

傅里叶变换衰减全反射红外光谱技术 对稻谷中常见有害霉菌的快速鉴别

刘凌平,和肖莹,都立辉*,沈飞,袁建,鞠兴荣

(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 210046)

摘要:本研究利用傅里叶变换衰减全反射红外光谱技术(ATR-FTIR)结合化学计量学方法,对稻谷中7种常见有害霉菌(尖孢镰刀菌 Pr、尖孢镰刀菌 Po、尖孢镰刀菌 M23、黄灰青霉 Pe、扩展青霉 3.7898、灰绿曲霉 3.3975 和亮白曲霉)进行了快速鉴定。结果显示,运用主成分分析法(PCA)能够有效区分七种不同类别的菌株样品。建立的线性判别分析(LDA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)模型,对7种不同类别菌株的留一交叉验证整体正确率分别达到 87.1% 和 87.3%。说明运用 ATR-FTIR 技术对稻谷侵染霉菌的种类实现快速鉴别具有一定可行性。

关键词:ATR-FTIR, 稻谷, 霉菌, 快速鉴别

Application of attenuated total reflection-fourier transform infrared spectroscopy for rapid identification of fungi strains on grain

LIU Ling-ping, HE Xiao-ying, DU Li-hui*, SHEN Fei, YUAN Jian, JU Xing-rong

(College of Food Science and Engineering/Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety/Key Laboratory of Grains and Oils Quality Control and Processing, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China)

Abstract: Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) was used in combination with chemometrics in this study for rapid identification of seven strains of fungi that usually cause seriously economic damage to paddy rice (*Fusarium oxysporum* Pr, *Fusarium oxysporum* Po, *Fusarium oxysporum* M23, *Penicillium aurantiogriseum* Pe, *Penicillium expansum* 3.7898, *Aspergillus glaucus* 3.3975 and *Aspergillus candidus*). The results indicated that, principal component analysis (PCA) could effectively distinguish the seven fungi strains. The overall correct classification in leaves-one-out cross-validation for different kinds of strains obtained by linear discriminant analysis (LDA) and partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) model was 87.1% and 87.3%, respectively. The results verified that the use of ATR-FTIR technology might be feasible for rapid identification of the species of fungi contamination on paddy rice.

Key words: ATR-FTIR; grain; fungi; strains; rapid identification

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)19-0298-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.19.049

粮食在高温高湿条件下极易发霉变质,不仅造成经济损失,且多数产毒霉菌的次级代谢产物严重威胁人畜健康^[1]。目前,粮食中霉菌种类的检测方法主要包括:平板菌落计数法^[2]、高效液相色谱法^[3-4,10]、气相色谱与质谱联用法^[5-6]、PCR 和免疫法^[7-9]等,然而,上述方法存在操作繁琐、灵敏性低,或成本高、耗时长等不足之处,难以实时监测霉菌的生长状况。因此,急需发展一种能够快速识别粮食中产毒霉菌的检测方法。

傅里叶变换衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR)法具有制样简单、无损和检测灵敏度高等特点^[11-12],是一种有效的微生物识别及鉴定手段^[13]。Naumann 等^[14]研究表明,傅里叶变换红外光谱(FTIR)技术可用于微生物的区分、归类和识别。目前,基于 FTIR 技术用于微生物特性的研究备受研究者青睐。柴阿丽等^[13]运用 ATR-FTIR 技术结合聚类分析法对来自 14 个属的 17 株真菌进行鉴别,达到理想效果。Volha Shapaval 等^[15]运用 FTIR 法分析 5 种菌属的 11

收稿日期:2016-03-21

作者简介:刘凌平(1989-),女,硕士研究生,研究方向:粮食储藏过程中的霉菌预警及其控制,E-mail:1091624063@qq.com。

*通讯作者:都立辉(1981-),男,博士生,副教授,研究方向:粮食储藏过程中的霉菌预警及其控制,E-mail:ddabc_2000@163.com。

基金项目:粮食公益性行业科研专项经费资助(201313002-01)以及江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

种真菌,结果表明,曲霉、毛霉、拟青霉可依据脂肪酸、脂质和碳水化合物的变化将其区分开来,且基于脂蛋白的差异可以区分交链孢霉和茎点霉。A.Lecellier等^[16]通过由486种真菌的红外光谱信息构成的数据库进行匹配,达到快速鉴别霉菌的目的。然而,目前多数研究仅限于霉菌种类的区别,缺乏对粮食中霉菌的鉴别分析。

