



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101846617 A

(43) 申请公布日 2010. 09. 29

(21) 申请号 200910312534. 7

(22) 申请日 2009. 12. 29

(71) 申请人 中国科学院地球化学研究所
地址 550002 贵州省贵阳市观水路 46 号
申请人 江苏大学

(72) 发明人 吴沿友 宋艳娇 李萍萍 施倩倩
鲁珊 朱咏莉 杨晓勇

(74) 专利代理机构 贵阳中新专利商标事务所
52100
代理人 吴无惧

(51) Int. Cl.
G01N 21/25 (2006. 01)

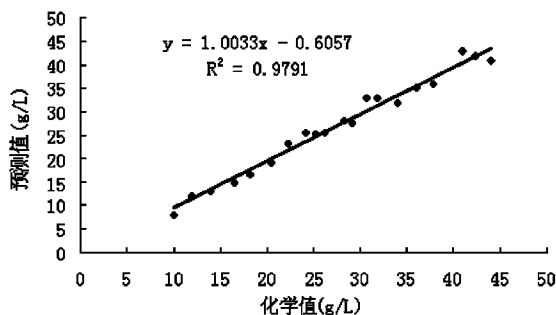
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种基于光谱分析的培养基中蔗糖含量的无菌检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于光谱分析的培养基中蔗糖含量的无菌检测方法,它是基于可见近红外光谱分析的方法进行的,包括以下过程:配制含有已知的不同浓度蔗糖的培养基,一部分作为校正集,一部分作为预测集,用光谱仪采集校正集、预测集以及待测样品的漫反射光谱信息,利用校正集样品的光谱数据建立校正模型,用预测集样品的光谱数据带入到校正模型进行预测,分析预测结果,选取预测精度达到要求的校正模型为预测模型对待测样品进行预测,获取待测样品蔗糖含量。校正集样品数大于 48 个,预测集样品数大于 10 个。用光谱仪采集校正集、预测集以及待测样品的漫反射光谱信息是同时采集。本发明无需提取培养基中的蔗糖,较常规测定蔗糖的方法快速、方便,无污染。



1. 一种基于光谱分析的培养基中蔗糖含量的无菌检测方法,其特征在于:它是基于可见-近红外光谱分析的方法进行的,包括以下过程:配制含有已知的不同浓度蔗糖的培养基,一部分作为校正集,一部分作为预测集,用光谱仪采集校正集、预测集以及待测样品的漫反射光谱信息,利用校正集样品的光谱数据建立校正模型,用预测集样品的光谱数据带入到校正模型进行预测,分析预测结果,选取预测精度达到要求的校正模型作为预测模型对待测样品进行预测,获取待测样品蔗糖含量。

2. 根据权利要求1所述的基于光谱分析的培养基中蔗糖含量的无菌检测方法,其特征在于:校正集样品数大于48个。

3. 根据权利要求1所述的基于光谱分析的培养基中蔗糖含量的无菌检测方法,其特征在于:预测集样品数大于10个。

4. 根据权利要求1所述的基于光谱分析的培养基中蔗糖含量的无菌检测方法,其特征在于:用光谱仪采集校正集、预测集以及待测样品的漫反射光谱信息是同时采集的。

5. 根据权利要求1所述的基于光谱分析的培养基中蔗糖含量的无菌检测方法,其特征在于:利用校正集样品的光谱数据建立校正模型包括以下步骤:采集校正集样品的光谱信息;利用遗传算法提取特征波长优选光谱数据;对遗传算法优选后的光谱数据,采用平滑和一阶微分处理后,联合采用偏最小二乘法和人工神经网络法构建样品中蔗糖含量和光谱数据的数学模型。

6. 根据权利要求1所述的基于光谱分析的培养基中蔗糖含量的无菌检测方法,其特征在于:用预测集样品的光谱数据带入到校正模型进行预测,分析预测结果,选取预测精度达到要求的校正模型作为预测模型对待测样品进行预测,指的是对预测集中的蔗糖含量实际值与预测值的相关系数及预测均方根误差进行比较,当预测集中相关系数、均方根误差满足预测要求时,即可用该校正模型对待测样品进行预测。

一种基于光谱分析的培养基中蔗糖含量的无菌检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于光谱分析的培养基中蔗糖含量的无菌检测方法,属于植物生物技术领域。

