

基于显微图像处理的 不同种属肉骨粉鉴别分析

姚玉梅 韩鲁佳 杨增玲 刘 贤

(中国农业大学工学院, 北京 100083)

摘要: 以 20 个可靠来源的肉骨粉样品(猪源、禽源、反刍源)为研究对象,采用标准方法制备骨颗粒试样,并采用光学显微镜图像系统获取其显微图像。通过系列图像处理提取骨颗粒表面代表性腔隙的显微组织特性数据,计算所得腔隙的面积、周长、长短轴长度及比率。研究发现,猪、鸡、牛、羊肉骨粉骨颗粒腔隙的面积、周长和长短轴长度数据均为正态分布,且不同种属之间均有显著性差异。PLS-DA 结果显示,基于骨颗粒腔隙的面积、周长特性数据可以鉴别哺乳动物源与鸡源肉骨粉,而基于长短轴长度数据的不同种属肉骨粉识别率均较低。独立验证集结果表明:基于面积、周长及其组合特性数据可以有效进行鸡源和哺乳动物源肉骨粉的鉴别分析,模型的判别正确率均达 0.93。其中基于面积和周长组合特性数据的鉴别分析结果优于基于单一特性数据的结果。而基于骨颗粒显微图像处理,很难进一步对不同哺乳动物(反刍动物和猪)源性肉骨粉进行鉴别分析。

关键词: 肉骨粉; 种属鉴别; 显微图像; 组织特性

中图分类号: S87 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2016)S0-0347-06

Discriminant Analysis of Different Species of Meat and Bone Meal Based on Microscopic Image Processing

Yao Yumei Han Lujia Yang Zengling Liu Xian

(College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Discriminant analysis of different species of meat and bone meal (MBM) can provide necessary technical support for feed safety. A total of 20 MBM samples, including five porcine, five poultry, five bovine and five ovine samples, were chosen. All the samples were of reliable sources. Bone fragment samples were prepared using standard methods and their microscopic images were obtained by biological microscope imaging system. Five lacunas' characterization data were extracted from each image by Matlab software including the area, perimeter, major axis and minor axis of each lacuna. Results showed that all the specific characterization data of lacunas fit the normal distribution and significant difference was found between different species. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) results showed that it is feasible to classify mammalian MBM and poultry MBM based on the area and perimeter values of lacuna, while it was hard to discriminant different species of MBM samples based on the major axis and minor axis. Results of separate validation proved that successful discrimination of mammalian and poultry MBM could be performed based on the separate area, perimeter and pair combination values of bone fragments; the correct discriminant rate of established model were all 0.93, while result based on the pair combination values was better than that of separate parameter values. However, it was difficult to further discriminant ruminant and porcine MBM samples by this technique.

Key words: meat and bone meal; species identification; microscopic image; texture characteristics

收稿日期: 2016-07-20 修回日期: 2016-08-15

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2014BAD08B11-2)和国家国际科技合作专项(2015DFG32170)

作者简介: 姚玉梅(1992—),女,硕士生,主要从事饲料安全检测技术研究,E-mail: Yaoao@cau.edu.cn

通信作者: 刘贤(1979—),女,副教授,博士生导师,主要从事饲料安全检测技术研究,E-mail: lx@cau.edu.cn

引言

肉骨粉是指以动物屠宰后不宜食用的下脚料以及肉类罐头厂、肉品加工厂等的残余碎肉、内脏、杂骨等为原料,经高温蒸煮、灭菌、脱脂、干燥粉碎后的产品^[1],具有蛋白质含量丰富及生物学价值高等特点,曾在养殖领域广泛使用。然而,自 1985 年疯牛病于英国爆发后,为了高效防范疯牛病,从源头上切断疯牛病的传播途径^[2],世界各国纷纷制定相关措施并通过法律法规控制肉骨粉等动物源性饲料的使用。为了更好地实施饲料产业的可持续发展和循环利用,细化至不同种属之间是否相互饲用是动物源性饲料禁用法律法规的必然发展趋势,而不同种属肉骨粉的有效鉴别一直是动物源性饲料检测的瓶颈问题^[3-4]。

