

# 基于气相色谱-离子迁移谱法分析青霉 侵染木耳菌丝的挥发性化合物

王媛媛<sup>1,2,3,4</sup>, 贺文文<sup>1,2,3,4</sup>, 冯克伟<sup>1,2,3,4</sup>, 王媛<sup>1,2,3,4\*</sup>, 岳田利<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 西北大学食品科学与工程学院, 西安 710069; 2. 陕西省营养健康食品个性制造工程实验室, 西安 710069;  
3. 陕西省食品安全风险识别控制技术研究中心, 西安 710069; 4. 陕西省食品安全与  
营养健康创新转化平台, 西安 710069)

**摘要:** **目的** 分析青霉侵染木耳菌丝的挥发性化合物, 发掘潜在的特征标志物。**方法** 以分离自木耳菌包的桔青霉、歧皱青霉及黑木耳菌丝为研究对象, 采用气相色谱-离子迁移谱法(gas chromatography-ion mobility spectrometry, GC-IMS)分析青霉侵染木耳菌丝不同时期挥发性化合物的种类及变化趋势, 并利用主成分分析(principal component analysis, PCA)比较不同侵染阶段挥发性化合物间的差异。**结果** 指纹图谱及 PCA 分析均可以比较明显地区分青霉侵染木耳菌丝的不同阶段。挥发性化合物主要在桔青霉和歧皱青霉侵染木耳菌丝后的第 4~8 d 产生, 整体变化趋势基本一致, 共鉴定出 41 种化合物, 包括酯类、醇类、酮类、醛类及其他类。1-戊醇、乙酸己酯、2,3-戊二酮、2-丁酮、2,3-丁二酮、1-丙醇、2-己醇、乙酸乙酯、丁酸乙酯、2-甲基丁酸等挥发性化合物可作为青霉侵染木耳菌丝的潜在标志物, 其中, 1-戊醇、乙酸己酯可作为青霉早期污染木耳菌丝的潜在标志物。3-羟基-2-丁酮可作为桔青霉侵染木耳菌丝后的潜在特征标志物。**结论** 本研究利用 GC-IMS 分析获得了两种青霉污染木耳菌丝的潜在特征标志物, 为木耳栽培过程中青霉污染的早期预测提供了一定的理论基础。

**关键词:** 黑木耳; 桔青霉; 歧皱青霉; 气相色谱-离子迁移谱法; 挥发性化合物

## Analysis of volatile compounds in mycelia of *Auricularia auricula* infected by *Penicillium* sp. based on gas chromatography-ion mobility spectrometry

WANG Yuan-Yuan<sup>1,2,3,4</sup>, HE Wen-Wen<sup>1,2,3,4</sup>, FENG Ke-Wei<sup>1,2,3,4</sup>, WANG Yuan<sup>1,2,3,4\*</sup>, YUE Tian-Li<sup>1,2,3,4</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. Laboratory of Nutritional and Healthy Food-individuation Manufacturing Engineering, Xi'an 710069, China; 3. Research Center of Food Safety Risk Assessment and Control, Xi'an 710069, China; 4. Innovative Transformation Platform of Food Safety and Nutritional Health, Xi'an 710069, China)

**ABSTRACT: Objective** To analyze the volatile components of mycelia of *Auricularia auricula* infected by *Penicillium* sp., and explore the potential characteristic markers. **Methods** *Penicillium citrinum* and *Penicillium steckii* isolated from cultivation bag, and mycelia of *Auricularia auricula* were used as research objects. The gas

**基金项目:** 国家重点研发计划项目子课题(2019YFC1606702-04)、国家自然科学基金项目(31801653)、陕西省自然科学基金项目(2019JQ-722)

**Fund:** Supported by the Subproject of National Key Research and Development Program of China (2019YFC1606702-04), the National Natural Science Foundation of China (31801653), and the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2019JQ-722)

\*通信作者: 王媛, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品中真菌毒素及产毒菌的污染及检测控制技术研究。E-mail: wy2018@nwu.edu.cn

\*Corresponding author: WANG Yuan, Ph.D, Associate Professor, College of Food Science and Technology, Northwest University, No.229, Taibai Road, Beilin District, Xi'an 710069, China. E-mail: wy2018@nwu.edu.cn

chromatography-ion mobility spectrometry (GC-IMS) was adopted to analyze the types and trends of volatile components in fungus mycelia infected by *Penicillium* sp., and the differences in volatile compounds in different infection stages were further compared by principal component analysis (PCA). **Results** The fingerprint and PCA analysis could clearly distinguish the different stages of the fungus infection. The volatile components were mainly produced on the 4<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup> day after the infection of *Penicillium citrinum* and *Penicillium steckii*, and overall trend were similar between the 2 *Penicillium* sp. strains. A total of 41 volatile compounds were identified, mainly included esters, alcohols, ketones, aldehydes, and others, and the volatile components of 1-pentanol, hexyl acetate, 2,3-pentanedione, 2-butanone, 2,3-butanone, 1-propanol, 2-hexanol, ethyl acetate, ethyl butyrate, 2-methyl butyric acid could be regarded as potential markers of mycelia of *Auricularia auricula* infected by *Penicillium* sp.. Besides, 1-pentanol and hexyl acetate could be considered as potential markers for early contamination of *Auricularia auricular* mycelia infected by *Penicillium* sp.. Additionally, 3-hydroxy-2-butanone could be a potential marker of mycelia infected by *Penicillium citrinum*. **Conclusion** The characteristic potential markers of mycelia of *Auricularia auricula* infected by *Penicillium* sp. were obtained by GC-IMS, which provides some theoretical foundations for the early prediction of contamination by *Penicillium* sp. during the cultivation of *Auricularia auricula*.

