

利用近红外光谱技术快速检测大豆氨基酸含量

李楠^{1,2}, 许韵华¹, 宋雯雯², 杨如萍², 秦培友², 杨修仕², 任贵兴², 韩天富²

(¹北京交通大学理学院, 北京 100044; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要:为探索近红外光谱技术在大豆氨基酸测试中的应用, 寻找一种快速的检测方法, 以 167 份大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 种子为材料, 采用傅里叶变换近红外光谱技术 (FT-NIRS) 对经高效液相色谱法 (HPLC) 分析的 18 种氨基酸含量进行模拟。结果显示: 天冬氨酸 ($R_{CV}^2 = 0.85$)、谷氨酸 ($R_{CV}^2 = 0.86$)、丝氨酸 ($R_{CV}^2 = 0.82$)、甘氨酸 ($R_{CV}^2 = 0.89$)、酪氨酸 ($R_{CV}^2 = 0.83$)、苯丙氨酸 ($R_{CV}^2 = 0.78$)、异亮氨酸 ($R_{CV}^2 = 0.86$) 和色氨酸 ($R_{CV}^2 = 0.81$) 及 15 种氨基酸总和 ($R_{CV}^2 = 0.82$) 可利用 FT-NIRS 准确预测; 苏氨酸、精氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和胱氨酸检测模型有一定的参考价值, 可用来进行相对含量的估测; 而对组氨酸、赖氨酸、脯氨酸和蛋氨酸的预测不准确。本研究进一步证明利用 FT-NIRS 技术预测大豆主要氨基酸组分是稳定可行的。

关键词: 近红外光谱技术; 大豆; 氨基酸; 高效液相色谱技术

A Rapid Method for Detecting Amino Acid Compositions in Soybean by Using Near-Infrared Spectroscopy

LI Nan^{1,2}, XU Yun-hua¹, SONG Wen-wen², YANG Ru-ping², QIN Pei-you²,
YANG Xiu-shi², REN Gui-xing², HAN Tian-fu²

(¹ School of Science, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044;

² Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: To establish a rapid, efficient and low-cost method of applying Fourier-Transform Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (FT-NIRS) to detecting amino acids in soybean, we selected 167 representative soybean flour samples from a large original population and utilized FT-NIRS to predict the contents (which were analyzed by HPLC) of eighteen amino acid species. According to the data we obtained, aspartate ($R_{CV}^2 = 0.85$), glutamate ($R_{CV}^2 = 0.86$), serine ($R_{CV}^2 = 0.82$), glycine ($R_{CV}^2 = 0.89$), tyrosine ($R_{CV}^2 = 0.83$), phenylalanine ($R_{CV}^2 = 0.78$), isoleucine ($R_{CV}^2 = 0.86$), tryptophan ($R_{CV}^2 = 0.81$) and the total amino acids content ($R_{CV}^2 = 0.82$) can be detected by FT-NIRS accurately; the detected models of threonine, arginine, alanine, valine, leucine, and cystine are valuable as references and can be used to estimate the relative contents; the content prediction of histidine, lysine, proline and methionine is inaccurate. This study has further demonstrated the stability and feasibility of using FT-NIRS to detect the major amino acid components in soybean.

Key words: NIR; Soybean; Amino acids; HPLC

大豆是人类重要植物蛋白来源, 其蛋白质含量在 40% 左右^[1-2]。大豆蛋白中氨基酸比例较为均衡, 其中赖氨酸、亮氨酸、精氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸含量较高, 但含硫氨基酸含量较低。大豆中氨基酸的比例及含量受品种、栽培技术及生态环境的影

响较大^[3-5]。当前, 大豆中氨基酸含量的测定主要采用氨基酸分析仪及高效液相色谱仪, 两种方法所需分析时间较长, 消耗人力、物力较大, 进而导致了育种效率的降低^[6-8]。如何快速、准确、高效地测定大豆种子中的氨基酸组分的含量, 以加速大豆品质

收稿日期: 2012-01-10 修回日期: 2012-04-04

基金项目: 农业部现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-04, CARS-09)