目前国际上通用的饲料中动物源性成分检测标准方法主要有 2 种:以组织学特性为基础的显微镜分析法和以 DNA 为基础的聚合酶链反应法^[5]。其中显微镜分析法是自 2003 年以来欧盟官方一直认定的饲料中动物源性成分的标准检测方法^[6-8]。该方法主要基于骨颗粒的光学显微组织特性进行鉴别,具有检出限低、分析热稳定性好、检测假阳性率低等优点,但需要具有丰富经验的分析技术人员。目前基于显微镜人为观察可以准确鉴别出饲料或鱼粉中的肉骨粉成分,但却很难进一步判定其颗粒的种属来源^[9]。基于这一问题,PINOTTI 等^[10]于 2004 年首次提出将显微镜分析法与光学图像处理相结合的理念,并采用箱线图和线性判别法初步探讨了哺乳动物源和禽类、猪源和牛源种属鉴别的可行性^[11-13]。本研究在此基础上,以可靠来源的不同种属肉骨粉骨颗粒为研究对象,利用光学图像处理所获取的典型显微组织特性数据,采用偏最小二乘判别分析法(PLS-DA)综合建立哺乳动物、反刍动物和禽类动物源性肉骨粉的鉴别分析模型。

1 材料与方法

1.1 实验样品与制备

实验样品包括可靠来源的猪、鸡、牛和羊肉骨粉各 5 个,均粉碎过 1 mm 试验筛。将供试肉骨粉样品采用欧盟标准方法 EC/51/2013 进行骨颗粒试样的制备,具体步骤为:称取 3 g 试样,置于分液漏斗中,加入 50 mL 四氯乙烯,连续振荡混合至少 30 s,再量取不少于 50 mL 四氯乙烯,连续沿分液漏斗内壁倒入彻底洗净着壁样品,静置 5 min,打开活塞,分离沉淀物于滤纸过滤后风干。风干后沉淀物,统一过 500 μm 试验筛,并采用茜素

红试剂进行着色。

1.2 骨颗粒显微图像的获取

对制备所得的骨颗粒试样进行玻片制备,具体步骤为:取清洁载玻片,加入 5~7 滴丙三醇,取约 10 mg 骨颗粒试样分散其中浸透,用探针搅拌使分散均匀,加盖玻片(20 mm×20 mm),用石蜡密封。每个肉骨粉骨颗粒试样制备一个玻片。

采用生物显微镜(DM 2500 型,德国徕卡公司)进行玻片观察,放大倍数为 100~200,采用冷 CCD 摄像头(DFC420C 型,德国徕卡公司)和专用软件(Leica Application Suite V3.30,德国徕卡公司)拍摄目标骨颗粒的显微图像,每个玻片随机拍摄 5 幅图像。

1.3 骨颗粒显微组织特性的图像数据提取

采用 Matlab 软件(R2010b,美国 Mathworks 公司)对所获取的骨颗粒显微图像进行骨颗粒表面代表性腔隙的显微组织特性数据提取。每幅显微图像随机选取 5 个组织结构清晰的腔隙,精确提取腔隙轮廓后,分别计算目标骨颗粒腔隙的面积、周长、长短轴比率(长轴和短轴的比值)。

采用“平均值±1.96 倍标准差”进行异常值的判定和剔除。

1.4 数据处理与分析

采用 SPSS(V20.0,美国 SPSS 公司)对所获取的骨颗粒显微组织特性数据进行 One-Way ANOVA 方差分析。

将所获取的不同种属肉骨粉骨颗粒腔隙的显微组织特性数据按种属和大小排序后,采用隔三选一的方法确定 105 组腔隙数据(其中猪肉骨粉 25 组,鸡、牛肉骨粉各 27 组,羊肉骨粉 26 组)作为独立验证集^[14],其余 317 组数据作为校正集,其中猪、鸡、牛、羊肉骨粉数据分别为 78 组、80 组、80 组和 79 组。

通过偏最小二乘判别分析法(PLS-DA)进行不同种属肉骨粉的鉴别分析,采用校正集的认识率和拒绝率进行定性模型评价,同时采用独立验证集对该鉴别分析方法进行验证,其中,识别率和拒绝率、独立验证集的正确判别率越接近于 1,不同种属动物源性饲料的鉴别分析效果越好^[15]。

所述识别率 K 、拒绝率 W 和正确判别率 R 计算公式为

$$K = P_A / (P_A + N_D) \tag{1}$$

$$W = N_A / (P_D + N_A) \tag{2}$$

$$R = N_C / N_T \tag{3}$$

式中 P_A ——判别阳性样品数
 N_D ——判别假阴性样品数
 N_A ——判别阴性样品数

P_D ——判别假阳性样品数
 N_C ——独立验证集的正确判别试样数
 N_T ——独立验证集的总试样数

2 结果与讨论

2.1 不同种属肉骨粉骨颗粒的显微图像

图 1 为实验获取的不同种属肉骨粉骨颗粒显微图像。

由图 1 可以看出,不同种属肉骨粉骨颗粒的显微组织特性非常相似,均为不规则多边形,颗粒上均可观察到黑色腔隙,沿腔隙分布若干黑色细短导管。此外,实际应用中由于骨颗粒的形状各异,所呈现的显微图像不尽相同,因此,仅基于显微镜的肉眼观察很难鉴别分析肉骨粉的不同种属来源。

