

## 葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)六种化学成分 近红外定量模型的建立

黄冠明<sup>1</sup>, 郭香<sup>2</sup>, 祁剑飞<sup>2</sup>, 宁岳<sup>2</sup>, 巫旗生<sup>2</sup>, 王晓清<sup>1\*</sup>, 曾志南<sup>2\*</sup>, 朱礼艳<sup>3</sup>

1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南长沙 410128
2. 福建省水产研究所, 福建厦门 361013
3. 福建安井食品股份有限公司中心实验室, 福建厦门 361028

**摘要** 葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)是中国南方重要的海水养殖生物。由于长期的人工育苗,且未采取种质保护措施,其种质资源不断衰退,从而给牡蛎消费市场带来了不良影响,急需开展葡萄牙牡蛎良种选育工作。选育营养好、口感佳的葡萄牙牡蛎,需要对大量样本进行营养成分分析,传统的实验室化学法耗时费力,成本较高,因此需寻求一种高效的葡萄牙牡蛎化学成分含量测定方法。采用美国 Thermo Fisher 公司的傅里叶近红外光谱仪对6个产地的105份经过冷冻干燥和研磨处理的葡萄牙牡蛎样本(去除闭壳肌)进行光谱扫描,通过采集的光谱数据与测定的化学真实值对比分析,检测了近红外光谱技术(NIRS)对葡萄牙牡蛎中蛋白质、糖原、牛磺酸、锌、硒和钙6种成分含量预测的准确性。利用 TQ Analyst 软件,选用偏最小二乘法(PLS),乘法散射校正(MSC)、一阶求导、Norris 平滑等光谱预处理方法,建立了6种成分的近红外定量模型,并选取1/3总样品量的样本作为验证样本,对模型进行了外部验证和交叉验证。葡萄牙牡蛎的蛋白质、糖原、牛磺酸、锌、硒和钙6个模型的校正相关系数( $R_c$ )分别为0.9853, 0.9651, 0.9504, 0.9554, 0.9200和0.9252, 预测相关系数( $R_p$ )分别为0.9851, 0.9636, 0.9441, 0.9461, 0.9190和0.9241, 交叉验证相关系数( $R_{cv}$ )分别为0.9817, 0.9461, 0.9005, 0.8975, 0.8753和0.8292。结果表明,模型预测值与化学真实值有很高的相关度,近红外光谱技术可以比较准确地预测葡萄牙牡蛎中蛋白质、糖原、牛磺酸、锌、硒、钙的含量。本实验样本采集时间跨度长,产地分布范围广,数量大,具有较好的代表性,样本经过冷冻干燥处理,减少了水分对光谱质量的影响,提高了模型的准确性及稳定性。鉴于近红外光谱技术分析过程高效,不使用化学试剂,检测成本低,该模型的建立对开展大规模葡萄牙牡蛎营养成分快速分析,选育肉质性状佳的新品系具有重要意义。

**关键词** 近红外光谱; 葡萄牙牡蛎; 定量模型; 相关系数

**中图分类号:** O433.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)05-1509-05

### 引言

葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)又名福建牡蛎,属软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、珍珠贝目(Pterioidea)、牡蛎科(Ostreidae)、巨蛎属(*Crassostrea*),其食物链较短、生长迅速、产量高,且经济效益好<sup>[1]</sup>,是福建省海水贝类养殖的主要种类。牡蛎味道鲜美,并富含蛋白质及多种微量元素,为人们提供了丰富的营养源,是一种受欢迎的海

产品。随着生活水平的提高,消费者更加看重牡蛎的营养和风味,选育营养好、口感佳的牡蛎新品种,在水产消费市场有着很大的需求。目前,葡萄牙牡蛎遗传育种的研究主要集中在种间杂交<sup>[2-3]</sup>,快速生长新品系和壳色新品种的选育等方面,曾志南等<sup>[4]</sup>通过连续数代的群体选育,培育出了金黄壳色速长葡萄牙牡蛎新品系,其生长速度明显高于普通群体,通过对该品系体成分的研究分析发现,该新品系水分、糖原、锌、铁的含量明显高于普通群体,高糖原含量的牡蛎普遍口感更佳,但新品系粗蛋白、钙的含量显著低于普通群

