，BZTR 与 FLTR 在酯类、醇类、酸类、酮类和烯烃类物质含量上均有不同程度的降低，新生成了醛类物质。在水果牛奶混合饮料样品中，BZNN 检测出 56 种挥发性物质，FLNN 检测出 64 种挥发性物质，WNN 检测出 62 种挥发性物质，挥发性物质的种类及含量见图 2b，三种处理的果汁均含有较高的酯类和醇类物质，相较于 WNN，BZNN 与 FLNN 在酸类、醛类物质和烯烃类物质含量上均有显著地降低。脂环酸芽孢杆菌在这两种果汁中有较明显的生长繁殖，代谢了果汁饮料中原来的一些挥发性物质，同时也产生了一些新的物质，并最终对果汁饮料的挥发性气味产生影响。

经 GC-MS 分析，在混合果汁饮料中，BZGZ 检测出 60 种挥发性物质，FLGZ 检测出 58 种挥发性物质，WGZ 检测出 65 种挥发性物质，挥发性物质的种类及含量见图 2c，由图可知，相较于 WGZ，BZGZ 与 FLGZ 在酯类物质含量上有所升高，而在醇类、酮类、烯烃类物质含量上均降低了。在草莓复合果汁饮料中，BZCM 检测出 32 种挥发性物质，FLCM 检测出 38 种挥发性物质，WCM 检测出 30 种挥发性物质，挥发性物质的种类及含量见图 2d，相较于 WCM，BZCM 与 FLCM 在酯类、醇类物质含量上均升高了，FLCM 中新生成了酮类物质，BZCM 中新生成了烯烃类物质。脂环酸芽孢杆菌在这两种果汁中有少量的生长繁殖，在混合果汁饮料中，各类物质的含量没有很明显的区别，但是果汁的挥发性气味已发生了改变，可能是在生长繁殖过程中改变了挥发性物质的种类。在草莓复合果汁饮料中，脂环酸芽孢杆菌明显代谢消耗了酯类和醇类物质，醛类物质含量的差异表明不同的菌种对挥发性物质的代谢也不一样。

经 GC-MS 分析，在橙汁饮料中，BZCZ 检测出 68 种挥发性物质，FLCZ 检测出 37 种挥发性物质，WCZ 检测出 71 种挥发性物质，挥发性物质的种类及含量见图 2e，由图可知，相较于 WCZ，BZCZ 与 FLCZ 在醇类物质含量上均升高了，而在酮类、烯烃类物质含量上均降低了，FLCZ 中生成了大量的酸类物质。在苹果汁饮料中，BZPG 检测出 56 种挥发性物质，FLPG 检测出 54 种挥发性物质，WPG 检测出 54 种挥发性物质，挥发性物质的种类及含量见图 2f，由图可知，相较于 WPG，BZPG 与 FLPG 在酯类、醇类、酸类、酮类物质含量上均有所升高，在醛类、烯烃类物质含量均降低了。脂环酸芽孢杆菌在这两种果汁中只有基本的生长，不同菌株的代谢情况在橙汁饮料中有明显的差别，而在苹果汁饮料中则没有表现出这种特征。

在接种处理的水蜜桃乳饮料和水果牛奶混合饮料中均检测出了含量很高的愈创木酚和邻乙氧基苯酚,在前者中愈创木酚最高可达 86.53 mg/L,邻乙氧基苯酚最高可达 92.84 mg/L,后者中愈创木酚最高可达 74.01 mg/L,邻乙氧基苯酚最高可达 19.32 mg/L,这两种物质是脂环酸芽孢杆菌的特征代谢产物,在未接种处理果汁样品和其他 4 组接种处理果汁样品中均未检出,这与脂环酸芽孢杆菌在这两种饮料中大量繁殖有关。

## 2.4 主成分分析

利用 SPSS 17.0 软件分别对经不同处理的 6 种果汁饮料的挥发性物质的含量进行主成分分析,得到主成分的特征值和特征向量见表 4。由表可知,6 种果汁饮料的第 1 主成分(PC1)和第 2 主成分(PC2)的累积贡献率均为 100%,主成分分析一般提取主成分包含 90%以上信息,因此提取的 2 个主成分足以说明该数据的变化趋势。