2.2 骨颗粒显微组织特性的数据提取与分析

图 2 为骨颗粒显微组织特性的数据提取过程。

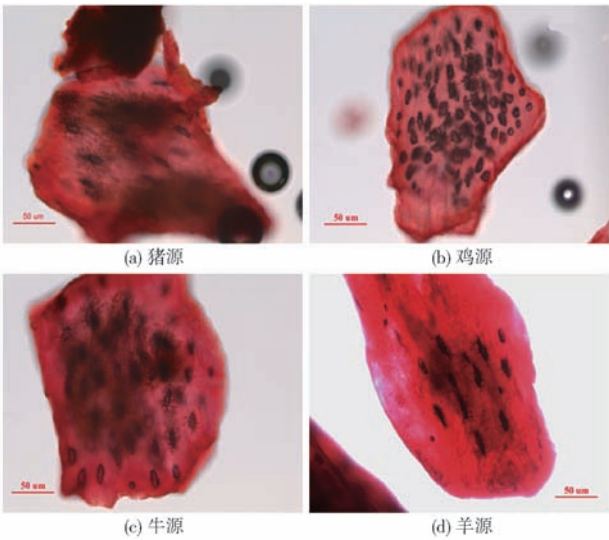


图 1 不同种属肉骨粉骨颗粒沉淀样品的显微图像
Fig. 1 Microscopic image of bone fragment of different species of MBM samples

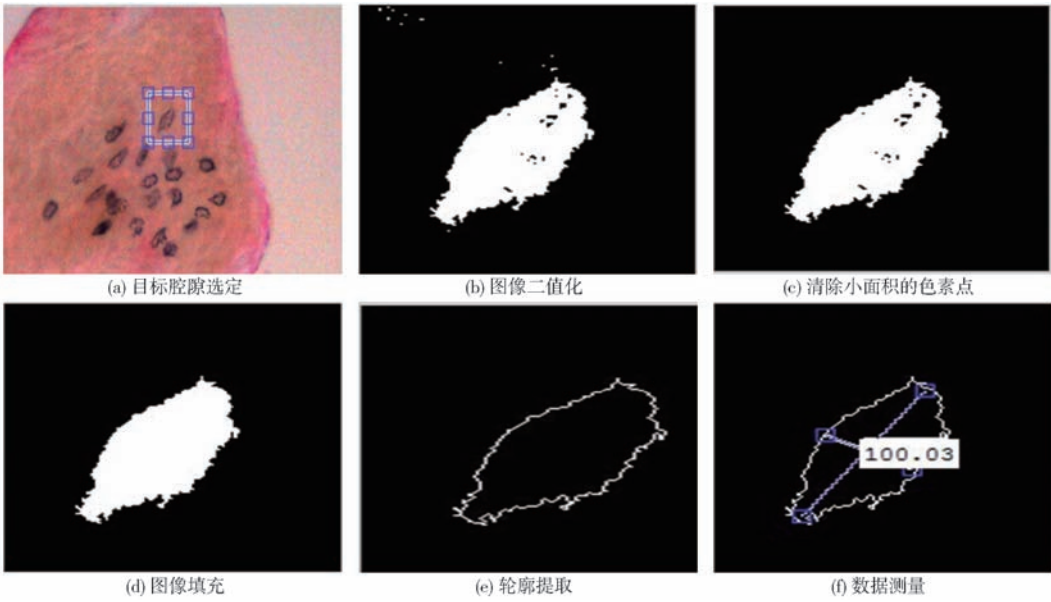


图 2 骨颗粒显微组织特性的数据提取过程
Fig. 2 Microscopic image processing of bone fragments

如图 2 所示,首先将拍摄的显微图像读入 Matlab 软件系统,选定待测显微图像的目标腔隙并进行剪裁,将目标图像灰度化、二值化后清除图像上小面积的色素点;然后进行目标腔隙图像填充,并提取图像轮廓得到该腔隙的面积

和周长数据,同时测量获得其长轴和短轴的数值。

不同种属肉骨粉骨颗粒显微组织特性数据测量与统计分析结果见表 1。不同种属肉骨粉骨颗粒腔隙的显微组织特性分布图见图 3。

表 1 不同种属肉骨粉骨颗粒显微组织特性数据统计分析结果
Tab. 1 Statistical results of microstructure characteristic data of tested bone fragments

