

不同温度下嗅觉可视化技术区分猪肉中主要致腐菌

邹小波, 郭雅宁, 石吉勇, 黄晓玮, 黄林, 李昕

(江苏大学 食品科学与生物工程学院, 江苏 镇江 212000)

摘要: 提出了一种基于嗅觉可视化技术的猪肉中主要致腐菌的检测方法。在室温(20 ℃)、冷藏(4 ℃)和冷冻(-16 ℃)3种贮藏条件下,精心挑选了4种卟啉化合物组成可视化传感器。将该可视化传感器分别检测染有3种主要致腐菌(韩国假单胞杆菌、热杀索丝菌、梭状芽胞杆菌)的猪肉样本,用图像处理技术分析可视化传感器与猪肉样本挥发性气体反应前后的颜色变化,并利用主成分分析法提取不同猪肉样本挥发性气味的特征信息,用于猪肉中上述3种主要致腐菌的区分。检测结果显示,嗅觉可视化技术对染有韩国假单胞杆菌样本组的识别率为98%,对染有梭状芽胞杆菌和热杀索丝菌样本组的识别率均为100%。研究结果表明,嗅觉可视化传感器阵列能够区分猪肉中的上述3种主要致腐菌。

关键字: 猪肉;嗅觉可视化技术;主要致腐菌

中图分类号: TP 212.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)09—0939—06

Study on Discrimination of Three Dominant Spoilage Bacteria in Pork Based on Olfaction Visualization Technology

ZOU Xiao-bo, GUO Ya-ning, SHI Ji-yong, HUANG Xiao-wei, HUANG Lin, LI Xin

(College of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China)

Abstract: This paper proposed a method to detect three Dominant Spoilage Bacteria in pork based on olfaction visualization technique. At room temperature (20 ℃), cold (4 ℃) and freeze (-16 ℃) conditions, 4 kinds of porphyrins were selected carefully to consist of visual sensors. The visual sensors was used to detect the pork sample which were infected three Dominant Spoilage Bacteria. The image processing techniques was used to collect images before and after the colorimetric sensor array interacted with pork volatile flavors, then using principle components analysis (PCA) get digital signals which reflected the characteristics of pork sample flavors to discriminate above three Dominant Spoilage Bacteria. The detection results show that the recognition rates of the *Pseudomonas koreensis* group was achieved 98%, the *Brochothrix thermosphacta* group and *Bacillus fusiformis* group were achieved 100%. The research results show that olfaction visualization technology can discriminate three Dominant Spoilage Bacteria.

Keyword: pork, olfaction visualization technology, the major pathogens

收稿日期: 2013-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(60901079); 全国优秀博士基金项目(200968); 江苏省农业自主创新项目(CX(11)2028)。

作者简介: 邹小波(1974—), 男, 湖南汨罗人, 教授, 博士生导师, 主要从事农产品、食品品质无损检测研究。

E-mail: zou_xiaobo@ujs.edu.cn

目前猪肉中致腐菌的检测方法有 GC/MS^[1-2]、微生物培养^[1]等方法。这些方法可以准确地区分猪肉中的不同致腐菌,但是过程复杂、试验周期长、成本高,不能做到快速检测及时判断。目前大部分研究仅针对 4℃冷藏贮藏条件下的猪肉致腐菌检测^[3-6]。在我国很多地方,猪肉从屠宰到餐桌往往要经历冷冻、冷藏等多种贮藏方式,甚至在冷链不完善的地区还要在常温下贮藏,因此有必要针对室温(20℃)、冷藏(4℃)和冷冻(-16℃)3种贮藏温度条件下,对猪肉中主要致腐菌的快速、无损检测技术进行研究。

嗅觉可视化技术是一种气体成像技术^[7-9],该技术根据可视化传感器与待测气体反应前后的颜色变化对气体进行定性定量判别^[10-12]。可视化传感器不仅利用气体敏感材料和待测气体之间的范德华力等很弱的相互作用,而且引入了金属键和极性键等较强的化学反应,所以在检测精度和灵敏度方面具有很强的优势^[13-15]。

