

张平平, 张 瑜, 唐 果, 等. 近红外光谱技术检测小麦谷蛋白大聚体含量[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1207-1211.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.002

近红外光谱技术检测小麦谷蛋白大聚体含量

张平平¹, 张 瑜¹, 唐 果², 姚金保¹, 马鸿翔¹

(1.江苏省农业科学院/江苏省农业生物学重点实验室/江苏省现代作物生产协同创新中心, 江苏 南京 210014; 2.波通瑞华科学仪器(北京)有限公司上海分公司, 上海 200000)

摘要: 对 120 份来源广泛的小麦品种籽粒样品进行了制粉, 用磷酸缓冲提取液提取面粉不溶性谷蛋白大聚体。利用高效液相色谱法测定提取液不溶性谷蛋白大聚体含量化学值, 同时利用反射式近红外光谱仪采集提取液光谱数据。采用 Unscrambler 化学计量学软件, 结合偏最小二乘法建立了不溶性谷蛋白大聚体含量预测的校准模型, 并对模型进行了验证。结果表明, 该定标模型决定系数为 0.89, 交互验证标准偏差为 36.40 AU/mg, 模型验证预测值和化学值决定系数为 0.86。可见, 近红外光谱方法可作为低成本高通量的面粉不溶性谷蛋白大聚体含量评价方法。

关键词: 近红外光谱; 小麦面粉; 不溶性谷蛋白大聚体

中图分类号: S512.103.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1207-05

Measurement of SDS-unextractable polymeric protein content in wheat flour based on near-infrared spectroscopy (NIRS) technique

ZHANG Ping-ping¹, ZHANG Yu¹, TANG Guo², YAO Jin-bao¹, MA Hong-xiang¹

(1. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/ Jiangsu Provincial Key Laboratory for Agrobiolgy/ Jiangsu Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production, Nanjing 210014, China; 2. Perten Instrument Corporation (China), Shanghai 200000, China)

Abstract: One hundred and twenty cultivars or advanced lines were selected from different wheat growing regions, and were milled into flour. The real content of SDS-unextractable polymeric protein (UPP) in the flour extracted by phosphate buffer was quantified by high performance liquid chromatograph method. At the same time, the spectrum data of UPP in the phosphate buffer was collected based on near infrared reflectance spectroscopy technique. The calibration model was created based on Unscrambler software and partial least squares (PLS) algorithm, and was validated. In the calibration model of UPP, the coefficient of determination and root mean square error of cross validation (RMSECV) was 0.89 and 36.40 AU/mg, respectively. The correlation coefficient between real content and predicted content in the validation set was 0.86. It was showed that near-infrared spectroscopy (NIRS) method was a low-cost and high-throughput method to quantify the UPP of wheat flour.

Key words: near-infrared spectroscopy (NIRS); wheat flour; SDS-unextractable polymeric protein (UPP)

收稿日期: 2017-07-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671690); 江苏省自然科学基金项目(BK20161375); 国家重点研发计划项目(2016YFD0100500); 国家小麦产业技术体系项目(CARS-03)

作者简介: 张平平(1977-), 男, 山西阳泉人, 博士, 研究员, 主要从事小麦遗传育种研究。(Tel) 025-84390257, (E-mail) pp_zh@126.com

近红外光谱(Near-infrared spectroscopy, NIRS)基于分子振动的非谐性, 由分子振动从基态向高能级跃迁时产生, 波长范围通常在 800~2 500 nm, 可以记录含氢基团 C-H、O-H、N-H、S-H、P-H 等振动的倍频和合频吸收, 建立吸收光谱和物质含量之间的关联^[1]。近红外光谱技术非常适用于被检物的水分含量分析和蛋白质、碳水化合物、脂类等碳氢有机物质