作者简介: 李楠, 硕士研究生, 主要从事大豆氨基酸检测方法的研究。E-mail: 10121940@bjtu.edu.cn

通信作者: 韩天富, 研究员。E-mail: hantf@mail.caas.net.cn

任贵兴, 研究员。E-mail: renguixing@caas.net.cn

育种是一个亟待解决的问题。

近红外光谱技术是 20 世纪 30 年代以来发展最快、最引人注目的光谱分析技术,是光谱测量技术与化学计量学学科的有机结合,已成功地应用于大豆粗蛋白、粗脂肪、脂肪酸、水分等的预测^[9-12]。在含量相对较低的氨基酸的预测方面,王文真等^[13]应用近红外光谱技术准确测定大豆子粒中天门冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸和精氨酸的含量,其定标和预测相关系数都在 0.86 以上。Kovalenko 等^[14]利用偏最小二乘法(PLS)、人工神经网络算法(ANN)和支持向量机算法(SVM)3 种回归分析方法成功预测了大豆子粒中除胱氨酸及色氨酸外的其他氨基酸含量,且发现偏最小二乘法、支持向量机算法的预测结果要优于人工神经网络算法。Fontaine 等^[15]也应用近红外光谱技术精确的预测了大豆中蛋氨酸、胱氨酸、赖氨酸、苏氨酸和色氨酸总和以及其他氨基酸的含量。Lee 等^[16]概述了近红外光谱技术在大豆种子品质方面的应用,认为近红外光谱技术可以很好的预测大豆种子中很多组分,特别是部分含量高的氨基酸,但也提出该方法难以预测含量低的氨基酸。本研究利用近红外光谱技术预测我国 167 份大豆品种(系)的傅里叶近红外漫散射光谱,采用偏最小二乘法,对 FT-NIRS 预测大豆氨基酸含量的方法进行研究,旨在探索 FT-NIRS 技术在大豆脂肪酸组成育种中的应用,提高我国大豆品质育种效率。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

选用的 167 个大豆 [*Glycine max*(L.) Merr.] 品种由中国农业科学院作物科学研究所国家大豆产业技术研发中心收集,分别来自同年全国各个大豆产区,试验前放入干燥器中平衡水分 7d,并将所有样品分为校正集(120 份样品)和外部验证集(47 份样品)。利用粉磨机(Retsch, R = 1.0mm, Glen Creston, England)将全部样品粉碎成粉状,过 60 目筛,分装于封口塑料袋,编号保存于 4℃ 冰箱中。

16 种氨基酸标准品、邻苯二甲醛(OPA)和氯甲酸苄甲酯(FMOC)购自阿拉丁试剂公司,纯度 ≥ 99%;磺基丙氨酸-蛋氨酸标准品购自 SIGMA 公司,纯度 ≥ 99%;色谱纯乙腈和甲醇购自 Merck 公司;盐酸、氢氧化锂、氢氧化钠、氢溴酸、甲酸、过氧化氢为分析纯,购自北京化工厂;2 次水取自实验室的 Millipore 纯水系统。

1.2 大豆氨基酸含量的高效液相色谱法(HPLC)测定

1.2.1 大豆粉样品前处理 (1) 盐酸水解:采用牟世芬等^[17]的方法。称取 60mg 大豆粉末于玻璃水解管中,加入 10ml 盐酸(6mol/L),将水解管置于液氮中,冷冻、抽真空、封管,待样品完全解冻后,置于 110℃ 烘箱中水解 22h。将水解液摇匀,过滤,取 0.3ml 水解液于浓缩仪上浓缩,加入 3ml 盐酸(0.01mol/L)复溶,摇匀,取 1ml 复溶液,过 0.22μm 滤膜,待上机检测。

(2) 氧化水解:参照国标(GB/T 15399-94)^[18]的方法,并做适当修改。称取 60mg 大豆粉末于浓缩管中,加入预冷的过甲酸 2ml,在 55℃ 水浴锅中反应 30min。于浓缩管中加入 0.3ml 氢溴酸,振摇,静置 30min,于浓缩仪上旋干(65℃),加入 10ml 盐酸(6mol/L),转移至厌氧管中,盖好瓶盖,于 110℃ 水解 22h。取出水解液转移至 20ml 的容量瓶中定容,过滤,摇匀后取 1ml 水解液于浓缩仪上浓缩,复溶于 1ml 盐酸(0.01mol/L)中,摇匀,取 1ml 复溶液,过 0.22μm 滤膜,待上机检测。

(3) 碱水解:采用杨文君等^[19]的方法。称取 60mg 大豆粉末于玻璃水解管中,加入 0.3ml 蒸馏水浸湿样品,再加入 3ml 氢氧化锂(4mol/L),混匀,液氮冷冻至结冰,抽真空,封管。待样品解冻后,置于 110℃ 烘箱中水解 20h,将水解液转移至 20ml 容量瓶中,加入约 3ml 盐酸(6mol/L)中和,定容,摇匀,取 1ml 复溶液,过 0.22μm 滤膜,待上机检测。

1.2.2 色谱检测条件 采用岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪,Agilent ZORBAX Eclipse AAA C₁₈ 柱(4.6mm × 75mm, 3.5μm)色谱柱进行分析。流动相:A 为 40mmol/L NaH₂PO₄(pH = 7.8),B 为乙腈:甲醇:水(45:45:10)。流动相梯度洗脱程序:0 ~ 1.0min, 0 B; 1.0 ~ 5min, 37% B; 5.0 ~ 10min, 57% B; 10.0 ~ 10.5min, 100% B; 10.5 ~ 12.5min, 100% B; 12.5 ~ 13min, 0B; 13 ~ 14.5min, 0B。流速为 2ml/min,柱温 40℃;检测波长:226nm 和 338nm 双波长检测;进样量:5μl。上机前,采用邻苯二甲醛(OPA)和氯甲酸苄甲酯(FMOC)联合柱前衍生法对氨基酸进行衍生。

