

基于电子鼻技术对草莓采后灰霉病的分析与早期诊断

刘 强¹, 张婷婷¹, 周丹丹², 丁海臻¹, 张 斌³, 陈 敏³, 丁 超¹, 潘磊庆³, 屠 康^{3*}

(1.南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 江苏高校粮油质量安全控制及深加工重点实验室, 江苏 南京 210023; 2.南京林业大学轻工与食品学院, 江苏 南京 210037; 3.南京农业大学食品科学技术学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 构建基于气味信息的草莓灰霉病无损检测的方法, 对草莓果实灰霉病过程进行动态分析。以健康草莓果实作为对照, 每隔24 h采用便携式电子鼻获取样品气味信息, 并结合顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用技术对样本挥发性组分进行定量检测, 最后采用偏最小二乘回归构建基于电子鼻技术的草莓果实菌落总数预测模型。结果表明: 草莓果实接种灰霉病后120 h内, 酯类、醛类和醇类含量变化明显, 以乙醇为代表的醇类含量(以湿质量计算)从初始0.85 $\mu\text{g/g}$ 快速上升至3.95 $\mu\text{g/g}$; 主成分分析表明基于电子鼻气味传感阵列对应的稳定值与微生物含量密切相关, 结合偏最小二乘法回归的草莓果实微生物含量预测的相对最佳模型对应的决定系数(R_p^2)为0.815, 相对分析误差为2.270, 基于电子鼻传感器稳定信号的无损预测可实现早期病害果实92.9%的准确区分。研究结果可以为实现草莓采后病害无损监控与早期诊断提供参考。

关键词: 草莓果实; 电子鼻技术; 灰霉病; 无损检测

Quantitative Analysis and Early Detection of Postharvest Gray Mold in Strawberry Fruit Using Electronic Nose

LIU Qiang¹, ZHANG Tingting¹, ZHOU Dandan², DING Haizhen¹, ZHANG Bin³, CHEN Min³, DING Chao¹, PAN Leiqing³, TU Kang^{3*}
(1. Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Jiangsu Key Laboratory of Quality Control and Further Processing of Cereals and Oil, College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China; 2. College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A non-destructive method for the detection of gray mold in strawberry fruit based on odor information was proposed in order to monitor the decay process of strawberry fruit. A portable electronic nose (E-nose) was utilized to collect the odor information of samples every 24 h. Healthy strawberry fruit were taken as the control group. The volatile compounds of samples were then quantitatively detected by headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) combined with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Finally, a regression model for predicting the microbial load in artificially infected strawberry fruit was established based on E-nose datasets by partial least squares regression (PLSR). The results showed that after 120 h storage, the contents of esters, aldehydes and alcohols in infected strawberry fruit were significantly changed, and the content of alcohol (mainly ethanol) increased rapidly from 0.85 to 3.95 $\mu\text{g/g}$. Principal component analysis (PCA) showed a high correlation between the microbial load and the stable response of E-nose sensors. The optimal PLSR model for the microbial load showed a coefficient of determination for prediction (R_p^2) of 0.815, and a relative percent deviation (RPD) of 2.270. Furthermore, the non-destructive detection method based on stable signals of E-nose sensors could identify early diseased strawberry fruit with an accuracy of 92.9%. These results can provide a reference for non-destructive monitoring and early detection of strawberry postharvest diseases.

Keywords: strawberry fruit; electronic nose; gray mold; non-destructive detection

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210511-112

中图分类号: TS255.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2022)12-0341-09

收稿日期: 2021-05-11

基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究面上项目(20KJB550005); 南京财经大学青年学者支持计划项目; 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

第一作者简介: 刘强(1991—)(ORCID: 0000-0001-6180-0376), 男, 讲师, 博士, 研究方向为农产品贮藏与加工。

E-mail: qiangliu@nufe.edu.cn

*通信作者简介: 屠康(1968—)(ORCID: 0000-0003-4314-2896), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品贮藏与加工。

E-mail: kangtu@njau.edu.cn

引文格式:

刘强, 张婷婷, 周丹丹, 等. 基于电子鼻技术对草莓采后灰霉病的分析与早期诊断[J]. 食品科学, 2022, 43(12): 341-349.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210511-112. <http://www.spkx.net.cn>

LIU Qiang, ZHANG Tingting, ZHOU Dandan, et al. Quantitative analysis and early detection of postharvest gray mold in strawberry fruit using electronic nose[J]. Food Science, 2022, 43(12): 341-349. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210511-112. <http://www.spkx.net.cn>

草莓果实色泽鲜艳, 香气馥郁, 富含多种维生素、糖类、有机酸等物质, 以及花色苷类、黄酮类等多种天然抗氧化活性物质, 具有很高的营养价值和食用价值, 深受广大消费者的青睐。草莓果实属于浆果类水果, 其果肉易在传送运输过程中受到机械损伤和微生物感染变质, 致使呈现腐烂、斑点等, 导致果实风味消失, 口感下降。其中灰霉病是草莓采后运输和贮藏中最容易发生的病害, 可以发生在采摘、运输、贮藏以及货架销售等任何环节。侵染初期在果实表面出现水浸状、针眼大的斑点, 而后逐渐扩大形成不规则形状的病斑, 直至表面出现大量菌丝体及孢子。灰霉病具有繁殖周期短、寄生范围广、遗传变异快的特点, 一般可造成减产10%~30%, 严重时可达50%以上, 短期3~5 d即可完成对整果的侵染。通常, 草莓除鲜食外, 大部分加工方式仍以初级加工为主, 安全性和高值化的产品成为消费市场的发展趋势。在草莓果实采摘和贮运过程中, 极易遭受机械碰撞、挤压产生瘀伤, 但此时果实仍具有一定程度的消费价值, 可以用于果酱、果汁等加工行业的应用。然而, 当果实遭受病害微生物侵染后, 不仅消费价值显著降低, 食用的安全性也受到严重影响, 需要被严格区分。另一方面, 当病害果实未被及时检测和剔除, 极容易在短期内造成整批次果实的交叉感染, 产生严重的经济损失。因此, 做好草莓采后真菌病害检测可以为草莓产业高值化发展提供重要支持。