收稿日期: 2019-08-06, 修订日期: 2019-12-25

基金项目: 国家重点研发计划专项(2018YFD0901403), 国家贝类产业技术体系项目(CARS-49)资助

作者简介: 黄冠明, 1993年生, 湖南农业大学动物科学技术学院硕士研究生 e-mail: 275916851@qq.com

\* 通讯联系人 e-mail: wangxiao8258@126.com; xmzzn@sina.com

体<sup>[5]</sup>,同时观测到,高铜、锌含量的葡萄牙牡蛎中牛磺酸的含量也明显较高。一直以来,国内外都未见有关牡蛎肉质性状选育工作的报道,原因是肉质性状进行选育时,需要对大量样本的成分指标进行检测分析,而传统的实验室化学检测方法存在耗时费力、成本高、污染环境等缺点<sup>[6]</sup>。

近红外光谱技术(near-infrared spectroscopy, NIRS)是一种敏感、高效、低成本、无污染的新型定量分析技术,能够对同一样本中的多项化学指标进行快速准确的预测,在食品<sup>[7]</sup>、医药<sup>[8]</sup>、选择育种<sup>[9]</sup>等方面有广泛的应用。目前,在水产育种领域,近红外光谱技术仅对长牡蛎(*Crassostrea gigas*)中蛋白质、糖原的含量有较准确的预测<sup>[10]</sup>,但尚未见用于分析葡萄牙牡蛎生化成分的报道。本研究对 105 份采自 4 个时间段,6 个产地的葡萄牙牡蛎样本进行冷冻干燥处理,避免牡蛎软体部高水分含量对近红外光谱分析的影响,建立了能够快速准确测定葡萄牙牡蛎中蛋白质、糖原、牛磺酸、锌、硒、钙 6 种体成分含量的近红外光谱模型,对今后选育肉质性状佳的葡萄牙牡蛎新品系提供了技术支持。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

自 2018 年 6 月至 2019 年 3 月,三个月为一间隔,分别从福建福州、石狮、诏安,广东汕头、湛江,广西防城港 6 个产地,共采集 105 份葡萄牙牡蛎样本。单个牡蛎软体部湿重(除去闭壳肌)为 0.28~2.33 g,根据开壳后牡蛎肉的大小,分为大个体样本组和小个体样本组,每份样本湿重 30~50 g。

将新鲜葡萄牙牡蛎开壳,取软体部,用剪刀剪去闭壳肌后称重,按大小分组后放入 50 mL 离心管,并将离心管置于冰盒中。先用剪刀将离心管中的牡蛎肉剪碎,然后用手持式匀浆机调至最大转速匀浆 60 s,在-80 °C 冰箱中保存 12 h 后,使用真空冷冻干燥机干燥 48 h。用研钵和研杵将干燥后的样本研磨至细粉末,然后用 60 目筛网筛分,样本颗粒越均匀细小,越利于提高模型预测的准确度<sup>[12]</sup>。将每份样本分成两份,一份用于近红外光谱的采集,一份用于 6 种成分化学真实值的测定。

### 1.2 仪器

傅里叶近红外(NIR)光谱仪(Thermo Fisher, Antaris II, USA),采集软件 RESULT-Integration(Thermo Fisher, USA),数据分析软件 TQ Analyst(Thermo Fisher, USA),全自动凯氏定氮仪(FOSS, Kjeltac 8400, Sweden),可见分光光度计(Shimadzu, UVmini-1240, Japan),液相色谱仪(Shimadzu, LC-16, Japan),火焰原子吸收分光光度计(Varian, AA240FS, USA),双道原子荧光仪(北京吉天, AFS-930, China),真空冷冻干燥机(CHRIST, Alpha 2-4 LDplus, Germany),手持式匀浆机(IKA T10 basic ULTRA-TUR-RAX, Germany)。

### 1.3 光谱采集

近红外光谱仪开机预热 30 min 后,将准备好的样品放入光谱仪配套的石英杯,样品厚度 1 cm,将软件设置为漫反

射光谱,光谱扫描范围在 10 000~4000 cm<sup>-1</sup>,扫描次数为 64 次,分辨率为 8 cm<sup>-1</sup>,吸收光谱用 log(1/R)表示,其中 R 表示反射率。在采集每个样品之前,先采集背景光谱以消除背景所带来的影响。

