

电子鼻监测百药煎的固态发酵

李雪春¹ 韩小敏² 禹玉洪² 向晓玲² 戴荣继² 孟薇薇² 邓玉林²

(¹解放军防化指挥工程学院, 北京 102206; ²北京理工大学生命学院, 北京 100081)

摘要: 发酵监控是控制药材质量的一个重要手段。随发酵时间延长, 一系列复杂生物转化反应逐步发生并产生多种有效成分, 因此选择合适的时间终止发酵对控制药材质量具有重要意义。本文主要利用电子鼻系统动态采集百药煎发酵过程中产生的气体信息并转化成传感器的信号响应值, 再经 PCA 和 LDA 等模式识别方法对采集数据进行处理, 分析表明电子鼻能够区分不同发酵时间的百药煎样品, 并将最佳的发酵时间定为 72h。

关键词: 百药煎; 发酵; 电子鼻; 监控

固态发酵是中药发酵技术中一种常用的方法, 其传统的监控方法主要包括以下三种: (1) 物理法, 它主要以发酵过程的温度变化、热量变化、二氧化碳变化、湿度变化等作为检测指标; (2) 化学方法, 它主要通过指示剂检测或高效液相定量分析目标性成分的含量变化为手段; (3) 微生物法, 它主要通过观察发酵过程中微生物的菌丝生长速度、微生物数量的增减来监控发酵的过程。

研究表明, 上述方法一般都存在样品处理繁琐、获取信息量少、不能正确反应发酵过程中气体成分的变化等缺点。近年来, 随着人们对检测精确度及安全性要求的逐步提高, 电子鼻无损检测技术在食品、医药领域得到了广泛的探索与应用。例如, S.K.Lee^[1]等利用电子鼻技术通过检测红参中芳香性化合物区分红参的质量; Nabarum Bhattacharya^[2]等利用电子鼻技术在线监控黑茶发酵过程中化学成分的变化, 确定了黑茶发酵的最佳时间, 为工业生产提供了理论依据; 王俊教授还将电子鼻技术用于西红柿的储藏^[3]、雪梨的合适储藏时间^[4]、柑橘成熟度^[5]、番茄硬度^[6]等的研究上, 取得了可喜的成果。

百药煎是一种传统发酵炮制中药, 主要由五倍子、茶叶与酒曲混合发酵而成的表面布满“白霜”的块状物, 始载于《丹溪心法》中, 在历代医药著作中均有记载, 具有清热化痰、生津止咳的功效^[7]。本实验主要利用电子鼻评价不同发酵时间的百药煎样品及在线监测发酵过程中气体成分的变化, 以进一步探索发酵时间与电子鼻信号响应间的关系, 为百药煎的质量监控提供一条新的技术途径。

1 材料与方法

1.1 仪器、材料与试剂

电子鼻, 德国 AIRSENSE 公司的 PEN3 便携式电子鼻; 五倍子购于安徽亳州中药饮片厂, 批号为 080218, 经鉴定为漆树科植物盐肤木 *Rhus chinensis* Mill. 等树上寄生倍蚜科昆虫角倍蚜或倍蛋蚜后形成的虫瘿, 符合《中国药典》2005 年版一部“五倍子”项下的各项规定; 茶叶为绿茶, 产于安徽亳州, 购于中国农业科学院茶叶专业市场; 酿酒曲, 批号: 20080417, 湖北宜昌安琪有限公司; 没食子酸对照品, 批号: 110831-200302, 经面积归一化法测定其纯度 >98%, 购于中国药品生物制品检定所。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵方法

取 ⁶⁰Co- γ 射线辐射灭菌后的五倍子、茶叶和酿酒曲加入无菌水 10ml 混匀, 置于恒温培养箱中培养, 制成小方块状, 保持温度控制在 (30±2) °C, 相对湿度为 (85±5) %, 开始发酵, 分别于发酵