草莓果实在运输和贮藏中受到病害侵染使水果新陈代谢紊乱, 其正常的生理机能和组织会发生一系列的变化。以灰葡萄孢霉 (*Botrytis cinerea*) 为典型的采后草莓致病菌能在运输、贮藏和销售所有环节侵染果实, 条件合适时, 短期4 d左右即能引起整果完全腐烂。此外, 病害果实若不及时剔除, 极容易造成整批次果实的腐烂, 经济价值急剧下降。传统的水果病虫害的检测方法有人工分拣、理化指标检测。人工分拣存在工作单调、主观性强、耗时长等缺点; 传统理化检测具有破坏性, 存在检测样品时间长、预处理繁琐、周期长等问题。若能在无损、非接触等条件下实现果实采后病害的诊断, 将有利于推动草莓产业分类分级等精细化发展。

电子鼻作为一种仿生嗅觉技术, 内部的阵列传感器可以捕捉样本的挥发性化学成分的信息, 并转换成数字信号用以描述样品的特征气味。Sanefiar等^[1]指出食

物贮藏过程中, 腐败气味主要来源于微生物的代谢, 而这种气味变化可以被电子鼻系统捕捉并进行差异分析; Pan Leiqing等^[2]研究表明草莓果实在不同真菌病害过程中的电子鼻信号会呈现差异, 而这种差异能否用于后期的定量分析需进一步验证; Pallotino等^[3]对柑橘青霉病无损检测研究发现, 结合电子鼻技术和化学计量学建立的病害识别模型, 可对2%~5%霉变率的整批次柑橘实现无损检测; 此外, 根据果实自身的气味特性, 相关研究也证实了电子鼻在水果成熟度、硬度、糖含量和pH值含量方面进行预测^[4-6]。然而, 以上研究主要开展电子鼻技术在水果品质和微生物污染程度检测方面的可行性分析, 特征数据处理方式较单一, 对草莓病害过程的传感器信号与气味组分间的内在联系仍需进一步研究。

因此, 为了明确电子鼻对草莓采后灰霉病的检测可行性与精度, 本实验针对草莓果实病害过程中挥发性化学成分的差异、微生物携带总量以及气味传感阵列信息之间的关联性, 采用电子鼻技术结合化学计量学方法对果实真菌污染过程进行评价, 建立基于电子鼻系统的采后早期病害识别分类模型, 以期为实现草莓采后真菌病害无损检测和在线监控技术提供技术参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

草莓果实 (品种: ‘红颜’) 采摘于江苏省南京市锁石生态园 (北纬32°07′、东经118°59′), 采摘时间为2019年2月27日和2019年3月20日。植株生长于生态园中温室大棚, 生长状态良好, 约花期后40 d采摘。由专业农户采摘大小一致, 表观没有机械损伤、无病害的草莓果实设实验样本, 并在采摘后1 h内立即输送至实验室, 流程如图1所示。



图1 实验流程图

Fig. 1 Flow char of the experiment

氯化钠 (分析纯) 西陇科学股份有限公司; 2-辛酮 (色谱级) 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 孟加拉

红培养基、马铃薯琼脂培养基 上海盛思生化科技有限公司。

1.2 仪器与设备

PEN3电子鼻系统 德国AIRSENSE公司; 7890A气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用仪 美国安捷伦科技有限公司; PDMS/DVB/CAR萃取头 美国Supelco公司; SW-CJ-2FD型超净工作台 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; HH-1恒温水浴锅、ZD-85A振荡摇床 常州国华电器有限公司; ME-T分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; PCTHI-150T恒温恒湿箱 施都凯仪器设备(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样本处理

为避免未知真菌病害造成草莓果实腐烂,采用0.5%的次氯酸钠溶液浸泡1 min;随后自来水浸泡2次,每次1 min;并最后采用流动灭菌蒸馏水冲洗1次,消除果实表面残余的次氯酸钠,洗净后的果实在室温条件下(20±5)℃自然晾干。选取典型草莓采后病害真菌灰葡萄孢作为致病真菌。菌株在恒温恒湿培养箱(温度(28±1)℃,相对湿度(85±10)%)条件下活化2周,制备孢子悬浮液,调节孢子悬浮液浓度至 1×10^5 spores/mL,现配现用。

处理组样本表面采用穿刺法接种,采用灭菌枪头在果实表面中心位置注射20 μL的孢子悬浮液,注射深度为果实皮下2 mm。接种完成后,所有样本自然晾干消除表面残余水分,并转移至消毒过的恒温恒湿箱内贮藏,此时设为采后贮藏初始时间点,贮藏条件设为温度(20±1)℃和相对湿度(85±5)%用以模拟常温货架条件;除接种孢子悬浮液替换成接种无菌生理盐水上,对照组所有样本处理与处理组一致。为获取不同病害阶段的草莓果实,取样时间分别设置0、24、48、72、96、120 h,待测样本在获取电子鼻信号后,用于理化指标及微生物携带量的测定。

早期病害定义参照文献[2],并补充条件:菌斑面积低于5%,未出现菌丝或其他繁殖体,无组织液外渗;病害自接种后贮藏时间不超过48 h。

1.3.2 电子鼻系统

采用商业化便携式电子鼻检测系统。设备主要由进气单元、传感器阵列和模式识别系统组成。空气流通采集电子鼻信号之前,将样品放置250 mL玻璃烧杯中,用锡箔纸密封烧杯端口。置于25℃水浴条件下,平衡10 min用以消除传感器检测时的基线漂移^[7]。采用顶空采样法进行样品气味收集,检测时间设为60 s,记录点默认每隔1 s,进气速率设为0.15 L/min。传感器响应信号值以电导率 G/G_0 值表示,完成单个样本测量后,进行120 s的

自然洗气,基线归零时间设为5 s,归零后 G/G_0 值强制初始化为1^[6]。对所有样本进行电子鼻信号采集,重复实验设置3次,取平均值用于后续数据分析。

1.3.3 挥发性化学成分检测

草莓果实挥发性化学成分采用顶空固相微萃取(headspace solid phase micro-extraction, HP-SPME)模式,结合GC-MS联用技术进行气味成分的定性与定量分析。测定方法及参数设定参照文献[8]并修改。

HP-SPME程序:鲜样草莓液氮研磨后,分别称取(5.0±0.3)g样品粉末、1 g NaCl置于20 mL顶空瓶中,内标加入100 μL质量浓度5.24 μg/mL的2-辛酮溶液^[9],密封后混匀。采用活化后PDMS/DVB/CAR纤维萃取头插入样品瓶的顶空部分,60℃水浴条件下,固相微萃取50 min。

