基于水解氨基酸分析山羊肉的产地溯源

刘兴勇，林涛，刘宏程，邵金良，何丽忠，黎其万，陈兴连，汪禄祥
（云南省农业科学研究院质量标准与检测技术研究所，农业部农产品质量监督检验测试中心，云南昆明 650223）

摘要：探讨氨基酸含量分析对羊肉产地溯源的可行性。对 50 个云南五地的黑山羊肉样品测定 17 种水解氨基酸含量，并进行方差分析、主成分分析、聚类分析、K 最邻近法及人工神经网络判别分析。不同产地山羊肉 Cys 含量无差异，其它氨基酸含量存在不同程度差异，罗平山羊除 Ala 和 Pro 外其它氨基酸最高;石林山羊 Ala 和 Met 最高；丽江、昆明山羊 Pro 最高；昆明与龙陵山羊氨基酸含量则居中下水平，二者 Glu、Phe、Lys、Arg、Pro 含量存在显著差异（P<0.05）。主成分分析和聚类分析使羊肉样品分成不同类别，与产地基本一致。K 最邻近法交叉验证对昆明样品的正确判别率为 78.58%，对丽江和石林样品的正确判别率均为 100%，整体正确判别率为 93.48%，人工神经网络对三地样品判别正确率均为 100%。对羊肉产地判别分类中人工神经网络优于 K 最邻近法。基于水解氨基酸含量分析对山羊肉产地来源的判别是有效可行的。

关键词：山羊肉；水解氨基酸；产地；判别分析

文章篇号：1673-9078(2013)11-2788-2792

Distinguishment of Goat Meat Geographical Origin Based on Amino Acids Composition

LIU Xing-yong, LIN Tao, LIU Hong-cheng, SHAO Jin-liang, HE Li-zhong, LI Qi-wan, CHEN Xing-lian, WANG Lu-xiang

(Institute of Quality Standards and Testing Technology, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Supervision & Testing Center for Farm Products Quality, Ministry of Agriculture, Kunming 650223, China)

Abstract: The feasibility of amino acids content analysis was studied for determination of the geographical origin of goat meat. The contents of 17 amino acids were detected in 50 hydrolyzed goat meat samples from five regions of Yunnan Province. By using analysis of variance (ANOVA), principal component analysis (PCA), cluster analysis (CA), K Nearest Neighbor (KNN) analysis and Artificial Neural Networks (ANN). The results showed that, except Cys, the amino acids contents were all different in the samples from different places. Especifically, all the amino acids contents besides Ala and Pro were the highest in the samples from Luoping area, while Ala and Met were the highest amino acid in those from Shilin area. And the content of Pro was the highest in those from Lijiang area and Kunming area. The Kunming and Longling samples had lower amino acids contents than the other samples , and these samples from the two sources showed significant differences ($P<0.05$) in Glu, Phe, Lys, Arg and Pro contents.. PCA and CA classified the samples into different categories, which was almost consistent to the geographical origin. The KNN accuracy with cross-validation test reached 78.58% in Kunming samples, 100% in Lijiang samples 100% in Shilin samples as well as 93.48% in all samples. ANN provided the best results in classifying geographical origin, showing 100% accuracy in samples from Kunming, Lijiang and Shilin. Therefore, it is feasible to determine the geographical origin of goat meat by the amino acids content analysis.

Key words: goat meat; hydrolysis amino acids; geographical origin; discriminant analysis

我国多山地，山羊品种资源丰富，饲养量居世界首位，大多形成具有地方特色的地理标识产品。近年来随着人们物质生活水平的提高，对羊肉消费需求和品质一直呈增长趋势。消费者在购买羊肉时主要关注的是羊的饲养方式，以达到对品质的保证[1]，可见羊的饲养环境倍受关注。但是目前我国畜禽溯源体系还不完善，各种畜禽疾病威胁时有发生，增加了肉类食品安全风险，加之人们对绿色食品、有机食品等安全健康食品的认可，出现市场假冒，严重危害消费者利益，给特色产品造成冲击。肉类的鉴别及产地溯源已经成为 21 世纪肉品安全的挑战之一[2]，因此，畜禽产