**KEY WORDS:** *Auricularia auricula*; *Penicillium citrinum*; *Penicillium steckii*; gas chromatography-ion migration spectrometry; volatile components

## 0 引言

黑木耳(*Auricularia auricula*)是我国第二大食用菌<sup>[1]</sup>, 富含多糖、黑色素和酚类等生物活性成分<sup>[2]</sup>, 具有抗氧化<sup>[3]</sup>、降血糖<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>和免疫刺激<sup>[6]</sup>等健康益处, 在食品生产和药物开发方面有很大的价值。此外, 黑木耳产业成为近年来国家推进精准扶贫政策的重点产业, 这使得黑木耳产业迎来了前所未有的发展机遇<sup>[7]</sup>。但是木耳在栽培过程中易受到有害微生物侵染, 使其不能正常发育, 导致菌丝体和子实体出现异常状态或死亡, 造成严重的经济损失<sup>[8]</sup>。真菌是木耳栽培生产中发生和危害最普遍的一类病原菌<sup>[9]</sup>, 真菌病害种类繁多且在木耳的任何生长阶段都有可能发生, 主要包括木霉、青霉、曲霉、脉孢菌、镰刀菌等<sup>[10]</sup>。霉菌在繁殖过程中不仅具有很强的竞争能力, 同时也可寄生于食用菌菌丝上, 产生有毒物质, 抑制食用菌菌丝生长的同时也对消费者造成了潜在的健康危害<sup>[11]</sup>。因此, 能够在早期准确、快速地识别霉菌污染对木耳栽培十分重要。

近年来, 越来越多的方法用于霉菌早期污染检测, 农产品在被霉菌侵染后, 伴随着微生物的生长, 繁殖和代谢, 会产生特异的挥发性化合物, 利用挥发性化合物的差异进行早期污染预测正成为防治微生物危害的新型有效手段<sup>[12]</sup>。气相色谱-离子迁移谱法(gas chromatography-ion mobility spectrometry, GC-IMS)是一种新兴技术, 可实现对样品挥发性化合物的快速检测, 且装置简单便携、灵敏度高<sup>[13]</sup>。基于 GC-IMS 的快速、无损检测已实现了对坚果<sup>[14-16]</sup>、玉米<sup>[17]</sup>、花生<sup>[18-19]</sup>等多种农产品的微生物污染的早期鉴别。WANG 等<sup>[20]</sup>利用 GC-IMS, 以乙酸乙酯-D、3-甲基-2-丁醇和环己酮作为核桃中黄曲霉污染潜在的特征

标志物。JIA 等<sup>[21]</sup>将 3 种优势菌接种至冷藏鲟鱼, 在 4℃下保存 14 d, 采用 GC-IMS 测定肌肉中的挥发性化合物, 结果显示, 正丙醇、丁酮、2-己酮等可作为腐败标志物对其新鲜度和腐烂度进行鉴定。

本研究以前期从木耳菌包中分离出的桔青霉(*Penicillium citrinum*)和歧皱青霉(*Penicillium steckii*)为目标菌株, 采用 GC-IMS, 结合主成分分析(principal component analysis, PCA)研究两株青霉侵染木耳菌丝后不同时期的挥发性化合物变化情况, 发掘潜在的特征标志物, 为木耳栽培过程中青霉污染的早期预测提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黑木耳菌种为黑威-29, 购自陕西柞水; 桔青霉和歧皱青霉分离自污染的木耳菌包, 所有菌种于 4℃保存。其中, 桔青霉在 25℃ 条件下, 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基上培养 12 d, 可以代谢产生 115.76 mg/L 的桔霉素, 是木耳潜在的质量安全危害因子。

正酮(2-丁酮、2-戊酮、2-己酮、2-庚酮、2-辛酮和 2-壬酮, 分析纯, 上海阿拉丁试剂有限公司)。

木耳菌种培养基: 马铃薯 200 g、麦麸 30 g、葡萄糖 20 g、蛋白胨 3 g、磷酸二氢钾 2 g、硫酸镁 1 g、维生素 B 10 mg、琼脂 20 g, 纯水定容至 1000 mL, 121℃ 灭菌 20 min。

### 1.2 仪器与设备

FlavourSpec GC-IMS 联用仪(德国 G.A.S 公司); MJX-160B-Z 恒温培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); FS-SE-54-CB-1 毛细管柱(15 m×0.53 mm, 1.0 μm, 美

国 Restek 公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 样品制备

##### (1)青霉孢子悬液的制备

将桔青霉和歧皱青霉分别接种于 PDA 培养基, 在 28℃条件下培养 5 d。随后用无菌生理盐水将青霉孢子洗下并过滤, 孢子悬浮液的最终浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL。

##### (2)木耳菌饼的制备

将黑木耳菌株在木耳菌种培养基上平板上活化培养 6~7 d 后, 用无菌的直径为 3.0 mm 的打孔器打取菌饼备用。

##### (3)青霉及木耳菌丝的接种与培养

接种方式如图 1 所示, 在 20 mL 的顶空瓶中加入 1 mL 的 PDA 培养基, 121℃灭菌 20 min, 制成斜面, 培养基上方接入一个木耳菌饼, 下方接入 1  $\mu$ L 青霉孢子悬浮液, 以空白培养基和仅接种木耳菌饼或青霉孢子悬浮液的样品作为对照, 每个处理设置 3 个生物学重复, 于 25℃条件下培养, 分别在第 0、2、4、6、8 d 进行取样检测。

#### 1.3.2 GC-IMS 检测

##### (1)顶空进样条件

顶空孵育温度 60℃; 孵育时间 5 min; 孵化转速为 150 r/min; 进样针温度为 80℃, 不分流模式; 进样体积为 500  $\mu$ L。每组样品测 3 次平行。载气为高纯度  $N_2$ (纯度  $\geq 99.999\%$ ); 清洗时间 0.5 min。

##### (2)气相色谱条件

色谱柱: FS-SE-54-CB-1 毛细管柱(15 m $\times$ 0.53 mm, 1.0  $\mu$ m); 柱温 60℃, 总运行时间为 20 min。流速: 初始 2 mL/min, 保持 2 min 后, 在 8 min 内线性增加至 80 mL/min, 在最后 10 min 内线性增加至 150 mL/min。漂移管温度 40℃; 漂移气为  $N_2$ (纯度  $\geq 99.999\%$ ), 流速 150 mL/min。管内线性电压(电场强度)400 V/cm; 放射源为  $\beta$  射线(氚,  $^3H$ ); 正离子模式。