GC-MS程序:采用7890 GC-MS仪。程序初始温度40℃,保持5 min后,以5℃/min速率升至150℃;再以10℃/min速率升温至240℃,最后保持5 min。采用氦气(纯度>99.99%)作为载气,流速1.00 mL/min;离子源温度230℃;离子阱温度150℃;传输线温度默认170℃;质量扫描范围 m/z 30~450;发射电流25 μA;扫描时间0.6 s;萃取解吸温度250℃,手动进样解吸时间5 min。各挥发性化学成分检测定性结果与NIST11.0质谱库比对,保留匹配度80%以上的物质。平行实验设置为3次,重复实验设置3次,取平均值用于后续数据分析。

1.3.4 微生物含量检测

测定方法参考GB 4789.15—2016《食品微生物含量检测标准》。切取接种病害部位草莓(15±0.5)g,研磨后溶解于135 mL无菌生理盐水,180 r/min条件下振荡2 min。随后梯度稀释至目标浓度。采用灭菌移液枪头吸取1 mL的目标溶液,并倒入孟加拉红培养基,待冷却后倒置。冷却后的平板放置于27℃、相对湿度85%的恒温恒湿箱中培养2~3 d,对霉菌菌落计数。统计结果以lg(CFU/g)表示。重复实验设为3次,取平均值用于数据分析。

1.3.5 特征数据提取

本实验中电子鼻系统可采集单个样本60 s时间内10个传感器的响应变化值,每个传感器对应的响应曲线包含初始化阶段、快速响应阶段和稳定化阶段。根据草莓果实信号变化规律,采用3种不同特征数据提取方案:快速响应值(第10秒);稳定响应值(第60秒);感应曲线最大斜率值,分别构建不同预测模型。

1.3.6 主成分分析(principal component analysis, PCA)

由于电子鼻的传感器信息中包含多重共线和非结构化问题,即使在经过特征提取后,每个样本仍包含10个传感器得到的特征数据(即维度为10)。结合PCA处

理,通过对原始数据进行新矩阵投影降维,将原有存在相互关联性的数据转变成相同维度但互不相关的单独成分。这些PC按照贡献率从大到小排列,除排名靠前的少数几个PC,其余后续PC贡献率较低,对整个信息的描述可以忽略^[10]。

1.3.7 数据建模

涉及构建基于电子鼻传感器信号的草莓真菌病害阶段分类及定量预测分析方法,采用偏最小二乘回归(partial least squares regression, PLSR)和偏最小二乘判别分析(partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)进行模型构建^[11]。

1.3.8 数据集划分

研究共涉及到2批次草莓采后真菌病害实验无损建模:草莓果实病害微生物携带量的无损预测分析(建模实验1)、草莓果实早期病害的预测分类(建模实验2)。建模实验1中,根据6个取样时间点,设置每组15个样品(合计:6个取样点×15个样本=90个样本),在采集完电子鼻信号后,进行微生物平板计数。实验数量按照2:1划分建模集(60个样本)和验证集(30个样本),划分依据参照Kennard-Stone算法挑选^[11]。

早期病害预测分类实验中,采用外部验证实验进行分类模型建立,设定双批次实验进行模型验证。实验共计收集126个健康果实和126个早期病害果实电子鼻信息数据。按照2:1划分建模集(168个样本)与验证集(84个样本)。

1.3.9 模型评价

采用决定系数(R^2)、校正均方根误差(root mean squared error of calibration, RMSEC)、交互验证均方根误差(root mean square cross validation, RMSECV)、预测均方根误差(root mean square error of prediction, RMSEP)、相对预测偏差(prediction of relative deviation, RPD)进行模型精度评价。

1.4 数据处理

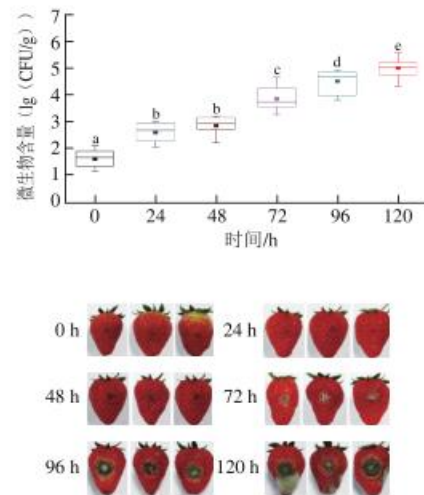
采用单因素方差分析对不同贮藏时间点的微生物携带量、挥发性成分进行差异显著分析($P<0.05$, 差异显著; $P<0.01$, 差异极显著);预测模型和分类模型建立均采用Matlab软件PLS_toolbox 7.5工具箱;PCA采用SPSS 18.0版软件进行;所有图形绘制采用Origin 9.0软件。

2 结果与分析

2.1 微生物含量变化

草莓采后病害时,微生物携带量和表观形态发生与病害时间呈现规律性变化^[12],如图2所示。在接种病菌后分别贮藏24、48、72、96、120 h,草莓果实真菌含量分别从初始1.65 (lg (CFU/g)) 上升至2.61、2.86、

3.86、4.53、5.00 (lg (CFU/g))。初始0~48 h阶段微生物总量增加了1.21 (lg (CFU/g)),而在随后的48 h贮藏时间内(48~96 h),微生物含量增幅扩大成2.98 (lg (CFU/g))。这种上升趋势在96~120 h贮藏时间段开始降低,仅为0.47 (lg (CFU/g))。病害草莓发病48 h后,虽然微生物含量呈现显著差异,仅从外观变化难以准确判断病害,因此后续研究尝试从气味的角度分析早期病害的可行性。



贮藏条件为温度20℃、相对湿度85%;字母不同表示差异显著, $P<0.05$ 。

图2 贮藏过程中草莓微生物含量变化和外观形态变化

Fig. 2 Changes in microbial load and appearance of strawberries during storage

2.2 挥发性成分变化

草莓病害过程会发生明显气味成分变化^[13-14],采用SPME-GC-MS技术对病害过程进行全扫描分析,并添加100 μL内标物(5.24 μg/mL 2-辛酮)用于半定量分析。如表1所示,主要挥发性化学成分包括醇类4种、醛类6种、酸类6种、酯类10种、酮类3种、萜烯类2种以及其他类3种,不同发病时期对应的物质种类以及含量均不相同。4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮(4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, HDMF)和4-甲氧基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮(4-methoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, DMMF)是形成草莓特有香气的关键物质成分,HDMF与丁酸乙酯的混合可以呈现“草莓味”香气^[15]。本实验HDMF和DMMF含量均呈现先升后降的趋势,其中在病害72 h后果实DMMF含量可显著增至0.36 μg/g;当病害发生120 h时,含量低于0.01 μg/g。病害发生初始时,会促进果实的成熟和水果香味的散发^[16-18];而当对应的特征香气成分急速下降后,表明草莓果实已经严重或完全腐烂,丧失了商品价值。