综上,本研究将采用ATR-FTIR法对稻谷中七种常见有害霉菌进行检测,结合主成分分析(PCA)、线性判别分析(LDA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA)建立7种霉菌的快速判别模型^[17],为ATR-FTIR法实现谷物中霉菌的快速检测及早期预警提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

七种稻谷中常见有害霉菌 灰绿曲霉3.3975、亮白曲霉、黄灰青霉菌Pe、扩展青霉3.7898、尖孢镰刀菌Po、尖孢镰刀菌Pr、尖孢镰刀菌M23,七种霉菌均为稻谷中分出并经过基因鉴定;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA) 北京陆桥技术有限责任公司;甘油 北京索莱宝科技有限公司。

傅立叶变换红外光谱仪 德国布鲁克公司;血球计数板 上海求精生化试剂仪器有限公司;EX30生物显微镜 宁波舜宇仪器有限公司;载玻片 盐城市飞舟玻塑有限公司;单人双面超净工作台 上海三发科学仪器有限公司;冰箱 青岛海尔股份有限公司;WH-2微型旋涡混合仪 上海沪西分析仪器厂有限公司;隔水式恒温培养箱 南京晓晓仪器设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 霉菌的培养 采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基培养。500 mL三角瓶装入400 mL马铃薯葡萄糖琼脂培养基,经121 °C灭菌20 min后,待培养基冷却到55 °C左右时,将培养基倒入到灭菌过的一次性的培养皿中,待培养皿中的培养基凝固后,将七种霉菌分别接种到培养基上,在培养箱中培养,培养温度为28 °C。

1.2.2 孢子悬浮液的收获与处理 将培养5 d后的霉菌取出,取4 mL灭菌的甘油-水(%v/v,1:10)溶液于培养基表面,轻微震荡后,移取培养基表面的孢子悬浮液于EP管中,置于-20 °C保藏备用。

1.2.3 霉菌孢子的计数 将孢子悬浮液置于微型旋涡混合仪上震荡10 s,取50 μL孢子悬浮液于血球计数板上,在EX 30生物显微镜下观察并计数,为验证ATR-FTIR对霉菌光谱的特异性以及不同孢子悬浮液浓度的影响,分别对以上样品稀释10倍和20倍,共计得到62份样品,进行检测分析。

1.2.4 ATR-FTIR光谱采集 利用德国布鲁克公司的FTIR仪,结合ATR附件(Pike公司,美国)采集不同浓度的7种霉菌孢子悬浮液的光谱信息。先扫描背景(空气),然后,移取4 μL的样品于ZnSe晶体上进行检测,扫描32次,分辨率为4 cm⁻¹,测量范围4000~800 cm⁻¹,每个样品检测3次,取平均光谱建

模。不同样品间需用无水乙醇擦拭平台以避免交叉污染。

1.3 数据分析方法

采用SPSS 16.0软件,TQ analyst 6.0和Matlab 7.0软件对样品光谱数据进行分析。运用主成分分析法(PCA)对样品聚类趋势进行分析,线性判别分析(LDA)和偏最小二乘判别分析(PLS-DA),并运用留一交叉验证法对模型性能进行验证。

2 结果与讨论

2.1 霉菌孢子计数结果

显微镜计数结果显示,七种霉菌悬浮液样品的浓度分别为:扩展青霉3.7898:5.5 × 10⁶个/mL,黄灰青霉Pe:5.4 × 10⁶个/mL,尖孢镰刀菌Pr:1.9 × 10⁷个/mL,尖孢镰刀菌Po:1.425 × 10⁷个/mL,尖孢镰刀菌M23:6.9375 × 10⁶个/mL,灰绿曲霉3.4.5 × 10⁶个/mL,亮白曲霉:1.02 × 10⁷个/mL,七种霉菌孢子悬浮液的孢子数均在一个数量级或在相近的数量级,即它们的孢子浓度相近。

2.2 ATR-FTIR光谱图

图1为7种霉菌孢子悬浮液在4000~800 cm⁻¹的红外光谱图。由于7种霉菌孢子悬浮液的化学成分相似,导致样品红外光谱图的整体趋势及出峰位置一致,难以直观判别不同样品。对光谱图分析可知,在3700~2996 cm⁻¹处与O-H、N-H伸缩振动有关的吸收^[18],1800~1450 cm⁻¹处关于蛋白质酰胺I带和酰胺II带的吸收^[19],1185~900 cm⁻¹处为C-O-C和C-O-P的伸缩振动带^[20-21]。仔细观察可知,不同霉菌样品的光谱曲线在1000~900 cm⁻¹区域存在明显差异,表明其内部成分存在细微差异。鉴于不同霉菌样品悬浮液的红外光谱图无明显差异,下一步需对光谱信息进一步分析。