1.2.3 液相色谱数据处理 以保留时间定性、峰面积定量、外标法计算。采用 Microsoft Office Excel 2003 软件进行数据分析。

1.3 大豆样品粉末的光谱数据采集与分析

试验所用仪器为德国 Bruker 公司的 Matrix-I 型傅立叶变换近红外光谱分析仪。将 30g 大豆粉末样品盛于直径 50mm 的旋转样品池中,在 4000 ~

12800/cm 谱区范围内扫描 64 次,分辨率为 16/cm,采集样品的吸收光谱。每个样品均重复装样扫描 3 次以消除样品粒度大小、均匀性不一致等因素对光谱的影响,计算机程序自动将反射光谱信息转换成吸光度值贮存,用布鲁克 OPUS 6.5 近红外处理软件计算平均光谱。

1.4 近红外模型的建立

运用 BRUKER 公司 OPUS 6.5 定量分析软件包进行光谱预处理、谱区选择和排除异常样品后,将样品按 4:1 的比例分成校正集和外部验证集。校正集采用偏最小二乘 (partial least squares, PLS) 回归法建立定量分析模型,内部交叉验证法确定数学模型所用的最佳维数,外部验证集对模型进行验证。采用不处理、矢量归一化、多元散射校正、一阶导数、二阶导数等方法对光谱数据进行预处理,消除基线和其他光谱变异来源。使用自动优化功能对每种组分进行优化,根据交叉验证决定系数 (R^2)、外部验证

决定系数 (R^2)、交叉验证均方根误差 ($RMSECV$)、预测均方根误差 ($RMSEP$) 和相对分析误差 (RPD) 等指标评价并确定最优校正模型。最后通过比较预测值和实际化学测定值的符合程度 (用决定系数 R^2 和 $RMSECV$ 表示) 来评价数学模型的预测效果。

2 结果与分析

2.1 样品氨基酸含量的变异性

如图 1 所示,18 种氨基酸在 15min 内全部出峰、分离较为完全,满足实验分析要求。

表 1 为高效液相色谱法 (HPLC) 检测结果,可知谷氨酸含量最高,平均含量为 64.97 mg/g,其含量变化范围在 42.31 ~ 95.52 mg/g 之间;天冬氨酸含量次之,变化范围在 31.27 ~ 64.34 mg/g 之间;赖氨酸平均含量为 28.38 mg/g,变化范围在 14.77 ~ 49.44 mg/g;而甘氨酸含量最低,平均含量为 6.11 mg/g,变化范围在 3.88 ~ 9.62% 之间。