表1 草莓果实病害过程中主要的挥发性物质及其含量

Table 1 Contents of major volatile compounds in strawberry samples during storage

种类	挥发性物质		μg/g					
	中文名称	英文名称	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
醇类	反-2-己烯-1-醇	(E)-2-hexen-1-ol	/	/	0.22±0.29 ^a	0.17±0.02 ^a	/	/
	乙醇	ethanol	0.52±0.02 ^a	0.50±0.03 ^a	0.57±0.13 ^a	0.72±0.06 ^a	2.01±0.49 ^b	3.95±0.88 ^c
	芳樟醇	limonol	0.20±0.03 ^b	0.16±0.01 ^b	0.32±0.16 ^b	0.06±0.07 ^b	/	/
	橙花叔醇	nerolidol	0.13±0.01 ^b	0.11±0.05 ^b	0.46±0.05 ^b	0.23±0.04 ^b	0.02±0.03 ^b	/
醛类	2-己烯醛	2-hexenal	0.62±0.11 ^a	0.38±0.04 ^a	0.07±0.03 ^a	0.10±0.02 ^a	/	/
	5-羟甲基糠醛	5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde	0.27±0.01 ^b	0.15±0.02 ^b	/	0.19±0.16 ^b	/	/
	5-甲基呋喃醛	5-methyl furfural	/	/	/	/	0.08±0.05	/
	苯甲醛	benzaldehyde	0.04±0.01 ^b	0.06±0.03 ^b	0.07±0.03 ^b	0.14±0.01 ^b	0.05±0.04 ^b	0.06±0.01 ^b
	癸醛	decanal	/	0.01±0.01 ^b	0.27±0.35 ^b	0.02±0.01 ^b	/	/
	糠醛	furfural	0.05±0.01 ^b	0.05±0.04 ^b	0.41±0.13 ^b	/	/	/
酸类	正己醛	hexanal	0.17±0.04 ^b	0.13±0.02 ^b	0.11±0.03 ^b	/	/	/
	二羧基马来酸	dihydroxymaleic acid	/	/	0.02±0.02 ^b	0.02±0.01 ^b	/	/
	反-9-十八碳烯酸	(9E)-octadecenoic acid	/	/	/	/	0.06±0.09 ^b	0.10±0.03 ^b
	壬酸	nonanoic acid	0.22±0.04 ^b	0.14±0.09 ^b	0.10±0.05 ^b	/	/	/
	壬酸	nonanoic acid	0.02±0.01 ^b	0.04±0.06 ^b	0.02±0.02 ^b	/	/	/
	辛酸	octanoic acid	0.04±0.003 ^b	0.04±0.02 ^b	0.04±0.02 ^b	/	0.02±0.02 ^b	/
	棕榈酸	palmitic acid	/	/	/	/	0.07±0.03 ^b	0.11±0.06 ^b
	乙酸苯甲酯	benzyl acetate	/	/	0.14±0.04 ^b	Tr	/	/
	乙酸桂酸	cinnamyl acetate	/	/	/	0.22±0.04	/	/
	丁酸乙酯	ethyl butyrate	/	/	0.23±0.06 ^b	0.14±0.01 ^b	/	/
酯类	己酸乙酯	ethyl caproate	0.14±0.02 ^b	0.15±0.08 ^b	0.41±0.17 ^b	0.51±0.09 ^b	/	/
	辛酸乙酯	ethyl caprylate	0.04±0.01 ^b	0.02±0.03 ^b	/	/	/	/
	油酸乙酯	ethyl oleate	/	/	/	0.02±0.01 ^b	0.06±0.03 ^b	0.24±0.08 ^b
	乙酸己酯	hexyl acetate	/	/	/	0.55±0.09 ^b	0.03±0.01 ^b	/
	苯甲酸甲酯	methyl benzoate	/	/	/	/	0.03±0.01	Tr
	乙酸甲酯	methyl hexanoate	0.16±0.02 ^b	0.15±0.03 ^b	0.43±0.17 ^b	0.56±0.07 ^b	0.06±0.06 ^b	/
	辛酸甲酯	methyl octanoate	0.03±0.01 ^b	0.02±0.003 ^b	0.03±0.01 ^b	0.14±0.03 ^b	0.03±0.03 ^b	/
	萜烯类	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(4H)吡喃酮	2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(4H)pyranone	0.04±0.03 ^b	0.07±0.07 ^b	/	/	/
4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮		4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	0.02±0.01 ^b	0.03±0.01 ^b	0.08±0.09 ^b	0.01±0.01 ^b	0.03±0.02 ^b	0.02±0.01 ^b
其他	4-甲氧基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮	4-methoxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	0.04±0.01 ^b	0.04±0.01 ^b	0.12±0.04 ^b	0.36±0.07 ^b	0.08±0.02 ^b	Tr
	苯乙炔	phenylethyne	/	/	/	0.11±0.01 ^b	0.02±0.01 ^b	0.03±0.01 ^b
萜烯类	β-法尼烯	β-farnesene	0.01±0.01 ^b	0.02±0.01 ^b	0.03±0.01 ^b	/	/	/
	肉豆蔻胺	1-tetradecylamine	/	/	/	/	/	0.04±0.04
其他	3-羟基哌啶	3-hydroxypiperidine	/	/	/	/	/	0.02±0.01
	双酚A	bisphenol A	/	/	/	/	0.07±0.04 ^b	0.09±0.04 ^b

注: / 未检出; Tr.微量, 含量<0.01 μg/g; 同行肩标字母不同表示差异显著 (P<0.05); 所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 内标物为2-辛酮。

健康果实中, 除HDMF和DMMF外, 如橙花叔醇、芳樟醇、正己醛、乙酸乙酯等物质均为草莓的主要挥发性成分^[8-10]。此外, 成熟草莓挥发性成分中乙醇、芳樟醇、橙花叔醇、2-己烯醛、正己醛、己酸乙酯、乙酸甲酯、HDMF和DMMF均被检出, 对应的醛类和酯类的种类最多。病害草莓中, 挥发性酯类由初始的4种物质被检