猪肉贮藏过程中主要致腐菌对猪肉腐败起主导作用,其利用猪肉中的蛋白质、碳水化合物、脂肪等营养物质进行自身代谢,产生的代谢产物如硫化物、胺类等可导致猪肉的气味和 pH 值发生变化,同时这些气体的种类和浓度与微生物种群及其数量也有密切的关系。作者精心挑选 4 种吡嗪化合物组成可视化传感器,分别在室温(20℃)、冷藏(4℃)和冷冻(-16℃)3种贮藏条件下,通过嗅觉可视化传感器与挥发性气体反应前后的颜色变化,尝试对猪肉中的 3 种主要致腐菌进行区分。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 材料与菌种 猪肉购于江苏省镇江市屠宰场,为生鲜背最长肌。按照文献^[1]所述方法取其内部无污染肉块约 1 080 g,修去筋腱。

猪肉贮藏过程中的主要致腐菌为韩国假单胞杆菌、热杀索丝菌及梭状芽胞杆菌,它们均为实验室分离纯化、鉴定后保存的菌种^[1,16-20]。

1.1.2 试剂 无菌生理盐水,体积分数 75%酒精,吡嗪试剂(Sigma,美国)。

1.1.3 仪器与设备 压力蒸汽灭菌锅(YM50 型,上海,三申医疗器械);双人单面净化工作台(SW-CJ-2FD 型,苏州);冰箱(美的,合肥);生物显微镜(XS-

212-202 型,南京,JNOEC);生化培养箱(LRH-150 型,上海,一恒科技);扫描仪(Scanjet G4050 型,美国,HP)。

1.2 样本制备

1.2.1 肉块的制备 于无菌操作台将猪肉分割成 108 块,精确称取 10 g 左右的均匀小块,进行表面灭菌后装入无菌薄膜袋中备用。

1.2.2 接种与贮藏 参照文献^[1]的方法,韩国假单胞菌、热杀索丝菌和梭状芽胞杆菌经过培养,获得菌原液。取上述分割好的无菌肉块 12 块作为对照组,再取 36 块分为 3 组,每组 12 块,分别浸泡于 3 种菌原液中,15 s 后取出,沥干菌液,装入无菌薄膜袋中^[14]。将接种后的猪肉按类分别放在 20、4℃和 -16℃条件下贮存,20℃条件下分别于 0、8、16、24 h 后取样分析,4℃条件下分别于 0、2、4、6 d 后取样分析,-16℃条件下分别于 0、3、6、9 d 后取样分析。

1.2.3 腐败菌计数 参照文献^[21]的方法,在无菌操作条件下,将样品剪碎放入含有 10 mL 灭菌生理盐水的灭菌乳钵内,经充分研磨做成均匀稀释液。用无菌微量移液器吸取 0.1 mL 样品匀液,沿管壁缓慢注入盛有 10 mL 稀释液的无菌试管中(注意吸头尖端不要触及稀释液面),振摇试管,制成体积比 1:100 的样品匀液。选择 2 个适宜稀释度的样品匀液,在显微镜下进行计数。

1.3 嗅觉可视化技术检测方法

1.3.1 传感器的制作 针对猪肉腐败过程中气味变化的特点,从 200 多种吡嗪中优选出 4 种与猪肉挥发气体发生反应最灵敏的吡嗪化合物组成可视化传感器阵列。为减少环境湿度对传感器精度的影响,选择具有良好疏水性的 C₂ 反相硅胶板作为传感器载体,其微小的孔径可以帮助吸附气体分子加快检测速度。利用毛细管点样法将气敏材料固定在传感器载体,形成一个如图 1 所示的 2×2 的可视化传感器阵列。



图 1 传感器阵列

Fig.1 Sensor array

1.3.2 跟踪检测 取已准备好的 60 块猪肉,将其放在特制的容器底部,将传感器阵列放置在容器顶部,然后将装置密封放于恒温避光处。可视化传感器阵列上色敏材料(吡啶)的颜色变化用扫描仪扫描获取^[15-16]。针对不同温度下的样品,跟踪监测的间隔不一样,20℃下每隔 8 h 扫描一次,4℃下每隔 2 d 扫描一次,-16℃下每隔 3 d 扫描一次。

