

不同产地小美牛肝菌的红外光谱聚类分析研究

周在进^{1,2}, 刘刚¹, 任先培¹

(1. 云南师范大学物理与电子信息学院, 云南昆明 650092; 2. 淮阴工学院计算科学系, 江苏淮安 223001)

摘要:同一种蕈菌子实体, 由于外观形貌相似, 凭传统外观形貌特征难以鉴别产地来源。用傅里叶变换红外光谱技术结合系统聚类分析了5个不同产地的63个野生小美牛肝菌子实体样本。结果表明, 原始红外光谱在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 总体特征相似, 主要是由蛋白质、多糖等吸收谱峰组成, 在 $1800 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 范围不同产地样本的原始光谱存在微小的差异。对光谱进行一阶导数和二阶导数处理, 用导数光谱进行系统聚类分析(HCA), 结果显示, 一阶导数光谱在 $1800 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$ 范围按不同产地样本聚类效果较好, 63个样本按5个不同产地很好地聚类, 分类正确率达到了90.5%。结果提示傅里叶变换红外光谱结合系统聚类分析可以快速、方便地对不同产地野生蕈菌进行鉴别分类。

关键词:生物光学; 傅里叶变换红外光谱; 系统聚类分析; 小美牛肝菌

中图分类号: O657.33

文献标识码: A

Investigation of boletus speciosus from different areas by Fourier transform infrared spectrometry combined with cluster analysis

ZHOU Zai-jin^{1,2}, LIU Gang¹, REN Xian-pei¹

(1. School of Physics and Electronic Information, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China;

2. Department of Computing Sciences, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223001, China)

Abstract: It is hard to differentiate the same species of wild growing mushrooms from different areas by macromorphological features. In this paper, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) combined with hierarchical cluster analysis was used to identify 63 samples of *Boletus speciosus* from five different areas. The original characteristic infrared spectras of the mushrooms are very similar, with small differences in the range of $1800 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$. Hierarchical cluster analysis was performed using the first derivative and second derivative spectral range $1800 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$. The first derivative spectra give satisfactory results. All *Boletus speciosus* samples were divided into 5 classes with a classification accuracy of 90.5%. It is proved that FTIR spectroscopy combined with hierarchical cluster analysis could be used to discriminate wild growing mushrooms at species level.

Key words: biotechnology; Fourier transform infrared spectroscopy; hierarchical cluster analysis; boletus speciosus

1 引言

小美牛肝菌又名华美牛肝菌(*Boletus speciosus*), 属伞菌目, 牛肝菌科, 牛肝菌属的一种食药真菌, 分布于热带、亚热带地区, 我国主要分布在云南、四川、贵州、西藏、福建等地^[1-2]。其中云南地区野生小美牛肝菌分布最为广泛, 也是市场上最为畅销的食用菌之一。小美牛肝菌营养极其丰富, 是一