收稿日期：2013-06-14

基金项目：公益性行业（农业）科研专项经费（201203046-5）

作者简介：刘兴勇（1985-），男，硕士，实习研究员，从事农产品品质与安全研究

通讯作者：汪禄祥（1966-），男，硕士，研究员，从事食品质量安全研究

地溯源技术的研究对解决上述问题有重要意义。

畜禽肌肉氨基酸含量与品种、性别、年龄、肌肉部位及养殖环境等因素有关，而对相同的品种和年龄，肌肉氨基酸含量受到环境影响十分显著。产地鉴别分析主要是探寻表征不同地域来源肉品的特异性指标。目前对畜禽产地溯源技术研究主要采用肌肉中矿质元素含量[3]、近红外光谱技术[4]、碳氮同位素[5]，多种指标相结合[6]及分子生物学技术[7]进行鉴定。已有研究表明利用氨基酸含量可以成功将蜂蜜[8]和葡萄酒产地[9]及茶叶的生产季节[10]、种类[11]、茶树品种[12~13]进行鉴别，而该指标对畜禽产地的鉴别研究则鲜见报道。畜禽溯源技术目前正处于完善阶段，并且不同种类食品溯源指标还未完全确定[4]。本研究拟通过分析不同地域来源羊肉水解氨基酸含量，依据其差异进行统计分类。通过探讨水解氨基酸含量对羊肉产地鉴别的可行性，为完善畜禽溯源技术提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 原料

从云南昆明、丽江、龙陵、罗平、石林 5 个山羊养殖点共采集自然放牧黑山羊样品 50 份，其中昆明 20 份，丽江 12 份，龙陵和罗平各 2 份，石林 14 份，山羊年龄在 1~2 岁。

1.2 试验方法

1.2.1 主要仪器设备及试剂

1.2.1.1 仪器

L-8800 氨基酸分析仪，日本日立公司；GM-0.33Ⅱ型隔膜真空泵，天津市津腾实验设备有限公司；101-2 型电热鼓风干燥箱，AE100 型电子分析天平，梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.2.1.2 试剂

混合氨基酸标准分析液（sigma）,浓盐酸，氢氧化钠，氯化钠，柠檬酸，柠檬酸钠，茚三酮，以纯，苯酚，无水乙酸钠。（均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司）。

1.2.2 样品制备

经屠宰后取羊臀部肌肉约 500 g 左右，装入自封袋并于-20 ℃保存备用。

1.2.3 水解氨基酸测定

新鲜样品解冻后剔除表面筋腱，切碎，经绞碎后分别称取 0.2000 g 于水解管中，加入 6 mol/L 盐酸 10 mL，将水解管抽真空，封管，在 110 ℃条件下水解 22 h，冷却后过滤，调节滤液 pH 值至中性，定容至 25 mL，取滤液与 0.02 mol/L 盐酸按 1:1 混合，混合液通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤，用日立 L-8800 氨基酸自动分析仪采用离子交换色谱-茚三酮柱后衍生法，测定样品中 Asp、Thr、Ser、Glu、Gly、Ala、Cys、Val、Met、Ile、Leu、 Tyr、Phe、Lys、His、Arg、Pro 17 种氨基酸的含量。氨基酸混合标准品购于 sigma 公司。色谱条件:标准分析柱 4.6 mm×60.0 mm，反应柱温度：57.0 ℃，反应器温度：136.0 ℃，缓冲液流速 0.40 mL/min，茚三酮溶液流速 0.35 0 mL/min，自动进样 20 μL。

1.2.4 数据处理

用 SPSS17.0 统计软件对数据进行方差分析、Duncan 多重比较分析、主成分分析（对数据进行标准化处理）、聚类分析（欧氏距离，聚类方法采用类间平均距离法）、K 最邻近法及人工神经网络（BP-ANN）进行判别分类。