含量分析。谷物成分含量的 NIRS 分析经半个世纪的发展,因具有制样简单、测试环境和技术要求低、快速、无损(非破坏)等特点,被广泛应用于各类农产品检测中,如小麦、水稻、玉米、大豆等大宗粮食作物都有相应的国家标准和国际标准。已经报道的应用领域还包括棉籽水分和脂肪检测^[1-2]、小麦氮含量估算^[3]、食用油分级^[4]、烤烟品种鉴别^[5]、奶制品品质检测^[6]和牧草 CNCPS 组分分析^[7]等。近红外光谱技术无论在理论基础、硬件设备和软件支持上都较为成熟。

小麦籽粒蛋白质含量约为 8%~20%,主要由谷蛋白和醇溶蛋白两类贮藏蛋白组成^[8]。谷蛋白通常以聚合体的形式存在,其中聚合度较高、在十二烷基硫酸钠磷酸缓冲液中不易被提取的部分称为不溶性谷蛋白大聚体(Unextractable polymeric protein, UPP)。UPP 仅占小麦贮藏蛋白总量的 5%左右,但其含量与面筋强度呈极显著的正相关,主要受基因型的影响,对面筋质量和食品品质具有决定性作用^[9-11]。因此,快速、准确地定量分析 UPP 含量成为小麦品种育种世代选择的重要内容。目前几种常用的谷蛋白大聚体分析方法包括双缩脲比色法^[12]、丙醇分离法^[13-14]、多层凝胶电泳光密度扫描法^[9]和凝胶色谱法^[10-11]。双缩脲比色法和丙醇分离法虽方法简单,但其测定的并非谷蛋白大聚体含量,而是谷蛋白聚合体总量。其中双缩脲比色法还存在平行样本间的重复性差、费时费力的问题。多层凝胶电泳光密度扫描法测定过程和技术复杂,对凝胶的染色脱色要求严格,成本较高,费时费力。凝胶色谱法是目前最准确的方法,但设备和耗材昂贵,费时费力,需要专门的技术人员,多用于要求较高的定量研究,但在育种辅助选择中应用较少。谷蛋白大聚体作为小麦蛋白质的一个部分,具备利用近红外光谱定量分析的基本特征。因此,本研究拟利用近红外光谱技术,尝试建立一种具有低成本、高通量、技术要求低等特点的谷蛋白大聚体含量近红外光谱分析方法,为小麦品质育种及研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验小麦品种(系)120 份,来源于江苏、安徽、山东、河南、陕西、四川等省份,蛋白质含量和不溶性

谷蛋白大聚体含量变异丰富(表 1)。随机选取其中 100 份用于建模,其余 20 份用于模型验证。2014-2015 年度种植于江苏省农业科学院六合试验基地(南京市六合区竹镇镇)。田间试验采用随机区组设计,3 行区,行长 1.5 m,2 次重复,全生育期施氮量约 225 kg/hm²,其他田间管理措施同当地大田生产,成熟后收获籽粒样品。

1.2 样品制备

将两重复籽粒样品等量混合后,使用布拉本德小型试验磨(Brabender Quadrumat Junior Laboratory)按照标准程序制粉,出粉率约 60%。谷蛋白大聚体分析样品的制备方法为:称取 20 mg 面粉置于 2.0 ml 离心管中,加入 1.6 ml 0.5 mol/L SDS-磷酸缓冲液提取液(0.5% SDS, pH6.90),室温振荡 10 min, 17 000 g 离心 5 min,弃上清。再次在沉淀中加入 1.6 ml 0.5 mol/L SDS-磷酸缓冲液提取液,使用超声波细胞粉碎机(直径 3 mm 探头,10 W)提取 20 s, 17 000 g 离心 5 min,上清液为谷蛋白大聚体待测样品。

1.3 凝胶色谱法测定面粉谷蛋白大聚体含量化学值

化学值测定主设备为 Dionex UltiMate 3000 高效液相色谱仪,色谱柱为 Biosep S4000 凝胶色谱柱。测定参数:流动相为含 0.05%三氟乙酸(体积分数)的 50%乙腈水溶液(体积分数),流速 0.5 ml/min。使用 0.45 μm 尼龙膜(水系)针头过滤器取 200 μl 待测样品进行色谱分析,方法参考 Larroque 等^[15]。化学值单位为 AU/mg,表示 1 mg 面粉中谷蛋白大聚体的吸光度。