种高蛋白、低脂肪、矿物元素含量高的美味食用菌, 王元忠等^[3]用原子吸收分光光度法、氨基酸分析等方法测得小美牛肝菌子实体的多糖、粗蛋白和粗纤

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30360068, 10764006) 资助。

作者简介: 周在进(1970-), 男, 在读硕士研究生, 讲师, 主要从事傅里叶变换红外光谱学方面的研究。E-mail: zd0531@sina.com

收稿日期: 2009-05-23

维含量高于一般食用菌。小美牛肝菌不但具有较高的营养价值,还具有清热解烦、养血和中、促进消化、增强免疫等重要的药用价值,是一种极具开发价值的珍贵食用菌。

传统的野生食用菌的分类方法主要是根据食用菌子实体的外观形貌、孢子的显微结构、食用菌生长特性等进行鉴别,但这种方法难以鉴别蘑菇的不同产地来源。

傅里叶变换红外光谱法是一种基于化合物中功能团和极性键振动的结构分析技术,红外光谱能够给出样品的化学组成方面的丰富信息,具有快速、简单、无损、易操作等优点^[4]。目前傅里叶变换红外光谱技术已广泛应用于生物、化工、食品、农林、医药等很多研究领域,近年来,FTIR 在高等植物、中草药、坚果等鉴别和分类研究方面也有不少文献报道^[5-12],孙素琴等^[13-14]对灵芝做了红外光谱研究,刘刚等^[15-18]用 FTIR 光谱对野生食用菌进行了鉴别研究,而关于不同产地野生食用菌的傅里叶变换红外光谱鉴别分类研究少有报道,仅有黑木耳的 FTIR 鉴别研究^[17],该文用相关性分析比较了不同产地的黑木耳。本文主要利用傅里叶变换红外光谱结合系统聚类分析(HCA)方法对云南省 5 个不同产地的 63 个野生小美牛肝菌样本进行分类研究。

2 实验

2.1 仪器设备与测试条件

光谱仪器为 Perkin Elmer 公司的 Spectrum 100 型傅里叶变换红外光谱仪,DTGS 探测器,光谱扫描范围为 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$,累加扫描次数为 16 次,分辨率为 4 cm^{-1} 。

2.2 样品及光谱

63 个野生小美牛肝菌(*Boletus speciosus*) 样本采自云南省 5 个不同产地,其中昆阳 13 个,编号为 KY01 ~ KY13;武定 15 个,编号为 WD01 ~ WD15;富民 10 个,编号为 FM01 ~ FM10;禄丰 17 个,编号为 LF01 ~ LF17;厂口 8 个,编号为 CK01 ~ CK08,所有样本为各产地不同区域随机采摘的独立子实体。采集的样本清洗干净后晾干保存待测。实验时取样本少量菌褶放入玛瑙研钵磨细,再加入适量 KBr 并研磨均匀,然后压片测定傅里叶变换红外光谱。测定前,首先扫描空光路背景光谱,样本光谱测定时仪器自动扣除背景光谱。所有样本光谱采用 OMNIC 6.0 红外光谱应用软件进行 9 点平滑、基线校正和归一化等预处理。

3 结果与讨论

3.1 五个产地野生小美牛肝菌红外光谱特征

图 1 为不同产地小美牛肝菌原始红外光谱图,

图 2 给出了各产地野生小美牛肝菌的傅里叶变换红外光谱平均光谱图。其中,a 是昆阳小美牛肝菌,b 是武定小美牛肝菌,c 是富民小美牛肝菌,d 是禄丰小美牛肝菌,e 是厂口小美牛肝菌。

