

びRNAL OF FISHERIES OF CHINA

DOI: 10.11964/jfc.20210512866



拉曼光谱检测脆肉草鱼肌肉脆度

杨 灵^{1,2}, 王青秀¹, 杨 航¹, 师泽晨¹, 苏立恒¹, 吴 霆^{1,2}, 林 蠡^{2*}, 邹 娟^{1*} (1. 仲恺农业工程学院信息科学与技术学院, 广东省食品安全溯源与控制工程技术研究中心, 广东广州 510225;

2. 仲恺农业工程学院动物科技学院,广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心, 广州市水产病害与水禽养殖重点实验室,广东 广州 510225)

摘要: 脆度是脆肉草鱼品质重要检测指标之一,过度脆化的脆肉草鱼会出现溶血、缺氧和 一些器官的病变。为研发出一种检测脆肉草鱼脆度的方法,实验提出一种基于拉曼光谱技 术检测脆肉草鱼脆度的方法。首先,通过对不同脆化时间的脆肉草鱼拉曼光谱进行 PCA 分析,结果显示,拉曼光谱能够应用于不同脆化时间脆肉草鱼脆度鉴别。肌肉总蛋白质结 构中的 α-螺旋随着脆化时间增加而减少,β-折叠随着脆化时间增加而增加,无规则卷曲在 脆化初期变化较大,脆化后期变化不明显。其次,采用 SG、SNV、MSC 和 Normalize 这 4 种方法预处理拉曼光谱数据,发现 Normalize 的预处理效果最好,预测集 RMSEP 为 2.33, R^2_P 为 0.73。再次,采用 PLSR、SVR 和 BPNN 方法建立脆肉草鱼脆度与拉曼光谱信息关 系模型,预测集 RMSEP 分别为 2.33、2.26 和 1.96, R^2_P 分别为 0.73、0.78 和 0.83,其中 BPNN 预测模型效果最好。研究表明,采用拉曼光谱技术和 Normalize-BPNN 建立的预测模型可 以检测脆肉草鱼脆度。本研究将为脆肉草鱼脆度检测提供新的思路。

关键词: 草鱼; 脆度; 拉曼光谱; Normalize-BPNN 模型; 蛋白质二级结构 中图分类号: O 657.37; TS 254.4 文献标志码: A

脆肉草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 肉质紧实、 口感爽脆,具有非常高的营养价值,完全可以与 三文鱼和鳗鲡相媲美。脆度是其重要指标之一, 草鱼经过脆化后,营养价值得到提升,口感也明 显提高,但过度脆化的脆肉草鱼会出现类似于溶 血、缺氧、器官功能性病变等问题,甚至会由于 血液循环障碍直接导致死亡^[1]。因此,亟需研发 一种检测脆肉草鱼脆度的方法,从而控制蚕豆的 喂养时间,达到脆度最优化。

脆肉草鱼脆度质构指标包括硬度、弹性、胶 黏性、咀嚼性和回复性等^[2],主要是根据脆肉草 鱼压缩变形所需力度、压缩后恢复程度及压缩峰 面积等计算质构指标值。脆肉草鱼脆度为 TPA 曲 线第一压缩周期中第一个峰处的力值,对应脆肉 草鱼的生物屈服点,表征在此点脆肉草鱼细胞构 造开始遭到破坏。目前脆肉草鱼脆度在养殖现场

资助项目:广东省重点领域研发计划项目 (2021B0202030001, 2019B020215001);广州市重点研发计划项目 (202103000067, 201803020033, 202002030154);花都区渔业产业园项目 (21302156);国家自然 科学基金 (31872606);广东省教育厅乡村振兴重点领域专项 (2020ZDZX1060);广东省自然科学 基金 (2018A0303130034, 2020A1515010834);广东省教育厅创新强校特色创新项目 (2018KTSCX096); 广东省省级科技计划项目 (2017A020225042);广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项 (2019KJ141, 2020KJ138)

- **第一作者:**杨灵(照片),从事农业人工智能、农业大数据和食品安全检测技术研究, E-mail: yang98613@163.com
- 通信作者:林蠡,从事水产动物健康养殖研究, E-mail: linli@zhku.edu.cn; 邹娟,从事农业人工智能、农业大数据研究, E-mail: 44497519@qq.com



中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

主要根据养殖时间依据经验进行判断,在实验室 主要采用感官评定^[3-4]和质构的 TPA 模式测试^[5-6], 感官评定和 TPA 评定方法可以检测脆肉草鱼的脆 度,但操作繁琐、耗时,需使用化学试剂,无法 实时活体测量。