### 1.4 数据分析

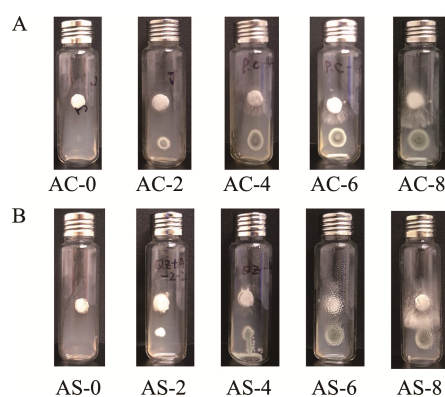
采用设备自带的 LAV 分析软件及 Library Search 定性软件对样品中的挥发性化合物进行采集和鉴定, 运用 LAV 中插件 Gallery Plot 进行 GC-IMS 指纹图谱的对比, 通过插件 Dynamic 进行样品 PCA 分析。通过比较保留时间和迁移时间, 计算每种化合物的保留指数, 通过 GC-IMS 库进行匹配从而对化合物进行定性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 挥发性化合物的 GC-IMS 分析

青霉及木耳菌丝在生长过程中会消耗营养物质, 产生各种挥发性化合物, 具体生长情况如图 1 所示, 在第 2 d 已可以观察到木耳和青霉的生长, 生长到第 8 d 时可以观察到两种菌接触到一起。通过 GC-IMS 对青霉感染木耳菌丝后不同时期的挥发性化合物变化情况进行检测, 并利用

差异对比模式, 以更加明显地比较不同阶段挥发性化合物的变化, 结果如图 2 所示, 每个样品中的总化合物由整个光谱显示, 左侧红色竖线为反应离子峰(reaction ion peak, RIP), 两侧的每一个点表示一种挥发性化合物, 白色表示浓度较低, 红色表示浓度较高。以第 0 d 的谱图为背景, 其他感染阶段的谱图扣除该背景, 白色表示样品中化合物浓度与参比相同, 蓝色表示样品中化合物的浓度低于参比样品, 红色表示样品中化合物的浓度高于参比样品。对比分析后可得出, 第 2~8 d 样品中挥发性化合物的种类更多、浓度更高。由此可见, 青霉感染木耳菌丝不同阶段的挥发性化合物存在较大差异, 有必要进一步对差异化合物进行有效区分和鉴定, 以期筛选出潜在的特征标志物。



注: AC: 木耳与桔青霉共同培养; AS: 木耳与歧皱青霉共同培养; 字母后面所接数字表示培养时间, 下同。

图 1 桔青霉(A)和歧皱青霉(B)感染木耳菌丝不同阶段样品生长情况

Fig.1 Sample growth conditions of *Auricularia auricula* mycelia infected by *P. citrinum* (A) and *P. steckii* (B) at different periods

### 2.2 挥发性化合物的鉴定

通过比较化合物与真实参考化合物的 GC 保留时间和 IMS 漂移时间, 利用正酮 C4~C8 作为外标, 得出每种挥发性化合物的保留指数, 通过与 GC-IMS 库(NIST 2014 数据库、IMS 数据库)的匹配对挥发性化合物进行定性分析。结果表明, 从两株青霉感染木耳菌丝过程中共检出 76 种化合物, 从数据库中匹配到 41 种挥发性化合物单体及部分物质的二聚体, 包括酯类 13 种、醇类 8 种、醛类 8 种、酮类 7 种和其他物质 5 种, 挥发性化合物信息见表 1。

### 2.3 挥发性化合物的 GC-IMS 指纹图谱分析

为了方便直观地对比青霉感染木耳菌丝不同时期挥发性化合物的差异, 利用 LAV 软件的 Gallery Plot 插件, 选取谱图中所有的待分析峰, 自动生成指纹图谱, 图 3 和图 4 分别为桔青霉和歧皱青霉感染木耳菌丝(第 0、2、4、6、8 d)样品中挥发性化合物的变化情况。图中每一行表示一个样品中选取的全部挥发性化合物信息, 每一列表示相同挥发性化合物在不同样品中的存在情况。

表 1 青霉侵染木耳菌丝的样品中挥发性化合物信息  
Table 1 Information of volatile components in *Auricularia auricula* mycelia infected by *Penicillium* sp.