背景技术

[0002] 植物组织培养中,蔗糖能支持绝大多数植物离体培养物的旺盛生长,一直被作为标准碳源添加到培养基中为培养物提供生长的能量。它的用量不仅影响培养物的生长速度和生长量,也影响其代谢水平、次生代谢物合成、以及细胞形态发生。因此,如果能对培养过程中培养基蔗糖含量的变化进行分析检测,反映培养物的生理性能的同时,还可能进行糖的回收利用,节约培养成本,为植物组培的大规模发展提供参考。

[0003] 植物组织培养是在无菌,半封闭环境中进行的,传统的蔗糖的测定方法都需要对培养基进行蔗糖的提取后才能进行测定,这样不仅使培养基遭到破坏,也同时破坏了植物生长的无菌环境。

[0004] 近红外光谱技术是 20 世纪 80 年代后期迅速发展起来的一种高效快速的现代分析技术,其最大的特点就是快速无损,样品无需或只需很少的预处理,分析速度快,无需化学试剂,堪称为绿色检测技术,在多个领域得到了日益广泛的应用。

[0005] 近红外光谱是指波长在 780 ~ 2526nm 范围内的电磁波,主要是由于分子振动的非谐振动性使分子振动从基态向高能级跃迁时产生的,记录的主要是含氢基团 C-H、O-H、N-H、S-H、P-H 等振动的倍频和合频吸收信息。所以近红外光谱含有丰富的物质内部结构和组成的信息,非常适合用于碳氢有机物的定量或定性分析。但由于物质在该谱区的倍频和合频吸收信号弱,谱带重叠,解析复杂,需要利用化学计量学解决光谱信息提取和背景干扰等方面的影响。不同基团或同一基团在不同化学环境中的近红外吸收波长与强度都有明显差别,反映了样品内部组分信息,因此,样品的近红外光谱和其性质参数间也必然存在着内在的联系。使用化学计量学对两者进行关联,可确立这两者间的定量关系,即校正模型。当模型精度和稳定度达到要求时,即可根据模型和未知样品光谱对未知样品进行定量预测分析。

[0006] 国内外学者逐步开展了近红外光谱法定量分析不同环境中的蔗糖。河野等人采用透射方式测量蜜橘的光谱,对糖分进行定标建模,恩田等人通过选择不同特征波段,对李子的糖度进行了近红外光谱分析,侯瑞丽等利用近红外透射法快速测定蜂蜜中的蔗糖含量;曹干等应用傅立叶变换近红外光谱透射技术快速定量分析甘蔗蔗汁糖分,利用内部交叉证实和自动优化功能对预测数学模型进行优化,得到蔗汁蔗糖分预测数学模型;郭晓冬等利用近红外分析方法对酸奶中的蔗糖含量进行了研究,Schaffler 等人还对混合果汁等糖食的糖度含量进行研究。而利用近红外光谱分析法对植物组织培养的半固态培养基中的蔗糖含量的测定还未见报道。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是,提供一种基于可见-近红外光谱分析的植物组织培

养的培养基中蔗糖含量的无菌检测方法,以便能无菌检测植物组织培养的半固态培养基中蔗糖含量,填补利用可见近红外光谱分析的方法进行该检测的空白。

[0008] 本发明采取以下技术方案:它是基于可见-近红外光谱分析的方法进行的,包括以下过程:配制含有已知的不同浓度蔗糖的培养基,一部分作为校正集,一部分作为预测集,用光谱仪采集校正集、预测集以及待测样品的漫反射光谱信息,利用校正集样品的光谱数据建立校正模型,用预测集样品的光谱数据带入到校正模型进行预测,分析预测结果,选取预测精度达到要求的校正模型作为预测模型对待测样品进行预测,获取待测样品蔗糖含量。

[0009] 所述的校正集样品数大于 48 个,预测集样品数大于 10 个。

[0010] 用光谱仪采集校正集、预测集以及待测样品的漫反射光谱信息是同时采集的。

[0011] 利用校正集样品的光谱数据建立校正模型包括以下步骤:采集校正集样品的光谱信息;利用遗传算法提取特征波长优选光谱数据;对遗传算法优选后的光谱数据,采用平滑和一阶微分处理后,联合采用偏最小二乘法和人工神经网络法构建样品中蔗糖含量和光谱数据的数学模型。

[0012] 用预测集样品的光谱数据带入到校正模型进行预测,分析预测结果,选取预测精度达到要求的校正模型作为预测模型对待测样品进行预测,是指对预测集中的蔗糖含量实际值与预测值的相关系数 R 及预测均方根误差 RMSEP 进行比较,当预测集中相关系数、预测均方根误差满足预测要求时,即可用该校正模型对待测样品进行预测。