拉曼散射光谱是研究分子振动、转动的一种 光谱方法,其优点是无损、快速、不受水环境干 扰。拉曼光谱能够反映样品中非极性基团振动变 化,从而反映氨基酸残基和蛋白二级结构信息^[7], 在肉类品质检测中应用广泛^[8]。Bauer 等^[9]利用拉 曼光谱技术评价牛臀部排酸冷鲜肉的嫩度,发现 检测样本重复数的增加能够显著提升拉曼光谱建 模准确性,提高预测准确度,并且拉曼光谱显示 口感硬的肉中蛋白结构更为紧密。陈晓思等^[10]用 不同浓度 2.2-盐酸脒基丙烷 (AAPH) 热解产生的脂 质初级代谢产物过氧自由基处理兔肉肌原纤维蛋 白 (MP), 拉曼光谱结果显示, MP 的 α-螺旋含量 下降,无规则卷曲含量上升,证实蛋白质二级结 构发生了改变。Zhou 等[11]利用拉曼光谱技术研究 发现,不同氧化程度油脂对鱼肌原纤维蛋白结构 有影响,油脂氧化程度越高,蛋白质的α-螺旋含 量越低。Laurent等^[12]使用 RS 法对天鹅、鸥、绿 头鸭和红隼4种鸟类的拉曼光谱酰胺 I 区进行分 析,发现相对于蛋白质侧链成分,β-折叠结构在 内部和外部区域之间减少。林婉玲等[13]研究发现, 拉曼谱带的酰胺 I 带 (1 640~1 680 cm⁻¹) 能够反映 蛋白质二级结构信息这个频段内主要发生了 C=O 平面的伸缩振动、C-N 拉伸以及 N-H 平面内弯曲, 这些化学键内的氢键性质变化代表了脆肉草鱼鱼 肉蛋白质二级结构信息的改变。张玉林[14]研究发 现,色氨酸残基的暴露是氧化增加蛋白质表面疏 水性的重要原因之一,其位于拉曼光谱中的指认 波段为 760 cm⁻¹。

本研究采用拉曼光谱技术,以脆肉草鱼为对 象,获取脆肉草鱼的拉曼光谱,采用 PCA 方法对 脆肉草鱼脆度进行定性分析;采用卷积平滑 (savitzky-golay smoothing, SG)、峰面积归一化 (area normalization,以下简称 Normalize)、标准正 则变换(standard nor-mal variable, SNV)、多元散 射校正 (multiple scattering correction, MSC)这4 种方法对拉曼光谱进行预处理,采用偏最小二乘 回归分析法 (partial least squares regression, PLSR)、 支持向量回归 (support vector regression, SVR)、BP 神经网络 (back propagation neural network, BPNN) 这3种方法建立模型,对脆肉草鱼脆度进行定量 分析,为脆肉草鱼脆度检测提供新方法。

1 材料与方法

1.1 样品制备

在 2020 年 7—12 月,从广东中山脆肉草鱼 某养殖场获得不同脆化时间的脆肉草鱼活体共 40 条,鱼体长 62~78 cm,体质量 6~9 kg,宰杀后, 取平行于胸鳍外侧及中线以上的两侧背肌 (图 1-a), 长约 10 cm,自来水清洗干净,去鳞、去皮,削 除肌肉表面的红肉。每块背肌大致切割成 10 cm× 1.5 cm×1.5 cm(长×宽×厚)长方体样品,再在每块 样品表面轻轻割取 5 片 2 cm×1.5 cm×0.2 cm(长× 宽×厚)薄片,用于拉曼光谱检测,剩下的长方体 样品用于质构剖面分析法 (texture profile analysis, TPA) 检测 (图 1-b)。

1.2 数据采集和分析

质构数据采集 质构检测采用质构仪 (TMS-Pro,美国),力量感应元 500 N。实验采用 直径为 6 mm 圆柱形不锈钢探头,设置触发力为 0.75 N,测试速度为 30 mm/min,形变率为 35%, 取脆肉草鱼样品从鱼头向鱼尾方向依次进行 TPA 模式检测,每个样品采集 5 个位点,每个位点测 试 2 次 (图 1-b),最后取平均值进行分析,脆度值 由质构仪配套的 TMS-Pro 物性分析系统读取和 计算。

拉曼光谱数据采集 拉曼光谱数据采集采 用共聚焦拉曼光谱仪 (HORIBA,法国),每个样 品割取一层脆肉草鱼背部鱼肉薄片并放在载玻片 上,聚焦清晰后进行光谱采集,每个薄片采集两 次。实验参数:50×倍物镜,532 nm 激光器激发 线,曝光时间 10 s,循环 3 次,波长范围 400~ 4 000 cm⁻¹,光栅为 1 200 线 (750 nm),滤光强度 25%,光阑 100, Hole 为 300。

光谱数据分析 采用 NGSLabSpec_5 和
PeakFit v4.12 软件进行光谱处理与分峰拟合分析、
采用 Origin 2018 b 软件进行 PCA 分析和模型图绘制,采用 matlab 2017 b 软件和 Unscrambler X 10.4
软件进行建模分析。

1.3 算法描述

在光谱分析中,预测因子和光谱变量高度相关,而偏最小二乘回归分析法 (partial least squares



图1 脆肉草鱼样品采集图



regression, PLSR)^[15]的自变量和因变量均有两种 或以上, PLSR 作为一种被广泛使用的多元统计方 法,集中了相关分析、多元线性回归分析和主成 分分析的优点,通过将 X 和 Y 投影到一个新的空 间,将预测 Y (脆度)的变量与预测因子 X 联系起 来。Y 的预测是通过从预测因子 X 中提取一组被 称为"潜在变量"的正交因子来获得的,这些潜在 变量具有最好的预测能力,并使 X 和 Y 之间的协 方差最大,将 X 和 Y 分解为因子得分和因子负荷, 从而使用 X 变量中最相关的部分进行回归,而不 相关的噪声信息则被忽略^[16]。PLSR 能够灵活地解 决样本个数少于变量个数以及 X 值之间存在的多 重共性的问题^[17]。公式:

$$Y = XB + E \tag{1}$$

式中, *Y*为相应矩阵, *X*为光谱矩阵, *B*为回归系数矩阵, *E*为误差矩阵, 通过因子分析和回归分析寻求出最优的 *B*和最小误差 *E*,同时对 *X*和 *Y*进行主成分分析,获取潜在的目标变量,从而实现数据模型定量分析^[17]。