| 序号 | 挥发性化合物         | CAS#       | 分子式                                              | 保留指数   | 保留时间/s   | 迁移时间/ms |
|----|----------------|------------|--------------------------------------------------|--------|----------|---------|
| 酯类 |                |            |                                                  |        |          |         |
| 1  | 醋酸甲酯(单体)       | 79-20-9    | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>     | 534.1  | 220.930  | 1.1935  |
| 2  | 乙酸乙酯(二聚体)      | 141-78-6   | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>     | 612.8  | 248.833  | 1.3360  |
| 3  | 丙酸乙酯(单体)       | 105-37-3   | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>    | 685.0  | 282.339  | 1.1443  |
| 4  | 丙酸乙酯(二聚体)      | 105-37-3   | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>    | 709.7  | 299.467  | 1.4510  |
| 5  | 丁酸甲酯(单体)       | 623-42-7   | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>    | 710.0  | 299.761  | 1.1487  |
| 6  | 醋酸丙酯(单体)       | 109-60-4   | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>    | 728.8  | 315.315  | 1.1662  |
| 7  | 异丁酸乙酯(二聚体)     | 97-62-1    | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>    | 755.4  | 340.671  | 1.5611  |
| 8  | 异丁酸乙酯(单体)      | 97-62-1    | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>    | 754.3  | 340.419  | 1.1946  |
| 9  | 丁酸乙酯(二聚体)      | 105-54-4   | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>    | 836.1  | 433.875  | 1.5656  |
| 10 | 丁酸乙酯(单体)       | 105-54-4   | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>    | 836.1  | 433.855  | 1.2071  |
| 11 | 沙林(单体)         | 107-44-8   | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> FO <sub>2</sub> P | 826.0  | 420.692  | 1.4698  |
| 12 | 乙酸己酯(单体)       | 142-92-7   | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>    | 991.2  | 738.736  | 1.4137  |
| 13 | 丁酸己酯(单体)       | 2639-63-6  | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>   | 1147.5 | 1119.819 | 1.4809  |
| 醇类 |                |            |                                                  |        |          |         |
| 14 | 异丙醇(二聚体)       | 67-63-0    | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O                  | 518.6  | 215.446  | 1.1716  |
| 15 | 异丙醇(单体)        | 67-63-0    | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O                  | 523.1  | 217.053  | 1.0864  |
| 16 | 1-丙醇(单体)       | 71-23-8    | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O                  | 553.0  | 227.591  | 1.2500  |
| 17 | 异丁醇(单体)        | 78-83-1    | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O                 | 619.9  | 251.444  | 1.3587  |
| 18 | 1-戊醇(单体)       | 71-41-0    | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O                 | 754.8  | 340.009  | 1.5118  |
| 19 | 正己醇(单体)        | 111-27-3   | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O                 | 839.2  | 433.440  | 1.3240  |
| 20 | 2-己醇(单体)       | 626-93-7   | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O                 | 777.5  | 364.056  | 1.2773  |
| 21 | 1-辛烯-3-醇(单体)   | 3391-86-4  | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O                 | 985.3  | 724.310  | 1.6049  |
| 酮类 |                |            |                                                  |        |          |         |
| 22 | 丙酮(单体)         | 67-64-1    | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O                  | 516.1  | 214.580  | 1.1158  |
| 23 | 2-丁酮(二聚体)      | 78-93-3    | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O                  | 585.9  | 239.215  | 1.2464  |
| 24 | 2-丁酮(单体)       | 78-93-3    | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O                  | 586.8  | 239.548  | 1.0583  |
| 25 | 2,3-丁二酮(单体)    | 431-03-8   | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>     | 586.5  | 239.445  | 1.1667  |
| 26 | 3-羟基-2-丁酮(二聚体) | 513-86-0   | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>     | 688.8  | 284.657  | 1.3335  |
| 27 | 环己酮(单体)        | 108-94-1   | C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O                 | 892.4  | 520.617  | 1.1535  |
| 28 | 2,3-戊二酮(单体)    | 600-14-6   | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>     | 685.7  | 282.751  | 1.2239  |
| 醛类 |                |            |                                                  |        |          |         |
| 29 | 异丁醛(单体)        | 78-84-2    | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O                  | 554.6  | 228.165  | 1.1065  |
| 30 | 正戊醛(单体)        | 110-62-3   | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O                 | 692.9  | 287.428  | 1.1854  |
| 31 | 2-甲基丁醛(单体)     | 96-17-3    | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O                 | 661.9  | 269.504  | 1.1582  |
| 32 | 2-甲基丁醛(二聚体)    | 96-17-3    | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O                 | 661.6  | 269.338  | 1.3982  |
| 33 | 异戊醛(单体)        | 590-86-3   | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O                 | 651.4  | 264.456  | 1.1704  |
| 34 | 异戊醛(二聚体)       | 590-86-3   | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O                 | 650.1  | 263.852  | 1.4065  |
| 35 | 3-甲基丁醛(单体)     | 123-51-3   | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O                 | 731.7  | 317.951  | 1.2451  |
| 36 | 3-甲基丁醛(二聚体)    | 123-51-3   | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O                 | 730.8  | 317.127  | 1.4902  |
| 其他 |                |            |                                                  |        |          |         |
| 37 | 噻唑(二聚体)        | 288-47-1   | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NS                 | 685.0  | 282.299  | 1.2544  |
| 38 | 2,5-二甲基咪唑(二聚体) | 625-86-5   | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O                  | 694.4  | 288.415  | 1.3528  |
| 39 | 2-甲基丁酸(单体)     | 116-53-0   | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>    | 890.1  | 516.702  | 1.2099  |
| 40 | 2-乙基吡嗪(单体)     | 13925-00-3 | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>     | 895.6  | 526.632  | 1.1244  |
| 41 | 乙酸(二聚体)        | 64-19-7    | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>     | 591.8  | 241.312  | 1.1437  |

黄色框表示单独培养木耳菌丝的挥发性化合物变化情况, 可以观察到在第 0~6 d 并未产生较多挥发性化合物, 仅在第 8 d 检测到了 2-甲基丁醛(单体及二聚体)、3-甲基丁

醛(单体及二聚体)和异丁醇(单体) 3 种物质, 其中 2-甲基丁醛和 3-甲基丁醛已经在金针菇、羊肚菌等多种食用菌<sup>[22]</sup>中检出过, 异丁醇在香菇、猴头菇等制成的发酵制品<sup>[23]</sup>中

被检测到, 是其主要的香味物质之一。绿色框表示单独培养青霉的挥发性化合物变化情况, 红色框表示青霉侵染木耳菌丝后的挥发性化合物变化情况。青霉在第 0~2 d 并未检测到较多挥发性化合物, CARLO 等<sup>[24]</sup>研究表明霉菌释放的挥发性化合物在 3~10 d 之间会达到最大值, 这与本研究的检测结果一致。区域 A 表示桔青霉侵染木耳菌丝第 4 d 的挥发性化合物, 共产生了 14 种新的物质, 从库中匹配到 7 种物质, 其中 2-甲基丁醛(单体及二聚体)、3-甲基丁醛(单体及二聚体)、异丁醇(单体)在单独培养 8 d 后的木耳菌丝中也被检测到, 1-戊醇(单体)和乙酸己酯(单体)为桔青霉侵染后产生的挥发性化合物, 可作为青霉早期污染木耳菌丝潜在的特征标志物。GU 等<sup>[15]</sup>利用 GC-IMS 和电子鼻检测发现 1-戊醇可作为曲霉污染大米的早期标志物。张亚琳等<sup>[25]</sup>研究发现在青霉等多种微生物强化作用下, 香肠中乙酸己酯等物质显著高于对照组, 本研究中桔青霉侵染木耳后, 乙酸己酯的含量也明显提高, 说明外界刺激可能促进了乙酸己酯的产生。区域 B 为桔青霉侵染木耳菌丝第 6 d 的挥发性化合物, 有 3 种新的挥发性化合物产生但未从库中匹配到具体物质; 区域 C 为桔青霉侵染木耳菌丝第 8 d 的挥发性化合物, 这时青霉与木耳菌丝接触到一起, 有较多物质被检测到, 可以从库中匹配到的有 23 种, 其中包含酯类 6 种: 丁酸甲酯(单体)、丁酸乙酯(单体及二聚体)、丙酸乙酯(单体)、异丁酸乙酯(单体)、乙酸乙酯(二聚体); 醛类 5 种: 异戊醛(单体及二聚体)、异丁醛(单体)、2-甲基丁醛(单体及二聚体); 酮类 4 种: 2,3-戊二酮(单体)、2-丁酮(二聚体)、2,3-丁二酮(单体)、3-羟基-2-丁酮(二聚体); 醇类 4 种: 1-丙醇(单体)、异丙醇(单体)、2-己醇(单体)、正己醇(单体); 其他物质 4 种: 2-甲基丁酸(单体)、噻唑(二聚体)、2,5-二甲基呋喃(二聚体)。