1.4 近红外光谱数据采集及处理

使用 Perten DA7200 反射式近红外分析仪(Perten Instruments North America Inc., Springfield, IL, USA)采集面粉谷蛋白大聚体待测样品近红外光谱。光谱的采集与凝胶色谱化学值测定同时进行。取谷蛋白大聚体待测样品 1.0~1.2 ml,使用 Perten DA7200 液体石英样品池,厚度为 1 mm。光谱扫描区间为 950~1 650 nm,扫描 10 次,室温,分辨率 5 nm。待测样品的主要吸收峰位于 1 400~1 600 nm,主要是 N-H 的一倍频、C-H 的组合频以及 O-H 的一倍频吸收(图 1)。由于近红外光谱区域内各组分的吸收峰互相重叠,因此采用 Unscrambler 化学计量学软件,结合偏最小二乘法方法,建立预测校

准模型。建模前,采用一阶导数+S-G平滑(平滑点数7点)的光谱预处理方式消除测量过程中光谱基线漂移对建模的影响。以交互验证的标准偏差($RMSECV$)和所建模型的决定系数(R^2)为评价建模效果的主要参数。同时,采用20个建模集以外的样品作为预测集对模型预测效果进行评估,以相对预测标准偏差($RMSEP$)和预测集的相对预测误差(RPD)作为评价模型预测效果的依据。 $RPD = SD / RMSEP$, SD 为预测集样品化学值的标准偏差, RPD 值 >2.5 则模型可用。

2 结果与分析

2.1 小麦谷蛋白大聚体含量分析建模样品的谷蛋白聚合体含量

参与建模的样品共100个,利用凝胶色谱法获

得的谷蛋白聚合体含量变异范围较大,为854.6~1 805.6 AU/mg,均值为1 108.4 AU/mg(表1)。这些样品的品种来源广泛,其化学值基本代表了大部分小麦品种的谷蛋白大聚体含量水平。

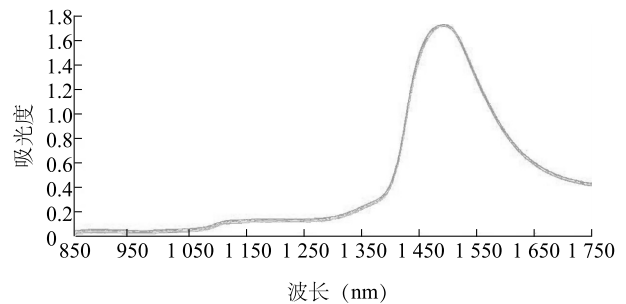


图1 面粉谷蛋白大聚体提取液近红外光谱图

Fig.1 The near infrared spectrum of unextractable polymeric protein extract from wheat flour

表1 小麦谷蛋白大聚体含量分析建模样品的凝胶色谱化学值和光谱预测值

Table 1 Real and NIR predicted content of SDS-unextractable polymeric protein (UPP) in wheat flour of the calibration set of samples