支持向量回归 (support vector regres-sion, SVR)^[18] 是支持向量机概念的扩展, SVR 主要是在 *M* 维空 间中通过一个超平表面进行数据划分, 当遇到线 性不可分的数据时, 巧妙通过引入核函数的方法 将样本映射到一个高维特征空间, 经过处理的样 本数据实现线性可分^[19-20]。SVR 采用与人工神经 网络相同的数据量 (80% 训练, 20% 测试), 训练 数据集以不同的输出执行 2 次。在每次运行中 使用不同的内核作为内核类型来预测。内核类 型有径向基函数、高斯函数、线性函数和指数 函数^[21]。

BP 神经网络 (back propagation neural network, BPNN)^[22] 是以 Rumelhart 和 McClelland 为首的科 学家在 1986 年提出的概念,它作为深度学习领域 应用最广泛的神经网络之一,是一种按照误差逆 向传播的多层前馈神经网络训练算法,经常被用 来处理各种类型的非线性问题。BP 神经网络通常 由输入层、输出层和几个隐含层组成,每一层由 几个节点组成,每个节点代表一个神经元,上节 点和下节点通过权值连接,各层之间的节点是完 全连接的,每一层的节点之间没有连接^[22]。本研 究采用 BP 神经网络进行监督式^[23]学习训练,通 过函数 signiod 作为传递函数,利用信号的前向 传播和误差的反向传播特征,计算误差输出时按 从输入到输出的方向进行,调整权值和阈值则从 输出到输入的方向进行^[24]。

1.4 模型评价方法

本研究应用到的模型评价指标为校正集均方 根误差 (RMSEC)、交叉验证均方根误差 (RMSE-CV) 和预测集均方根误差 (RMSEP),并且用 *R*²表 示变量对因变量的解释程度, *R*²越接近 1,相关 度越高。

2 结果

2.1 质构数据结果与分析

脆肉草鱼肌肉脆度可以通过质构检测中的硬 度、内聚性、弹性、胶黏性和咀嚼性等体现。其 中硬度表示臼齿之间或者上颚与舌头间压迫食品 的力量;内聚性表示样品内部的收缩力,数值越 大,内聚性越强;弹性表示样品恢复形变和恢复 程度: 胶黏性表示破碎胶态食物到可咀嚼状态需 要的能量; 咀嚼性表示将样品咀嚼到可吞咽状态 所需要的能量^[4]。实验根据脆肉草鱼脆化时间划 分为4类,即分别脆化0、40、80和120d,每类 选取3尾脆肉草鱼进行质构检测,其质构检测结 果及汇总分析如表1所示。不同脆化时间脆肉草 鱼个体之间的硬度、弹性、胶黏性和咀嚼性都有 显著差异 (P<0.05), 内聚性没有显著差异 (P> 0.05)。脆化时间相同的脆肉草鱼个体硬度差异不 大, 脆化时间不同的脆肉草鱼个体硬度差异明显; 脆化0d和脆化120d的脆肉草鱼硬度差异显著, 脆化0d和40d、80d的脆肉草鱼个体硬度有一定 区分度,但是显著性不高, 脆化 0 d 和 40 d 的硬 度差异最低。脆肉草鱼脆化 0 d 与 40 d、80 d、120 d 的弹性差异显著,但是脆化 40 d、80 d 和 120 d 的弹性差异不显著。脆肉草鱼的胶黏性和咀嚼性 差异表现相似,从个体看,脆化 0 d 与 40 d没有 区分度,脆化 80 d 与 120 d 没有区分度,从总体 看,脆化 0 d 与 40 d 区分不显著,而脆化 80 d 和 120 d 区分显著。因此,硬度、胶黏性和咀嚼性是 脆肉草鱼脆度的重要指标,这与现有的研究一致^[4, 25],其中硬度应用于脆肉草鱼不同个体区分度更 加清晰,本研究主要以硬度特性表征脆肉草鱼的 脆性特征,并分析其与拉曼光谱的相关性。

2.2 拉曼光谱数据分析

拉曼光谱是一种快速无损的光谱检测技术^[7], 其空间分辨率为 0.5~1.0 μm 量级。其原理是依赖 拉曼散射效应,当光子以 *w*₀ 能量照射到样品上, 分子会吸收能量产生分子振动或者转动,使其处 于激发态 *E*₁,不同化学键或者官能团的 Δ*E* 不一 致^[26],从而产生不同频段的波峰。可以通过不同 频段的波峰来分析样品中分子成分的化学键或者 基团。不同脆化时间脆肉草鱼的拉曼光谱图如 图 2 所示,谱带中各频段变化代表了脆肉草鱼的