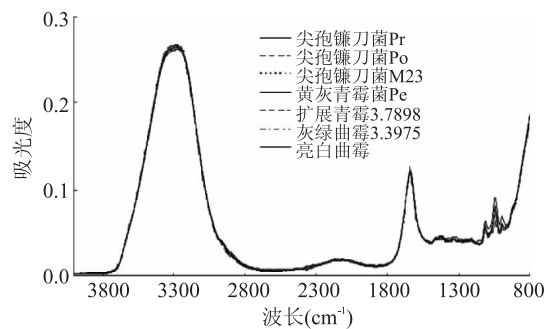


图1 7种霉菌孢子悬浮液样品的ATR-FTIR光谱图

Fig.1 ATR-FTIR spectra of spore suspensions from seven kinds of fungal strains

2.3 PCA结果

图2为7种不同浓度的霉菌孢子悬浮液光谱信息的主成分得分图。由图2可知,从菌属来看,尖孢镰刀菌属、青霉属和曲霉属3种菌属样品有大致分离趋势,说明三种菌属样品之间的差异较为明显,曲霉类样品可完全区分于其他2类。除了个别来自青霉菌属的样品与其他类别混在一起之外,大部分样品能够被很好的区分。进一步观察7类霉菌样品的聚类趋势可知,除了3种尖孢镰刀菌样品及黄灰青

霉 Pe 样品间存在部分重叠之外,其余 3 种霉菌可区分良好。结果表明,不同霉菌样品悬浮液的红外光谱吸收强度存在区别,PCA 可以提取不同样品间的差异信息,采用 ATR-FTIR 法识别稻谷中的不同霉菌具有可行性。下一步将利用从光谱中提取的前 10 个主成分建立不同菌属的判别分析模型。

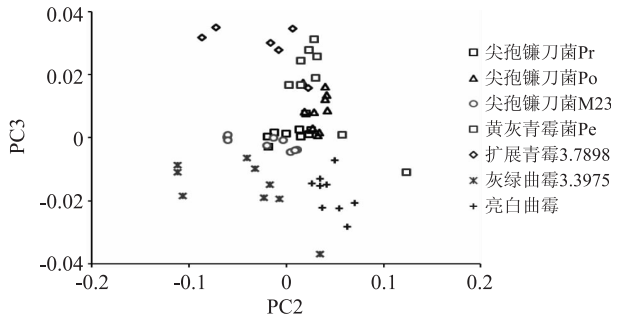


图2 7种霉菌孢子悬浮液样品的PCA得分图
Fig.2 PCA scores plot of spore suspensions from seven kinds of fungal strains

2.4 LDA 结果

7 种霉菌孢子红外光谱信息的 LDA 函数得分图如图 3 所示。结果显示,不同类别霉菌样品在水平方向的位置相距较远,差异明显,除青霉菌属间和曲霉菌属间出现部分重叠外,其余样品均能被完全区分,其结果优于 PCA。留一交互验证结果如表 1 所示,整体判别正确率为 87.1%,其中仅尖孢镰刀菌 M23 的判别正确率偏低,3 个样误判为尖孢镰刀菌 Pr,其余结果均大于或等于 80%。尖孢镰刀菌 Pr 和黄灰青霉 Pe 的判别正确率最高,均为 100%。另外,仔细观察发现,误判均发生在不同菌属内,3 类菌属间的判别正确率同为 100%。

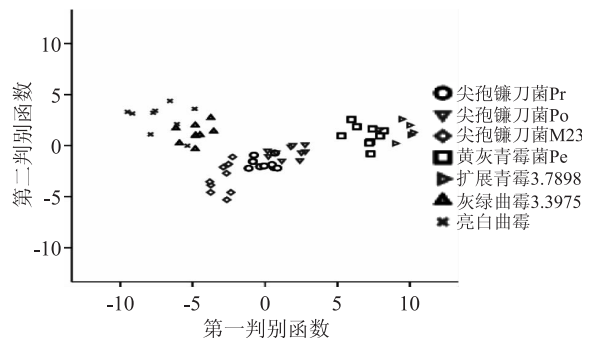


图3 7种霉菌孢子悬浮液样品红外光谱信息的LDA得分图
Fig.3 LDA score map of the infrared spectra of spore suspensions from seven kinds of fungal strains