从图 3~4 可以看出, 虽然接种的青霉种类不同, 但挥发性化合物的种类和浓度的变化趋势基本一致。歧皱青霉侵染木耳菌丝后第 4 d 产生的挥发性化合物与桔青霉基本相似, 如区域 D 所示, 但部分物质(异戊醛、异丁醛、异丙醇和 2-甲基丁醛)含量更高, 可能是由于歧皱青霉单独培养 4 d 后也会代谢产生这 4 种物质, 且浓度较高; 歧皱青霉侵染木耳菌丝后第 6 d 并未检测到新的挥发性化合物, 如区域 E 所示, 部分物质如乙酸己酯等的含量较第 4 d 含量降低; 区域 F 为第 8 d 的挥发性化合物产生情况, 主要有 2,3-戊二酮(单体)、2-丁酮(二聚体)、2,3-丁二酮(单体)、1-丙醇(单体)、2-己醇(单体)、乙酸乙酯(二聚体)、丁酸乙酯(单体)、2-甲基丁酸(单体)。这些物质在桔青霉侵染木耳菌丝的样品中也可以检测到, 因此, 这些物质可作为青霉中后期污染木耳菌丝潜在的特征标志物。其中 2,3-丁二酮、2-丁酮、乙酸乙酯、丁酸乙酯及仅在桔青霉侵染木耳菌丝后第 8 d 检测到的丙酸乙酯都可作为大米<sup>[15]</sup>、玉米<sup>[17]</sup>和花生<sup>[19]</sup>等农产品早期真菌污染的特定分子标志物。

通过分析还进一步发现, 由于青霉与木耳菌丝在第 8 d

开始接触, 相互作用促使部分疑似抑菌物质的产生, 歧皱青霉侵染木耳菌丝的样品中检测到了正己醇<sup>[26]</sup>, 桔青霉侵染木耳菌丝样品中检测到了正己醇和 3-羟基-2-丁酮, 且 3-羟基-2-丁酮仅在桔青霉侵染木耳菌丝的样品中检测到, 可作为桔青霉侵染木耳菌丝的潜在特征标志物。正己醇是一种常见的抑菌物质<sup>[27]</sup>, 0.1%浓度的正己醇能够完全抑制草莓上黑根霉、青霉属、灰葡萄孢和疫霉属 4 种病原真菌的生长<sup>[28]</sup>; 杨波等<sup>[29]</sup>发现鲍鱼菇菌丝体中提取得到微黄色的挥发油对霉菌、酵母菌和细菌均有一定的抑制作用, 利用气相色谱-质谱法分析证明正己醇在增强挥发油抑菌能力上有着较强的作用。3-羟基-2-丁酮也是一种主要的抑菌物质<sup>[30]</sup>, 有报道表明其既可以促进植物等的生长, 还可以诱导抑菌物质的产生<sup>[31]</sup>。

## 2.4 挥发性化合物的 PCA

为使差异进一步可视化, 通过仪器软件自带的 Dynamic 进行 PCA 处理, 可以更直观的判别青霉侵染木耳菌丝后不同时期挥发性化合物间的差异, 分析结果见图 5, 可以观察到桔青霉和歧皱青霉侵染木耳菌丝后挥发性化合物的变化趋势与指纹图谱中的趋势基本一致, 可以分为 3 个阶段: 阶段一为侵染的第 0~2 d, 挥发性化合物分离不明显, 样本间聚集度较高, 部分样本有轻微的区域重叠, 这可能是因为培养时间较短, 并未产生较多和挥发性化合物; 阶段二为侵染的第 4~6 d, 样品距离较近, 表明这两个侵染阶段的挥发性化合物差异较小; 阶段三为侵染的第 8 d, 样品与其他样品距离最远, 说明挥发性化合物存在较大差异。桔青霉侵染木耳菌丝后第一主成分 PC1 贡献率为 61%, 第二主成分 PC2 贡献率为 18%, 累计贡献率分别达到了 79%, 歧皱青霉侵染木耳菌丝后第一主成分 PC1 贡献率为 52%, 第二主成分贡献率为 21%, 第一、二主成分的累计贡献率分别达到了 73%。PCA 结果表明, GC-IMS 分析结果能够较好的区分青霉侵染木耳菌丝的不同阶段, 为更好的判断青霉污染及其不同污染阶段提供可能。

## 3 结 论

本研究采用 GC-IMS 分析桔青霉和歧皱青霉侵染木耳菌丝不同时期挥发性化合物的变化情况, 共鉴定出 41 种挥发性化合物, 通过指纹图谱进一步分析, 1-戊醇、乙酸己酯可作为青霉早期污染木耳菌丝潜在的特征标志物, 2,3-戊二酮、2-丁酮、2,3-丁二酮、1-丙醇、2-己醇、乙酸乙酯、丁酸乙酯、2-甲基丁酸可作为青霉中后期污染木耳菌丝潜在的特征标志物。同时, PCA 分析可将青霉的侵染过程分为 3 个主要阶段, 说明青霉侵染木耳菌丝不同时期的挥发性化合物存在较大差异, 此研究结果为木耳菌丝中青霉污染的早期监测预警提供了可能性, 也为后期研究青霉与木耳菌丝的互作机制奠定了一定理论和方法基础, 下一步将从未知挥发性化合物的定性以及青霉污染木耳子实体的早期预警开展进一步研究。