1.4 传感器响应信号提取和数据建模分析

可视化传感器与猪肉顶空可挥发性气体发生颜色反应,只有对传感器与猪肉气体发生反应前后的图像进行图像处理,使其数字化,才能对这些变化进行定量描述,进而用来检测样品。由扫描仪获得的传感器反应前后图像经过图像处理,通过如下公式提取可视化传感器阵列上色敏材料(吡啶)反应前后颜色变化的绝对值 ΔR 、 ΔG 、 ΔB 。

$$\Delta R = |R_a - R_b| \quad (1)$$

$$\Delta G = |G_a - G_b| \quad (2)$$

$$\Delta B = |B_a - B_b| \quad (3)$$

式中, a (after)代表可视化传感器阵列与待检测气体反应后的图像, b (before)代表可视化传感器阵列与待检测气体反应前的图像。将 ΔR 、 ΔG 、 ΔB 值作为输入变量,应用 Matlab7.0 软件建立模型进行 PCA 分析^[22]。

2 结果与分析

2.1 致腐菌变化规律

图 2(a)(b)(c)分别为-16、4 和 20℃条件下猪肉中 3 种主要致腐菌(韩国假单胞杆菌、热杀索丝菌、梭状芽胞杆菌)的菌总数变化图。从图 2 中可以看出在这 3 种温度下猪肉的致腐菌总数的初始值均为 10^3 – 10^4 个/g。随猪肉存放时间的增加,3 种腐败菌的总数均呈明显的上升趋势。

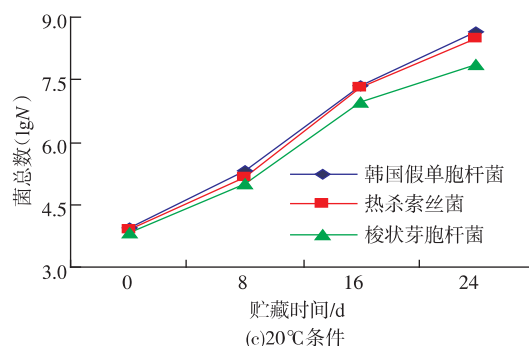
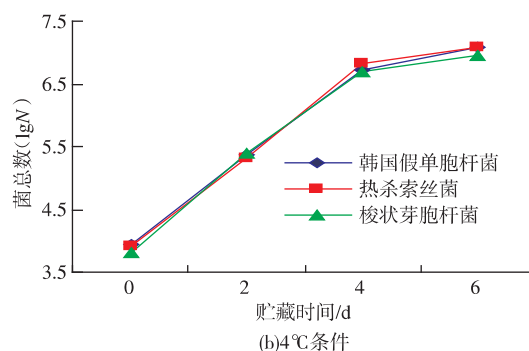
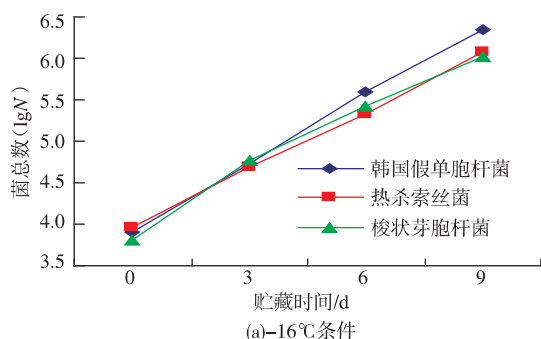


图 2 -16、4、20℃下猪肉中菌数变化情况

Fig.2 Bacteria count changes in pork at -16, 4, 20℃

如图 2(a)所示,在-16℃条件下,致腐菌菌总数在第 9 天时达到 10^7 个/g。菌总数与初始值相比增加了一倍,韩国假单胞杆菌明显是优势菌。如图 2(b)所示,在 4℃条件下,由于温度升高,细菌生长速率相对加大,在第 6 天的时候就已经达到 10^7 个/g,此时也达到了初始菌数的两倍。如图 2(c)所示,在 20℃条件下,细菌生长速率明显加大,在 16 h 后就已达到 10^7 个/g,在 24 h 后达到 10^8 个/g 并伴随着明显的腐臭味,在这 3 种温度条件下,猪肉中 3 种主要致腐菌的生长速率的增加程度都比较明显,且韩国假单胞杆菌是造成猪肉腐败的主要菌群,在-16℃条件下尤其明显,结果与文献[1]一致。