编号	品种(系)	化学值 (AU/mg)	预测值 (AU/mg)	编号	品种(系)	化学值 (AU/mg)	预测值 (AU/mg)
1	宁麦9号	924.5	937.0	51	安农0451	1 106.3	1 115.6
2	宁麦13号	946.2	926.0	52	川农42	1 094.4	1 109.2
3	宁麦14号	957.4	940.2	53	鄂35-264	1 187.7	1 176.0
4	扬06G5	964.6	981.3	54	丰抗98	957.4	885.6
5	扬06G138	1 073.5	1 122.2	55	丰优94206	1 436.8	1 401.3
6	邯6172	964.5	919.3	56	华麦0460	1 117.9	1 098.2
7	郑麦9023	1 295.2	1 281.2	57	淮麦18	1 555.4	1 601.2
8	镇麦6号	1 262.8	1 307.3	58	淮9720	1 573.0	1 545.0
9	镇麦5号	1 239.1	1 216.8	59	绵2000-1	1 232.2	1 260.5
10	苏麦3号	1 240.4	1 248.7	60	绵麦37	942.4	912.2
11	W22	1 092.3	1 152.7	61	农大116	1 805.6	1 771.2
12	冈太8944	1 030.1	1 099.9	62	山东9625	1 317.2	1 285.2
13	生抗1号	1 164.4	1 120.4	63	皖0608	1 064.6	1 074.1
14	扬麦16号	1 251.9	1 273.7	64	皖麦54	1 146.2	1 127.7
15	扬麦12	1 167.8	1 183.3	65	原冬107	1 152.9	1 194.0
16	生选4号	1 066.9	1 074.3	66	豫麦18	969.1	1 020.7
17	扬麦19	1 145.8	1 174.7	67	豫麦34	998.9	1 000.4
18	南农9918	1 073.2	1 043.4	68	周麦102	1 271.7	1 220.4
19	安农95081	1 194.9	1 175.5	69	周麦24	1 071.5	1 090.4
20	济麦20	1 134.8	1 145.2	70	紫麦子	1 099.1	1 097.5
21	皖麦55	1 123.1	1 132.2	71	改良系II	1 103.7	1 040.7
22	烟2801	1 110.0	1 038.8	72	西农6426	1 077.1	1 104.5
23	渝02321	1 207.3	1 182.2	73	花培一号	1 110.5	1 149.1
24	宁9-78	1 038.3	1 038.4	74	W28	955.2	954.8
25	宁9-11	1 097.6	1 088.9	75	W32	1 050.4	1 064.5

续表 1 Continued

编号	品种 (系)	化学值 (AU/mg)	预测值 (AU/mg)	编号	品种 (系)	化学值 (AU/mg)	预测值 (AU/mg)
26	宁麦 16 号	1 080.7	1 090.8	76	宁麦 19 号	1 075.4	1 088.5
27	宁麦 10 号	1 056.8	1 060.5	77	宁麦 3 号	890.3	922.1
28	宁 98081	1 152.6	1 146.0	78	宁 8940	1 083.8	1 011.3
29	宁 0149	1 021.6	1 082.7	79	资 07-01	1 053.4	1 113.8
30	宁 0311	1 144.2	1 153.7	80	资 07-02	1 066.4	1 054.0
31	宁 0422	1 053.8	1 055.5	81	资 07-11	1 070.6	1 053.6
32	宁 06-174	1 260.2	1 219.8	82	资 07-16	1 067.6	1 020.4
33	宁 0798	1 297.4	1 242.1	83	资 07-76	983.2	955.6
34	生选 3 号	1 243.9	1 237.3	84	资 07-108	854.6	905.4
35	Y18	1 348.1	1 336.9	85	资 07-1596	918.2	936.6
36	扬 05-121	1 240.5	1 209.9	86	资 07-1701	1 067.7	1 031.2
37	扬辐麦 2 号	1 183.0	1 237.9	87	宁 98036	1 156.4	1 142.8
38	镇 02168	1 252.1	1 212.9	88	镇 07028	878.2	899.3
39	镇 0569	986.1	1 016.0	89	镇 06090	875.4	891.7
40	南农 04Y10	1 061.9	1 060.0	90	镇 07199	952.5	911.3
41	南农 05Y628	1 152.4	1 143.8	91	盐 071-16	890.6	850.1
42	宁 98081	934.2	955.7	92	资 0811	936.6	887.2
43	南农 3519	1 200.3	1 176.3	93	新宇 06-22	1 121.8	1 070.1
44	苏麦 6 号	1 085.3	1 115.1	94	定红 201	1 210.3	1 153.5
45	华 2152	1 206.3	1 199.1	95	宁麦 20	1 008.1	1 061.1
46	常 11-10	1 158.5	1 205.9	96	扬辐麦 7177	944.0	989.6
47	宁丰 518	1 064.7	1 067.7	97	扬麦 20	933.4	920.1
48	宁 09299	1 253.5	1 208.6	98	扬 067054	940.0	916.4
49	宁 61799	1 144.1	1 093.6	99	扬丰麦 1 号	1 003.5	1 013.6
50	生选 6 号	1 059.7	1 020.5	100	扬麦 11	1 050.1	1 043.7