肉骨粉样品	猪源	鸡源	牛源	羊源
腔隙数	103	107	107	105
面积/ μm^2	0.194 ± 0.048^a	0.119 ± 0.028^b	0.191 ± 0.057^a	0.164 ± 0.045^c
周长/ μm	0.941 ± 0.135^a	0.647 ± 0.096^b	0.974 ± 0.185^c	0.845 ± 0.147^d
长轴长度/ μm	0.704 ± 0.107^a	0.519 ± 0.097^b	0.729 ± 0.163^a	0.614 ± 0.136^c
短轴长度/ μm	0.315 ± 0.056^a	0.264 ± 0.056^b	0.301 ± 0.058^a	0.298 ± 0.056^a
长短轴比率	0.455 ± 0.098^a	0.530 ± 0.159^b	0.435 ± 0.132^a	0.507 ± 0.132^b

注:表中特性数据为“平均值±标准差”。同列标有不同小写字母表示组间差异显著($p < 0.05$),同列标有相同小写字母表示组间差异不显著($p > 0.05$)。

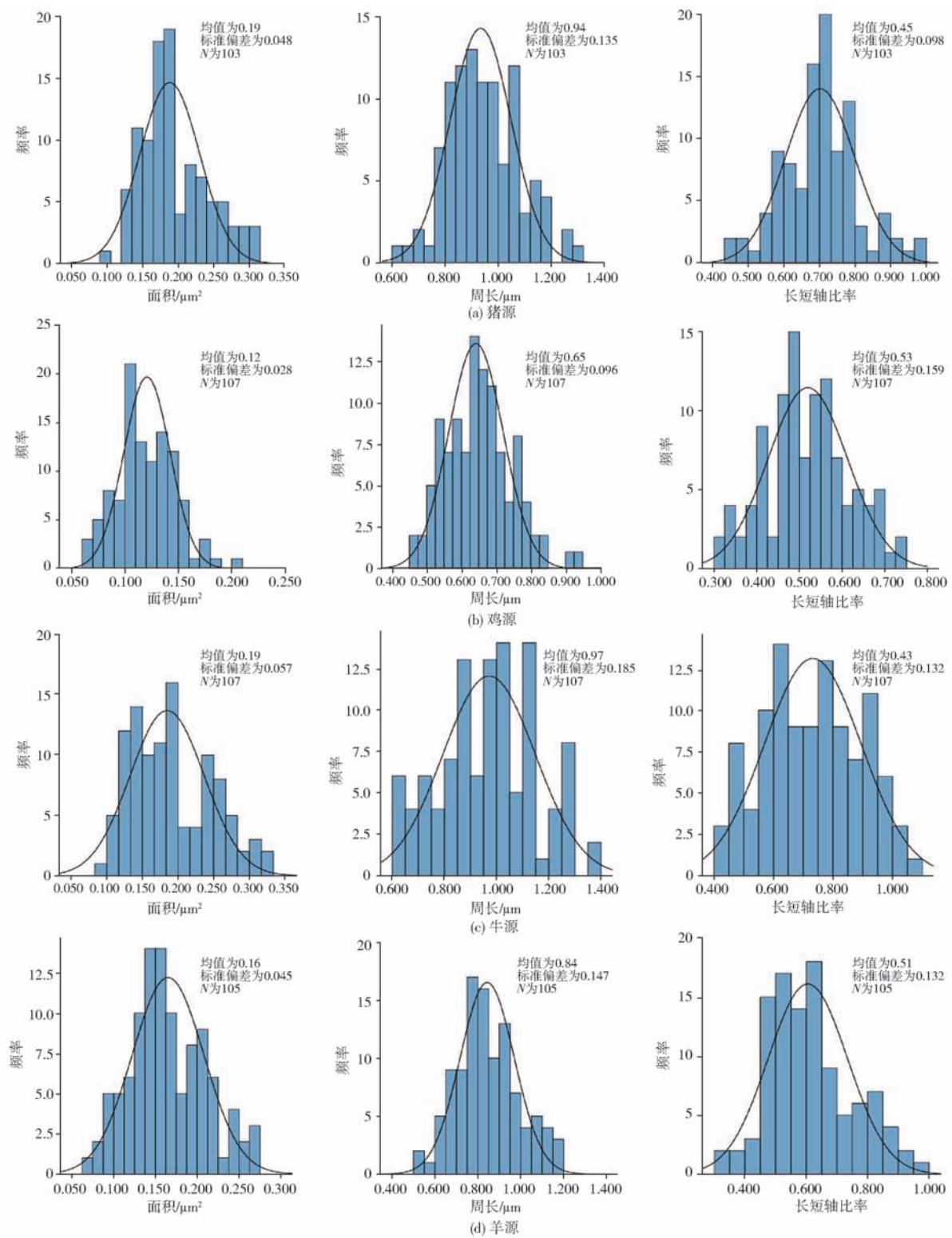


图3 不同种属肉骨粉骨颗粒腔隙的显微组织特性分布

Fig.3 Data distribution of bone fragments with different specie origins

由显微组织特性直方图可以看出,猪、鸡、牛、羊肉骨粉骨颗粒腔隙的面积、周长和长短轴比率数据均为正态分布。

由表1可知,根据骨颗粒腔隙的面积数据方差分析可知,猪肉骨粉和牛肉骨粉之间的面积测定数值无显著性差异,但均显著高于羊肉骨粉,而鸡肉骨粉的面积测定数值显著低于其他3类来源肉骨粉;

基于骨颗粒腔隙的周长数据方差分析,4类肉骨粉之间均有显著性差异,由大到小依次为牛肉骨粉、猪肉骨粉、羊肉骨粉、鸡肉骨粉;猪、牛肉骨粉骨颗粒腔隙的长轴显著高于羊肉骨粉,三者均高于鸡肉骨粉数据。基于骨颗粒腔隙的短轴数据方差分析,哺乳动物猪、牛和羊肉骨粉之间无明显差异,均显著高于鸡肉骨粉。长短轴比率数据方差分析显示,猪肉骨

粉和牛肉骨粉之间无显著性差异,鸡肉骨粉和羊肉骨粉之间无显著性差异,而鸡肉骨粉和羊肉骨粉的测定数值显著高于猪肉骨粉和牛肉骨粉。由此,研究所获取的骨颗粒显微组织特性数据具有进行不同种属肉骨粉鉴别分析的潜力。

表 2 校正集和验证集的数据统计分析结果
Tab.2 Statistical results of calibration and validation sets

样品集	肉骨粉样品	骨颗粒腔隙数	面积/ μm^2	周长/ μm	长短轴比率	短轴长度/ μm	长轴长度/ μm