表1 脆肉草鱼质构检测结果

天数/d days	硬度/N hardness	内聚性 cohesiveness	弹性/mm elasticity	胶黏性/N adhesiveness	咀嚼性/mJ chewiness
0 _{A1}	16.18±0.53 ^g	0.46±0.19ª	3.87±0.41 ^{cd}	9.10±3.73 ^b	32.68±6.94 ^b
0 _{A2}	18.72±0.49 ^{fg}	0.45±0.05ª	$3.42{\pm}0.07^{d}$	$8.41{\pm}1.08^{b}$	28.82 ± 3.89^{b}
0 _{A3}	19.45±1.12 ^{efg}	$0.51{\pm}0.07^{a}$	3.94±0.24 ^{cd}	8.24±1.32 ^b	36.19±18.74 ^b
40_{B1}	21.33±1.39 ^{def}	0.40±0.02ª	3.59±0.12 ^{cd}	8.75±0.79 ^b	38.43±9.16 ^b
40_{B2}	22.59±0.72 ^{cde}	$0.41{\pm}0.08^{a}$	4.30±0.11 ^{ab}	8.56±1.54 ^b	31.43±2.22 ^b
40_{B3}	23.89±1.01 ^{cd}	0.40±0.10 ^a	4.42 ± 0.17^{ab}	8.65±1.76 ^b	36.88 ± 7.08^{b}
80 _{C1}	26.17±0.64 ^{bc}	0.50±0.03ª	4.33±0.11 ^{ab}	13.09±1.11 ^{ab}	56.69±6.04a ^b
80 _{C2}	27.82±2.16 ^b	0.43±0.05ª	4.51±0.27 ^{ab}	11.43 ± 1.42^{ab}	51.63±8.05a ^b
80 _{C3}	28.16±1.13 ^b	$0.45{\pm}0.08^{a}$	4.89±0.15 ^a	11.09±2.01 ^{ab}	54.53±11.32a ^b
120 _{D1}	35.37±0.23ª	$0.42{\pm}0.08^{a}$	4.14±0.27 ^{bc}	14.14±1.99 ^{ab}	58.23±5.81a ^b
120 _{D2}	35.51±1.05ª	0.45±0.06ª	4.64±0.20 ^{ab}	15.68±2.68ª	73.00±14.94ª
120 _{D3}	35.75±1.45ª	$0.43{\pm}0.00^{a}$	4.69±0.10 ^{ab}	14.49±1.29 ^{ab}	68.18±7.22 ^a
0 _{A总}	17.89±2.23 ^d	0.43±0.11ª	3.90±0.36 ^b	7.99±2.05°	31.56±10.18°
40 _{B总}	22.46±1.37°	0.43±0.069ª	4.13±0.48 ^{ab}	9.18±2.03°	38.09±11.42°
80 _{C总}	27.30±1.37 ^b	$0.41{\pm}0.07^{a}$	4.37±0.52 ^a	11.34±1.95 ^b	49.79±11.58 ^b
120 _{D总}	32.86±1.78 ^a	$0.41{\pm}0.09^{a}$	4.31±0.22ª	13.97±1.87 ^a	60.23±9.33ª

Tab. 1 Analysis of crispy C. idella texture detection results

注: A~D分别为催化时间0、40、80和120 d, A1~A3分别代表0天不同样本,以此类推,图3同。上标不同字母代表同一指标的两组数据之间存在显著差异 (P<0.05)

Notes: A-D represent the embrittlement time 0, 40, 80 and 120 d, respectively. A1-A3 represent different samples at day 0, and so on, the same as Fig. 3. Different lowercase letters represent the significant difference between the two groups of data with the same index (P<0.05)

脆肉草鱼 (图 2)。脆肉草鱼蛋白质结构中的拉曼光

肉草鱼的脆度检测,对不同脆化时间的脆肉草鱼

拉曼光谱 (700~1 800 cm⁻¹) 进行主成分分析, 脆肉

草鱼拉曼光谱的前5个主成分的特征值占总方差

的百分比分别为 79.37%、6.14%、4.72%、3.63%

为进一步探究拉曼光谱谱带是否适用于对脆

谱振动频率以及振动模式如表2所示[27-28]。

和 2.43%,累计达到了 96.28%。从主成分分析图 可知,不同脆化时间有比较明显的区分度,0、 40 和 80 d之间有区分度但不是特别明显,0、40、 80 与 120 d之间的重合度都不高,能明显将 120 d 分离,其中 0 和 120 d的区分度明显,重合部分 少(图 3),这与质构分析结果基本一致,说明拉曼 光谱能够应用于脆肉草鱼脆度鉴别。

2.3 脆肉草鱼蛋白质二级结构的变化分析

酰胺 I 带的振动主要位于拉曼光谱谱带 1 640~ 1 680 cm⁻¹ 处,这个频段内主要发生了 C=O 平面的伸缩振动、C-N 拉伸以及 N-H 平面内弯曲^[29-30],



图 2 不同脆化时间脆肉草鱼的拉曼光谱图

Fig. 2 Raman spectra of crispy C. idella with different crisping time

表 2	脆肉草鱼蛋白质结构中的部分拉曼光谱振动模式
1X 4	加内半鱼蛋白灰油与丁的的力量支化自服药医药

Fab. 2 Pa	art of the Raman	spectrum	vibration	mode in th	e protein	structure of	crispy	C. idella
-----------	------------------	----------	-----------	------------	-----------	--------------	--------	-----------

谱带来源 specband source	波数/cm ⁻¹ wave number	官能团或化学键指认 functional group	结构信息 structural information	
色氨酸 tryptophan	760	吲哚环	包埋的残基,对极性环境敏感	
酪氨酸 tyrosin	850/830	费米共振	苯酚-OH的状态	
苯丙氨酸 phenylalan	1 006	breathe环	构象不敏感;可作为内标	
天冬氨酸、谷氨酸 aspartic and glutamic acids	1 400~1 430	COO-的C=O伸缩振动	离子化羧基	
脂肪族氨基酸 aliphatic residues	1 450、1 465	C—H弯曲振动	微环境、极性	
酰胺 I 带 amide I band	1 645~1 660	酰胺C=O伸缩振动,N-H摇摆振动	α-螺旋	
	1 660~1 665		无规则卷曲	
	1 665~1 680		β-折叠	
酰胺Ⅲ带 amide Ⅲ band	>1 275	N-H面内弯曲振动,C-N伸缩振动	α-螺旋	
	1 230~1 240		β-折叠	
	1 241~1 249		无规则卷曲	