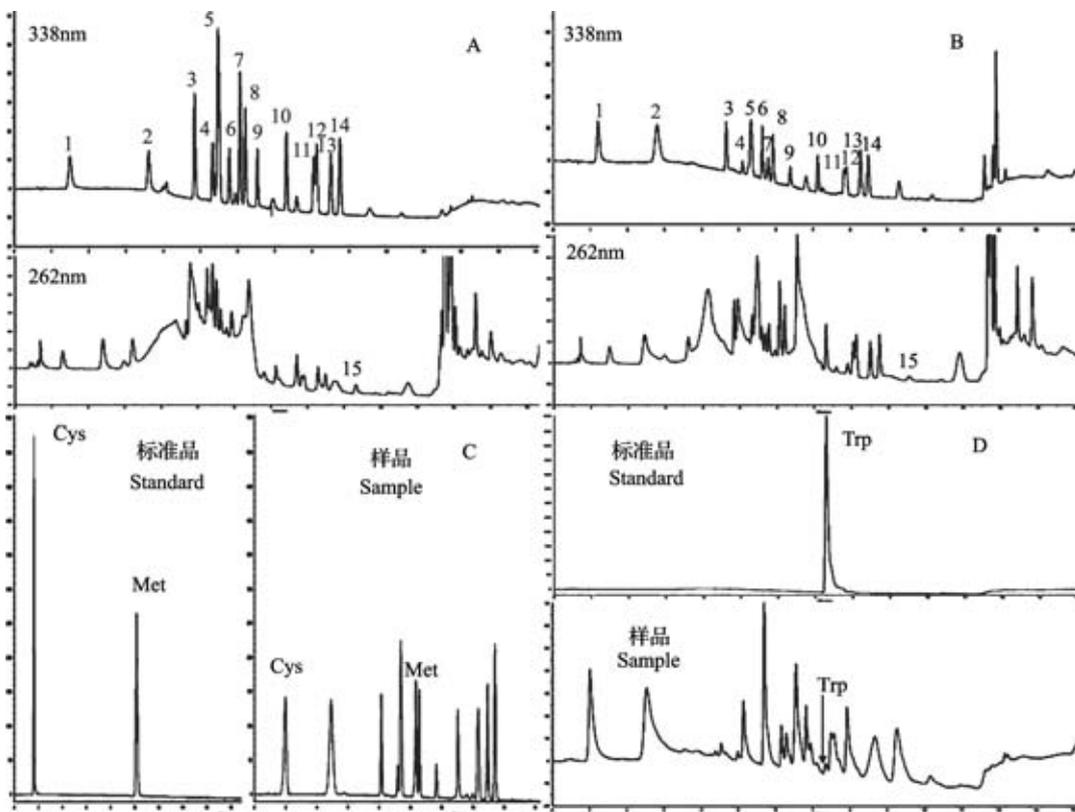


图 1 大豆中 18 种氨基酸高效液相色谱图

Fig. 1 The High Performance Liquid Chromatogram of 18 kinds of amino acid in soybean

A: 15 种氨基酸标准品色谱图, B: 大豆样品 15 种氨基酸色谱图, C: 大豆胱氨酸 (Cys) 和蛋氨酸 (Met) 标准品与样品色谱图,

D: 大豆色氨酸 (Trp) 标准品与样品色谱图。1-15 分别为天冬氨酸, 谷氨酸, 丝氨酸, 甘氨酸, 组氨酸, 苏氨酸, 精氨酸, 丙氨酸, 酪氨酸, 缬氨酸, 苯丙氨酸, 异亮氨酸, 亮氨酸, 赖氨酸, 脯氨酸。

A: Spectra of 15 kinds of amino acid standards, B: Spectra of 15 kinds of amino acids in soybeans, C: Spectra of cysteine and methionine standard and sample in soybeans, D: Spectra of tryptophan standard and sample in soybeans 1 - 15 were respectively Asp, Glu, Sev, Gly His, Thr, Ary, Ala, Tyr, Val, Phe, Ile, Leu, Lys, and Pro.

表 1 大豆中 18 种氨基酸含量化学测定值统计(干基)

Table 1 Contents of 18 amino acids in soybeans using chemical method (dry weight)

组分 Component	<i>R</i>	检出限(mg/L) Detection limit	回收率(%) Recovery	平均值(mg/g) Mean	变幅(mg/g) Range	标准差 <i>s</i>
天冬氨酸	0.9997	0.083	99.89	48.34	31.27 ~ 64.34	0.32
谷氨酸	0.9994	0.056	99.64	64.97	42.31 ~ 95.52	1.08
丝氨酸	0.9995	0.093	100.65	25.45	15.67 ~ 38.91	0.39
甘氨酸	0.9994	0.069	97.33	6.11	3.88 ~ 9.62	0.21
组氨酸	0.9991	0.402	97.55	9.27	5.11 ~ 17.94	0.16
精氨酸	0.9996	0.077	99.35	40.91	23.25 ~ 89.16	0.72
苏氨酸	0.9991	0.079	100.03	12.93	4.62 ~ 22.75	0.40
丙氨酸	0.9995	0.059	98.45	29.49	19.88 ~ 55.61	0.34
酪氨酸	0.9989	0.061	99.63	17.45	17.09 ~ 31.54	0.22
缬氨酸	0.9996	0.069	99.68	21.57	13.49 ~ 43.48	0.37
苯丙氨酸	0.9992	0.062	96.88	21.45	10.01 ~ 45.74	0.55
亮氨酸	0.9997	0.074	100.81	22.62	13.33 ~ 41.82	0.36
异亮氨酸	0.9990	0.106	98.59	37.15	24.88 ~ 74.21	0.53
赖氨酸	0.9993	0.596	99.35	28.38	14.77 ~ 49.44	0.51
脯氨酸	0.9998	0.099	98.98	32.24	19.91 ~ 91.70	0.38
蛋氨酸	0.9985	0.783	100.46	63.28	31.42 ~ 87.44	0.22
胱氨酸	0.9997	0.095	101.19	68.92	48.62 ~ 96.23	0.38
色氨酸	0.9983	0.115	99.39	5.601	4.49 ~ 9.38	0.25

2.2 近红外预测模型的建立及优化

图 2 为大豆粉末样品的近红外光谱。利用 OPUS 6.5 软件包中的 Quant 2 定量分析方法,采用偏最小二乘法建立大豆 18 种氨基酸含量近红外光谱的分析模型。

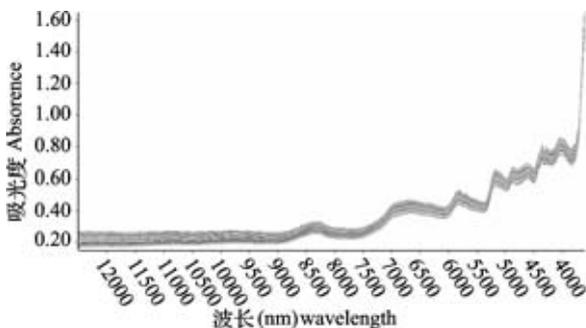


图 2 大豆粉样品近红外漫反射光谱

Fig. 2 Typical NIR spectra obtained from different soybean samples.