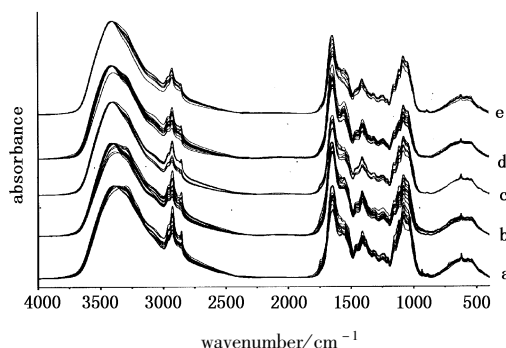


图 1 不同产地小美牛肝菌原始红外光谱图

(a)昆阳;(b)武定;(c)富民;(d)禄丰;(e)厂口

Fig.1 FTIR original spectra of *Boletus speciosus* from different areas

(a) Kunyang; (b) Wuding; (c) Fumin; (d) Lufeng; (e) Changkou

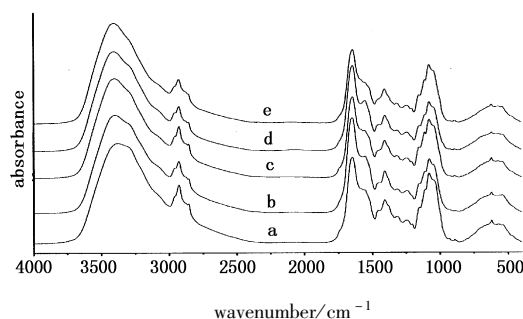


图 2 不同产地小美牛肝菌红外光谱平均光谱图

(a)昆阳;(b)武定;(c)富民;(d)禄丰;(e)厂口

Fig.2 the average FTIR spectra of *Boletus speciosus* from different areas

(a) Kunyang; (b) Wuding; (c) Fumin; (d) Lufeng; (e) Changkou

从图 1、图 2 中可以看出,不同产地小美牛肝菌的红外光谱都具有一些典型的共有峰,主要为 3400 cm^{-1} , 2958 cm^{-1} , 2927 cm^{-1} , 2872 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1644 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} , 1405 cm^{-1} , 1311 cm^{-1} , 1242 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} , 1113 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} , 890 cm^{-1} , 618 cm^{-1} 等。其中 3400 cm^{-1} 附近的宽峰,主要为来自多糖、蛋白质的羟基和氨基的伸缩振动; 2958 cm^{-1} , 2927 cm^{-1} 和 2872 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} 附近谱峰主要为来自脂类、多糖、蛋白质等甲基、亚甲基的反对称伸缩振动和对称伸缩振动; 1644 cm^{-1} 和 1545 cm^{-1} 附近谱峰为蛋白质酰胺 I 带和酰胺 II 带吸收峰,归属为 C=O 伸缩振动和 N—H 弯曲振动; $1500 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 范围为蛋白质、脂肪酸和多糖的混合振动吸收区; $1200 \sim 950 \text{ cm}^{-1}$ 处谱峰为多糖的特征吸收峰,其中 1076 cm^{-1} 为此区最强峰,归属为碳水化合物的 C—O 伸缩振动峰; $950 \sim 750 \text{ cm}^{-1}$ 吸收

强度较弱,此范围能够区分糖类不同的异构体,如 890 cm^{-1} 附近的峰可以归为 β -构型多糖的特征峰, α -构型多糖的特征峰位于 $860\sim 800\text{ cm}^{-1}$ 。所有这些光谱典型的特征吸收峰反映了小美牛肝菌的主要成分为蛋白质和碳水化合物^[15-19],与王元忠等^[3]用原子吸收分光光度法、氨基酸分析等方法分析的结果比较一致。

3.2 五个产地野生小美牛肝菌红外光谱差异及系统聚类分析(HCA)

对图1中的63个小美牛肝菌样本的红外光谱进行比较,原始光谱整体上比较相似,表明它们所含的主要化学组分非常相似。但不同产地的样本在 $1800\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 范围光谱在峰数、峰位、峰强上存在一定的差异,具有指纹性和特征性,从图2的平均光谱图也可以看出它们的一些差异。这可能与小美牛肝菌在不同分布地,由于生长环境差异而导致某些化学成分构型或含量发生了微小的变化有关,但总体上差异不是十分明显。为了能够更好地显示 $1800\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 之间样本光谱的差异,对该范围光谱求一阶导数和二阶导数光谱,并求出各平均光谱在 $1800\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 范围的相关系数,图3(a)、图3

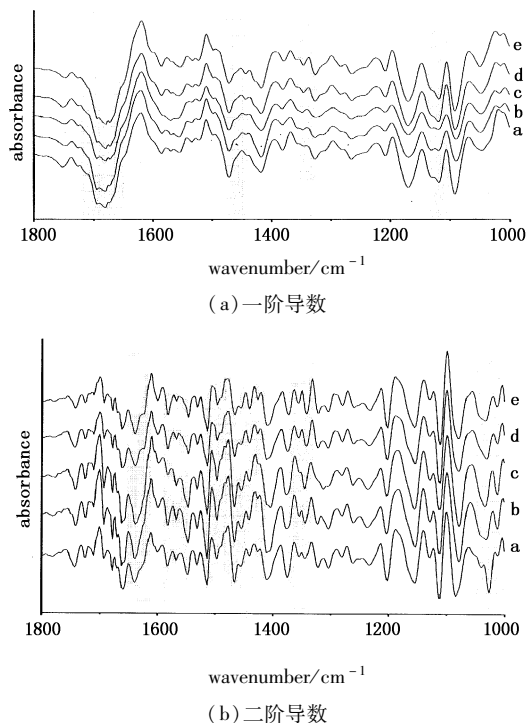


图3 $1800\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 范围不同产地小美牛肝菌的一阶导数和二阶导数平均光谱图