2.5 PLS-DA 结果

为比较不同化学计量学方法对模型精度的影响,进一步运用主成分得分建立 PLS-DA 判别分析模型^[22],结果如表 2 所示。结果显示,模型对尖孢镰刀菌 Pr 和灰绿曲霉 3.3975 类样品的判别精度最佳,对尖孢镰刀菌 M23、扩展青霉 3.7898 和亮白曲霉的精度稍差。7 类样品的判别正确率为 79.2%~99.1% 之间,整体平均判别正确率为 87.3%,与 LDA 方法所得整体判别正确率值类似。表明 ATR-FTIR 技术,结合化学计量学方法,在霉菌菌属鉴别上取得了良好的效果。进一步的研究,应该扩大样本量,运用多种特征提取方法,以进一步提高模型的精度、适用性和稳健性。

3 结论

本文利用 ATR-FTIR 技术对稻谷中 7 种常见有害霉菌进行了快速检测分析。PCA 结果显示不同类别的霉菌样品可被良好区分,且样品孢子悬浮液浓

表 1 7 种霉菌孢子悬浮液样品的 LDA 模型留一交互验证结果

Table 1 Discrimination results of cross-validation LDA of spore suspensions from seven kinds of fungal strains

类别	预测类别							正确率 (%)
	尖孢镰刀菌 Pr	尖孢镰刀菌 Po	尖孢镰刀菌 M23	黄灰青霉 Pe	扩展青霉 3.7898	灰绿曲霉 3.3975	亮白曲霉	
尖孢镰刀菌 Pr	10	0	0	0	0	0	0	100.0
尖孢镰刀菌 Po	2	8	0	0	0	0	0	80.0
尖孢镰刀菌 M23	3	0	6	0	0	0	0	66.7
黄灰青霉 Pe	0	0	0	9	0	0	0	100.0
扩展青霉 3.7898	0	0	0	1	5	0	0	83.3
灰绿曲霉 3.3975	0	0	0	0	0	8	1	88.9
亮白曲霉	0	0	0	0	0	1	8	88.9
总计								87.1

表 2 7 类霉菌样品的留一交互验证 PLS-DA 模型判别结果

Table 2 Discrimination results of cross-validation PLS-DA of seven fungal species

项目	尖孢镰刀菌 Pr	尖孢镰刀菌 Po	尖孢镰刀菌 M23	黄灰青霉 Pe	扩展青霉 3.7898	灰绿曲霉 3.3975	亮白曲霉
样品量(个)	10	10	9	9	6	9	9
正确率(%)	99.1	89.4	79.2	88.8	79.6	95.5	79.6
敏感性(%)	100	82.7	90.4	88.7	98.1	98.2	92.5
特异性(%)	98.1	78.8	88.5	88.7	92.5	91.1	92.5

度对结果影响不明显,建立的 LDA 和 PLS-DA 模型对 7 种霉菌的留一交互验证结果的整体判别正确率分别为 87.1% 和 87.3%,且尖孢镰刀菌属、青霉菌属和曲霉菌属间的判别正确率高达 100%。结果表明,ATR-FTIR 技术可用于谷物中霉菌不同属间的快速鉴别,尤其对不同菌属的霉菌具有良好的判别效果。

参考文献

- [1] 周玉庭,任佳丽,张紫莺.粮食中霉菌污染检测方法现状及发展趋势[J].食品安全质量检测学报,2016,7(1):244-250.
- [2] 张燕燕,蔡静平,蒋澎.储粮微生物危害检测技术研究进展[J].食品与机械,2013,29(6):267-270.
- [3] 彭志兵,章焯,蒋建云.液液萃取-高效液相色谱法测定粮食中黄曲霉毒素的研究[J].粮食科技与经济,2013,38(1):26-29.
- [4] C Soderstrom, H Boren, C Krantz - Rulcker. Use of an electronic tongue and HPLC with electrochemical detection to differentiate molds in culture media[J].International Journal of Food Microbiology,2005,97:247-257.
- [5] Norbert Stoppacher, Bernhard Kluger, Susanne Zeilinger, et al. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS[J].Journal of Microbiological Methods,2010,81:187-193.
- [6] J Olsson, T Borjesson, T Lundstedt, et al. Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose[J].International Journal of Food Microbiology,2002,72:202-214.
- [7] 遇晓杰.食品中 5 种致病菌多重 PCR 快速检测技术的建立与应用[J].中国食品卫生杂志,2009,21(5):398-401.
- [8] 张臻,陆利霞,熊晓辉.食品中霉菌毒素检测技术研究新进展[J].安徽农业科学,2012,40(6):3597-3599.
- [9] 窦玉平.薄层层析法测定粮食中的黄曲霉毒素 B1[J].吉林农业,2011,(1):23.
- [10] 孙娟,李为喜,张妍,等.用超高效液相色谱串联质谱法同时测定谷物中 12 种真菌毒素[J].作物学报,2014,40(4):691-701.
- [11] 黄红英,尹齐和.傅里叶变换衰减全反射红外光谱法

(ATR-FTIR)的原理与应用进展[J].中山大学研究生学报,2011,32(1):20-31.