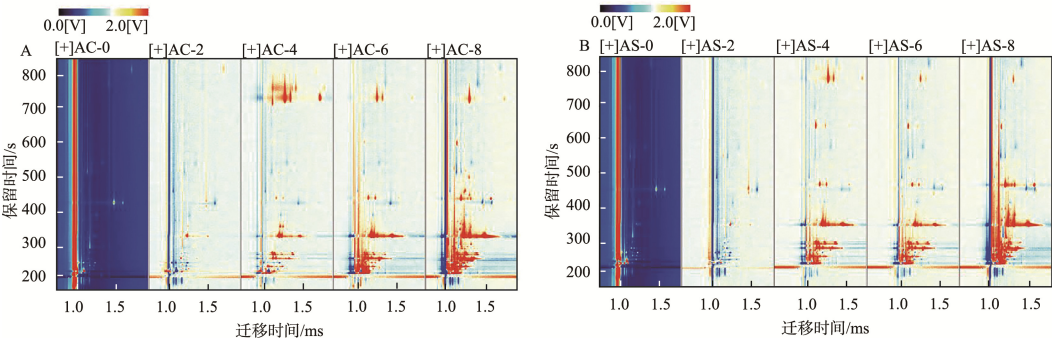
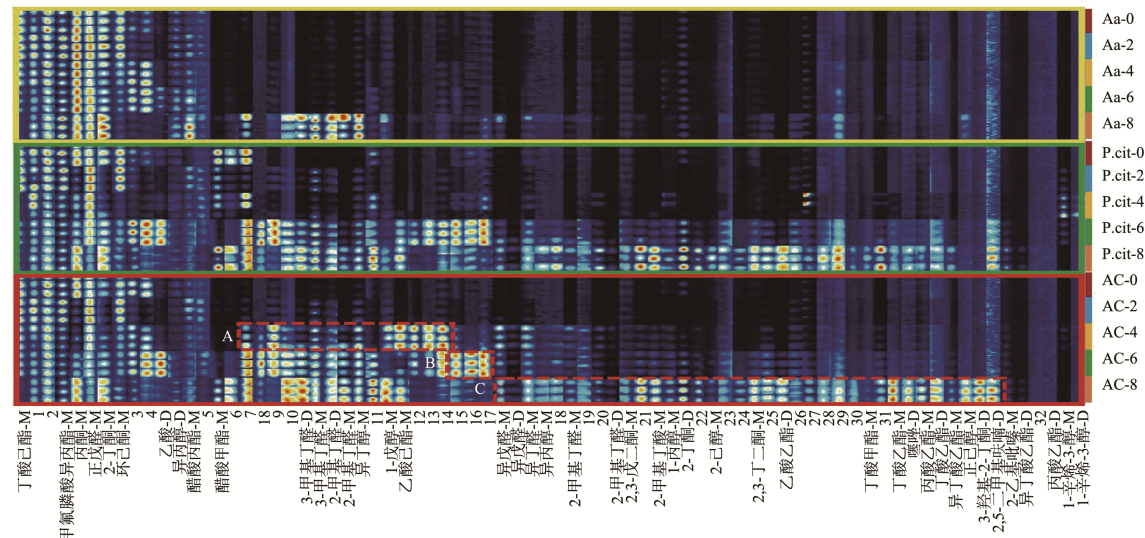


图 2 桔青霉(A)和歧皱青霉(B)感染木耳菌丝不同阶段挥发性化合物的 GC-IMS 二维差异图谱

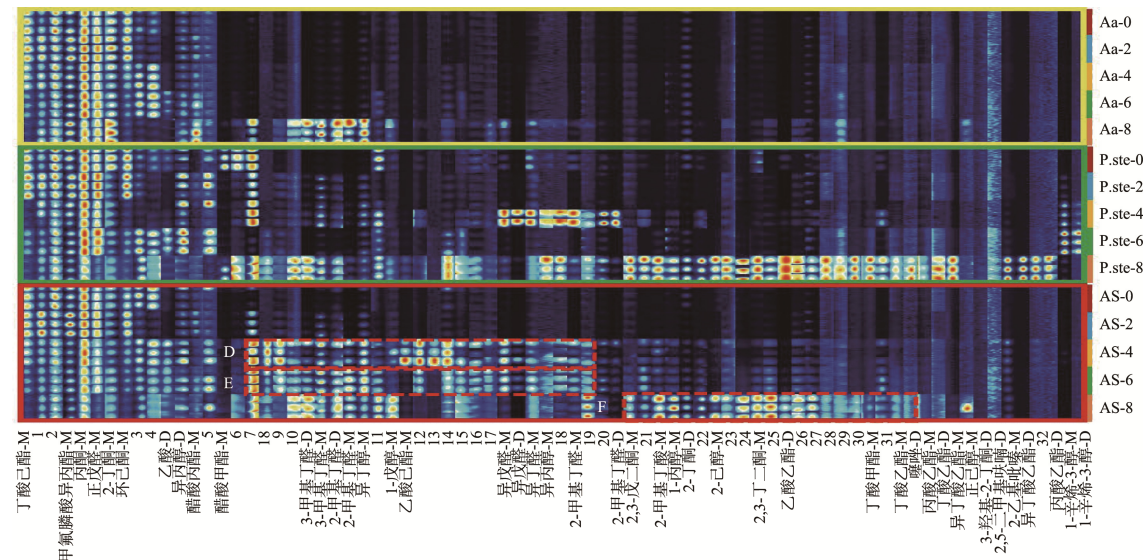
Fig.2 GC-IMS two-dimensional difference spectra of volatile compounds in *Auricularia auricula* mycelia infected by *P. citrinum* (A) and *P. steckii* (B) at different periods