出, 在72 h后上升到8种; 而后持续下降, 在120 h后仅有2种酯类物质被检出。横向比较不同病害时间发现, 病害发生24 h时, 青草类香气成分如2-己烯醛会显著下降 (P<0.05), 由0.62 μg/g降至0.38 μg/g, 反映了草莓果实的进一步成熟和衰老, 类似结果也出现在桃果实采后病害的分析中^[19]。当果实受到外界胁迫后, 通过激活相关酶代谢途径合成相关C₆或C₉类醇、醛类物质增强自身防御体系^[20-21]。但随着病原微生物的破坏力进一步增强, 草莓原有的果实香气成分逐渐丧失, 乙醇含量急剧上升, 从0.72 μg/g (72 h) 上升至3.95 μg/g (120 h)。

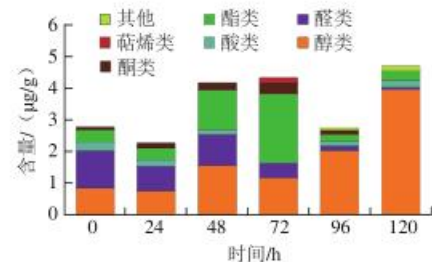
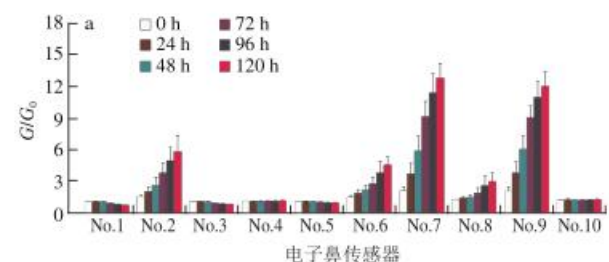


图3 草莓病害过程中挥发性物质的定量分析
Fig. 3 Changes in contents of different classes of volatile compounds in strawberries during fungal decay

如图3所示, 不同病害时间下, 草莓挥发性气味中的醇类、醛类、酯类、酸类、萜烯类以及其他成分总量及占比不同。酯类含量由初始的0.37 μg/g (0 h) 上升至2.14 μg/g (72 h), 然后急剧下降至0.24 μg/g (120 h)。病害推动了糖类、脂类及蛋白质等化合物的分解进程, 加速了草莓果实的成熟和衰老^[8]。初始阶段时, 果实抵抗能力较强, 自身呼吸作用加强, 酯类物质增多; 随病害加剧, 果实自身合成酯类物质的代谢体系被完全破坏, 挥发性成分呈现急剧下降。醇类作为真菌病害过程的最典型物质, 在整个过程中含量由初始的0.85 μg/g上升至3.95 μg/g; 而对应的醛类含量从1.15 μg/g下降至0.06 μg/g, 这种与病害过程的特殊关联性, 已被用于特定的草莓腐烂指数数学模型建立^[22]。

2.3 传感器响应特性



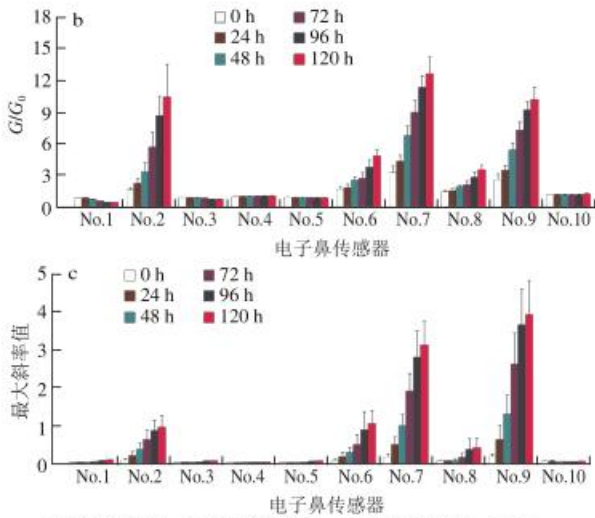


图4 不同特征提取模式下电子鼻信号变化差异
Fig. 4 Variation in electronic nose signals in different feature extraction modes

由图4可知,在快速响应时间时, No.2对应的响应值普遍偏低,范围在1.43~5.75之间(图4a);分析所有传感器响应曲线最大斜率发现,整个过程中No.7和No.9号传感器变化波动最为剧烈,而No.2传感器在整个过程中呈现缓慢上升的趋势(图4c)。

结合传感器对应的敏感化合物分析看, No.2、No.7和No.9响应值变化可能是草莓果实病害过程中,醇类、酯类和萜烯类挥发性物质含量上升所引起的(图3),或者其他成分含量(如醛类)在贮藏过程中发生明显的变化所造成^[22]。部分传感器,如No.4和No.10传感器在整个阶段保持相对稳定,原因是它们敏感物质分别对应的氢气和烷烃,不是草莓果实主要挥发性成分(表1)。另一方面,传感器检测限也是影响信号波动的主要原因,如No.2、7和9号传感器检测限可达0.001 g/m³,对挥发性成分的波动相对敏感。

2.4 不同病害阶段PCA

不同病害阶段的草莓样本电子鼻信号PCA结果如图5所示。快速响应值、稳定响应值、最大斜率值的PC1贡献率均超过80%,说明了PCA可对电子鼻数据进行大规模的保留。分析整个病害过程,将0~24、48~72 h和96~120 h分别归为早期阶段、中期阶段以及后期阶段进行定性区分。结果表明,所有模式下病害发生的早期阶段与后期阶段能实现完全区分,这说明电子鼻数据可以用于区分早期霉变和完全霉变的果实。另一方面,中期阶段与其他两个阶段仍有部分样品重叠,尚未无法完全分离,这是因为受果实个体生理差异,在接种病原菌后发病程度不完全与贮藏时间一一对应。