由 6 种果汁饮料的挥发性物质的成分矩阵系数可知,在水蜜桃乳饮料中,PC1 反映的指标主要有乙醇、柠檬烯、戊酸戊酯、2-壬酮、辛酸;PC2 反映的指标主要有异戊酸乙酯、醋酸异戊酯、2-庚酮、正辛醇和月桂酸。在混合果汁饮料中,PC1 反映的指标主要有己酸乙酯、己酸,2-丙烯酯、丁酸,3-己烯酯、丁位突厥酮和马索亚内酯;PC2 反映的指标主要有甲基环庚烷、2-羟基-3-甲基-6-甲基乙基-2-环己烯酮、丙二酸、3,5-二叔丁基邻苯二酚和 3-甲基丁醇。在橙汁饮料中,

PC1 反映的指标主要有壬醛、1-甲基-4-(1-异丙烯基)-苯、呋喃甲醛、4-(2,6,6-三甲基-2-环己烯)-3-丁烯酮和 2,6-二甲基-5,7-辛二烯-2-醇;PC2 反映的指标主要有桉油精、2-甲基环戊酮、戊烷环丙烷、异薄荷醇酯、 $\alpha$ -杜松醇。在苹果汁饮料中,PC1 反映的指标主要有呋喃甲醛、丙二酸二乙酯、对乙基苯酚、5-羟甲基糠醛、1,2-苯甲酸,丁基辛酯;PC2 反映的指标主要有乙醇、D-柠檬烯、2,4-癸二烯醛、苯乙醇和十一酸。在草莓复合果汁饮料中,PC1 反映的指标主要有己酸乙酯、2-甲基四氢噻吩-3-酮、1-(4-甲基苯基)-乙酮和 3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯醇、苯酚;PC2 反映的指标主要有丁酸乙酯、2-甲基丁酸乙酯、乙酸丁酯、1-己醇和 6,11-二甲基-2,6,10-十二碳三烯醇。在水果牛奶混合饮料中,第 1 主成分反映的指标主要有己烷、己醛、4-乙基-1,3-苯二酚和乙基香兰素、香草醛;第 2 主成分反映的指标主要有异戊酸异丁酯、丁酸庚酯、3-甲氧基丙酸、卞醇和 5-庚基-2,3-二氢呋喃酮。

6 种果汁饮料反映主成分的指标物质各不相同,但主要指向醇类、酯类、酸类和酮类物质,其指标物质含量见图 3,可发现在经不同处理的同一种果汁饮料中指标物质的含量确实存在着较大的差异,其差异在一定程度上反映了不同处理样品间醇类、酯类、酸类和酮类物质的差异,将这几类物质用来评价果汁饮料的挥发性物质组成,使得其可通过鉴定挥发性物质图谱的差异来区别正常样品与脂环酸芽孢杆菌污染的样品。

表 4 主成分的特征值及贡献率

Table 4 Eigenvalues, contribution and cumulative contribution of principal components

饮料样品	主成分	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%
水蜜桃乳饮料	1	44.99	53.56	53.56
	2	39.01	46.44	100.00
混合果汁饮料	1	56.23	58.58	58.58
	2	39.77	41.42	100.00
橙汁饮料	1	72.43	56.15	56.15
	2	56.57	43.85	100.00
苹果汁饮料	1	45.23	55.16	55.16
	2	36.77	44.84	100.00
草莓复合果汁饮料	1	41.37	59.96	59.96
	2	27.63	40.04	100.00
水果牛奶混合饮料	1	63.71	67.06	67.06
	2	31.29	32.94	100.00