### 1.4 化学真实值测定

葡萄牙牡蛎中蛋白质、牛磺酸、锌、硒、钙含量测定采用 GB 5009.5—2016《食品中蛋白质的测定》、GB 5009.169—2016《食品中牛磺酸的测定》、GB 5009.14—2017《食品中锌的测定》、GB 5009.93—2017《食品中硒的测定》、GB 5009.92—2016《食品中钙的测定》的方法,糖原含量测定采用试剂盒法(EnzyChrom™ 糖原试剂盒, BioAssay Systems, USA)。

### 1.5 模型建立与验证

采用 TQ Analyst 软件,选用偏最小二乘法(PLS),以及乘法散射校正(MSC)、一阶求导、Norris 平滑的光谱预处理方法,并选择软件自动推荐的波段范围,剔除异常样本。模型采用外部验证和交叉验证的方法对模型预测效果进行验证,验证样本数量为总样本数的 1/3。

## 2 结果与讨论

### 2.1 化学成分测定结果

采用国标法和试剂盒法对 105 份葡萄牙牡蛎干粉样本的蛋白质、糖原、牛磺酸、锌、硒、钙含量进行测定。分析结果如表 1 所示,蛋白质含量分布范围为 30.60%~68.00%,糖原 3.00%~48.10%,牛磺酸 7.80%~27.60%,锌 0.11%~2.21%,硒 1.36%~6.91%,钙 1.09%~11.70%,可见样本中 6 种成分含量的分布范围广,有较强代表性,满足了近红外定量模型要求样本成分含量分布范围广的基本要求。

表 1 葡萄牙牡蛎样本中蛋白质、糖原、牛磺酸、锌、硒、钙含量分析结果

Table 1 Statistics of protein, glycogen, taurine, zinc, selenium and calcium contents of *Crassostrea angulata* samples

	蛋白质	糖原	牛磺酸	锌	硒	钙
最大值/%	68.00	48.10	27.60	2.21	6.91	11.70
最小值/%	30.60	3.00	7.80	0.11	1.36	1.09
平均值/%	51.62	18.52	16.25	0.74	2.69	3.19
标准偏差/%	9.06	11.69	4.70	0.50	1.03	2.11
总样本数	105	105	105	105	105	105

### 2.2 原始光谱分析

用近红外光谱仪采集了 105 份样本原始光谱,如图 1 所示,光谱曲线走向基本一致,但不同样本的光谱曲线又略有不同,说明各样本成分含量有差异。由于部分样本采集光谱时正处于南方梅雨季节,实验室湿度较大,导致采集的原始光谱在 7 500~7 000 和 5 500~5 000 cm<sup>-1</sup>附近的水峰区域有噪声干扰,图谱质量受到了水汽影响。

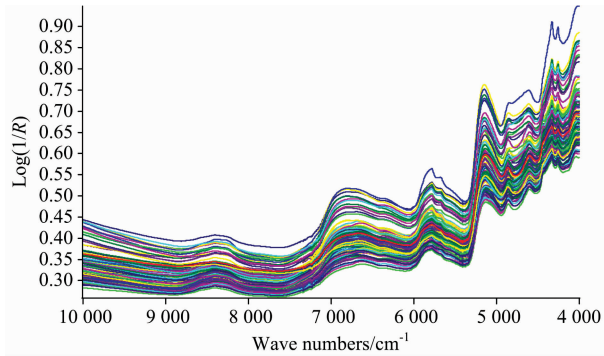


图 1 葡萄牙牡蛎样本的原始光谱图

Fig. 1 The raw spectra of *Crassostrea angulata* samples

2.3 预处理光谱分析

如图 2 所示,原始光谱通过乘法散射校正(MSC)、一阶求导、Norris 平滑的光谱预处理方法,消除了由于样本颗粒大小等原因引起的光谱信号基线漂移及噪声等问题<sup>[12]</sup>,减少了图谱中的不均匀散射效应,提高了信噪比(SNR)。