2.2 嗅觉可视化技术检测

表 1 为 20、4℃和-16℃3 种贮藏温度下,嗅觉可视化传感器跟踪检测染有 3 种致腐菌猪肉样本的特征图像。由特征图像可以看出,每幅图的反应变化都有所不同,随着猪肉贮藏时间的延长,传感器的响应范围在扩大,且反应强度也逐渐增强。从嗅觉可视化传感器阵列颜色变化(图 3)中,能够看出染有 3 种致腐菌(韩国假单胞杆菌、热杀索丝菌、梭状芽胞杆菌)的猪肉样本有明显的差异,并且在不同温度下(不同贮藏时间)(20℃(8、16、24 h),

4℃(2、4、6 d), -16℃(3、6、9 d))猪肉的变质情况不同。这是由于不同的菌产生的挥发性气体的质量分数有一定的差异,并且随着贮藏时间的延长,猪肉顶空挥发性气体成分的种类和浓度不断变化所致。

前期相关研究^[15,21]表明,生鲜猪肉处于贮藏初期,新鲜度高,挥发性气体成分较少,多是烃类和酮类等气体,只能通过与少许金属卟啉发生非特异性吸附,反应强度较弱。随着贮藏时间的延长,生鲜猪肉品质开始下降,与腐败有关的含硫含氮气体分子开始产生。此时,金属卟啉容易与含硫和含氮气体分子发生特异性吸附,金属卟啉中的金属离子与这

些化合物中的硫原子和氮原子发生键合得到电子对形成配位键,从而引起较强烈反应,传感器反应强度愈来愈明显。对照组猪肉样本由于其自身内部含有少量细菌导致其腐败变质,并且每种致腐菌在不同温度下生长速度不一样,产生的气味也有差别。染有韩国假单胞菌猪肉样本产生的挥发性气体中含硫化物、酯和酸比较多;染有热杀索丝菌猪肉样本产生的挥发性气体中挥发性酸较多;染有梭状芽胞杆菌猪肉样本的挥发性气体中分子胺和氨类物质较多。这也就是可视化气体传感器可以区分不同菌种不同贮藏时间的主要原因。