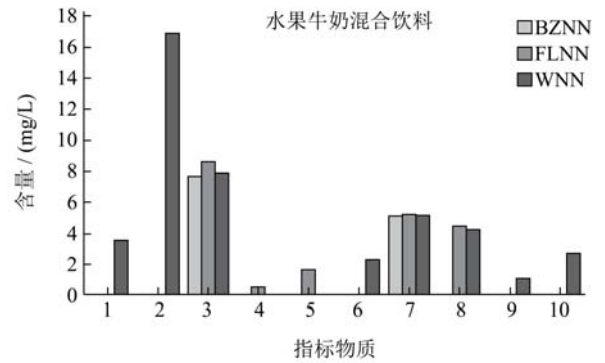
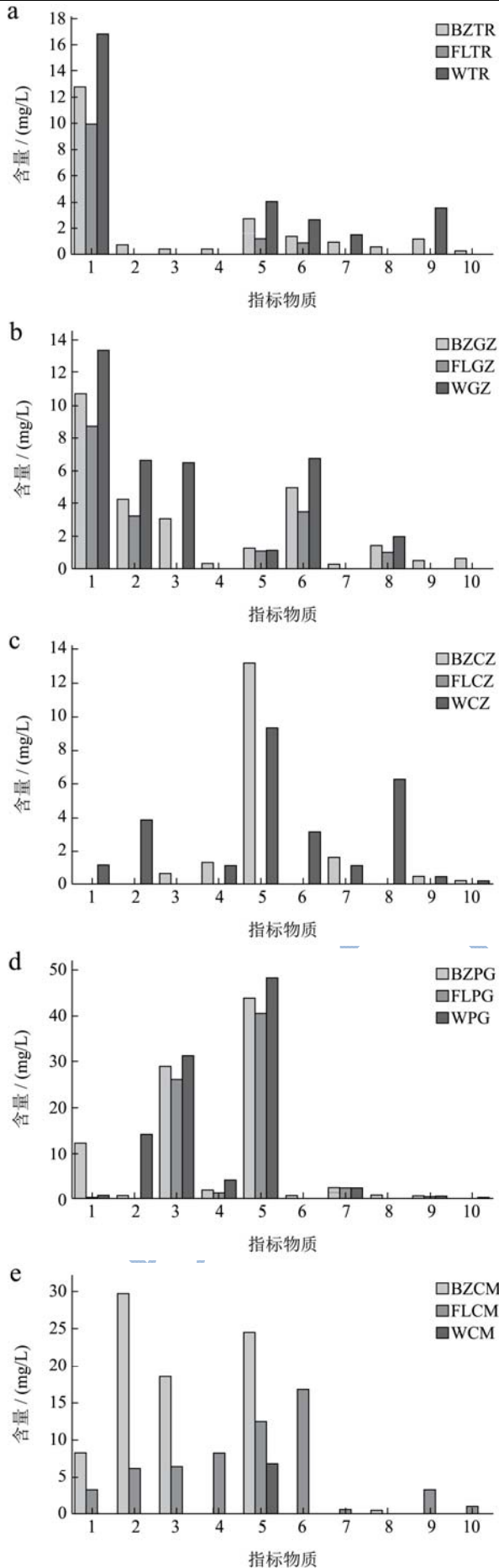


图3 不同处理的6种果汁饮料中PC1和PC2各前五项目指标物质含量

Fig.3 The first five indicator substances content of PC1 and PC2 of 6 kinds of commercial fruit juice beverages with different treatments

注：图 a 中，1 表示乙醇；2 表示异戊酸乙酯；3 表示醋酸异戊酯；4 表示 2-庚酮；5 表示柠檬烯；6 表示戊酸戊酯；7 表示 2-壬酮；8 表示正辛醇；9 表示辛酸；10 表示月桂酸。图 b 中，1 表示己酸乙酯；2 表示己酸，2-丙烯酯；3 表示丁酸，3-己烯酯；4 表示甲基环庚烷；5 表示 2-羟基-3-甲基-6-甲基乙基-2-环己烯酮；6 表示丁位突厥酮；7 表示丙二酸；8 表示 5,6-二氢-6-戊基-2-吡喃酮；9 表示 3-甲基丁醇；10 表示 3,5-二叔丁基邻苯二酚。图 c 中，1 表示桉油精；2 表示 2-甲基环戊酮；3 表示壬醛；4 表示 1-甲基-4-(1-异丙烯基)-苯；5 表示呋喃甲醛；6 表示戊烷基环丙烷；7 表示 2,6-二甲基-5,7-辛二烯-2-醇；8 表示异薄荷醇酯；9 表示 4-(2,6,6-三甲基-2-环己烯)-3-丁烯酮；10 表示  $\alpha$ -杜松醇。图 d 中，1 表示乙醇；2 表示 D-柠檬烯；3 表示呋喃甲醛；4 表示 2,4-癸二烯醛；5 表示丙二酸二乙酯；6 表示苯乙醇；7 表示对乙基苯酚；8 表示十一酸；9 表示 5-羟甲基糠醛；10 表示 1,2-苯甲酸，丁基辛酯。图 e 中，1 表示丁酸乙酯；2 表示 2-甲基丁酸乙酯；3 表示乙酸丁酯；4 表示己酸乙酯；5 表示 1-己醇；6 表示 2-甲基四氢噻吩-3-酮；7 表示 1-(4-甲基苯基)-乙酮；8 表示 6,11-二甲基-2,6,10-十二碳三烯醇；9 表示 3,7,11-三甲基-2,6,10-十二碳三烯醇；10 表示苯酚。图 f 中，1 表示己烷；2 表示己醛；3 表示异戊酸异丁酯；4 表示丁酸庚酯；5 表示 3-甲氧基丙酸；6 表示 4-乙基-1,3-苯二酚；7 表示卞醇；8 表示 5-庚基-2,3-二氢呋喃酮；9 表示乙基香兰素；10 表示香草醛。