表 2 是利用 Quant 2 定量分析方法,通过软件自动优化给出的不同氨基酸在同一光谱范围内不同预处理方法(包括无光谱预处理、一阶导数)下的最

佳成分数时 R^2 和 $RMSECV$ 值。比较并选择主成份数相对较小的分析模型作为预测模型,再根据检验收集的 R^2 和 $RMSE$ 值的大小来决定选择模型。由表 2 可知,除了组氨酸、精氨酸、赖氨酸、脯氨酸、蛋氨酸和胱氨酸外,其他 12 种氨基酸都可以得到比较理想的预测模型。表 2 和表 3 为交叉验证集和外部验证集中 NIRS 预测的大豆氨基酸模型的评价标准。所选择的 167 份大豆品种覆盖了我国当前生产上推广的大豆品种,其氨基酸含量之间存在着广泛的品种差异,具有较好的建模检测样品代表性,可以保证建立的大豆氨基酸 NIRS 预测模型的可靠性。

2.3 模型的预测结果分析

利用近红外光谱分析不同的氨基酸含量时,用于建模的谱区和预处理方法不尽相同。天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸和色氨酸 8 种氨基酸及 15 种氨基酸总和分别用二阶导数、直线扣除等光谱预处理方法,在一定的谱区范围内,预测模型的校正决定系数 R^2 值都达到 0.79(表 2),表明该方法可快速准确地预测此 8 种氨基酸的含量。该预测模型对苏氨酸、精氨酸、丙氨

表 2 近红外光谱预测大豆氨基酸含量的交叉验证集统计分析

Table 2 Cross validation statistics of the NIRS calibration equations developed to estimate amino acid concentrations in soybeans

组分 Component	品种数量 No.	最小值 (mg/g) Min.	最大值 (mg/g) Max.	标准偏差 <i>s</i>	变异系数 <i>CV</i>	最优波长 Optimum wavelength selection	决定系数 R^2	内部交叉 验证均方差 <i>RMSECV</i>	验证相对分析 误差 <i>RPD</i>
天冬氨酸	129	36.4	57.2	0.36	0.07	9997.9 ~ 7498.4 6102.1 ~ 4246.8	0.85	0.17	2.55
谷氨酸	129	42.3	80.6	0.23	0.03	12493.5 ~ 5446.4	0.86	0.26	2.67
丝氨酸	129	15.7	32.2	0.35	0.14	9295.8 ~ 6098.2 5450.2 ~ 4597.8	0.82	0.12	2.33
甘氨酸	201	1.9	9.1	0.11	0.18	9997.9 ~ 7498.4 6102.1 ~ 4246.8	0.89	0.07	2.97
组氨酸	131	7.1	11.2	0.04	0.04	6102.1 ~ 4246.8	0.55	0.06	1.49
精氨酸	161	29.2	52.3	0.64	0.15	12493.5 ~ 7498.4	0.73	0.26	1.93
苏氨酸	104	7.4	17.1	0.11	0.08	7502.3 ~ 4507.8	0.62	0.11	1.59
丙氨酸	131	25.7	34.9	0.06	0.02	7502.3 ~ 4507.8	0.71	0.09	1.87
酪氨酸	121	13.7	20.7	0.25	0.15	12493.5 ~ 7498.4 6102.1 ~ 5446.4	0.83	0.06	2.44
缬氨酸	128	17.8	25.1	0.17	0.08	6102.1 ~ 5446.4	0.73	0.09	1.81
苯丙氨酸	107	16.6	27.2	0.24	0.10	5450.2 ~ 4597.8	0.78	0.11	2.14
亮氨酸	129	19.2	25.4	0.12	0.05	12493.5 ~ 6098.4 6102.1 ~ 5446.4	0.75	0.06	2.02
异亮氨酸	118	31.6	45	0.03	0.007	12493.5 ~ 7498.4 6102.1 ~ 4246.8	0.86	0.11	2.52
赖氨酸	122	18.1	49.4	0.51	0.18	5450.2 ~ 4597.8	0.55	0.04	1.44
脯氨酸	157	12.9	46.2	0.27	0.09	7502.3 ~ 4246.8	0.35	0.60	1.78
蛋氨酸	120	4.9	8.5	0.13	0.18	5450.2 ~ 4597.8	0.56	0.93	2.06
胱氨酸	128	6.1	11.2	0.26	0.06	7502.3 ~ 4507.8	0.61	0.26	2.55
色氨酸	131	4.6	9.2	0.25	0.05	5450.2 ~ 4597.8	0.81	0.29	1.86
氨基酸总含量	128	347.5	508.2	5.54	0.13	12493.5 ~ 5446.4	0.82	1.33	2.35