开始后的 0h、12h、24h、36h、48h、60h、72h、84h 取样（以上操作均在超净工作台中进行）。

1.2.2 电子鼻检测方法

将不同发酵时间的百药煎样品连同培养皿放置于 500ml 烧杯中，并用处理后的封口膜封口，采用预实验结果静止 10min 使烧杯中的气体达到顶空平衡，再用电子鼻监测。首先用针头将挥发性气体吸到电子鼻的传感器通道，然后对清洗时间、检测时间等参数进行设定；多次预实验结果表明，电子鼻的传感器的信号响应值从 40S 左右开始趋于稳定，为保证检测数据的稳定性和准确度，本次试验中，均取 50s 处的检测信号，流速 60ml/min，稀释比例为 1:4，清洗时间 60s，每隔 12h 取样检测。

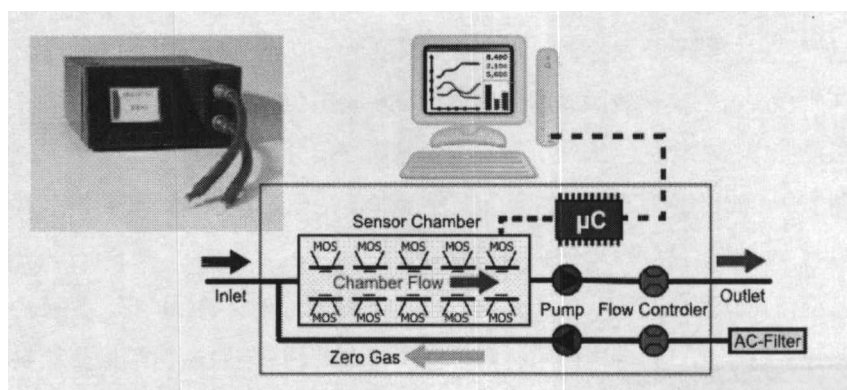


图 1.1 电子鼻的检测简易装置图

1.2.3 电子鼻信号数据处理方法

提取实验中每次采样所取的 10 个传感器的 50s 处的信号响应值，然后采取主成分分析法（PCA）和线性判别法（LDA）作为主要分析方法。PCA 是对多维数据常见降维处理方法，将原来相关性较强的多个指标化为较少的几个综合指标，降维后的综合指标之间互不相关，却能反映原来多指标的信息。PCA 方法得到的特征是最佳描述特征而不是最佳分类特征。LDA 对已经进行明确的数据类别，是一种常规的模式识别和样品分类方法，注重类别的分类以及各种组之间的距离分析。

2 结果与讨论

2.1 不同发酵时间获得的百药煎发酵品表现图

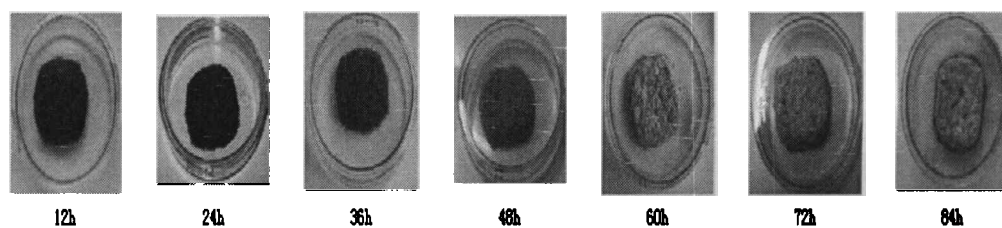


图 2.1 不同发酵时间的百药煎样品表现图

从图中可看出随发酵时间延长，安琪酿酒曲中的微生物逐渐在药料表面开始生长，24h 开始可见少量微生物附着在药料表面，48h 时已有一层薄白霜覆盖在药料表面，60h 白霜覆盖完全且较厚，72h 时白霜仍然在药料表面覆盖，84h 时白霜表面开始出现黑色孢子。