- [12] 王若男,岳田利,袁亚宏,等.基于傅里叶变换近红外光谱的脂环酸芽孢杆菌种间分类鉴定[J].光谱学与光谱分析,2015,35(11):3073-3077.
- [13] 柴阿丽,李金萍,石延霞,等.基于傅里叶变换红外光谱和聚类分析的真菌鉴别[J].光谱学与光谱分析,2010,30(1):2941-2944.
- [14] L.Mariey, J P.Signolle, C Amiel, et al. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics[J].Vibrational Spectroscopy, 2001,26:151-159.
- [15] Volha Shapaval, Trond Moretro, Henri-Pierre Suso, et al. A high-throughput microcultivation protocol for FTIR spectroscopic characterization and identification of fungi[J].Journal of Biophotonics,2010,3(8-9):512-521.
- [16] A Lecellier, V Gaydou, J Mounier, et al. Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds[J].Food Microbiology,2015,45:126-134.
- [17] A Salman, I Lapidot, A Pomerantz, et al. Detection of *Fusarium oxysporum* Fungal Isolates Using ATR Spectroscopy[J]. Spectroscopy,2012,27:551-556.
- [18] Hande Kaya - Celiker, P Kumar Mallikarjunan, David Schmale III, et al. Discrimination of moldy peanuts with reference to aflatoxin using FTIR-ATR system[J].Food Control,2014,44:64-71.
- [19] Vitaly Erukhimovitch, Valentina Pavlov, Marina Talyshinsky, et al. FTIR microscopy as a method for identification of bacterial and fungal infections[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,2005,37:1105-1108.
- [20] 聂明,罗江兰,包衍,等.镰刀菌的傅里叶变换红外光谱鉴别[J].光谱学与光谱分析,2007,27(8):1519-1522.
- [21] A Salman, L Tsrer, A Pomerantz, et al. FTIR spectroscopy for detection and identification of fungal phytopathogenes[J]. Spectroscopy,2010,27(3-4):261-267.
- [22] A Lecellier, J Mounier, V Gaydou, et al. Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia[J].International Journal of Food Microbiology,2014,168-169:32-41.

(上接第 297 页)

grid2008/dbpub/detail.aspx? dbname = SCPD2014&filename = CN103435720A.

- [8] 张成明,姜立,李十中.酸水解对 DNS 法测定甜高粱中总糖的影响分析[J].农业机械学报,2014,45(9):199-203.
- [9] 张有林,张润光,王鑫腾.甘薯采后生理、主要病害及贮藏技术研究[J].中国农业科学,2014,47(3):553-563.
- [10] 陆慧玲,胡飞.酶法提取菊糖工艺的研究[J].食品工业科技,2006,(10):158-160.
- [11] 王文岭,黄雪松. DNS 法测定木糖含量时最佳测定波长的选择[J].食品科学,2006,27(4):196-198.
- [12] 朱海霞,石瑛,张庆娜,等.3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法测定马铃薯还原糖含量的研究[J].中国马铃薯,2005,19(5):266-269.

[13] 李环,陆佳平,王登进. DNS 法测定山楂片中还原糖含量的研究[J].食品工业科技,2013,34(18):75-77.

- [14] 刘忠义,汤海青,欧昌荣,等.3,5-二硝基水杨酸法测定葡萄酒中总糖含量的条件优化[J].核农学报,2013,27(11):1717-1723.
- [15] 邛楠,何聪芬,董银卯,等.改进 DNS 比色法测定 N-AcGA 含量的研究[J].食品工业,2011,(2):92-95.
- [16] 巩莉,华颖,刘大群,等.3,5-二硝基水杨酸法测定番茄废渣中糖分含量的研究[J].保鲜与加工,2014,14(3):37-42.
- [18] 姚嘉旻,姜岷,陈可泉,等.改进 DNS 法测定玉米皮水解液中总糖含量[J].食品科技,2007,(11):165-168.
- [19] 赵凯,许鹏举,谷广焯.3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J].食品科学,2008,29(8):534-536.