### 3 结论

3.1 本研究将从玉米果汁饮料中分离得到的芽孢杆菌和购自德国菌种保藏中心的脂环酸芽孢杆菌分别接种到 6 种商业果汁饮料中，与未经接种处理的饮料样品厌氧条件下 45 °C 培养 30 d，未处理的饮料样品均无脂环酸芽孢杆菌检出，而经接种处理后的样品均有不同程度的脂环酸芽孢杆菌生长，其中水蜜桃乳饮料检



出量最大,达到  $10^6$  CFU/mL,水果牛奶混合饮料和草莓复合果汁饮料检出量次之,而对于澄清型饮料橙汁饮料和苹果汁饮料则检出量最小,菌落总数小于  $10^2$  CFU/mL。

3.2 为了达到可以快速有效地检测出被脂环酸芽孢杆菌污染的产品的目的,对经不同处理的饮料样品进行电子鼻分析,发现采用 FOX4000 电子鼻可以准确地将正常样品与脂环酸芽孢杆菌污染的样品区分开,并且第一主成分(PCA)累计方差贡献率均大于 98%,完全可以有效解释矩阵中的绝大部分信息。电子鼻不仅可以污染样品与正常样品区分开,还可对接种不同芽孢杆菌的样品也进行一定程度的区分,因此将电子鼻用于快速鉴别样品是否被污染是可行的。

3.3 电子鼻主要是将气体中的不同化学信号经传感器转化为电信号,最后再转化为数字信号进行数据分析,为了验证电子鼻是确实能有效快速检测出污染样品与正常样品的不同,对经不同处理的饮料样品进行 GC-MS 分析。结果表明经脂环酸芽孢杆菌污染之后的样品与正常样品相比,挥发性物质的种类和含量均有显著地改变。含量高的成分不一定代表着样品的典型香气,因此用主成分分析法对 6 种果汁饮料样品分别进行分析,均提取出 2 种主成分,可以包含原始数据的全部信息,主成分分析表明虽然不同的果汁饮料样品的第 1 主成分和第 2 主成分反映的指标物质不同,但主要以醇类、酯类、酸类和酮类物质为主,而这四类物质也是样品中主要的挥发性物质,这些物质含量的差异使得不同处理的样品间的挥发性物质图谱显示出一定的差异,从而导致电子鼻接受到的化学信号也不同,因此可以鉴别正常样品与脂环酸芽孢杆菌污染的样品。

3.4 在水蜜桃乳饮料和水果牛奶混合饮料中,由于脂环酸芽孢杆菌大量繁殖,生成了大量的愈创木酚和邻乙氧基苯酚,这两种挥发性成分都是脂环酸芽孢杆菌的特征代谢物质,在其他 4 种饮料样品中并未检出这两种物质,可能与菌在不同基质中的生长特性与繁殖速度有关。

## 参考文献

- [1] Concina I, Bornsek M, Baccelliere S, et al. *Alicyclobacillus* spp.: Detection in soft drinks by Electronic Nose [J]. Food Research International, 2010, 43(8): 2108-2114
- [2] Smit Y, Cameron M, Venter P, et al. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation-a review [J]. Food Microbiology, 2011, 28(3): 331-349
- [3] 胡贻椿,岳田利,袁亚宏,等.果汁中脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus* spp.)的危害及其控制[J].食品科学,2008,29(1):364-368
- [4] HU Yi-chun, YUE Tian-li, YUAN Ya-hong, et al. Hazards and Controlling Methods of *Alicyclobacillus* spp. in Juice [J]. Food Science, 2008, 29(1): 364-368
- [5] Catara G, Fiume I, Iuliano F, et al. A new kumamolisin-like protease from *Alicyclobacillus acidocaldarius*: an enzyme active under extreme acidic conditions [J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2006, 24(5): 358-370
- [6] 王军堂.浓缩苹果汁生产过程中嗜酸耐热菌的控制技术[D].咸阳:西北农林科技大学,2011
- [7] Groenewald W, Gouws P, Witthuhn R. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa [J]. Food Microbiology, 2009, 26(1): 71-76
- [8] 岳田利,胡贻椿,袁亚宏,等.脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus*)分离鉴定研究进展[J].食品科学,2008,29(2):487-492
- [9] YUE Tian-li, HU Yi-chun, YUAN Ya-hong, et al. Review on isolation and identification of *Alicyclobacillus* [J]. Food Science, 2008, 29(2): 487-492
- [10] Chang S S, Kang D H. *Alicyclobacillus* spp. In the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2004, 30(2): 55-74
- [11] Siegmund B, Pollinger-Zierler B. Growth behavior of off-flavor-forming microorganisms in apple juice [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(16): 6692-6699
- [12] Walker M, Phillips C A. The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice [J]. Food Control, 2008, 19(10): 974-981
- [13] Steyn C E, Cameron M, Witthuhn R C. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment-a review [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 147: 1-11
- [14] Bianchi F, Careri M, Mangia A, et al. Characterisation of the volatile profile of orange juice contaminated with *Alicyclobacillus acidoterrestris* [J]. Food Chemistry, 2010, 123(3): 653-658
- [15] Perez-Cacho P R, Danyluk M D, Rouseff R. GC-MS quantification and sensory thresholds of guaiacol in orange juice and its correlation with *Alicyclobacillus* spp [J]. Food