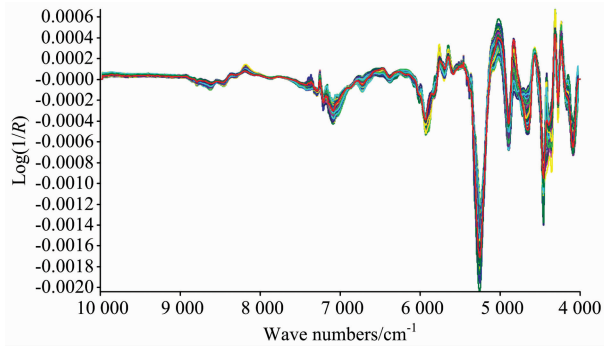


图 2 乘法散射校正、一阶求导结合 Norris 平滑

Fig. 2 MSC+1st derivative+Norris derivative filter

2.4 模型的确立和外部验证

选择 TQ Analyst 软件自动推荐的光谱波段范围(如表 2),建立了 6 种成分的近红外定量分析模型,并对模型进行了外部验证。

蛋白质定量模型的校正相关系数( $R_c$ )为 0.985 3,校正均方根误差(RMSEC)为 1.62,预测相关系数( $R_p$ )为 0.985 1,预测均方根误差(RMSEP)为 1.59(如图 3)。

糖原定量模型的校正相关系数( $R_c$ )为 0.965 1,校正均方根误差(RMSEC)为 3.19,预测相关系数( $R_p$ )为 0.963 6,预测均方根误差(RMSEP)为 3.17(如图 4)。

牛磺酸定量模型的校正相关系数( $R_c$ )为 0.950 4,校正均方根误差(RMSEC)为 1.14,预测相关系数( $R_p$ )为 0.944 1,预测均方根误差(RMSEP)为 1.05(如图 5)。

锌定量模型的校正相关系数( $R_c$ )为 0.955 4,校正均方根误差(RMSEC)为 0.156,预测相关系数( $R_p$ )为 0.946 1,预测均方根误差(RMSEP)为 0.153。

硒定量模型的校正相关系数( $R_c$ )为 0.920 0,校正均方根误差(RMSEC)为 0.290,预测相关系数( $R_p$ )为 0.919 0,预测均方根误差(RMSEP)为 0.289。

表 2 光谱范围

Table 2 Spectral range

建模波段/ $\text{cm}^{-1}$	
蛋白质	7 089~7 031
糖原	4 747~4 620, 6 190~5 935
牛磺酸	4 177~4 107, 4 755~4 339, 7 413~7 335
锌	6 888~6 086, 8 832~8 388
硒	4 261~4 123, 7 069~6 880
钙	4 786~4 493, 5 866~5 735, 6 190~6 012

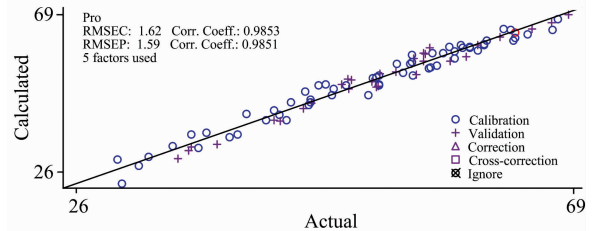


图 3 蛋白质化学真实值与预测值的相关关系图

Fig. 3 Protein chemical value and predictive value of correlation diagram

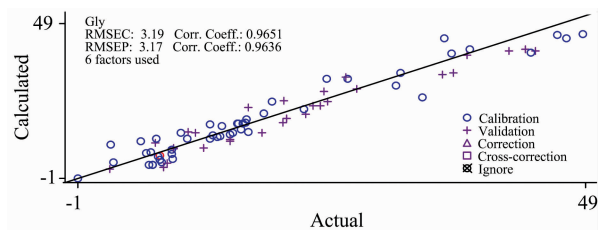


图 4 糖原化学真实值与预测值的相关关系图

Fig. 4 Glycogen chemical value and predictive value of correlation diagram

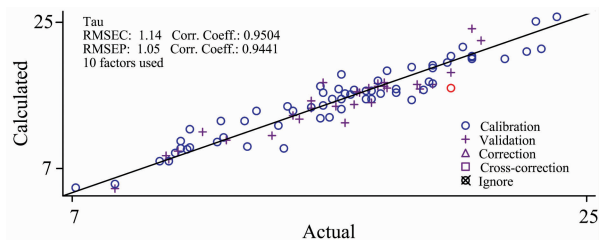


图 5 牛磺酸化学真实值与预测值的相关关系图

Fig. 5 Taurine chemical value and predictive value of correlation diagram

钙定量模型的校正相关系数( $R_c$ )为 0.925 2,校正均方根误差(RMSEC)为 0.929,预测相关系数( $R_p$ )为 0.924 1,预测均方根误差(RMSEP)为 1.03。