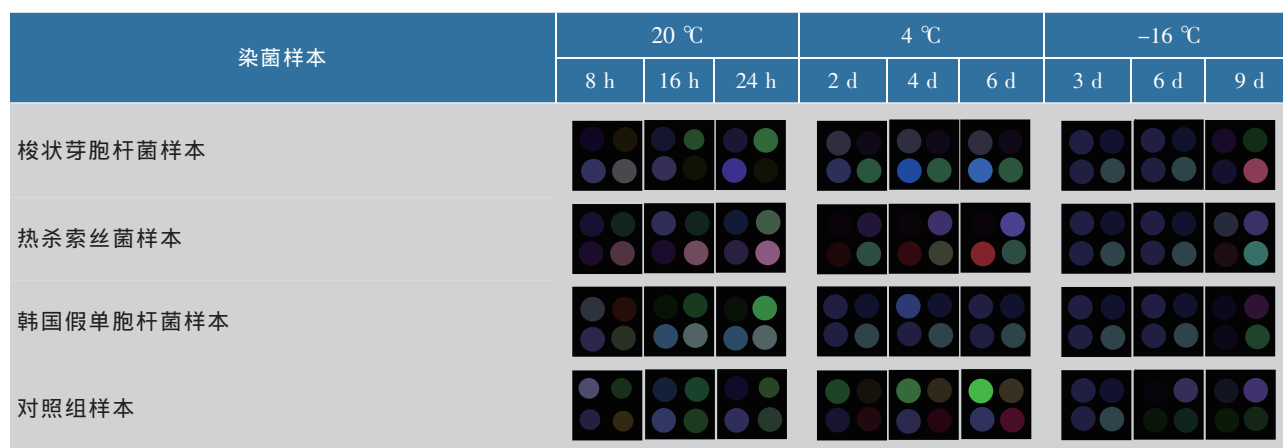


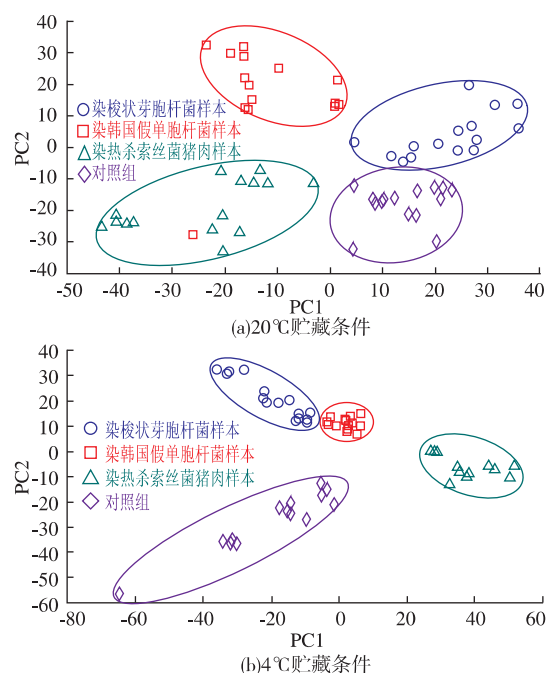
图3 猪肉在20℃、4℃和-16℃下0~24 h、0~6 d和0~9 d的特征图像

Fig. 3 Feature images of pork storing below 20℃, 4℃ and -16℃ during 0~24 h, 0~6 d and 0~9 d

2.3 数据处理与分析

在-16、4℃和20℃这3种贮藏温度下,传感器阵列图像上每个卟啉化合物的 ΔR 、 ΔG 、 ΔB 值组成3个15×4×3的矩阵,将这些矩阵分别进行主成分分析。在20℃常温条件下的第一主成分的贡献率为59.82%,第二主成分的贡献率为21.34%;在4℃冷藏条件下的第一主成分的贡献率为64.48%,第二主成分的贡献率为22.32%;在-16℃冷冻条件下的第一主成分的贡献率为67.23%,第二主成分的贡献率为24.41%。样本经PCA分析后的数据前两个主成分的二维投影如图4所示,图4(a)(b)(c)分别为3种贮藏温度条件下,传感器区分对照组、染有梭状芽胞杆菌样本、染有热死环丝菌样本、染有假单胞菌样本的情况。

从图3中可以明显看出,3种染菌组均能相互分开。



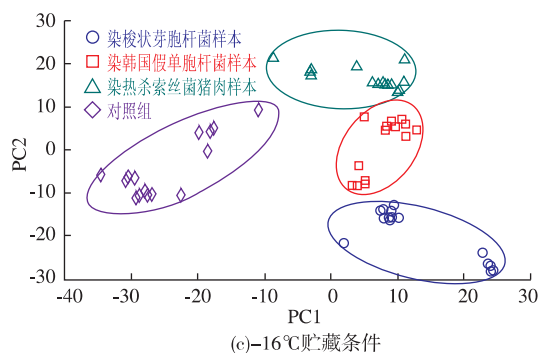


图4 主成分分析结果

Fig.4 Principal component scatter plot

图3(a)为20℃条件下的主成分分析结果,染

有韩国假单胞杆菌的14个样本均能被正确识别,1个样本被误判为染有热死环丝菌样本组;染有热杀索丝菌和梭状芽胞杆菌的猪肉样本组均能被正确识别,总体识别率达到98%。

3 结语

在-16、4、20℃这3种贮藏温度下,嗅觉可视化技术结合主成分分析方法对猪肉中的3种主要致腐菌进行了检测,结果显示韩国假单胞杆菌样本组的识别率为98%,梭状芽胞杆菌和热杀索丝菌样本组的识别率均为100%。表明,应用嗅觉可视化技术可以区分猪肉中的上述3种主要致腐菌。

参考文献:

- [1] 彭勇. 冷却猪肉常见腐败微生物致腐能力的研究[D]. 北京:中国农业大学,2005:1-16.
- [2] 马瑜璐,朱斌,张雷,等. 顶空固相微萃取-气质联用检测猪肉新鲜度[J]. 食品科学,2011,32(14):253-256.
MA Yu-lu,ZHU Bin,ZHANG Lei,et al. Evaluation of pork freshness by HS-SPME-GC-MS [J]. **Food Science**,2011,32(14):253-256.(in Chinese)
- [3] 李苗云,赵改名,张建威,等. 冷却猪肉贮藏过程中主要腐败菌的聚类分析[J]. 中国农业科学,2011,44(12):2531-2536.
LI Miao-yun,ZHAO Gai-ming,ZHANG Jian-wei,et al. Cluster analysis of the main spoilage bacteria during storage in chilled pork[J]. **Scientia Agricultura Sinica**,2011,44(12):2531-2536.(in Chinese)
- [4] 李苗云,张秋会,高晓平,等. 冷却猪肉贮藏过程中腐败品质指标的关系研究[J]. 食品与发酵工业,2008(7):186-189.
LI Miao-yun,ZHANG Qiu-hui,GAO Xiao-ping,et al. Study on the relationship of spoilage quality indexes of chilled pork during storage[J]. **Food and Fermentation Industries**,2008(7):186-189. (in Chinese)
- [5] 肖虹,谢晶. 不同贮藏温度下冷却肉品质变化的实验研究[J]. 制冷学报,2009(3):40.
XIAO Hong,XIE Jing. Experiment on chilled pork under different storage temperature [J]. **Journal of Refrigeration**,2009(3):40.(in Chinese)
- [6] 甄少波. CO 在冷却猪肉气调包装中的应用及安全性评价[D]. 北京:中国农业大学,2006.
- [7] 邹小波,张建,赵杰文. 嗅觉可视化技术及其对四种食醋的识别[J]. 农业工程学报,2008(6):173-176.
ZOU Xiao-bo,ZHANG Jian,ZHAO Jie-wen. Identification of four vinegars by olfaction visualization technology[J]. **Transactions of the CSAE**,2008(6):173-176.(in Chinese)
- [8] 邹小波,赵杰文,殷晓平,等. 嗅觉可视化技术在白酒识别中的应用[J]. 农业机械学报,2009(1):116-119.
ZOU Xiao-bo,ZHAO Jie-wen,YIN Xiao-ping,et al. Chinese liquors identification by olfaction visualization technology [J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**,2009(1):116-119.(in Chinese)
- [9] 赵杰文,张建,邹小波. 嗅觉可视化技术及其对5种化学物质的区分[J]. 江苏大学学报:自然科学版,2008(1):7-10.
ZHAO Jie-wen,ZHANG Jian,ZOU Xiao-bo. Olfaction visualization technology and discriminance of five chemical compounds [J]. **Journal of Jiangsu University:Natural Science Edition**,2008(1):7-10.(in Chinese)
- [10] 赵杰文,邹小波,黄星奕,等. 基于气体传感器阵列技术的食品气味快速无损检测方法及其装置:中国03131660.3[P]. 2003-01-01.
- [11] 邹小波,赵杰文,蔡健荣,等. 两种不同气体传感器阵列组合检测气味的方法和装置:中国200710024696.1[P]. 2007-01-01.
- [12] Di Natale Corrado,Paollesse Roberto,Macagnano Antonella,et al. Characterization and design of porphyrins based broad selectivity chemical sensors for electronic nose applications[J]. **Sensors and Actuators B:Chemical**,1998,52(1-2):162-168.
- [13] LONG Jing,XU Jian-hua,XIA Shuang. Volatile organic compound colorimetric array based on zinc porphyrin and metalloporphyrin derivatives[J]. **Energy Procedia**,2011(12):625-631.