2 结果与分析

2.1 新鲜羊肉中水解氨基酸含量差异

通过对 5 个地方羊肉中 17 种氨基酸含量进行方差分析结果见表 1，除 Cys 外，样品中其余 16 种氨基酸存在显著差异。罗平山羊中各氨基酸普遍较高，除 Ala 和 Pro 外显著高于（P<0.05）其它 4 个地区；石林地区山羊 Ala 和 Met 显著高于（P<0.05）其它地方；丽江、昆明山羊 Pro 显著高于（P<0.05）其它地方；昆明与龙陵地方山羊氨基酸含量则居中下水平，二者 Glu、Phe、Lys、Arg、Pro 含量存在显著差异（P<0.05）。

表 1 羊肉水解氨基酸含量(%)

Table 1 Hydrolysis amino acids content of goat meat

氨基酸	产地				
	昆明	丽江	龙陵	罗平	石林
Asp	1.02±0.08^{c}	1.25±0.10^{b}	1.09±0.04^{c}	1.60±0.06^{a}	1.06±0.01^{c}
Thr	0.53±0.06^{bc}	0.60±0.05^{b}	0.51±0.07^{bc}	0.85±0.01^{a}	0.54±0.03^{bc}
Ser	0.42±0.05^{bc}	0.50±0.03^{b}	0.35±0.08^{c}	0.76±0.03^{a}	0.38±0.03^{c}

转下页

接上页

Glu	1.76±0.21^{b}	1.96±0.45^{b}	1.64±0.15^{c}	3.05±0.20^{a}	1.75±0.02^{b}
Gly	0.55±0.06^{c}	0.64±0.03^{b}	0.58±0.07^{bc}	0.89±0.06^{a}	0.49±0.04^{c}
Ala	0.74±0.09^{c}	0.78±0.06^{c}	0.70±0.06^{c}	1.10±0.13^{b}	1.86±0.01^{a}
Cys	0.10±0.02	0.12±0.03	0.21±0.29	0.21±0.00	0.16±0.02
Val	0.67±0.08^{b}	0.69±0.07^{b}	0.64±0.03^{b}	0.91±0.02^{a}	0.68±0.04^{c}
Met	0.29±0.06^{b}	0.20±0.10^{b}	0.26±0.05^{b}	0.55±0.02^{a}	0.59±0.02^{a}
Ile	0.66±0.09^{b}	0.66±0.08^{b}	0.66±0.05^{b}	0.90±0.01^{a}	0.69±0.03^{b}
Leu	1.10±0.12^{c}	1.08±0.10^{c}	1.10±0.10^{c}	1.55±0.04^{a}	1.30±0.01^{b}
Tyr	0.40±0.04^{c}	0.42±0.05^{c}	0.37±0.04^{c}	0.68±0.04^{a}	0.59±0.02^{b}
Phe	0.52±0.05^{d}	0.59±0.12^{cd}	0.67±0.06^{bc}	0.93±0.03^{a}	0.80±0.03^{b}
Lys	1.18±0.11^{b}	1.22±0.12^{b}	0.76±0.04^{c}	1.71±0.03^{a}	1.28±0.04^{b}
His	0.43±0.04^{b}	0.45±0.06^{b}	0.41±0.03^{bc}	0.59±0.01^{a}	0.39±0.04^{bc}
Arg	0.78±0.06^{d}	0.88±0.06^{bc}	1.02±0.07^{b}	1.23±0.01^{a}	0.95±0.05^{b}
Pro	0.22±0.02^{b}	0.39±0.04^{a}	0.03±0.01^{c}	0.02±0.002^{c}	0.02±0.004^{c}