在电子鼻信号降维基础上,进一步将降维后的特征数据与草莓病害指标进行关联性探讨。选取原始数据贡献率最大的PC1作为表征参数,开展不同提取模式下的

PC1与病害重要参数的回归性分析,结果如表2所示。3种模式下的PC1与真菌总数、醇类、其他挥发性成分呈正相关,与醛类、酸类、酯类、酮类以及萜烯类挥发性成分成分负相关。其中稳定响应值下对应的PC1与真菌总数的关联性系数最高($r=0.982$)。酸类、酯类、酮类和萜烯类虽然都与PC1有一定的关联性,但在统计学上并不显著($P>0.05$)。这表明单一的PC数据虽然能够实现部分参数如真菌总量、醇类以及其他类物质的相关分析或预测,但针对病害过程中总体的特征变化仍有不足。

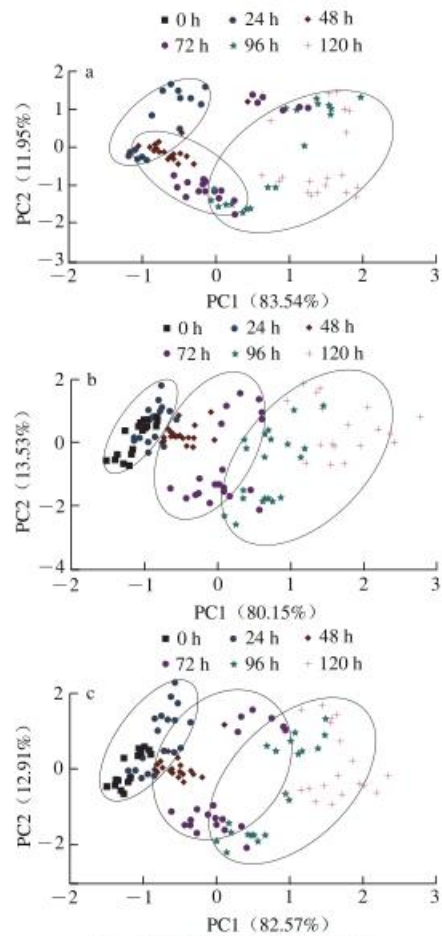


图5 草莓病害的电子鼻数据PCA
Fig. 5 PCA loading plot for healthy and diseased strawberries based on E-nose data

表2 草莓病害过程品质指标与PC1相关性分析

Table 2 Correlation analysis of PC1 values and quality attributes in strawberry fruit during storage

项目	PC1		
	快速响应值	稳定响应值	最大斜率值
真菌总数	0.965**	0.982**	0.977**
醇类	0.868**	0.921**	0.856*
醛类	-0.981**	-0.944**	-0.984**
酸类	-0.473	-0.405	-0.456
酯类	-0.132	-0.106	-0.173
酮类	-0.344	-0.356	-0.372
萜烯类	-0.028	-0.040	-0.070
其他	0.940**	0.952**	0.918**

注: *显著相关, $P<0.05$; **极显著相关, $P<0.01$ 。

2.5 多特征模式下微生物含量预测

由表3可知, 总体建模集 R^2 在0.848~0.910范围, RMSEC范围为0.365~0.474 (lg (CFU/g)); 交互验证集 R^2_{CV} 为0.813~0.889, RMSECV为0.406~0.529 (lg (CFU/g)); 预测集 R^2_p 为0.715~0.815, RMSEP为0.515~0.645 (lg (CFU/g)), RPD为1.813~2.270。对同一特征信息源结构下的草莓果实真菌含量预测时, 建模集、交互验证集和预测集的 R^2 差值均未超过0.15, 这表明建立的PLSR草莓果实真菌含量预测模型没有过拟合。对不同方案的PLSR建模效果比对发现, 稳定响应值对应的特征数据建模、交互验证以及预测效果相对最优, RPD可以达到2.270。通常, 当建立的无损模型预测精度RPD能达到2.0及以上, 表明该模型具有良好的指标预测效果^[23-24], 因此快速响应值、稳定响应值和最大斜率值数据集下建立的电子鼻特征数据传感模型均达满意效果。类似研究报道了传感器稳定阶段响应值相比其他特征值建模结果, 能够更好地区分不同山核桃样本, 在建立单一特征值预测和分类模型时, 采用稳定阶段的传感器响应值为建模数据得到的结果更令人满意^[25-27]。

表3 基于电子鼻信息的草莓果实真菌总数PLSR模型的预测结果
Table 3 Performance of the PLSR models for microbial load of individual strawberries based on E-nose data

模式	潜在变量	建模集		交互验证集		预测集		RPD
		R^2	RMSEC	R^2_{CV}	RMSECV	R^2_p	RMSEP	
快速响应值	3	0.897	0.390	0.876	0.429	0.781	0.559	2.092
稳定响应值	3	0.910	0.365	0.889	0.406	0.815	0.515	2.270
最大斜率值	3	0.848	0.474	0.813	0.529	0.715	0.645	1.813

2.6 病害早期阶段的分类

基于电子鼻稳定信号值的健康草莓 (class 1) 和早期病害草莓 (class 2) 的PLS-DA模型分类结果见图6。对2批次共计252个草莓样本电子鼻稳定信号值分析发现, 能够实现健康草莓85.7% (判定正确数量72个/总体建模数量84个) 建模准确率和69.0% (判定正确数量29个/总体建模数量42个) 的预测准确率; 早期病害草莓能够实现92.9% (判定正确数量78个/总体建模数量84个) 建模准确率和92.9% (判定正确数量39个/总体建模数量42个) 预测准确率。结果表明在电子鼻稳定信号的数据源基础上建立的无损分类模型, 基本可以实现准确的早期病害判别。PLS-DA算法能基本做到表征出两者不同类型样本间的映射关系, 但健康草莓果实更容易被误判成早期病害草莓, 模型准确率有待进一步提高。原因可能是早期病害引起的气味差异被果实自身的香气掩盖。后续研究关于如何改善草莓早期病害识别方面需要进一步优化。

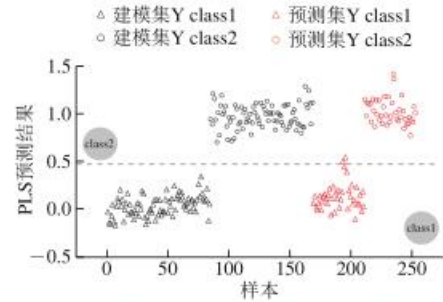


图6 基于电子鼻稳定信号值的草莓的PLS-DA模型分类结果
Fig. 6 Classification results of strawberries by PLS-DA model based on E-nose stable responses