[0013] 本发明的优点如下:

[0014] 1) 本方法无需提取培养基中的蔗糖,因此,它较常规测定蔗糖的方法快速、方便。

[0015] 2) 本方法可批量测定培养基中蔗糖含量,且培养基不受污染。也可以动态测定植物组织培养过程中培养基蔗糖的变化。

[0016] 3) 由于光谱数据可以无线传输到计算机中,因此,本方法可以现场检测培养基中蔗糖含量。

[0017] 4) 本方法可以对同一组样品进行多次重复测定,增加了数据的可靠性。

附图说明

[0018] 图 1 为本发明通过遗传算法优选波长后建立的 PLS+ANN 模型的预测效果示意图;

[0019] 图 2 为本发明具体实施例 1 的对待测样品培养基中蔗糖含量的检测效果图。

具体实施方式

[0020] 本发明是基于可见近红外光谱分析的方法进行的,包括以下过程:配制含有已知的不同浓度蔗糖的培养基,一部分作为校正集,一部分作为预测集,用光谱仪采集校正集、预测集以及待测样品的漫反射光谱信息,利用校正集样品的光谱数据建立校正模型,用预测集样品的光谱数据带入到校正模型进行预测,分析预测结果,选取预测精度达到要求的校正模型作为预测模型对待测样品进行预测,获取待测样品蔗糖含量。

[0021] 校正集样品数大于 48 个;预测集样品数大于 10 个。

[0022] 用光谱仪采集校正集、预测集以及待测样品的漫反射光谱信息是同时采集的。

[0023] 利用校正集样品的光谱数据建立校正模型包括以下步骤:

[0024] 1) 采集校正集样品的光谱信息。光谱测量前采用标定白板对采集的光谱信息进行标定。然后通过可见近红外光谱仪采集校正集的样品的全波段的反射光谱信息。

[0025] 2) 优选波长。利用遗传算法优选波长,剔除噪声污染过大的谱区和对模型效果不好的波长点,保留信噪比高的波段,有效提取特征波长段以及体现蔗糖的较强烈吸收波段 970-980nm。

[0026] 3) 建立培养基中蔗糖含量的光谱校正模型。对遗传算法优选后的光谱数据,采用平滑和一阶微分处理后,联合采用偏最小二乘法 (PartialLeast Square, PLS) 和人工神经网络 (Artificial Neural Network, ANN) 法构建样品中蔗糖含量和光谱数据的数学模型。

[0027] 对建立的校正模型进行预测效果分析选择预测模型,包括以下步骤:

[0028] 1) 采集预测集的样品的光谱信息。与采集校正集的样品的光谱信息的同时,同样通过可见近红外光谱仪采集预测集样品的全波段的反射光谱信息。

[0029] 2) 分析预测结果,选取预测模型。用上述校正模型对预测集中的样品进行预测,比较预测集中的蔗糖含量实际值与预测值的相关系数 (R) 及预测均方根误差 (RMSEP),当预测集中相关系数、均方根误差满足预测要求时,即可用该校正模型作为预测模型对待测样品进行预测。

[0030] 实施例 1:

[0031] 考虑样品的正态分布原则和植物组织培养中糖浓度的范围,按蔗糖浓度从 2% -50% 配备培养基,在培养基凝固之前将它们倒入材质相同的锥形瓶中,凝固后得到具有一定蔗糖含量梯度的标准培养基样品。将这些标准培养基样品分成 2 组,一组 57 个样品作为校正集,一组 20 个样品作为预测集。

[0032] 光谱的采集。采用美国 ASD (analyticalspectraldevice) 的 FieldSpec 3 便携式光谱仪,光谱范围为 350 ~ 2500nm,采样间隔为 1.4nm (350 ~ 1000nm 区间) 和 2nm (1000 ~ 2500nm 区间),分辨率为 3nm (350 ~ 1000nm 区间) 和 10nm (1000 ~ 2500nm 区间)。采集环境温度保持在 22-26℃,采用仪器配套的人工光源,采集时避除其他光源,测量方式为漫反射式,选用 25° 视场角的光纤探头,用三角架固定,与光源成 45° 左右夹角,测量时始终保持探头距离装有培养基的锥形瓶底部 3 ~ 5cm,以确保视场域范围在样品上。测定前先进行系统配置优化和白板校正,对校正集、预测集和待测培养基样品进行光谱采集,每个样本重复测量 3 次,每条谱线经过 10 次扫描。利用 NIRSA 软件系统 (计算机软件著作权登记号 2007SR06801) 计算出全光谱数据和实际化学值之间的相关系数,设置阈值为 0.6,选取出相关系数在 0.6 以上的波段区域,分别为 350-750nm, 970-1100nm, 1150-1250nm, 1300-1450nm 共 784 个波长点。对 784 个波长点用遗传算法进行优选,交叉概率为 0.85,变异概率为 0.01,最大迭代次数为 100,最终挑选出 103 个波长点。对遗传算法优选后的 103 个波长点的光谱数据,采用平滑和一阶微分处理后,联合采用偏最小二乘法 (PartialLeast Square, PLS) 和人工神经网络 (ArtificialNeuralNetwork, ANN) 法构建样品中蔗糖含量和光谱数据的数学模型。该模型对预测集的样品进行预测,预测效果见表 1 和图 1。