酸、缬氨酸和亮氨酸的估算也有一定的参考价值。在确定模型的预处理方法时,除选择较优的定标集 R^2 和 $RMSECV$ 值外,还需考虑检验集的 R^2 及 $RMSEP$ 值,在实际运用时,应反复检查,选择合适的预处理方法。组氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、胱氨酸和脯氨酸的预测模型不太理想(图 3)。

由表 3 可知,蛋氨酸和酪氨酸检验集的校正决定系数略低于定标集,其他 16 种氨基酸基本与定标集一致,表明通过改变光谱预处理方法、光谱区间、主成分数等参数来调整模型,可获得最佳的近红外光谱模型。

近红外光谱模型的准确性依赖于化学测定结果

的准确性。大豆粉末样品的氨基酸含量主要取决于肽键结合态的蛋白氨基酸,测定前需将蛋白链打开,水解成单个氨基酸,再通过 HPLC 测定其与游离氨基酸的总含量。目前,仍未发现能将所有种类的氨基酸毫无破坏地水解并使其保持稳定的水解剂和方法,因而导致了氨基酸含量测定的不准确性。即使是在蛋白水解最适宜的条件($110^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 22h)下,含硫氨基酸(Met、Cys)和色氨酸(Trp)仍会被破坏。本研究采用过甲酸氧化方法测定含硫氨基酸(Cys、Met),碱水解法单独检测色氨酸,检测的结果较为准确。但是由于蛋氨酸和胱氨酸稳定性较差,使得检测仍存在误差。

表 3 近红外光谱预测大豆氨基酸含量的外部验证集统计分析

Table 3 External validation statistics of the NIRS calibration equations developed to estimate amino acids concentrations in soybeans

组分 Component	品种数量 No.	最小值(mg/g) Min	最大值(mg/g) Max	标准偏差 S	变异系数 CV	决定系数 R^2	内部交叉验证 均方差 RMSEP	验证相对 分析误差 RPD
天冬氨酸	32	37.4	57.2	0.27	0.06	0.91	0.17	3.38
谷氨酸	31	46.2	80.2	0.4	0.08	0.88	0.30	2.93
丝氨酸	32	17.9	30.8	0.12	0.06	0.89	0.12	2.96
甘氨酸	40	1.9	9.0	0.02	0.04	0.90	0.07	3.23
组氨酸	32	7.1	11.2	0.05	0.06	0.58	0.07	1.55
精氨酸	41	28.2	52.4	0.06	0.05	0.83	0.26	2.41
苏氨酸	33	7.9	17.0	0.12	0.09	0.80	0.11	2.26
丙氨酸	32	26.4	34.2	0.21	0.07	0.72	0.11	1.96
酪氨酸	30	14.4	20.1	0.08	0.04	0.79	0.07	2.22
缬氨酸	31	18.3	24.9	0.19	0.08	0.73	0.10	1.91
苯丙氨酸	31	17.3	26.8	0.27	0.11	0.78	0.14	2.07
亮氨酸	32	19.4	25.3	0.15	0.07	0.82	0.07	2.36
异亮氨酸	30	31.6	44.8	0.36	0.09	0.91	0.11	3.24
赖氨酸	32	27.2	29.5	0.07	0.02	0.65	0.04	1.75
脯氨酸	32	8.2	20.1	0.11	0.13	0.50	1.15	2.3
蛋氨酸	40	4.8	8.3	0.22	0.28	0.60	0.85	1.41
胱氨酸	31	6.6	11.0	0.20	0.22	0.65	0.24	2.37
色氨酸	33	9.8	19.9	0.53	0.38	0.85	0.26	1.96
氨基酸总含量	31	347.8	488.8	4.05	9.8	0.86	1.37	2.71

3 讨论

3.1 氨基酸近红外光谱预测模型

本研究结果表明,采用直接酸解的方式,可以成功预测天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、甘氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸和异亮氨酸等 8 种氨基酸的含量,无论是定标集还是检验集,其校正决定系数都高于 0.73。缬氨酸、丙氨酸和苏氨酸的预测模型仅有一定的参考价值,组氨酸、精氨酸、赖氨酸和脯氨酸的预测模型结果也不太理想,但是这 8 个预测模型在大豆育种材料选择上可作为一种快速筛选方法。本研究中天冬氨酸和赖氨酸预测模型的校正决定系数略低于王文真等^[13]的报道,精氨酸和赖氨酸的决定系数则远低于报道的 0.86。造成该结果的原因可能是由于样品的选择不同,同时采用的化学分析方法亦不相同。