(a) 昆阳; (b) 武定; (c) 禄丰; (d) 富民; (e) 厂口

Fig. 3 first (a) and second (b) derivative average FTIR spectra ($1800\sim 1000\text{ cm}^{-1}$) of *Boletus speciosus* from different areas

(a) Kunyang; (b) Wuding; (c) Lufeng; (d) Fumin; (e) Changkou

(b) 分别为各产地小美牛肝菌样本光谱的一阶导数和二阶导数平均光谱图,表1、表2分别为一阶导数和二阶导数平均光谱之间的相关系数。比较图3不同产地样本的导数光谱差异(例如阴影部分)以及表1、表2中的相关系数,可以看出,一阶导数和二阶导数光谱都体现了不同产地样本具有一定的差异性,且二阶导数光谱之间的相关系数比一阶导数光谱之间相关系数相对低一些,表明二阶导数光谱差异性相对较大。因此,分别利用一阶导数和二阶导数光谱数据做进一步系统聚类分析研究。

表1 一阶导数平均光谱在 $1800\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 范围内的相关系数

Tab. 1 correlation coefficients of first derivative average spectra between 1800 cm^{-1} and 1000 cm^{-1}

	KY	WD	FM	LF	CK
KY	1.000	0.947	0.978	0.940	0.964
WD	0.947	1.000	0.971	0.985	0.949
FM	0.978	0.971	1.000	0.969	0.989
LF	0.940	0.985	0.969	1.000	0.953
CK	0.964	0.949	0.989	0.953	1.000

表2 二阶导数平均光谱在 $1800\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 范围内的相关系数

Tab. 2 correlation coefficients of second derivative average spectra between 1800 cm^{-1} and 1000 cm^{-1}

	KY	WD	FM	LF	CK
KY	1.000	0.848	0.928	0.808	0.883
WD	0.848	1.000	0.897	0.956	0.860
FM	0.928	0.897	1.000	0.862	0.974
LF	0.808	0.956	0.862	1.000	0.828
CK	0.883	0.860	0.974	0.828	1.000

系统聚类分析是采用定量数学方法,根据一批样本的多个观测指标,具体找出一些能够度量样本之间相似程度的统计量,以这些统计量为划分类型的依据,其基本分类思想是把一些相似程度较大的样本聚合为一类,把另外一些彼此之间相似程度较大的样本又聚合为另一类,关系密切的聚合到一个小的分类单位,关系疏远的聚合到一个大的分类单位,直到把所有的样本聚合完毕。这种化学计量学方法具有很大的实用价值,近年来应用比较广泛,郝朝运等^[4]应用聚类分析对忍冬科植物进行了分类研究,洪庆红等^[20]应用聚类分析对菟丝子真伪进行鉴别研究。这里选取所有样本一阶导数和二阶导数光谱在 $1800\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ 范围的吸光度值,构成各