[0033] 表 1 遗传算法优选波长后建立的 PLS+ANN 模型的预测效果

[0034]

主成分	相关系数 (R)	校正集均方根误差 RMSEC)	预测均方根误差 (RMSEP)	预测平均误差
4	0.9895	0.8688	1.5363	5.447%

[0035] 通过遗传算法优选波长后建立的 PLS+ANN 模型的预测效果如图 1 所示意。

[0036] 从图 1 和表 1 中可以看出,遗传算法优选波长后建立的 PLS+ANN 模型,相关系数较大为 0.9895,预测均方根误差较小为 1.5363,表明其具有较好的预测效果,可以用来预测待测样品,该模型可作为预测模型。将待测样品的光谱数据输入到上述预测模型对待测样品的培养基蔗糖含量进行计算,获得待测样品的蔗糖含量。表 2、图 2 是将生长有组培苗的待测样品的光谱数据输入到预测模型对待测样品培养基中蔗糖含量进行检测的结果。

[0037] 表 2 对待测样品培养基中蔗糖含量的检测效果

[0038]

样品号	化学值	检测值	绝对误差	相对误差 %
1	30.93	30.32	0.61	1.97
2	30.93	35.88	4.95	16.00
3	30.93	30.01	0.92	2.97
4	30.93	30.32	0.61	1.97
5	30.93	27.88	3.05	9.86
6	30.93	31.79	0.86	2.78
7	30.93	33.26	2.33	7.53
8	30.93	29.46	1.47	4.75
9	7.52	9.47	1.95	25.93
10	11.98	12.62	0.64	5.34
11	16.52	17.08	0.56	3.39
12	20.44	20.07	0.37	1.81
13	7.52	6.93	0.59	7.85
14	11.98	9.91	2.07	17.28
15	16.52	14.03	2.49	15.07
16	24.23	23.09	1.14	4.70
17	26.16	23.25	2.91	11.12
18	28.25	27.20	1.05	3.72
19	24.23	23.74	0.49	2.02
20	26.16	28.57	2.41	9.21
21	28.25	27.97	0.28	0.99
22	30.68	28.09	2.59	8.44
平均值				7.49

[0039] 对待测样品培养基中蔗糖含量的检测效果如图 2 所示。

[0040] 从表 2 和图 2 中可以看出,待测样品培养基中蔗糖含量的被检测出的结果与化学值的平均相对误差仅为 7.49%,检测值与化学值的拟合方程 $y = 0.9974x - 0.2541$ ($R^2 = 0.9463$, $n = 22$) 的斜率为 0.9974,与 1 极为接近。说明将待测样品的光谱数据输入到预测模型对待测样品培养基中蔗糖含量进行检测的效果较好,检测的结果与实际化学值较接近,可以通过基于可见近红外光谱分析方法无菌检测培养基中蔗糖含量。

[0041] 实施例 2:

[0042] 标准培养基样品的制备、光谱的采集、校正模型的建立、预测模型的选择以及对待

测样品的检测等步骤与实施例 1 相同。

[0043] 待测样品为生长不同类型茅苍术组培苗的培养基。自茅苍术组培苗转接到培养基的第一天开始,每隔五天用本发明对培养基中蔗糖含量进行预测,以观察这些培养基中蔗糖含量的变化。试验时间为 30 天,结果见表 3。

[0044] 表 3 生长不同类型茅苍术组培苗的培养基中蔗糖含量随培养时间的变化

[0045]