Fig. 3 PCA analysis of Raman spectra

这些化学键的氢键性质变化代表脆肉草鱼蛋白质 二级结构信息的变化。其中1645~1660 cm⁻¹为α-螺旋、1660~1665 cm⁻¹为无规则卷曲、1665~1680 cm⁻¹为β-折叠^[31]。采用去卷积处理结合曲线拟合 方法对酰胺 I 带的拉曼光谱条带进行分峰拟合处 理,其蛋白质二级结构变化如图4所示。不同脆 化时间的蛋白质二级结构有明显区别,脆化0d 的蛋白质二级结构中,α-螺旋占比最多,相对含 量占73%,随着脆化时间增加,α-螺旋占比逐渐 减少,脆化120d下降到49%;β-折叠占比和α-螺 旋相反,随着脆化时间增加,占比增大,脆化 120d比0d增加了大约14%;无规则卷曲在脆化 初期变化较大,由20%增加到33%,脆化40d后, 具有一定的增大趋势,但变化不明显。





2.4 建模与分析

光谱预处理 为了排除原始光谱采集过程 中受设备、环境、样本制作等因素产生的基线漂 移和光谱噪音,实验采用 SG、SNV、MSC和 Normalize 这4种方法对光谱数据进行预处理,其 结果如图 5 所示。

经过 SG 预处理的拉曼光谱变得平滑,但是 光谱基线漂移仍然没有被消除,各波段的特征峰 不明显 (图 5-a);经过 MSC 和 SNV 预处理的效果 比较相似,波谱变得更加紧凑,特征峰清晰,光 散射被消除,但是 500~800 cm⁻¹ 波段的噪音变大, 波谱区分度不高,说明这两种方法在一定程度上 消除了基线漂移和光散射干扰 (图 5-b, c);经过 Normalize 预处理的拉曼光谱更加紧密有序,基线 干扰被消除,特征峰信号较强但是不如 MSC 和 SNV 的特征峰信号强 (图 5-d)。采用 PLS 建模方 法,对4种预处理方法处理后的光谱进行建模, 选出一种最优预处理方法 (表 3)。

与原始光谱相比,SG、MSC、SNV和 Normalize 的预处理效果都有一定程度提高(表 3),说 明这 4 种预处理方法可修正拉曼光谱的基线平移 并消除噪音,其中 SG 的预处理效果最弱。MSC、 SNV 预处理的交叉验证集 *R*²_{CV}非常接近,都约 为 0.69,SNV 预处理的测试集 *R*²_P 略低,为 0.67。 经过 Normalize 预处理后,预测集决定系数 *R*²_P上 升了 0.09,达到 0.73,为 4 种预处理方法中最高, 均方根误差 RMSEP 下降了 1.01,达到 2.33,为 4 种预处理方法中最低,说明 Normalize 预处理方法 能够有效提高脆肉草鱼脆度预测模型的准确度。

预测模型的建立 本研究采用 PLS、SVR 和 BPNN 这 3 种建模方法建立脆肉草鱼脆度预测 模型,建模过程中随机选取三分之二的样本作为 校正集,其余样本作为检测集。为了提高模型准 确度,采用 4 折交叉验证法进行模型调优,PLS、 SVR 和 BPNN模型性能比较情况如表 4 所示。

SVR 模型建模效果较好,决定系数 R_P^2 和 RMSEP 分别为 0.78 和 2.26,相对于 PLS 模型分 别改善了 0.05 和 0.07,因此,SVR 模型优于 PLS 模型。神经网络模型 BPNN预测集 RMSEP 为 1.96,在 3 种模型中最低,决定系数 R_P^2 为 0.83,在 3 种模型中最高 (表 4),因此,BPNN 模型优于 SVR 和 PLS 模型,能够显著提高脆肉草鱼脆度预测模型的准确性。



Fig. 5 Raman spectra pretreatment of crispy C. idella

(a) SG, (b) MSC, (c) SNV, (d) Normalize

Tab. 3 Comparison of the effects of the four pretreatment methods

预处理	模型 model -	校正集 calibration set		交叉验证集 cross validation set		预测集 prediction set	
pretreatment		RMSEC	$R^2_{\rm C}$	RMSECV	$R^2_{\rm CV}$	RMSEP	R^2_{P}
无 no pretreatment	PLS	2.95	0.75	3.12	0.63	3.34	0.64
SG	PLS	2.84	0.79	3.04	0.66	3.15	0.69
MSC	PLS	2.25	0.82	2.39	0.69	2.83	0.71
SNV	PLS	3.44	0.73	3.29	0.68	3.53	0.67
Normalize	PLS	2.24	0.85	2.26	0.72	2.33	0.73

注: RMSEC为校正集均方根误差, RMSECV为交叉验证均方根误差, RMSEP为预测集均方根误差。 R^2_C 为校正集决定系数, R^2_{CV} 为交叉验证 决定系数, R^2_p 为预测集决定系数, 下同 Notes: RMSEC is the correction set root mean square error, RMSECV is the cross validation root mean square error, RMSEP for the prediction set root mean square error. R^2_C is the correction set determination coefficient, R^2_{CV} is the cross validation determination coefficient, R^2_p for the prediction set determination coefficient, the same below

46卷

Tab. 4Performance comparison of PLS, SVR and BPNN models								
模型	校正 calibrati	集 on set	交叉验证集 cross-validation set		预测集 forecast set			
model	RMSEC	$R^2_{\rm C}$	RMSECV	$R^2_{\rm CV}$	RMSEP	R^2_{P}		
PLS	2.24	0.85	2.31	0.72	2.33	0.73		
SVR	1.51	0.88	2.01	0.73	2.26	0.78		
BPNN	1 43	0.91	1 70	0.78	1.96	0.83		