以上 6 个定量模型的校正相关系数( $R_c$ )均高于或等于 0.92,预测相关系数( $R_p$ )均高于 0.91,模型预测值与化学真实值有很高的的相关度,且校正均方根误差(RMSEC)和预测均方根误差(RMSEP)都在可接受范围,6 个近红外定量模型都有着较好的预测效果,尤其蛋白质、糖原、牛磺酸、锌

定量模型的预测效果特别令人满意。由此可见,此次建模适用于今后葡萄牙牡蛎体成分的实际检测。

### 2.5 模型的交叉验证

通过软件对 6 个模型进行了交叉验证,得到以下结果:

蛋白质定量模型的交叉验证相关系数( $R_{CV}$ )为 0.981 7,交叉验证均方根误差(RMSECV)为 1.81。

糖原定量模型的交叉验证相关系数( $R_{CV}$ )为 0.946 1,交叉验证均方根误差(RMSECV)为 3.95。

牛磺酸定量模型的交叉验证相关系数( $R_{CV}$ )为 0.900 5,交叉验证均方根误差(RMSECV)为 1.61。

锌定量模型的交叉验证相关系数( $R_{CV}$ )为 0.897 5,交叉验证均方根误差(RMSECV)为 0.233。

硒定量模型的交叉验证相关系数( $R_{CV}$ )为 0.875 3,交叉验证均方根误差(RMSECV)为 0.360。

钙定量模型的交叉验证相关系数( $R_{CV}$ )为 0.829 2,交叉验证均方根误差(RMSECV)为 1.39。

以上 6 个实验结果,交叉验证均方根误差(RMSECV)都

在可接受范围,交叉验证相关系数( $R_{CV}$ )除了钙的结果不够理想,其余均高于 0.87,预示模型有着较好的预测效果,但钙的近红外定量模型今后还有可优化空间。

## 3 结 论

实验样本采集时长 9 个月,葡萄牙牡蛎样本来自于 6 个不同产地,且样本量足够大,具有较好的代表性,样本经过冷冻干燥处理,减少了水分对光谱质量的影响,有利于提高模型的准确性及稳定性。实验所建立的 6 个近红外定量模型,有着较高的校正相关系数和预测相关系数,可见模型具有较好的预测效果,近红外光谱技术适用于葡萄牙牡蛎中蛋白质、牛磺酸、锌、硒、钙含量的检测。但钙定量模型的交叉验证相关系数稍低,还需对其进行优化,进一步提高其实际预测的准确性。

本模型的建立,对今后开展大规模葡萄牙牡蛎体成分的测定,选育肉质性状佳的葡萄牙牡蛎新品系有着重要意义。

## References

- [ 1 ] ZENG Zhi-nan, NING Yue(曾志南, 宁 岳). Marine Sciences(海洋科学), 2011, 35(9): 112.
- [ 2 ] SU Jia-qi, WANG Zhao-ping, ZHANG Yue-huan, et al(苏家齐, 王昭萍, 张跃环, 等). Journal of Fisheries of China(水产学报), 2015, 39(3): 353.
- [ 3 ] ZHENG Huai-ping, WANG Di-wen, LIN Qing, et al(郑怀平, 王迪文, 林 清, 等). Journal of Fisheries of China(水产学报), 2012, 36(2): 210.
- [ 4 ] ZENG Zhi-nan, NING Yue, QI Jian-fei, et al(曾志南, 宁 岳, 祁剑飞, 等). Cultivation of a New Strain of Crassostrea Angulata with Golden Yellow Shell(一种贝壳金黄色速长葡萄牙牡蛎新产品系的培养方法). Chinese Patent(中国专利): ZL 2014 1 0197671. 1 [P]. 2015-08-26.
- [ 5 ] QI Jian-fei, WU Qi-sheng, NING Yue, et al(祁剑飞, 巫旗生, 宁 岳, 等). Journal of Xiamen University • Natural Science(厦门大学学报 • 自然科学版), 2019, 58(2): 276.
- [ 6 ] WANG Wei-jun, YANG Jian-min, DONG Ying-hui, et al(王卫军, 杨建敏, 董迎辉, 等). Oceanologia et Limnologia Sinica(海洋与湖沼), 2015, 46(4): 845.
- [ 7 ] Zhou L J, Wu H, Li J T, et al. Meat Science, 2012, 90(3): 658.
- [ 8 ] Zang H C, Li L, Wang F S, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 61: 224.
- [ 9 ] Rosales A, Galicia L, Oviedo E, et al. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(20): 10781.
- [10] Wang W J, Yang J M, Li Q, et al. Journal of Shellfish Research, 2015, 34(2): 303.
- [11] Tøgersen G, Arnesen J F, Nilsen B N, et al. Meat Science, 2003, 63(4): 523.
- [12] WANG Xiao-xiao, LI Jun-tao, SUN Xiang-li, et al(王潇潇, 李军涛, 孙祥丽, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2018, 38(1): 58.