2.2 小麦谷蛋白大聚体含量定标结果

小麦谷蛋白大聚体含量分析建模样品的近红外光谱预测值变异范围为 850.1~1 771.2 AU/mg, 均值为 1 105.0 AU/mg (表 1)。定标模型决定系数 R^2 为 0.89 (图 2), 模型的交互验证定标标准偏差 $RMSECV=36.40$ AU/mg, 仅为建模样品均值的 3.28%。从模型的相关度值和标准偏差判断, 近红外方法可以比较精确地检测 SDS 磷酸缓冲提取液中不溶性谷蛋白大聚体的含量。

2.3 小麦谷蛋白大聚体含量近红外光谱分析方法验证

为验证小麦谷蛋白大聚体含量预测校准模型的实际检测效果, 对未参与建模的 20 个样品, 使用近红外光谱分析法和高效液相色谱法分别测定样品谷蛋白大聚体含量的预测值和化学值, 检测方法和条件与建模时保持一致。结果显示, 这 20 个样品谷蛋白大聚体含量的预测值和化学值变异范围分别为

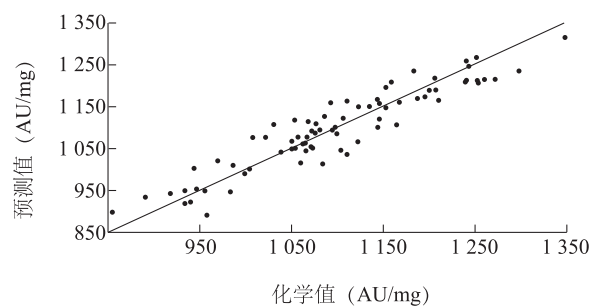


图 2 小麦谷蛋白大聚体含量化学值和近红外光谱预测值的相关性

Fig.2 Correlations of real and NIR predicted content of wheat flour unextractable polymeric protein

974.3~1 298.2 AU/mg 和 915.4~1 270.6 AU/mg, 均值分别为 $(1 137.4 \pm 110.9)$ AU/mg 和 $(1 133.4 \pm 119.3)$ AU/mg (表 2)。对比两种方法所得结果可以看出, 建立的小麦谷蛋白大聚体含量近红外检测模型的检测范围较宽, 预测值和化学值的变异范围和

均值基本一致,预测决定系数为 0.86,标准预测偏差仅为 43.66 AU/mg。预测集的相对预测误差 *RPD* 为 2.72,说明模型可用,能够快速对微量面粉样本进行分析。

表 2 小麦谷蛋白大聚体含量分析验证样品的凝胶色谱化学值和光谱预测值

Table 2 Real and NIR predicted content of UPP in wheat flour of the validation set of samples

编号	品种(系)	化学值 (AU/mg)	预测值 (AU/mg)
1	宁 894013	1 223.6	1 270.1
2	新中长	1 236.7	1 179.3
3	温州红和尚	1 015.0	1 057.4
4	万年 2 号	1 116.0	1 059.5
5	宁 7840	953.2	1 000.3
6	扬麦 5 号	1 215.2	1 274.3
7	扬麦 13 号	1 270.6	1 209.4
8	小偃 22	1 128.1	1 160.0
9	安农 0219	1 045.7	1 014.8
10	川农 17	1 148.3	1 129.6
11	莱州 95021	934.4	977.4
12	连 5036	1 091.6	1 055.4
13	连 9791-4	985.3	987.9
14	扬麦 158	1 250.4	1 246.1
15	创新 06229	1 226.5	1 298.2
16	周麦 98165	1 222.4	1 187.5
17	WL216	1 242.7	1 202.9
18	宁 9181	1 204.4	1 234.3
19	6E132	1 248.9	1 228.2
20	宁 05450	915.4	974.3