表 4 PLS、SVR 和 BPNN 模型性能比较

3 讨论

通过质构检测结果,发现不同脆化时间的脆 肉草鱼脆度存在差异,其主要原因是由于脆化过 程中鱼肉蛋白质含量和二级结构发生变化。通过 脆肉草鱼蛋白质结构中的部分拉曼光谱振动模式表 (表 2) 和 PCA (图 3) 分析可知, 拉曼光谱能够快速 检测肉类中的蛋白质二级结构和氨基酸组成成分 变化。本研究中通过分析不同脆化时间脆肉草鱼 拉曼光谱谱带信息及蛋白质二级结构含量可知, α-螺旋含量与脆肉草鱼脆性成负相关关系, B-折叠 与脆肉草鱼脆性成正相关关系, 文献表明这与蛋 白质组分中的脯氨酸和甘氨酸相关,由于这两种 氨基酸的侧链上缺少取代基团以及由脯氨酸参与 形成的肽键的角度限制等特殊因素,构成了不利 于形成 α-螺旋的条件^[32-33]。同时文献表明脆肉草 鱼在生长过程中会发生蛋白质结构的变化,而且 蛋白质在变性过程中会发生热变性,蛋白质需要 吸收热量来破坏分子间的相互作用力,这使得蛋 白质具有更高的焓和稳定性^[34]。另外脆肉草鱼的 疏水性氨基酸会随着脆化时间的延长而增加,二 硫键也会随之增加[33],导致脆肉草鱼的蛋白质结 构更加稳定。

通过本研究建立的脆肉草鱼脆度与拉曼光谱 关系模型评价指标发现,Normalize 预处理方法优 于 SG、MSC 和 SNV,说明Normalize 在处理拉曼 光谱数据的基线漂移和噪音波动问题方面更有效。 通过比较 3 种建模效果发现,BPNN 模型的建模 效果优于 PLS 和 SVR,这主要是 PLS 和 SVR 对于 处理光谱信息这类非线性数据信息的能力不强, 而 BPNN 具有较强的自学能力和自适应能力,能 够通过学习提取出数据间的规则。

脆肉草鱼的物理特性(脆度)由脆肉草鱼的生 化特性(蛋白质含量及二级结构)决定,采用质构 仪可以检测脆肉草鱼的物理特性,拉曼光谱能够 反映样品中非极性基团振动的变化,从而反映氨 基酸残基和蛋白质二级结构信息。脆肉草鱼拉曼 光谱图由光谱波数与光谱强度组成,将拉曼光谱 谱带信息作为输入,采用 BP 神经网络自动提取 表征脆肉草鱼脆度特征,找出鉴别不同脆度的光 谱图差异特征,建立脆度预测模型,可以有效检 测脆肉草鱼脆度,同时也可为其他肉制品脆度检 测提供新的理论依据。

4 结论

不同脆化时间的脆肉草鱼脆度存在差异,其 主要原因是由于脆化过程中鱼肉蛋白质含量和二 级结构发生了变化,蛋白质二级结构中的α-螺旋 随着脆化时间增加而减少,β-折叠随着脆化时间 增加而增加,无规则卷曲在脆化初期变化较大, 脆化 40 d 后,变化不明显。700~1 800 cm⁻¹ 波段 的拉曼光谱能够反映蛋白质的二级结构,并能够 应用于不同脆化时间脆肉草鱼脆度鉴别。本研究 采用 SG、MSC、SNV 和 Normalize 这 4 种方法对 拉曼光谱进行预处理,结果显示 Normalize 预处理 方法效果最优。采用 PLS、SVR 和 BPNN 这 3 种 建模方法建立脆肉草鱼脆度预测模型,结果显示 SVR 模型取得较好的效果,决定系数 R^2_P 和 RMSEP 分别为 0.78 和 2.26, 相对于 PLS 模型, 分别改善 了 0.05 和 0.07。经过 Normalize 预处理后的光谱 数据结合 BPNN 算法得到的模型预测效果最好, 预测集 RMSEP 为 1.96, 预测集决定系数 R^2_P 为 0.83、因此、采用基于 Normalize-BPNN 建立脆肉 草鱼脆度预测模型,可以实现脆肉草鱼脆度的定 性分析和定量检测。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] 谭乾开,黎华寿. 脆化草鱼(Ctenopharyngodon idellus
 C. et V)的病理生理生态学[J]. 生态学报, 2006, 26(8):
 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

2749-2756.

Tan Q K, Li H S. Preliminary study on the ecology, physiology and pathology of crisped grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V)[J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(8): 2749-2756 (in Chinese).

- [2] 林婉玲,杨贤庆,李来好,等. 脆肉鲩质构与感官评价的相关性研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(1): 1-7,72.
 Lin W L, Yang X Q, Li L H, *et al.* Research of relationship between texture and sensory evaluation of crisp grass carp[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(1): 1-7,72 (in Chinese).
- [3] Bourne M C. Food texture and viscosity: concept and measurement[M]. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2002.
- [4] 伍芳芳,林婉玲,李来好,等.草鱼脆化过程中肌肉胶 原蛋白、矿物质含量和脂肪酸组成变化[J].食品科学, 2015,36(10):86-89.