# Establishment of Quantitative Model for Six Chemical Compositions in *Crassostrea Angulata* by Near Infrared Spectroscopy

HUANG Guan-ming<sup>1</sup>, GUO Xiang<sup>2</sup>, QI Jian-fei<sup>2</sup>, NING Yue<sup>2</sup>, WU Qi-sheng<sup>2</sup>, WANG Xiao-qing<sup>1\*</sup>, ZENG Zhi-nan<sup>2\*</sup>, ZHU Li-yan<sup>3</sup>

1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China

3. Central Laboratory, Fujian Anjoy Foods Holdings Co., Ltd., Xiamen 361028, China

**Abstract** *Crassostrea angulata* is the main variety of marine aquaculture in southern China. Due to long-term artificial breeding with no germplasm protection measures, its germplasm resources are declining, which has a negative impact on the oyster consumption market. Therefore, it is urgent to develop breeding of *Crassostrea angulata* (*C. angulata*). The selection for *C. angulata* with good nutrition and good flesh quality requires a large number of samples in the nutrient analysis. Traditional laboratory chemical method is time-consuming and costly, so we are looking for an efficient method for determining the chemical content of *C. angulata*. The spectroscopic scan was carried out using 105 frozen-dried and grinded *C. angulata* samples (removed the adductor muscle) from six regions with the Fourier near-infrared spectrometer (Thermo Fisher, USA) in this study. By comparing the spectroscopic scan data to the chemical values, the accuracy of the content predictions of protein, glycogen, taurine, zinc, selenium and calcium in *C. angulata* obtained by near-infrared spectroscopy (NIRS) was studied. Using TQ Analyst (Thermo Fisher, USA) software, and selecting partial least squares (PLS), spectral preprocessing method like multiplication scattering correction (MSC), 1st derivative, and Norris derivative filter, the near-infrared models of the six components were established. And 1/3 of the total samples were selected as validation samples. The models were validated by external and cross validation. The correlation coefficients of calibration ( $R_C$ ) of the six models of protein, glycogen, taurine, zinc, selenium and calcium were 0.985 3, 0.965 1, 0.950 4, 0.955 4, 0.920 0 and 0.925 2, respectively. The correlation coefficients of prediction ( $R_P$ ) were 0.985 1, 0.963 6, 0.944 1, 0.946 1, 0.919 0 and 0.924 1, respectively. The correlation coefficients of cross validation ( $R_{CV}$ ) were 0.981 7, 0.946 1, 0.900 5, 0.897 5, 0.875 3 and 0.829 2, respectively. The results showed that the predicted values of the models had a high correlation with the chemical values, which indicated the NIRS could accurately predict the contents of protein, glycogen, taurine, zinc, selenium and calcium in *C. angulata*. The samples in this study had good representativeness. The collection time was long. The production area was wide and the quantity was large. The samples were frozen-dried, which reduced the influence of water on the spectral quality. Thus, the accuracy and stability of the models were improved. Spectroscopic scan and analysis based on NIRS was very efficient with no chemical reagents and low cost. The established quantitative model for 6 chemical compositions in *C. angulata* by NIRS would have a great significance for large-scale analysis of the nutritional compositions and for the selection of new strains with good flesh quality in *C. angulata*.

**Keywords** Near-infrared spectroscopy; *Crassostrea angulata*; Quantitative model; Correlation coefficient

(Received Aug. 6, 2019; accepted Dec. 25, 2019)

\* Corresponding authors