时间 (天)	短披针型		长披针型		缺刻型	
	浓度 (g/L)	消耗量 (%)	浓度 (g/L)	消耗量 (%)	浓度 (g/L)	消耗量 (%)
0	35.00	0.00	35.00	0.00	35.00	0.00
1	32.80	6.29	32.53	7.06	37.84	-8.11
5	29.08	16.91	30.55	12.71	33.07	5.51
10	22.10	36.86	21.52	38.51	19.75	43.57
15	17.00	51.43	13.93	60.20	9.86	71.83
20	14.13	59.63	11.24	67.89	8.25	76.43
25	2.87	91.80	5.46	84.40	0.11	99.69
30	0.13	99.63	2.57	92.66	0	100.00

[0046] 从表中可以看出,不同类型茅苍术对蔗糖的消耗量是不同的。在前 5 天长披针型和短披针型的茅苍术消耗的量大于缺刻型,随后的 10 天缺刻型的茅苍术消耗蔗糖的速度加快,到转接后 15 天,缺刻型的茅苍术消耗了 72% 的蔗糖,而短披针型茅苍术消耗的蔗糖为 51%,长披针型也只消耗了 60% 的蔗糖。另一个蔗糖消耗高峰在 20-25 天,缺刻型的茅苍术消耗了 23% 的蔗糖,短披针型茅苍术消耗的蔗糖为 32%,长披针型消耗了 18% 的蔗糖。在组织培养过程中,植物消耗培养基中的糖来建立机体,形成自养器官绿色叶片,从上面的分析可以看出,缺刻型的茅苍术在接种 15 天后,就消耗了 72% 的蔗糖,这样形成的绿色组织的时间就早和快,自养作用随之提前和加大,导致生长速度的加快。因此,从培养基中的蔗糖消耗来看,缺刻型茅苍术有着较好的生理机能,这和野外缺刻型茅苍术生长速度明显快于其他类型的结论相吻合,也表明检测结果具有可信性。

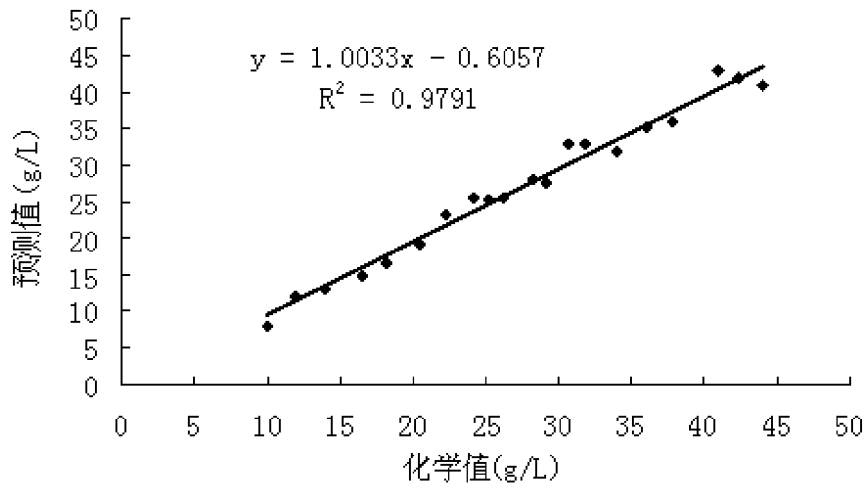


图 1

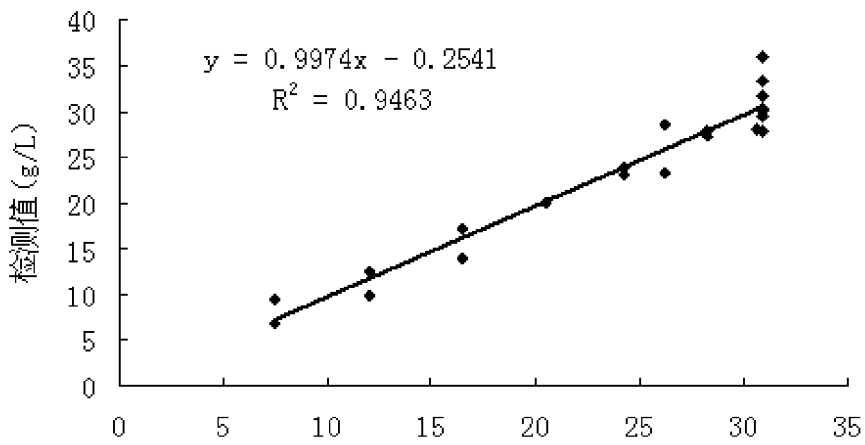


图 2