3 讨论

采用电子鼻技术捕捉水果/农产品贮藏、加工过程中的气味变化特性, 可用于对样品的品质参数及状态等评判。在已有研究中, Rizzolo等^[28]证实了电子鼻可用于描述桃果实冷藏过程中的气味特性变化, 结果表明果实在贮藏阶段内挥发性成分种类及含量会出现差异性变化, 随后这种成分的变化造成电子鼻信号出现规律性波动。Guo Zhiming等^[29]利用电子鼻结合化学计量学实现了苹果青霉病的无损检测, 结果表明基于传感器信号的霉变果实面积预测 R_p 值高达0.972, RMSEC为1.28, 证实了电子鼻技术可以用于水果采后腐烂程度的定量评价。本实验采用电子鼻技术结合HP-SPME-GC-MS对草莓霉变过程中气味组分及状态信号进行了具体分析, 研究过程发现电子鼻的特征数据与特定真菌病害过程紧密联系, 草莓果实在受到病害后, 挥发性醇类、酯类、醛类、酸类、萜烯类以及部分其他成分及含量变化明显。其中, 醇类总量呈现明显上升趋势, 可由0.85 $\mu\text{g/g}$ 上升至3.95 $\mu\text{g/g}$; 而对应的醛类物质则是下降最为显著, 可从1.15 $\mu\text{g/g}$ 下降至0.06 $\mu\text{g/g}$ 。回归性分析表明上述物质组分的变化, 是引起电子鼻传感器特征响应的重要因素之一, 可以在电子鼻数据压缩和特征降维后呈现出来。此外, 根据草莓不同真菌病害的气味差异, Pan Leiqing等^[2]对草莓采后早期病害进行了分类预测, 结果表明草莓在接种灰葡萄孢霉、匍枝根霉以及扩展青霉后的传感器信号稳定值 (10 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏2 d) 呈现差异, 这种信号的差异可以通过PCA处理实现微生物病害类型区分。

本实验针对性分析了几种不同的数据提取方案, 在3种不同方案提取下, 传感器的稳定响应值对不同时间段的病害草莓识别区分效果相对最好。基于这3种数据源建立的草莓果实真菌携带量PLSR定量预测模型, 能实现 R_p^2 为0.715~0.815的准确预测, 这说明了电子鼻传感器的特征信号能较好反映草莓真菌病害的程度。类似, Gu Xinzhe等^[30]利用了PEN3电子鼻对铜绿假单胞杆

菌在香肠的生长情况,进行气味捕捉和生长追踪,结果表明No.8和No.10传感器稳定响应值能实现决定系数 R^2 为0.89~0.99的微生物生长曲线的追踪。Letricia等^[31]初步证实了电子鼻技术可以用于区别咖啡豆的品种,但不同的建模方式对应的准确率不同,数据处理方式与模型精度有直接关联。Kodogiannis^[32]利用便携式电子鼻对猪肉腐烂过程进行了动态监测,采用模糊小波神经网络模型可以对健康、亚健康和腐烂样本实现95.71%的准确区分,与单一模型相比,集成模型具备更好预测精度和鲁棒性。本实验建立的传感器快速响应模型同样能实现良好的预测和分类效果,这种检测时间的大幅度缩短,将会推动该技术在在线方面的应用。王蓓等^[33]对花生霉变程度和毒素含量进行了同步检测,黄曲霉毒素含量的检测时间得到显著降低,特征传感器(LY2/G、T30/1、T70/2和PA/2)响应值与花生霉变程度显著相关,对产毒菌株样品和非产毒菌株样品分类正确率超过95%。结合实际情况,传统草莓真菌病害的检测非常依赖于肉眼的观察,受到了多方面人为因素的限制,费时费力,而且无法做到精确定量的检测。考虑到微生物在线检测需要兼顾快速、准确和无损等方面,采用电子鼻的快速响应值进行草莓果实等级评判和质量预测,将更有利于该技术实时在线应用^[34]。

4 结论

采用电子鼻技术、顶空固相微萃取、气相色谱-质谱联用技术以及国标的微生物检验手段,对不同病害阶段的草莓果实进行了气味评价,揭示了挥发性组分与电子鼻传感器信号间的关联响应特性。结论如下:

1) 本实验条件下,草莓采后灰霉病过程中,主要醇类物质含量可从0.85 $\mu\text{g/g}$ 上升至3.95 $\mu\text{g/g}$;主要醛类物质可从1.15 $\mu\text{g/g}$ 下降至0.06 $\mu\text{g/g}$ 。主要挥发性醇类、醛类以及少数几种物质与电子鼻特征信号呈现显著关联。

2) 结合不同特征提取方案,分别建立了草莓果实真菌病害的定量PLSR模型。稳定响应值对应的预测效果相对最佳,RPD能实现2.270。

3) 开展了草莓果实早期病害的无损识别,在草莓接种病害发生不超过48 h,病斑面积低于5%,未出现菌丝或其他繁殖体的前提下,采用电子鼻技术实现了对早期病害果实92.9%的准确区分。结果可为控制草莓/水果采后品质安全以及电子鼻技术在食品微生物检测方面的应用提供参考。

参考文献:

- [1] SANAEIFAR A, ZAKIDIZAJI H, TAFARI A, et al. Early detection of contamination and defect in foodstuffs by electronic nose: a review[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2017, 97: 257-271. DOI:10.1016/j.trac.2017.09.014.
- [2] PAN L Q, ZHANG W, ZHU N, et al. Early detection and classification of pathogenic fungal disease in post-harvest strawberry fruit by electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Research International, 2014, 62: 162-168. DOI:10.1016/j.foodres.2014.02.020.
- [3] PALLOTTINO F, COSTA C, ANTOUNCCI F, et al. Electronic nose application for determination of *Penicillium digitatum* in Valencia oranges[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(9): 2008-2012. DOI:10.1002/jsfa.5586.
- [4] ANNA R, GIULIA B, MARISTELLA V, et al. Electronic nose to detect volatile compound profile and quality changes in 'spring Belle' peach (*Prunus persica* L.) during cold storage in relation to fruit optical properties measured by time-resolved reflectance spectroscopy[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(8): 1671-1685. DOI:10.1021/jf302808g.
- [5] ZHANG H M, WANG J, YE S, et al. Application of electronic nose and statistical analysis to predict quality indices of peach[J]. Food & Bioprocess Technology, 2012, 5(1): 65-72. DOI:10.1007/s11947-009-0295-7.
- [6] BALDWINE A, JINHE B, ANNE P, et al. Electronic noses and tongues: applications for the food and pharmaceutical industries[J]. Sensors, 2011, 11(5): 4744-4766. DOI:10.3390/s110504744.
- [7] SHEN F, WU Q F, PENG L, et al. Detection of *Aspergillus* spp. contamination levels in peanuts by near infrared spectroscopy and electronic nose[J]. Food Control, 2018, 93: 1-8. DOI:10.1016/j.foodcont.2018.05.039.
- [8] ZHANG J J, WANG X, YU O, et al. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria* \times *Ananassa* Duch.) during fruit development and maturation[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(3): 1103-1118. DOI:10.1093/jxb/erq343.
- [9] 付蕾, 刘正生, 孙鑫洋, 等. 4种纤维头对草莓香气成分的萃取效果[J]. 中国农业科学, 2010, 43(21): 4473-4481. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2010.21.017.
- [10] GRANATO D, SANTOS J S, ESCHER G B, et al. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: a critical perspective[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 72: 83-90. DOI:10.1016/j.tifs.2017.12.006.
- [11] 何勇, 刘飞, 李晓丽, 等. 光谱及成像技术在农业中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 2016.
- [12] ALKAN N, FORTES A M. Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to post-harvest fungal pathogens[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 889-902. DOI:10.3389/fpls.2015.00889.
- [13] SCHWAB W. Natural 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (Furaneol®)[J]. Molecules, 2013, 18(6): 6936-6951. DOI:10.3390/molecules18066936.
- [14] PÉREZ A G, OLÍAS R, OLÍAS J M, et al. Biosynthesis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and derivatives in *in vitro* grown strawberries[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(2): 655-658. DOI:10.1021/jf950435j.

- [15] WATSON R. Influence of harvest date and light integral on the development of strawberry flavour compounds[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(377): 2121-2129. DOI:10.1093/jxb/erf088.
- [16] QIN X J, XIAO H M, CHENG X, et al. *Hanseniaspora uvarum* prolongs shelf life of strawberry via volatile production[J]. *Food Microbiology*, 2017, 63: 205-212. DOI:10.1016/j.fm.2016.11.005.
- [17] 张运涛, 王桂霞, 董静, 等. '星都1号'和'星都2号'草莓及其亲本果实挥发性物质的分析[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(10): 3208-3213. DOI:CNKI:SUN:ZNYK.0.2008-10-043.
- [18] ZHU J C, NIU Y W, XIAO Z B, et al. Characterization of the key aroma compounds in Laoshan green teas by application of odour activity value (OAV), gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry (GC-MS-O) and comprehensive two-dimensional gas chromatography mass spectrometry (GC × GC-qMS)[J]. *Food Chemistry*, 2021, 339: 128-136. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.128136.
- [20] 赵秀洁. 基于气味判别'红颜'草莓采后品质的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [21] 王爱华, 马红叶, 李荣飞, 等. 凤梨草莓与黄毛草莓种间杂种果实香气成分的代谢谱分析[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(5): 1043-1054. DOI:10.3321/j.issn:0578-1752.2004.12.030.
- [22] LIU Q, ZHAO N, ZHOU D D, et al. Discrimination and growth tracking of fungi contamination in peaches using electronic nose[J]. *Food Chemistry*, 2018, 262: 226-234. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.04.100.
- [23] 褚小立. 化学计量学方法与分子光谱分析技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011.
- [24] 宁晓峰, 刘娜, 陈永亮, 等. 草莓品质光谱检测方法比较研究[J]. *沈阳农业大学学报*, 2020, 51(2): 177-184. DOI:10.3969/j.issn.1000-1700.2020.02.007.
- [25] 姜水. 基于电子鼻技术的山核桃内部品质快速无损检测方法的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [26] 范霞, 崔心平. 基于HS-SPME-GC-MS和电子鼻技术分析不同肉质桃子采后贮藏期的香气成分[J]. *食品科学*, 2021, 42(20): 222-229. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20201026-261.
- [27] 宋小青, 任亚梅, 张艳宜, 等. 电子鼻对低温贮藏猕猴桃品质的预测[J]. *食品科学*, 2014, 35(20): 230-235. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201420046.
- [28] RIZZOLO A, BIANCHI G, VANOLI M, et al. Electronic nose to detect volatile compound profile and quality changes in 'spring Belle' peach (*Prunus persica* L.) during cold storage in relation to fruit optical properties measured by time-resolved reflectance spectroscopy[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2013, 61(8): 1671-1685. DOI:10.1021/jf302808g.
- [29] GUO Z M, GUO C, CHEN Q S, et al. Classification for *Penicillium expansum* spoilage and defect in apples by electronic nose combined with chemometrics[J]. *Sensors*, 2020, 20(7): 2130. DOI:10.3390/s20072130.
- [30] GU X Z, SUN Y, TU K, et al. Evaluation of lipid oxidation of Chinese-style sausage during processing and storage based on electronic nose[J]. *Meat Science*, 2017, 133: 1-9. DOI:10.1016/j.meatsci.2017.05.017.
- [31] LETRICIA B P, OLGA R P, ILARIO F, et al. Assessment of volatile fingerprint by HS-SPME/GC-qMS and E-nose for the classification of cocoa bean shells using chemometrics[J]. *Food Research International*, 2019, 123: 684-696. DOI:10.1016/j.foodres.2019.05.041.
- [32] KODOGIANNIS V S. Application of an electronic nose coupled with fuzzy-wavelet network for the detection of meat spoilage[J]. *Food and Bioprocess Technology* 2017, 10: 730-749. DOI:10.1007/s11947-016-1851-6.
- [33] 王蓓, 沈飞, 何学明, 等. 电子鼻同步检测花生霉菌及霉菌毒素[J/OL]. *食品科学*, 2021. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210322-275. https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CAPJ&dbname=CAPJLAST&filename=SPKX20210521011&uniplatform=NZKPT&v=3RAbDEYpQvnS-o22V4t1O5LGb-IKIBKyVd2YZWYM2vSd0z9Sb_HuqGw9Nn-nF4z.
- [34] ADELINA N M, WANG H, ZHANG L, et al. Comparative analysis of volatile profiles in two grafted pine nuts by headspace-SPME/GC-MS and electronic nose as responses to different roasting conditions[J]. *Food Research International*, 2021, 140: 110026. DOI:10.1016/j.foodres.2020.110026.