注：表中不同字母表示差异显(P<0.05)。

2.2 羊肉中氨基酸含量主成分分析

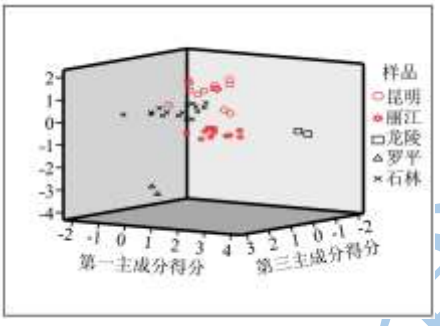


图 1 前三个主成分得分图

Fig.1 Scatter plot of the first 3 principal components

对 5 个地方存在显著差异的 16 种氨基酸进行主成分分析结果见表 2，可知前三个主成分的累计贡献率达到 83.826%。其中第一主成分主要综合了样品中 Asp、Thr、Ser、Glu、Gly、Val、Ile、Leu、Tyr、Phe 、Lys、His 12 种氨基酸含量信息，第二主成分为 pro 含量信息，第三主成分综合了 Ala、Met 含量信息。利用前 3 个主成分的标准化得分作 3D 散点图见图 1，结果表明，昆明和石林样品第一和第二主成分得分正负值均有，分布在第一和第四象限，且有部分样品重叠。龙陵和罗平羊肉样品第一主成分为正值，第二主成分为负值，分布在第二象限；丽江样品大部分第一和第二主成分得分为负，分布在第三象限。除了昆明和石林部分样品重叠，其余分离较好。第一主成分信息在罗平样品中表现最高，第二主成分为 pro 含量信息，昆明和丽江样品均表现最高。可见主成分分析与多重比较分析结果一致，能较好的综合各变量信息直观表现出来。

表 2 前 3 个主成分各变量特征向量及累计贡献率

Table 2 The eigenvectors and cumulative contribution of variance of the first 3 principal components

氨基酸	主成分		
	1	2	3
Asp	0.844	0.232	-0.317
Thr	0.930	0.242	-0.066
Ser	0.832	0.410	0.021
Glu	0.818	0.176	0.016
Gly	0.823	0.216	-0.355
Ala	0.526	-0.466	0.503
Val	0.891	0.105	-0.014
Met	0.510	-0.625	0.473
Ile	0.890	-0.079	-0.074
Leu	0.907	-0.254	0.049
Tyr	0.844	-0.213	0.360
Phe	0.710	-0.530	-0.206
Lys	0.710	0.423	0.508
His	0.814	0.246	-0.067
Arg	0.522	-0.419	-0.643
Pro	-0.043	0.893	0.216
方差贡献率/%	57.608	16.154	10.064
累计贡献率/%	57.608	73.762	83.826

2.3 羊肉中氨基酸含量的聚类分析

采用前 3 个主成分的标准化得分数据进行聚类分析，结果见图 2。对羊肉样品的分类结果与其产地来源基本一致，不同来源羊肉被聚类为一类。聚类树型图从聚类距离 15 处切断，羊肉样品来源被分为 5 大类，

昆明和石林为一类，来源为昆明的一份样品单独成为一类；其它地方来源的样品分别单独成一类。如果将树型图从聚类距离 10 以下切断，各大类基本又分为 2 小类，可能与羊肉性别来源有关。其中石林的样品包括了一份昆明的样品。以上结果与主成分分析一致，同样显示了昆明与石林部分样品的重叠。

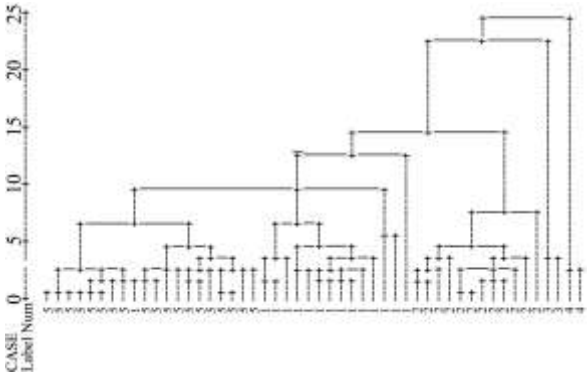


图 2 系统聚类树图

Fig.2 Dendrogram of cluster analysis

注：1-昆明；2-丽江；3-龙陵；4-罗平；5-石林。

2.4 羊肉样品 K 最邻近法分类

K最邻近法（K-nearest neighbor ，KNN）是一种应用广泛的非参数检验模式识别方法，能在多维空间中找到与未知样本最邻近的K个点而将其进行分类，参数K的取值会影响KNN模式的判别正确率，K最佳取值一般依据判别时的最低错误率确定，一般取奇数[10]。采用前3个主成分的标准化得分数据进行K最邻近法判别分析，分别取K值为3、5、7、9对样本数较多的昆明、丽江、石林三个地方进行交叉验证，结果正确率都为93.48%，其中昆明样品有3例错判为石林样品，正确率为78.58%，其余地方正确率为100%。结果见表3。