注: Aa: 单独接种木耳; P.cit: 单独接种桔青霉, 下同。

图 3 桔青霉感染木耳菌丝样品中挥发性化合物指纹图谱

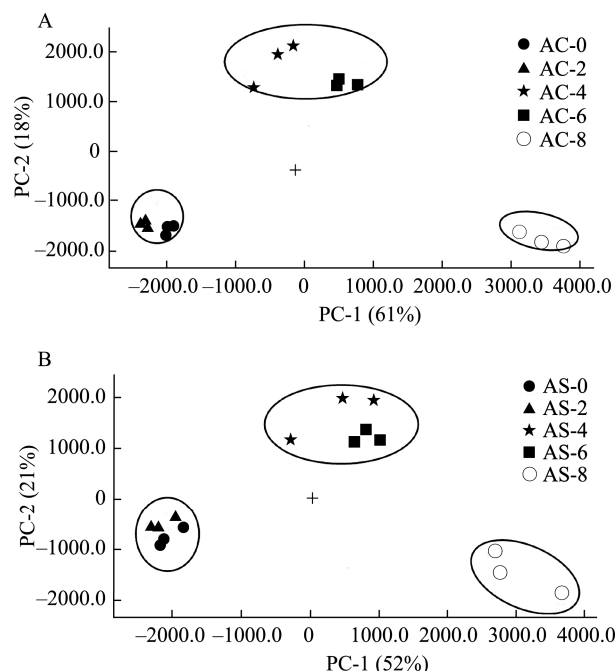
Fig.3 Fingerprint of volatile compounds in mycelium samples of *Auricularia auricula* infected by *P. citrinum*



注: P.ste: 单独接种歧皱青霉。

图 4 歧皱青霉感染木耳菌丝样品中挥发性化合物指纹图谱

Fig.4 Fingerprint of volatile compounds in mycelium samples of *Auricularia auricula* infected by *P. steckii*



注：图中的每个点表示一个样品，同一个组的样品使用同一种颜色表示。

图5 桔青霉(A)和枝皱青霉(B)侵染木耳菌丝不同时期 PCA 图  
Fig.5 PCA plots of *P. citrinum* (A) and *P. steckii* (B) infecting the *Auricularia auricula* mycelia at different periods

## 参考文献

- 王晨, 马欣欣, 平琳琳, 等. ARTP 诱变技术选育黑木耳优良发酵菌株初探[J]. 中国食用菌, 2021, 40(3): 17-22, 26.  
WANG C, MA XX, PING LL, *et al.* Preliminary study on breeding excellent fermentation strains of *Auricularia auriculae* by ARTP mutation technology [J]. Edible Fungi China, 2021, 40(3): 17-22, 26.
- 苗晶因, 徐丹, 李海霞, 等. 毛木耳多糖分离纯化方法及生物活性研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(10): 3059-3066.  
MIAO JN, XU D, LI HX, *et al.* Research progress on biological activities and separation and purification methods of polysaccharides from *Auricularia polytricha* (Mont) Sacc [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(10): 3059-3066.
- 刘鑫, 袁源, 侯若琳, 等. 毛木耳黑色素提取条件优化及体外抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(10): 1688-1696, 1752.  
LIU X, YUAN Y, HOU RL, *et al.* Optimization of extraction conditions of melanin from *Auricularia polytricha* and its antioxidant activities *in vitro* [J]. Nat Prod Res Dev, 2019, 31(10): 1688-1696, 1752.
- 刘荣, 栾淑莹, 程萍, 等. 酸性黑木耳多糖降血脂功能的实验研究[J]. 营养学报, 2016, 38(4): 408-410.  
LIU R, LUAN SY, CHENG P, *et al.* The experimental study on blood lipids-lowering effect of *Auricularia* polysaccharide [J]. Acta Nutr Sin, 2016, 38(4): 408-410.
- 甘霓, 吴小勇, 郑传进, 等. 黑木耳多糖对 B16 黑色素瘤细胞抗肿瘤作用研究[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(6): 758-762.  
GAN N, WU XY, ZHENG CJ, *et al.* Study on the antitumor activity of *Auricularia auricula* polysaccharides on B16 melanoma cells [J]. J Guangdong Pharmaceutical, 2017, 33(6): 758-762.
- 许海林. 黑木耳水溶性多糖的分离纯化及其免疫调节活性研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2017.  
XU HL. Extraction, purification, and immunoregulation activity of water soluble polysaccharide from *Auricularia auricula* Judge [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2017.
- 王明友, 宋卫东, 王帅洋, 等. 我国黑木耳生产技术研究[J]. 中国农机化学报, 2022, 43(3): 99-103.  
WANG MY, SONG WD, WANG SY, *et al.* Research on production technology of *Auricularia auricula* in China [J]. J Chin Agric Mechaniz, 2022, 43(3): 99-103.
- 崔丽红. 食用菌栽培菌棒上污染真菌的分离鉴定及多样性分析[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2017.  
CUN LH. Isolation, identification and diversity analysis of the contaminating fungi from the edible mushroom-growing synthetic wood logs [D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2017.
- 曹满堂, 李宾, 李宏, 等. 食用菌蛛网病研究进展[J]. 食用菌学报, 2020, 27(3): 127-136.  
CAO MT, LI B, LI H, *et al.* Advances in research on cobweb disease of edible fungi [J] Acta Edulis Fungi, 2020, 27(3): 127-136.
- 王帮香. 羊肚菌栽培中的病原真菌鉴定与生物防治初探[D]. 南充: 西华师范大学, 2021.  
WANG BX. Preliminary study on identification of Pathogen fungi and biological control in *Morchella* cultivation [D]. Nanchong: China West Normal University, 2021.
- 胡晶晶. 杏鲍菇病原菌的鉴定与侵染机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.  
HU JJ. Study on the identification and infection mechanism of *Pleurotus eryngii* pathogenic bacteria [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018.
- 方舒婷, 刘舒芹, 向章敏. 微生物挥发性有机物检测及在食品安全监测中的应用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(16): 353-361.  
FANG ST, LIU SQ, XIANG ZM. Detection of microbial volatile organic compounds and Its application in food safety monitoring [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(16): 353-361.
- GU S, ZHANG J, WANG J, *et al.* Recent development of HS-GC-IMS technology in rapid and non-destructive detection of quality and contamination in agri-food products [J]. TrAC Trends Anal Chem, 2021, 144: 116435.
- ASADA J, KAZUFUMI O, UBONRAT S. Visualization of volatome profiles for early detection of fungal infection on storage Jasmine brown rice using electronic nose coupled with chemometrics [J]. Measurement, 2020, 157: 107561.
- GU S, CHEN W, WANG ZH, *et al.* Rapid detection of *Aspergillus* spp. infection levels on milled rice by headspace-gas chromatography ion-mobility spectrometry (HS-GC-IMS) and E-nose [J]. LWT, 2020, 132(3): 109758.
- HE P, HASSAN MM, TANG F, *et al.* Total fungi counts and metabolic dynamics of volatile organic compounds in paddy contaminated by *Aspergillus niger* during storage employing gas chromatography-ion mobility spectrometry [J]. Food Anal Method, 2022, 15(6): 1-14.