3.2 应用近红外光谱快速预测大豆中氨基酸含量的可行性

本研究根据实际需求选择来源广泛的大豆品

种,组成近红外光谱建模的校正集和外部验证集,利用近红外光谱技术建立了大豆氨基酸组分的近红外光谱预测模型。采用大豆粉末样品进行光谱扫描,可在很大程度上减少因大小差异和不均一性对光谱扫描造成的影响,从而提高了预测模型的精度。

大量的具有代表性的大豆样品是建立高质量的近红外预测模型的前提。由于大豆氨基酸含量受基因型、年份和环境条件的影响较大,变异范围广,本研究所建立的模型尚不足以涵盖所有品种的氨基酸含量范围。因此,应该在现有的基础上提高大豆种质的广泛性,使得大豆育种材料中氨基酸组分的变化范围尽可能涵盖所有观察值,同时优化预测模型,提高模型的质量和适用范围,为大豆氨基酸育种和种质资源品质鉴定提供更加快速、准确、高效、低成本的测试手段。

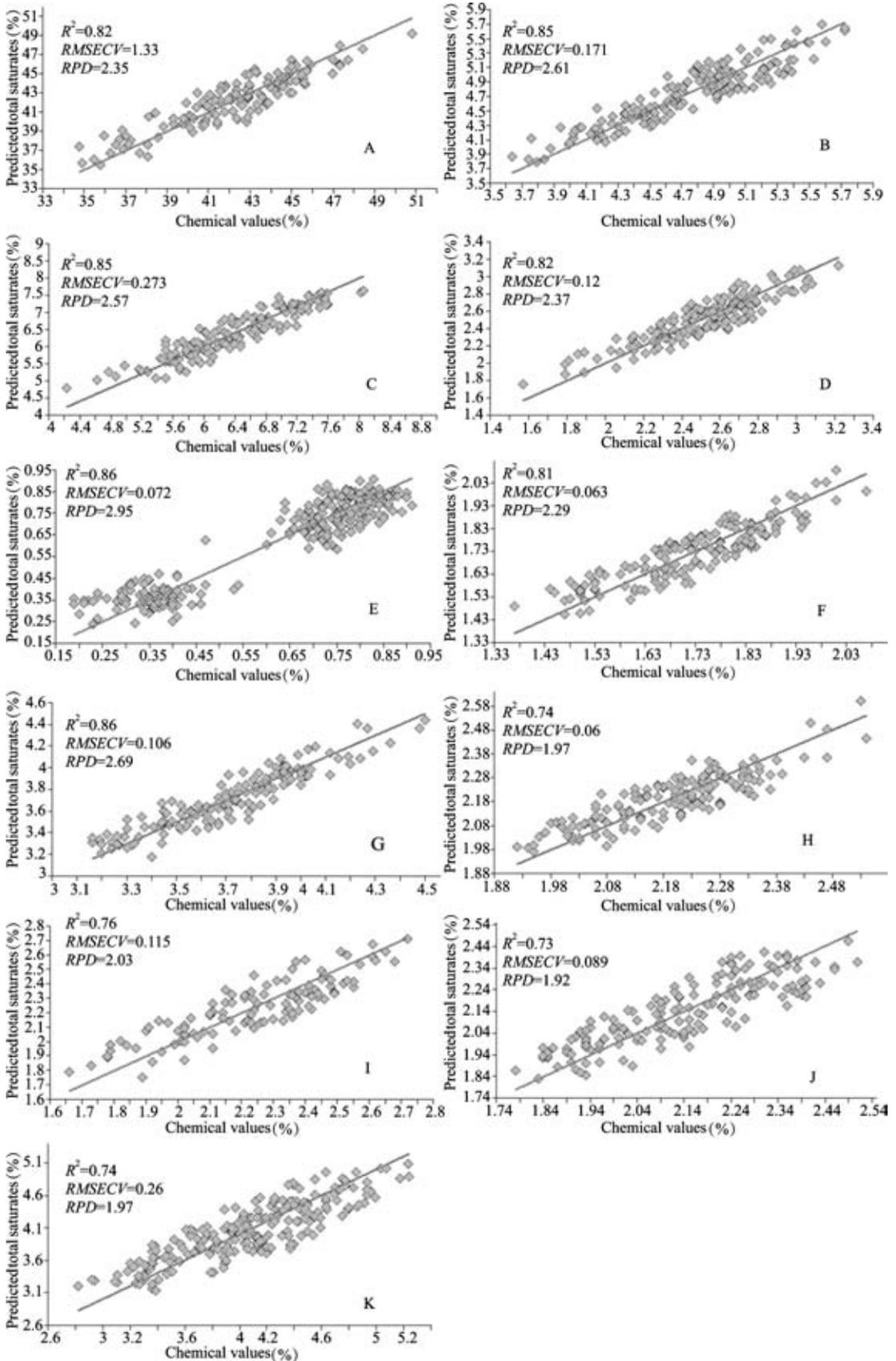


图3 交叉验证集 NIRS 和 HPLC 方法预测氨基酸含量的相关性散点图

Fig.3 Scatter plots of correlation between NIRS and HPLC methods for the prediction of amino acid concentrations in cross validation set.