Wu F F, Lin W L, Li L H, *et al.* Changes in muscle collagen content, mineral contents and fatty acid composition of grass carp during crisping process[J]. Food Science, 2015, 36(10): 86-89 (in Chinese).

- [5] Bourne M C. Texture profile analysis[J]. Food Technology, 1978, 32: 62-66.
- [6] 丁莫,林婉玲,李来好,等.紫苏叶水提物对调理脆肉 鲩鱼片冷藏过程中品质的影响[J].食品工业科技, 2017,38(23):250-255.

Ding M, Lin W L, Li L H, *et al.* Effect of water extract from perilla leaf on the quality changes of prepared crisp grass carp fillets during chilling storage[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(23): 250-255 (in Chinese).

- [7] Chen H Y, Han M Y. Raman spectroscopic study of the effects of microbial transglutaminase on heat-induced gelation of pork myofibrillar proteins and its relationship with textural characteristics[J]. Food Research International, 2011, 44(5): 1514-1520.
- [8] 李可, 闫路辉, 赵颖颖, 等. 拉曼光谱技术在肉品加工 与品质控制中的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40(23): 298-304.

Li K, Yan L H, Zhao Y Y, *et al.* Recent progress in application of Raman spectroscopy in meat processing and quality control[J]. Food Science, 2019, 40(23): 298-304 (in Chinese).

[9] Bauer A, Scheier R, Eberle T, *et al.* Assessment of ten-中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries derness of aged bovine gluteus medius muscles using Raman spectroscopy[J]. Meat Science, 2016, 115: 27-33.

[10] 陈晓思, 贺稚非, 王泽富, 等. 过氧自由基对兔肉肌原
 纤维蛋白理化性质及结构的影响[J]. 食品与发酵工业,
 2021, 47(8): 54-61.

Chen X S, He Z F, Wang Z F, *et al.* The effect of peroxyl radicals on the physicochemical properties and structure of rabbit meat myofibril protein[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(8): 54-61 (in Chinese).

- [11] Zhou X X, Chen H, Lyu F, *et al.* Physicochemical properties and microstructure of fish myofibrillar proteinlipid composite gels: effects of fat type and concentration[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 90: 433-442.
- [12] Laurent C M, Dyke J M, Cook R B, *et al.* Spectroscopy on the wing: investigating possible differences in protein secondary structures in feather shafts of birds using Raman spectroscopy[J]. Journal of Structural Biology, 2020, 211(1): 107529.
- [13] 林婉玲, 王瑞旋, 王锦旭, 等. 脆肉鲩不同部位肌肉的 质构特征分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(3): 211-218.
 Lin W L, Wang R X, Wang J X, *et al.* Texture analysis of different parts of mucsles in crisp grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V)[J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(3): 211-218 (in Chinese).
- [14] 张玉林. 宰后活性氧簇 (ROS) 的形成对鹅肉品质影响 机制的研究 [D]. 宁波: 宁波大学, 2014.
 Zhang Y L. The mechanism of the influence on meat quality of goose muscle caused by the generation of reactive oxygen species (ROS) after slaughter[D].
 Ningbo: Ningbo University, 2014 (in Chinese).
- [15] Tenenhaus M, Vinzi V E, Chatelin Y M, et al. PLS path modeling[J]. Computational Statistics & Data Analysis, 2005, 48(1): 159-205.
- [16] Wold S, Sjöström M, Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics[J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2001, 58(2): 109-130.
- [17] Pérez-Enciso M, Tenenhaus M. Prediction of clinical outcome with microarray data: a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) approach[J]. Human Genetics, 2003, 112(5-6): 581-592.
- [18] Vapnik V. The support vector method of function estimation[M]//Suykens J A K, Vandewalle J. Nonlinear Modeling. Boston: Springer, 1998: 55-85.
- [19] Khan S, Ullah R, Khan A, et al. Analysis of dengue https://www.china-fishery.cn

infection based on Raman spectroscopy and support vector machine (SVM)[J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(6): 2249-2256.

- [20] Zhang Y, Dai M L, Ju Z M. Preliminary discussion regarding SVM kernel function selection in the twofold rock slope prediction model[J]. Journal of Computing in Civil Engineering, 2016, 30(3): 04015031.
- [21] Najm S M, Paniti I. Predict the effects of forming tool characteristics on surface roughness of aluminum foil components formed by SPIF using ANN and SVR[J]. International Journal of Precision Engineering and Manufacturing, 2021, 22(1): 13-26.
- [22] Su L, Fu L H. Regional land planning based on BPNN and space mining technology[J]. Neural Computing and Applications, 2021, 33(10): 5241-5255.
- [23] 付泰然,刘广鑫,万全元,等.基于栈式自编码BP神经 网络预测水体亚硝态氮浓度模型[J].水产学报,2019, 43(4):958-967.

Fu T R, Liu G X, Wan Q Y, *et al.* Establishment of a water nitrite nitrogen concentration prediction model based on stacked autoencoder-BP neural network[J]. Journal of Fisheries of china, 2019, 43(4): 958-967 (in Chinese).

[24] 来纯晓,武振国,金松林,等.基于BP神经网络的小麦 抗寒性模型构建[J].河南科技学院学报(自然科学版), 2019,47(3):72-78.

Lai C X, Wu Z G, Jin S L, *et al.* Construction of wheat cold resistance model based on BP neural network[J]. Journal of Henan Institute of Science and Technology (Natural Science Edition), 2019, 47(3): 72-78 (in Chinese).