2.2 电子鼻在线检测发酵过程中气体成分

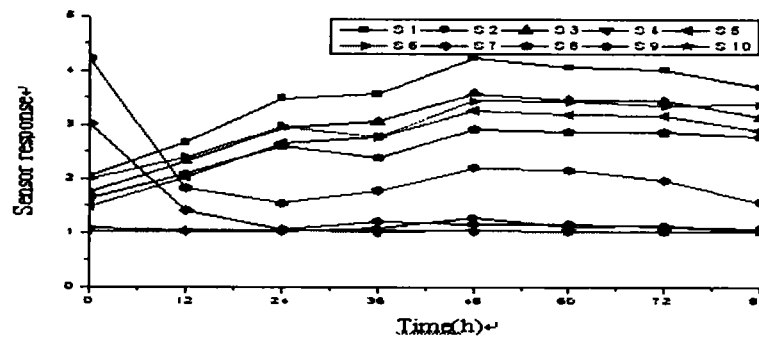


图2.2 电子鼻在线检测各传感器信号响应值图

对氨氧化物敏感的传感器 S2、对氢气敏感的传感器 S4、对传感器 S10 响应极低,说明发酵过程此类气体成分产生极少;对硫化物敏感的传感器 S7/S9 响应值开始较高,然后逐步降低,此结果可能是有于安琪酿酒曲中可供微生物繁殖所需的营养基质逐步分解所致;对芳香类成分敏感的传感器 S1/S3/S5、对乙醇敏感的传感器 S6/S8 响应值在前 48h 响应值一直增加,说明发酵过程中产生了此类气体成分,这与人的嗅觉感知获得的结果相吻合。

对传感器响应值总体变化趋势分析可知,在 0h-48h 内大部分传感器的信号响应值一直升高,表明微生物的代谢速率持续增加,并产生了种类丰富的代谢产物,在 48h 时响应值达到最大值,随后在 48h-72h 信号响应值处于平稳阶段,表明微生物的代谢活跃,达到最佳状态;72h 后传感器的信号响应值下降,表明微生物的分解转化能力逐步降低,为在 72h 结束发酵提供了理论依据,上述所获的最佳发酵时间与表观指标分析结果相同,重复验证了电子鼻检测百药煎发酵过程的可靠性。

2.3 PCA和LDA分析不同发酵时间的百药煎样品

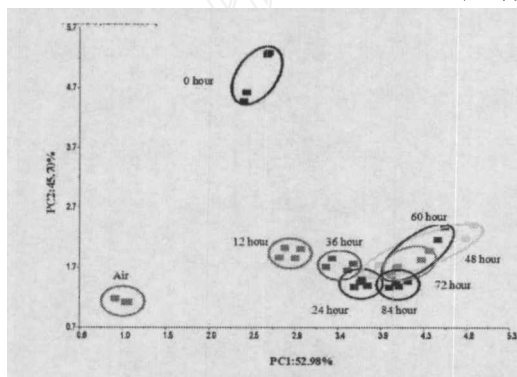


图2.3 不同发酵时间百药煎的PCA分析

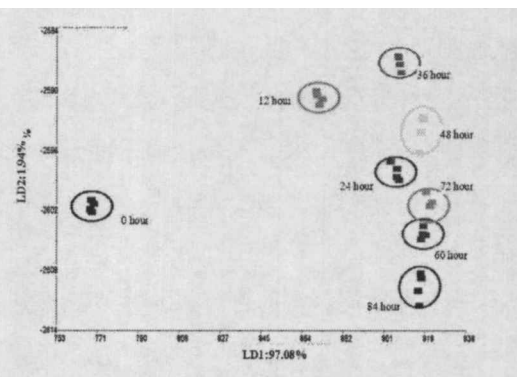


图2.4 不同发酵时间百药煎的LDA分析

表2.1 不同发酵时间百药煎的差异度分析

	0	12	24	36	48	60	72	84	空白
0		0.972	0.986	0.981	0.990	0.987	0.989	0.989	0.981
12	0.972		0.982	0.890	0.774	0.919	0.962	0.988	0.994
24	0.986	0.982		0.870	0.512	0.642	0.791	0.937	0.998
36	0.981	0.890	0.870		0.551	0.755	0.861	0.944	0.995
48	0.990	0.774	0.512	0.551		0.084	0.108	0.479	0.941
60	0.987	0.919	0.642	0.755	0.084		0.084	0.501	0.979
72	0.989	0.962	0.791	0.861	0.108	0.084		0.693	0.992
84	0.989	0.988	0.937	0.944	0.479	0.501	0.693		0.998
空白	0.981	0.994	0.998	0.995	0.941	0.979	0.992	0.998	