A: 氨基酸总含量, B: 天冬氨酸, C: 谷氨酸, D: 丝氨酸, E: 甘氨酸, F: 酪氨酸, G: 异亮氨酸, H: 亮氨酸, I: 苯丙氨酸, J: 缬氨酸, K: 苏氨酸
A: Total content of amino acids, B: Asp, C: Glu, D: Ser, E: Gly, F: Tyr, G: Ile, H: Leu, I: phe, J: Val, K: Thr

参考文献

- [1] 国家大豆产业技术体系. 2010 年度大豆产业技术发展报告 [M]//农业部科技教育司, 财政部教科文司. 中国农业产业技术发展报告(2010 年度). 北京: 中国农业出版社. 2011, 16-22
- [2] 韩立德, 盖钧镒, 张文明. 大豆营养成分研究现状[J]. 种子, 2003, 131(5): 57-59
- [3] 吕景良, 邵荣春, 吴百灵, 等. 东北地区大豆品种资源氨基酸组成的分析研究[J]. 大豆科学, 1988, 7(3): 193-201
- [4] 田岚. 栽培技术对大豆种子氨基酸影响的研究[J]. 东北农学院学报, 1988, 19(2): 150-155
- [5] 孟祥勋, 胡明祥, 张明. 生态环境对大豆子粒氨基酸组成的影响[J]. 吉林农业科学, 1988(1): 13-20
- [6] 姚振纯. 大豆蛋白质的氨基酸组分与改良[J]. 黑龙江农业科学, 1997(1): 38-39
- [7] Agrafiotou P, Sotiropoulos S, Pappa-Louisi A. Direct RP-HPLC determination of underivatized amino acids with online dual UV absorbance, fluorescence, and multiple electrochemical detection [J]. J Sep Sci, 2009, 32(7): 949-954
- [8] Zangrando R, Piazza R, Cairns W R, et al. Quantitative determination of un-derivatised amino acids in artistic mural paintings using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry [J]. Anal Chem Acta, 2010, 675(1): 1-7
- [9] 韩熹, 严红兵, 卢福洁, 等. 基于国产近红外谷物分析仪的大豆中粗蛋白与粗脂肪含量的检测研究[J]. 现代科学仪器, 2009(2): 119-121
- [10] 孙君明, 韩粉霞, 闫淑荣, 等. 傅里叶近红外反射光谱法快速测定大豆脂肪酸含量[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 2(6): 1290-1295
- [11] 薛雅琳, 王雪莲, 赵会义, 等. 利用近红外分析技术测定大豆水分含量方法的研究[J]. 中国油脂, 2009, 34(7): 69-71
- [12] 柴玉华, 谭克竹. 基于近红外分析技术检测大豆脂肪酸含量的研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(1): 238-241
- [13] 王文真, 付翠真. 利用近红外反射光谱快速测定大豆籽粒蛋白质、脂肪和部分氨基酸含量[J]. 作物品种资源, 1994(1): 31-32
- [14] Kovalenko I V, Rippeke G R, Hurburgh C R. Determination of amino acid composition of soybeans (*Glycine max*) by near-infrared spectroscopy [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(10): 3485-3491
- [15] Fontaine J, Horr J, Schirmer B. Near-infrared reflectance spectroscopy enables the fast and accurate prediction of the essential amino acid contents in soy, rapeseed meal, sunflower meal, peas, fishmeal, meat meal products, and poultry meal [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(1): 57-66
- [16] Lee J D, Shannon J G, Choung M G. Application of Nondestructive Measurement to Improve Soybean Quality by Near Infrared Reflectance Spectroscopy [M]. Rijeka: Soybean-Applications and Technology, Tzi-Bun Ng, ISBN: 978-953-307-207-4, InTech, 2011
- [17] 牟世芬, 丁永胜. 氨基酸直接分析法原理及应用[J]. 现代科学仪器, 2001(2): 24-27
- [18] 常碧影, 李建凡, 张明, 等. GB/T 15399-94, 饲料中含硫氨基酸测定方法-离子交换色谱法[S]. 北京: 国家技术监督局, 1994
- [19] 杨文君, 张丽英, 常碧影, 等. 反相高效液相色谱法测定饲料中色氨酸含量[J]. 中国饲料, 2004(4): 33-35