- [25] 郁二蒙,谢骏,卢炳国,等. 脆肉鲩与普通草鱼肌肉显 微结构观察[J]. 南方农业学报, 2014, 45(4): 671-675.
 Yu E M, Xie J, Lu B G, *et al.* Microstructure of muscles between crisp grass carp and common grass carp[J]. Journal of Southern Agriculture, 2014, 45(4): 671-675 (in Chinese).
- [26] 陈倩,李沛军,孔保华. 拉曼光谱技术在肉品科学研究中的应用[J]. 食品科学, 2012, 33(15): 307-313.
 Chen Q, Li P J, Kong B H. Application of Raman spectroscopy technique in meat science: a review[J]. Food Science, 2012, 33(15): 307-313 (in Chinese).

- [27] Herrero A M. Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: a review[J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1642-1651.
- [28] Herrero A M, Carmona P, Cofrades S, et al. Raman spectroscopic determination of structural changes in meat batters upon soy protein addition and heat treatment[J]. Food Research International, 2008, 41(7): 765-772.
- [29] Alix A J P, Pedanou G, Berjot M. Fast determination of the quantitative secondary structure of proteins by using some parameters of the Raman amide I band[J]. Journal of Molecular Structure, 1988, 174: 159-164.
- [30] Herrero A M, Cambero M I, Ordóñez J A, et al. Raman spectroscopy study of the structural effect of microbial transglutaminase on meat systems and its relationship with textural characteristics[J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 25-32.
- [31] 郑红,苏现波,马良,等.不同冷藏时间的鳝鱼肉经熟 化后质构特性变化及其机理[J]. 食品科学,2018, 39(23):199-204.

Zheng H, Su X B, Ma L, *et al.* Effect and underlying mechanism of cold storage on textural properties of cooked *Monopterus albus*[J]. Food Science, 2018, 39(23): 199-204 (in Chinese).

- [32] 阎隆飞, 孙之荣. 蛋白质分子结构 [M]. 北京: 清华大学 出版社, 1999.
 Yan L F, Sun Z R. Protein molecular structure[M].
 Beijing: Tsinghua University Press, 1999 (in Chinese).
- [33] 朱志伟,李汴生,阮征,等. 脆肉鲩鱼肉与普通鲩鱼鱼 肉理化特性比较研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(2): 109-112,119.

Zhu Z W, Li B S, Ruan Z, *et al.* Differences in the physicochemical characteristics between the muscles of *Ctenopharyngodon idellus* C. et V and *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(2): 109-112,119 (in Chinese).

[34] Lin W L, Zeng Q X, Zhu Z W, et al. Relation between protein characteristics and TPA texture characteristics of crisp grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Texture Studies, 2012, 43(1): 1-11.

Muscle crispness of crispy grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) based on Raman spectroscopy

YANG Ling^{1,2}, WANG Qingxiu¹, YANG Hang¹, SHI Zechen¹, SU Liheng¹, WU Ting^{1,2}, LIN Li^{2*}, ZOU Juan^{1*}

(1. Guangdong Provincial Food Safety Traceability and Control Engineering Technology Research Center,

School of Information Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center,

Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Science & Technology,

Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Crispness is one of the most important indexes for Ctenopharyngodon idella. Over-crispy C. idella will show hemolysis, hypoxia and pathological changes of some organs. Therefore, it is urgent to develop method to detect the crispness of C. idella. In this paper, a method based on Raman spectroscopy was proposed to detect the crispness of C. idella. Firstly, the Raman spectra of C. idella with different crisping time were analyzed by PCA method. The results showed that Raman spectroscopy could be used to identify the crispness of crispy C. idella with different crisping time. Additionally, with the extension of the crisping time, the α -helix of the total protein in the muscle of crispy C. *idella* was decreased, while the β -fold of the total protein in the muscle of crispy C. *idella* was increased. In terms of irregular curl of the total protein in the muscle of C. idella, obvious changes were observed at the early stage, but not at the late stage of crisping. Secondly, four preprocessing methods, including SG, SNV, MSC and Normalize, were used to preprocess the Raman spectrum data. It was found that Normalize method had the optimal preprocessing effect, with RMSEP of 2.33 and $R^2_{\rm P}$ of 0.73. Thirdly, PLSR, SVR and BPNN were used to establish the relationship model between crispness and Raman spectrum information from the muscle of C. idella. The RMSEP of the prediction set was 2.33, 2.26 and 1.96, respectively, and the $R^2_{\rm P}$ of the prediction set was 0.73, 0.78 and 0.83, respectively. Apparently, the BPNN model was the optimal one. Taken together, our results showed that the Normalized-BPNN prediction model based on Raman spectroscopy could effectively detect the crispness of C. idella. This study paves a new way for C. idella muscle crispness detection methods in the future.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; brittleness; Raman spectroscopy; Normalize-BPNN model; protein secondary structure

Corresponding authors: LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn;

ZOU Juan. E-mail: 44497519@qq.com

Funding projects: R & D Projects in Key Areas of Guangdong Province (2021B0202030001, 2019B020215001); Key R & D Projects in Guangzhou (202103000067, 201803020033, 202002030154); Huadu District Fishery Industrial Park Project (21302156); National Natural Science Foundation of China (31872606); Special Program for Key Areas of Rural Revitalization of Guangdong Provincial Department of Education (2020ZDZX1060); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2018A0303130034, 2020A1515010834); Innovation Project of Guangdong Provincial Department of Education for Strengthening School Characteristics (2018KTSCX096); Guangdong Provincial Science and Technology Plan Project (2017A020225042); Special Project for Innovation Team Construction of Modern Agricultural Industrial Technology System in Guangdong Province (2019KJ141, 2020KJ138)