- [17] LI HB, KANG XF, WANG S, *et al.* Early detection and monitoring for *Aspergillus flavus* contamination in maize kernels [J]. Food Control, 2021, 121: 107636.
- [18] GU S, CHEN W, WANG ZH, *et al.* Rapid determination of potential aflatoxigenic fungi contamination on peanut kernels during storage by data fusion of HS-GC-IMS and fluorescence spectroscopy [J]. Postharv Biol Technol, 2021, 171: 111361.
- [19] 黎家奇, 康晓风, 李红波, 等. 基于离子迁移谱的花生霉变早期预警标示分子研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 41–49.
- LI JQ, TANG XF, LI HB, *et al.* Molecular markers for early warning of peanut mildew by gas chromatography-ion mobility spectrometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(21): 41–49.
- [20] WANG S, MO H, XU D, *et al.* Determination of volatile organic compounds by HS-GC-IMS to detect different stages of *Aspergillus flavus* infection in Xiang Ling walnut [J]. Food Sci Nutr, 2021, 9(5): 2703–2712.
- [21] JIA SL, LI Y, ZHUANG S, *et al.* Biochemical changes induced by dominant bacteria in chill-stored silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and GC-IMS identification of volatile organic compounds [J]. Food Microbiol, 2019, 84: 103248.
- [22] 殷朝敏, 范秀芝, 史德芳, 等. HS-SPME-GC-MS 结合 HPLC 分析 5 种食用菌鲜品中的风味成分[J]. 食品工业科技, 2019, 40(3): 254–260.
- YIN CM, FAN XZ, SHI DF, *et al.* Flavor compounds analysis of 5 fresh mushrooms using HS-SPME-GC-MS and HPLC [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, 40(3): 254–260.
- [23] 左蕾蕾, 曾里, 曾凡骏. 香菇猴头菇枸杞保健酒的研制[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(3): 95–98.
- ZUO LL, ZENG L, ZENG FJ. Development of edible fungus healthy liquor [J]. Food Res Dev, 2012, 33(3): 95–98.
- [24] CARLO T, THOMAS H, BERNHARD K, *et al.* Stephan. Investigation of gaseous metabolites from moulds by ion mobility spectrometry (IMS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [J]. Int J Ion Mobil Spectrom, 2010, 13(1): 17–24.
- [25] 张亚琳, 陈福生. 微生物强化对西式发酵香肠 Salami 理化指标与挥发性风味成分的影响[J/OL]. 食品与发酵工业: 1–8. [2022-09-20]. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.031260
- ZHANG YL, CHEN FS. Effects of Strengthening microbes on physicochemical indexes and volatile flavor components of salami, a western fermented sausage [J/OL]. Food Ferment Ind: 1–8. [2022-09-20]. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.031260
- [26] 余伟, 宋玥, 余仲露, 等. 拮抗酵母菌挥发物单体对草莓灰霉病的防治效果[J]. 食品科学, 2018, 39(21): 230–236.
- YU W, SONG Y, SHE ZL, *et al.* Effect of volatile monomers from *Hanseniaspora uvarum* on controlling postharvest gray mold of strawberry [J]. Food Sci, 2018, 39(21): 230–236.
- [27] PAN L, ZHANG W, ZHU N. Early detection and classification of pathogenic fungal disease in post-harvest strawberry fruit by electronic nose and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Res Int, 2014, 62: 162–168.
- [28] 李英华, 袁海英, 巴吐尔, 等. 新疆草莓采后主要致病病原真菌的鉴定及正己醇处理对其抑制作用[J]. 新疆农业大学学报, 2009, 32(1): 60–63.
- LI YH, YUAN HY, BA TER, *et al.* Identification of pathogenic fungi from the post-harvest strawberry and effect of hexanol treatment on them [J]. J Xinjiang Agric Univ, 2009, 32(1): 60–63.
- [29] 杨波, 刘志刚, 刘丹丹, 等. 鲍鱼菇菌丝体挥发油化学成分及抗菌活性分析[J]. 中国食用菌, 2009, 28(3): 40–42.
- YANG B, LIU ZG, LIU DD, *et al.* Chemical constituent and antimicrobial activity of essential oil from the cultured mycelia of *Pleurotus abalonus* [J]. Edible Fungi China, 2009, 28(3): 40–42.
- [30] 王静, 曹建敏, 陈德鑫, 等. 短小芽孢杆菌 AR03 挥发性有机物的抑菌活性及其组分分析[J]. 中国农业科学, 2018, 51(10): 1908–1919.
- WANG J, CAO JM, CHEN DX, *et al.* Antimicrobial effect and components analysis of volatile organic compounds from *Bacillus pumilus* AR03 [J]. Sci Agric Sin, 2018, 51(10): 1908–1919.
- [31] 罗晓宇, 单晨阳, 贾召召, 等. 内生细菌 S258 产挥发性有机物的抑菌促生长活性及其组分分析[J]. 华北农学报, 2021, 36(5): 198–203.
- LUO XY, SHAN CY, JIA ZZ, *et al.* The antifungal and plant growth-promoting effect and components analysis of the volatile organic compounds from an endophytic bacterium S258 [J]. Acta Agric Boreali-Sin, 2021, 36(5): 198–203.

(责任编辑: 郑 丽 韩晓红)

## 作者简介



王媛媛, 硕士, 主要研究方向为食品质量与安全控制。  
E-mail: 1143173441@qq.com



王 媛, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品中真菌毒素及产毒菌的污染及检测控制技术研究。  
E-mail: wy2018@nwu.edu.cn