3 结 论

本研究利用 100 份面粉样本作为建模集,建立了小麦谷蛋白大聚体含量近红外光谱分析方法。研究表明,近红外光谱方法可以有效检测 SDS 不溶性谷蛋白大聚体的含量,定标模型决定系数为 0.89。在建模集谷蛋白大聚体含量化学值变异范围 854.6~1 805.6 AU/mg 条件下,定标标准偏差为 36.4 AU/mg,检测精度较高。该方法采用开放式近红外反射方法,在室温和自然光或普通照明条件下均可使用。仅需极少面粉样品,待测样品制备简单快速、成本低,尤其适用于育种材料的大规模高通

量筛选。

参考文献:

- [1] 张晓芳,俞 信, 阎吉祥,等. 近红外反射技术开放式检测棉籽中水分和油含量的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(3):473-476.
- [2] 黄庄荣,沙 莎,荣正勤,等. 基于近红外技术快速无损分析整粒棉籽中的脂肪酸含量[J]. 分析化学, 2013, 41(6):922-926.
- [3] 张 兵,范泽华,姚江河,等.基于近红外光谱与多元模型的小麦氮含量估算[J].江苏农业科学,2016,44(9):374-378.
- [4] COSTA G B, FERNANDES D D, GOMES A A, et al. Using near infrared spectroscopy to classify soybean oil according to expiration date[J]. Food Chemistry, 2016, 196(7):539-543.
- [5] 王一丁,赵铭钦,付 博,等. 基于可见光-近红外光谱技术的烤烟品种鉴别研究[J].山东农业科学,2016,48(2):119-124.
- [6] HUANG Y, MIN S, DUAN J, et al. Identification of additive components in powdered milk by NIR imaging methods[J]. Food Chemistry, 2014, 145(4):278-283.
- [7] 杜雪燕,王 迅,柴沙驼,等. 基于近红外光谱的天然牧草 CNCPS 组分分析与预测[J]. 江苏农业学报,2015,31(5):1115-1123.
- [8] ANJUM F M, KHAN M R, DIN A, et al. Wheat gluten: high molecular weight glutenin subunits-structure, genetics, and relation to dough elasticity[J]. Journal of food Science, 2007,72(3):56-63.
- [9] ZHU J, KHAN K. Effects of genotype and environment on glutenin polymers and bread making quality[J]. Cereal Chemistry, 2001, 78(2):125-130.
- [10] TSILO T J, HARELAND G A, OHM J, et al. Polymeric proteins and their association with grain yield in hard red spring wheat lines[J]. Euphytica, 2013, 194(2):187-196.
- [11] ZHANG P P, HE Z H, XIA X C, et al. Effect of percent SDS-unextractable polymeric protein (%UPP) on end-use quality in Chinese bread wheat cultivars[J]. Cereal Chemistry, 2008, 85(5):696-700.
- [12] 刘 丽,周 阳,何中虎,等. Glu-1 和 Glu-3 等位变异对不溶性谷蛋白含量的影响[J]. 作物学报,2004,30(11):1086-1092.
- [13] BEAN S R, LYNE R K, TILLEY K A, et al. A rapid method for quantitation of insoluble polymeric proteins in flour[J]. Cereal Chemistry, 1998, 75(3):374-379.
- [14] FU B X, SAPIRSTEIN H D. Procedure for isolating monomeric proteins and polymeric glutenin of wheat flour[J]. Cereal Chemistry, 1996, 73(1):143-152.
- [15] LARROQUE O R, GIANIBELLI M C, GOMEZ S M, et al. Procedure for obtaining stable protein extracts of cereal flour and whole meal for size exclusion HPLC analysis[J]. Cereal Chemistry, 2000, 77(4):448-450.

(责任编辑:张震林)