- Chemistry, 2011, 129(1): 45-50
- [14] Gocmen D, Elston A, Williams T, et al. Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS [J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 40(3): 172-177
- [15] 朱小翠. 苹果汁中耐热菌的分离鉴定与 PCR 快速检测的研究[D]. 西北农林科技大学, 2008
- [16] 陈世琼, 陈文峰, 胡小松, 等. 16SrDNA PCR-RFLP 法快速鉴定分离自浓缩苹果汁生产线的脂环酸芽孢杆菌[J]. 中国食品学报, 2006, 6(2): 99-102
- CHEN Shi-qiong, CHEN Wen-feng, HU Xiao-song, et al. Rapid identification of *Alicyclobacillus* isolated from concentrated apple juice processing by 16S rDNA PCR-RFLP [J]. Chinese Institute of Food Science and Technology, 2006, 6(2): 99-102
- [17] Wang Z, Yue T, Yuan Y, et al. Development of polyclonal antibody-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Alicyclobacillus* strains in apple juice [J]. Food Science, 2012, 77(11): 643-649
- [18] 许灿, 李二虎, 王鲁峰, 等. 电子鼻检测复合果汁饮料中的脂环酸芽孢杆菌[J]. 中国食品学报, 2015, 15(2): 193-200
- XU Can, LI Er-hu, WANG Lu-feng, et al. Detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage of mixed fruit juice beverage by electronic nose [J]. Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(2): 193-200
- [19] 王俊, 崔绍庆, 陈新伟, 等. 电子鼻传感技术与应用研究进展[J]. 农业机械学报, 2013, 44(11): 160-167, 179
- WANG Jun, CUI Shao-qing, CHEN Xin-wei, et al. Advanced technology and new application in electronic nose [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery, 2013, 44(11): 160-167, 179
- [20] 李宝丽, 邓建玲, 蔡欣, 等. 顶空固相微萃取-气质联用结合主成分分析研究纯葡萄汁的香气成分[J]. 中国食品报, 2016, 16(4): 258-270
- LI Bao-li, DENG Jian-ling, CAI Xin, et al. Studies on aroma components in pure grape juice by HS-SPME-GC-MS coupled with PCA [J]. Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(4): 258-270
- [21] 周立华, 牟德华, 张哲琦, 等. GC-MS 分析灯笼果果汁和果酒的香气成分[J]. 酿酒科技, 2015, 8: 96-100
- ZHOU Li-hua, MOU De-hua, ZHANG Zhe-qi, et al. Analysis of flavoring components in *Physalis peruviana* Fruit Juice and *Physalis peruviana* wine by GC-MS [J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015, 8: 96-100
- [22] 许灿, 李二虎, 王鲁峰, 等. 酸土脂环酸芽孢杆菌对玉米果汁饮料挥发性成分及色度的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(6): 268-275
- XU Can, LI Er-hu, WANG Lu-feng, et al. Effect of *Alicyclobacillus acidoterrestris* on volatile compounds and color of corn juice beverage [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(6): 268-277
- [23] 肖作兵, 马胜涛, 牛云蔚, 等. 气相色谱嗅闻技术结合主成分分析鉴定甜橙油特征香气成分[J]. 中国食品学报, 2017, 17(1): 253-257
- XIAO Zuo-bing, MA Sheng-tao, NIU Yun-wei, et al. Detection of the key aroma compounds of sweet orange oils by GC-O coupled with PCA [J]. Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(1): 253-257
- [24] 王虎玄, 胡仲秋, 龙芳羽, 等. 苹果汁中鲁氏接合酵母早期污染的电子鼻识别研究[J]. 农业机械学报, 2016, 47(1): 209-214
- WANG Hu-xuan, HU Zhong-qiu, LONG Fang-yu, et al. Research on identification of spoilage in apple juice caused by *Zygosaccharomyces rouxii* at early stage using electronic nose [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Machinery, 2016, 47(1): 209-214