自的吸光度矩阵,采用欧氏距离 (Euclidean distance),应用聚类分析中的离差平方和法 (Ward's method) 对不同产地小美牛肝菌进行系统聚类分析,结果显示,一阶导数光谱在此范围按不同产地聚类效果较好,图4 为一阶导数光谱在 1800 ~ 1000 cm^{-1} 范围的系统聚类图。从图中可以看出,不同产地 63 个小美牛肝菌样本能够按 5 个产地各自聚合在一起,与采摘的地区实际情况比较相符,分类与各产地的样本生长环境条件应有一定的相关性。在聚类图中若按不同分类水平可以划分为不同的类群,但明显地可以看出,若按 4 类水平来分,富民和厂口被归为一类,说明这两个产地的样本光谱非常相似,这可能是因为这两个产地相距比较近的原因而造成它们之间的相似性,从表 1 所显示的这两个产地样本一阶导数平均光谱之间相关系数为最大值(0.989)以及图 3(a)中 d 与 e 的光谱图形的相似性,也可以看出两产地的样本差别较小。另外除了 WD13, LF03, LF06, LF13, FM03, FM08 等 6 个样本被错分外(图 4

中阴影标注),其他样本都能够很好地按不同产地归类,分类正确率达到了 90.5%,取得了满意的分类效果。这些聚类结果的信息表明,由于地质、地貌、土壤、气候等生长条件的影响,生长环境相似的小美牛肝菌的化学组成非常相似,而环境有差异的小美牛肝菌在化学成分构型或含量上具有一定的差异,利用 FTIR 光谱结合系统聚类分析(HCA)可以区分不同产地的野生小美牛肝菌,为地域性的优质野生蕈菌鉴别提供了新的思路。显然,如果样本取自地质、地貌、土壤、气候条件等生长环境相差较大的不同地区时,聚类效果与正确率应该会更好一些,这将有待于以后进一步研究。

4 结论

采用傅里叶变换红外光谱技术对 63 个来自 5 个不同产地的野生小美牛肝菌样本进行了研究。所有样本的红外光谱较为相似,表明了野生小美牛肝菌主要化学组分非常相似,主要为蛋白质和多糖等,样本在 1800 ~ 1000 cm^{-1} 范围峰形、峰强等存在一些微小差异,通过系统聚类分析比较,发现一阶导数光谱在 1800 ~ 1000 cm^{-1} 范围内采用欧氏距离和 Ward 方法聚类较好,使不同产地野生小美牛肝菌分类取得了较为满意的聚类效果,分类正确率达到了 90.5%。因此,利用傅里叶变换红外光谱技术结合适当的化学计量学(系统聚类分析)方法可以快速、方便地区分不同产地的野生小美牛肝菌,为进一步对野生蕈菌的产地鉴别和质量控制提供了新的方法。

参考文献:

[1] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2000.
 [2] 黄年来. 中国大型真菌原色图鉴[M]. 北京:中国农业出版社,1998:197.
 [3] 王元忠,李兴奎,虞泓,等. 小美牛肝菌子实体主要成分的测定[J]. 食用菌报,2005,12(4):5-8.
 [4] 郝朝运,程存归,刘鹏. FTIR 直接测定法在解决忍冬科一些分类学问题中的应用研究[J]. 光谱学与光谱分析,2007,27(1):38-42.
 [5] 罗庇荣,刘刚,时有明,等. FTIR 结合主成分分析对杜鹃花植物鉴别分类研究[J]. 红外技术,2009,31(1):39-43.
 [6] Ayca Dogan, Galip Siyakus, Feride Severcan. FTIR spectroscopic characterization of irradiated hazelnut (*Corylus avellana* L.) [J]. Food Chemistry, 2007, 100:

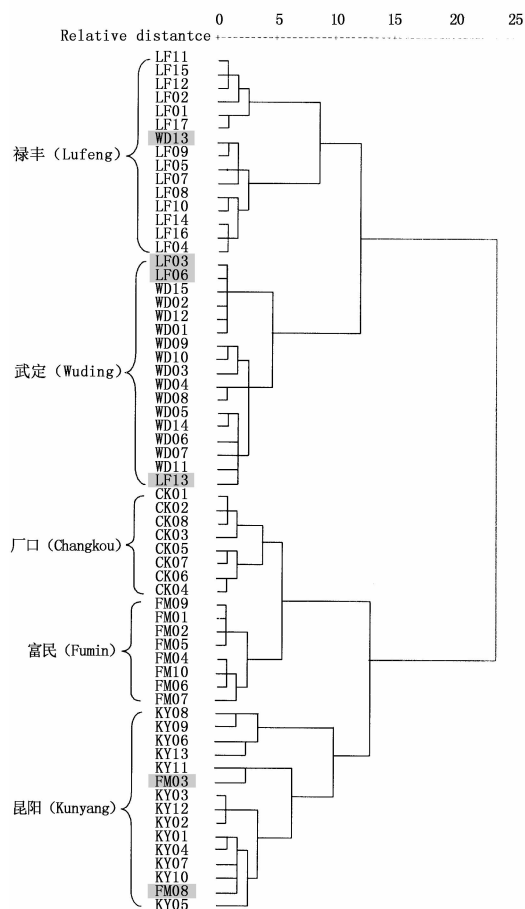


图4 1800 ~ 1000 cm^{-1} 范围小美牛肝菌一阶导数光谱系统聚类图

Fig.4 hierarchical cluster diagram with first derivative FTIR spectra of the 63 *Boletus speciosus* in the range of 1800 ~ 1000 cm^{-1}

- 1106 - 1114.
- [7] 左康,李丹婷,郭水良,等.不同产地虎杖根 FTIR 主成分分析研究[J].光谱学与光谱分析,2007,27(10):1989 - 1992.
- [8] Stéphanie Bonnin, Françoise Besson, Micaèle Gelhausen. A FTIR spectroscopy evidence of the interactions between wheat germ agglutinin and N-acetylglucosamine residues [J]. FEBS Letters, 1999, 456: 361 - 364.
- [9] F Guibeta, C Amiela, P Cadotb, et al. Discrimination and classification of Enterococci by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy [J]. Vibrational Spectroscopy, 2003, 33: 133 - 142.
- [10] N A Ngo-Thi, C Kirschner, D Naumann. Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry [J]. Journal of Molecular Structure, 2003, 661 - 662: 371 - 380.
- [11] Saravanan Dharmaraj, A Suhaimi Jamaludin, H Mohammad Razak, et al. The classification of Phyllanthus niruri Linn. according to location by infrared spectroscopy [J]. Vibrational Spectroscopy, 2006, 41: 68 - 72.
- [12] Sevgi Turker Gorgulu, Musa Dogan, Feride Severcan. The Characterization and Differentiation of Higher Plants by Fourier Transform Infrared Spectroscopy [J]. Applied Spectroscopy, 2007, 61(3): 300 - 308.
- [13] 孙素琴,杜德国,梁曦云,等.36种灵芝产品傅里叶变换红外光谱快速鉴别研究[J].分析化学研究简报,2001,29(3):309 - 312.
- [14] 孙素琴,梁曦云,杨显荣.六色灵芝的 FTIR 快速无损鉴别[J].光谱学与光谱分析,2002,22(2):226 - 228.
- [15] 刘刚,刘剑虹,宋鼎珊,等.野生食用菌不同部位的红外光谱研究[J].光谱学与光谱分析,2005,25(7):1053 - 1056.
- [16] 刘刚,刘剑虹,杨爱明,等.食用菌的傅里叶变换红外光谱鉴别[J].光谱学与光谱分析,2004,24(8):941 - 945.
- [17] 时有明,刘刚,刘剑虹,等.不同产地黑木耳的傅里叶变换红外光谱鉴别[J].光学学报,2007,27(1):129 - 132.
- [18] 赵德璋,刘刚,宋鼎珊,等.鹅膏菌的傅里叶变换红外光谱研究[J].光谱学与光谱分析,2007,27(6):1086 - 1089.
- [19] 孙素琴,周群,秦竹.中药二维相关红外光谱鉴定图集[M].北京:化学工业出版社,2003.
- [20] 洪庆红,成则丰,李群力. FTIR 聚类分析法应用于菟丝子真伪的鉴别[J].光谱学与光谱分析,2008,28(8):1803 - 1805.