表3 使用3最邻近法的交叉验证结果

Table 3 Cross-validation results of using 3 nearest neighbor

产地	预测样本数及分类正确率			样品总数(正确率)
	昆明	丽江	石林	Total/%
昆明	11(78.58%)	0	3(21.41%)	11(78.58%)
丽江	0	12(100%)	0	12(100%)
石林	0	0	20(100%)	20(100%)
样品百分率	23.92%	26.09%	50%	93.48%

2.5 羊肉样品人工神经网络分类

人工神经网络是一种多层反向网络，可以实现输入和输出间的任意非线性映射。在基于化学成分的分类中，BP神经网络（BP-ANN）是一种有效的分类鉴别方法，基于将目标变量的预测误差最小化的函数实现输入和输出间的非线性映射，体系结构包括输入层、隐藏层、输出层。本研究利用BP神经网络模型采用3层网络拓扑结构，即17×2×3，表示以17个氨基酸变量作为输入层预测变量，隐含层为2，输出为3，即样品的三个产地，1~3分别对应产地石林、丽江和昆明。模式的训练和预测结果见表4。网络模型对训练集和预测集样品识别率都为100%，其结果好于KNN模型。

表4 ANN模型识别结果

Table 4 Discriminating results of ANN model

样品	Observed	识别结果			
		1 石林	2 丽江	3 昆明	正确率
训练集	1 石林	12	0	0	100.0%
	2 丽江	0	5	0	100.0%
	3 昆明	0	0	12	100.0%
	样品百分率/%	41.4%	17.2%	41.4%	100.0%
预测集	1 石林	2	0	0	100.0%
	2 丽江	0	7	0	100.0%
	3 昆明	0	0	8	100.0%
	样品百分率/%	11.8%	41.2%	47.1%	100.0%

云南省由于特殊的地理环境，独具特色的立体气候，94%的山区大多处于温带和亚热带，为养羊业提供了丰富的饲草饲料和种质资源[14]，加之地形复杂，同一纬度因海拔落差较大可形成不同的生态条件，“一山分四季，十里不同天”，小区域气候明显，由于山羊能适应多种气候条件，在任何一个小区域范围内都可立体分布，形成区域规模养殖，大多数山羊都是自然放养，许多地方存在封闭饲养长达数十年的羊群，形成其独特的品质特征。这可能是能够对其进行产地鉴别的重要原因。氨基酸与多元素分析等指标一样对畜禽产地鉴别能力有一定局限性，为得到准确的结果，需要获得大量与产地有关的数据信息[15]，影响羊肉氨基酸含量的因素众多，在相同品种下，除产地外还有年龄、性别、肌肉部位等，因此，在实际应用中常需要考虑以上因素。对产地鉴别指标的选取目前还不明确，多种指标结合可获得充分的信息，对判别模式的分类也更精准[16]，因此，可将氨基酸与其它判别指标结合，以便更实用。

3 结论

不同产地山羊肉样品水解氨基酸含量各有特征，经过聚类分析和 K 最邻近法产地鉴别，分为五类，分别代表五个不同产地，两种鉴别结果一致，即来自丽江、龙陵和罗平的样品能实现 100%完全分类，而昆明与石林的样品则有部分重叠，出现错判，正确率为93.48%。龙陵和罗平的样品由于数量较少，未进行人工神经网络分类，在对昆明、石林、丽江三地的样品

进行识别时，该方法正确率为100%，结果明显优于K最邻近法。说明通过氨基酸含量对羊肉产地的判别是可行的，氨基酸含量可以作为羊肉产地的判别指标之一，依据不同产地羊肉氨基酸含量，应用统计学的判别分析，可有效对羊肉产地进行判别和溯源。