- [14] 黄星奕,周芳,蒋飞燕. 基于嗅觉可视化技术的猪肉新鲜度等级评判[J]. 农业机械学报,2011,42(5):142-145.
HUANG Xing-yi,ZHOU Fang,JIANG Fei-yan. Evaluation of pork freshness using olfaction visualization detection technique[J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**,2011,42(5):142-145.(in Chinese)
- [15] 周芳. 嗅觉可视化技术检测猪肉新鲜度的研究[D]. 镇江:江苏大学,2011.
- [16] Borch E,Kant-Muemansb M. Bacterial spoilage of meat products and cured meat[J]. **Food Microbiology**,1996,33(1):103-120.
- [17] 刘国庆,张黎利,宗凯,等. 冷鲜猪肉货架期品质测定及主要致腐微生物预报[J]. 食品科学,2009,30(18):394-399.
LIU Guo-qing,ZHANG Li-li,ZONG Kai,et al. Shelf-life properties of chilled pork and forecasting of main putrescence microorganisms[J]. **Food Science**,2009,30(18):394-399.(in Chinese)
- [18] 傅鹏,李平兰. 冷却猪肉初始菌相分析与冷藏过程中的菌相变化规律研究[J]. 食品科学,2006,27(11):119-124.
FU Peng,LI Ping-lan. Study on the initial microflora and its changes of chilling pork meat [J]. **Food Science**,2006,27(11):119-124.(in Chinese)
- [19] 朱维军,焦镭,石闽生. 冷却猪肉中常见腐败细菌的分离与鉴定[J]. 中国农学通报,2009,25(18):99-101.
ZHU Wei-jun,JIAO Lei,SHI Ming-sheng. Isolation and identification of common corrupt bacterium from chilled meat [J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**,2009,25(18):99-101.(in Chinese)
- [20] Gill C O,Bryant J. The contamination of pork with spoilage bacteria during commercial dressing,chilling and cutting of pig carcasses[J]. **International Journal of Food Microbiology**,1992,16(1):51-62.
- [21] GB/T 5009. 44-2003. 肉与肉制品卫生标准分析方法[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [22] 海铮. 基于电子鼻的牛肉新鲜度检测[D]. 杭州:浙江大学,2006.

科 技 信 息

美国 FDA 就消费者对营养强化食品营养素信息的态度开展问卷调查

据美国联邦公报消息,2013 年 8 月 22 日美国 FDA 就消费者对营养强化食品(饼干、碳酸饮料、糖果)标签上营养含量声称的态度发起问卷调查。

研究显示,消费者对产品的认识和购买意向会受产品标签声明的影响。美国 FDA 为促进公众健康,建议进行一次可控的、随机性的测验,以探索消费者对休闲食品(饼干、碳酸饮料、糖果)标签中标示的或暗示性的营养素含量声称的态度。本次研究将利用 15 分钟的网络问卷搜集信息,征集截止 2013 年 9 月 23 日。

[信息来源]食品伙伴网. 美国 FDA 就消费者对营养强化食品营养素信息的态度开展问卷调查 [EB/OL]. (2013-8-30). <http://news.foodmate.net/2013/08/242030.html>.

欧盟批准羊奶蛋白用于婴幼儿配方奶粉

据欧盟网站消息,8 月 29 日欧盟发布 2013/46/EU 号委员会指令,修订 2006/141/EC 号指令,批准羊奶蛋白质作为婴儿配方奶粉和较大婴儿配方奶粉的蛋白质来源。本指令自发布后第 20 天起生效。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟批准羊奶蛋白用于婴幼儿配方奶粉 [EB/OL]. (2013-8-30). <http://news.foodmate.net/2013/08/241977.html>.

欧盟批准蔗糖脂肪酸酯用于调味饮料香精

8 月 29 日欧盟发布(EU) No 818/2013 号委员会条例,修订了(EC)No1333/2008 号法规附录 III,批准蔗糖脂肪酸酯(Sucrose esters of fatty acids)用于水基澄清调味饮料香精,在香精中的最大用量为 15000 mg/kg,成品中的限量为 30 mg/l。

本法规自发布之日起第 20 天生效,所有条款都将具有法律效力并直接适用于所有成员国。

[信息来源]:

COMMISSION REGULATION (EU) No 818/2013 :amending Annex III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council as regards the use of Sucrose esters of fatty acids (E 473) in flavourings for water based clear flavoured drinks [EB/OL]. (2013-8-30). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:230:0012:0013:EN:PDF>.