注:颜色之间的差异代表相似性大小,同种颜色表明各数据之间的差异小

PCA 两轴的贡献率分别为 45.70%和 52.98%，两者之和为 98.68%，大于 95%说明 PCA 可被用来分析百药煎的发酵过程。PCA 客观的表示多指标样本间的远近关系，由 PCA 分布图中可看出，空气、0h 的气体特征与其他时间的发酵气味截然分开，其余时刻的比较类似，参考 Discrimination power 分析结果，可看出 0h、12h、24h、36h、48h 之间显著性差异都大于 0.5，相互比较好区分，处于变化期；48h、60h、72h 相互间的显著性差异都小于 0.1，说明此阶段发酵产生代谢产物的成分比较相似，发酵处于平稳时期。

LDA 主要为了建立不同样本分类间的差异，图 2.4 可看出，不同发酵时间的百药煎发酵品的气味特征相互之间很少发生重叠，能被较好的区分，且同一个发酵时间样品的气体特征比较集中。

3 结论

经上述分析表明电子鼻可用来监控百药煎发酵的发酵过程，并能很好的区分不同发酵时间的百药煎样品，避免了使用各种有机溶剂造成的环境污染、人体感官的主管因素及其他人为因素造成的误差，提高了检测的精确度，确保百药煎的质量，且电子鼻采集的数据是药品发酵过程中的整体“指纹”图谱信息，能提供样品的隐含性质，具有可操作性，实现了百药煎发酵的高效、快速、在线、无损检测。

参考文献：

- [1] J.H.Kim, et al. Changes in aroma characteristics during the preparation of red ginseng estimated by electronic nose, sensory evaluation and gas chromatography/mass spectrometry[J]. Sensors and Actuators B, 2005, 106:7-12.
- [2] Nabarum Bhattacharya, Bipan Tudu, et al. Preemptive identification of optimum fermentation time for black tea using electronic nose[J]. Sensors and Actuators B, 2008, 131:110-116.
- [3] Antihus Hernandez Gomez, Jun Wang, Guixian Hu, Annia Garcia Pereira. Monitoring storage shelf life of tomato using electronic nose technique [J]. Journal of Food Engineering, 2008, 85:625-631.
- [4] Hongmei Zhang, Jun Wang, Sheng Ye. Predictions of acidity, soluble solids and firmness of pear using electronic nose technique[J]. Journal of Food Engineering, 2008, 86:370-378.
- [5] 胡桂仙, Antihus Hernández Gómez, 王俊. 电子鼻无损检测柑橘成熟度的实验研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(8):57-61.
- [6] 周亦斌, 王俊. 番茄硬度的电子鼻评价与预测的研究[J]. 园艺学报, 2005, 32:1020-1024.
- [7] 江苏新医学院编, 中药大辞典(上册)[Z]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001:391

百药煎发酵过程中关键菌株的确定

韩小敏^{1,2} 禹玉洪^{2*} 向晓玲² 张建丽² 戴荣继² 邓玉林²

(1 北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050, 2 北京理工大学生命学院, 北京 100081)

摘要: 本论文以从安琪酿酒曲中自行分离的三株菌为研究对象, 在相同条件下分别单独进行发酵, 并对其降解效果通过微生物在药材表面的生长情况和高效液相色谱进行评价分析, 最终确定黑曲霉是百药煎发酵过程中的关键菌株。

关键词: 百药煎; 发酵; 关键菌株; 黑曲霉