参考文献

[1] Sepulveda WS, Maza MT, Mantecon AR. Factors associated with the purchase of designation of origin lamb meat [J]. Meat Sci., 2010, 85(1): 167-173

[2] Sofos JN. Challenges to meat safety in the 21st century[J]. Meat Sci., 2008, 78(1-2): 3-13

[3] 孙淑敏,郭波莉,魏益民,等.基于矿物元素指纹的羊肉产地溯源技术[J].农业工程学报,2012,28(17):237-243
Sun Shumin, Guo Boli, Wei Yimin, et al. Geographical origin traceability of lamb based on mineral element fingerprints [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(17): 237-243

[4] 孙淑敏,郭波莉,魏益民,等.近红外光谱指纹分析在羊肉产地溯源中的应用[J].光谱学与光谱分析,2011,31(4):937-941
Sun Shumin, Guo Boli,Wei Yimin, et al. Application of Near Spectral Fingerprint Technique in Lamb meat origin Traceability [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011, 31(4): 937-941

[5] Sun S, Guo B, Wei Y, et al. Classification of geographical origins and prediction of δ13C and δ15N values of lamb meat by near infrared reflectance spectroscopy [J]. Food Chem. 2012, 135(2): 508-514

[6] Sacco D, Brescia MA, Buccolieri A, et al. Geographical origin and breed discrimination of Apulian lamb meat samples by means of analytical and spectroscopic determinations [J]. Meat Sci., 2005, 71(3): 542-548

[7] Vázquez JF, Pérez T, Ureña F, et al. Domínguez A. Practical application of DNA fingerprinting to trace beef [J]. J Food Prot., 2004, 67(5): 972-979

[8] Kečkeš J, Trifković J, Andrić F, et al. Amino acids profile of Serbian unifloral honeys. [NCBI]. 2013 Apr 19.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

[9] 张颖,张健,史珅.氨基酸含量分析判别梅鹿辄葡萄原酒产地[J].食品研究与开发,2011,32(5):9-12
ZHang Ying, ZHang Jian, SHi Shen. Diferentiation of Merlot Grape Base Liquors According to RegiOn Based on their Amino Acid Content [J]. Food Research And Developmen, 2011, 32(5): 9-12

[10] Xu W, Song Q, Li D, et al. Discrimination of the production season of Chinese green tea by chemical analysis in combination with supervised pattern recognition [J]. J Agric Food Chem., 2012, 18; 60(28): 7064-7070

[11] Alcázar A, Ballesteros O, Jurado JM, et al. Differentiation of green, white, black, Oolong, and Pu-erh teas according to their free amino acids content [J]. J Agric Food Chem., 2007, 55(15): 5960-5965

[12] 陈林,陈键,张应根,等.清香型乌龙茶品质形成中游离氨基酸指纹图谱变化规律[J].农业工程学报,2012,28(17):244-252
Chen Lin, Chen Jian, Zhang Yinggen, et al. Variations in free amino acid fingerprints during quality formation of fresh scent-flavor Oolong tea [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(17): 244-252

[13] Pedro L Fernández-Cáceres, Marı´a J Martı´n, Fernando Pablos, et al. Differentiation of Tea (*Camellia sinensis*) Varieties and Their Geographical Origin According to their Metal Content [J]. J. Agric. Food Chem, 2001, 49: 4775-4779

[14] 洪琼花,袁跃云,李卫娟,等.云南羊产业发展现状及前景[J].云南畜牧兽医,2008,3:23-25
Hong qiong-hua, Yuan yue-yun, li wei-juan, et al. Deveiopment status and prospects of sheep industry in Yunnan [J]. Yunnan Journal of animal science and veterinary madivine, 2008, 3: 23-25

[15] Montowska M, Pospiech E. Is authentication of regional and traditional food made of meat possible? [J]. Crit Rev Food Sci Nutr. 2012; 52(6): 475-487

[16] Xu L, Ye ZH, Yan SM, et al. Combining local wavelength information and ensemble learning to enhance the specificity of class modeling techniques: Identification of food geographical origins and adulteration [J]. Anal Chim Acta, 2012, 19; 754: 31-38