校正集	猪源	78	0.195 ± 0.049	0.945 ± 0.133	0.459 ± 0.099	0.317 ± 0.059	0.703 ± 0.109
	鸡源	80	0.121 ± 0.027	0.648 ± 0.099	0.533 ± 0.154	0.267 ± 0.054	0.521 ± 0.094
	牛源	80	0.194 ± 0.058	0.978 ± 0.189	0.433 ± 0.130	0.304 ± 0.062	0.734 ± 0.159
	羊源	79	0.164 ± 0.046	0.848 ± 0.138	0.512 ± 0.123	0.299 ± 0.054	0.607 ± 0.129
验证集	猪源	25	0.190 ± 0.042	0.927 ± 0.143	0.442 ± 0.095	0.307 ± 0.049	0.709 ± 0.103
	鸡源	27	0.116 ± 0.031	0.644 ± 0.085	0.523 ± 0.176	0.256 ± 0.063	0.515 ± 0.107
	牛源	27	0.183 ± 0.053	0.961 ± 0.178	0.439 ± 0.140	0.294 ± 0.046	0.714 ± 0.172
	羊源	26	0.165 ± 0.046	0.835 ± 0.174	0.493 ± 0.158	0.294 ± 0.061	0.634 ± 0.154

表 2 表明校正集和验证集数据分布均匀,分集方法合理。表 3 为分别基于骨颗粒腔隙特性中的面积、周长和长短轴比率数据所建立的 PLS - DA 模型及独立验证集的判定结果。

表 3 基于显微组织特性的不同种属肉骨粉 PLS - DA 判别分析结果

Tab.3 Species discrimination results of PLS - DA based on individual parameter

评价指标	肉骨粉样品	识别率	拒绝率	正确判别率
面积	猪源	0.31	0.80	0.48
	鸡源	0.90	0.68	0.93
	牛源	0.24	0.85	0.19
	羊源	0.17	0.97	0.31
周长	猪源	0.54	0.73	0.56
	鸡源	0.93	0.81	0.93
	牛源	0.43	0.81	0.41
	羊源	0.04	0.96	0.23
短轴长度	猪源	0.40	0.65	0.36
	鸡源	0.63	0.62	0.74
	牛源	0.20	0.80	0.00
	羊源	0.00	1.00	0.12
长轴长度	猪源	0.47	0.81	0.68
	鸡源	0.81	0.69	0.81
	牛源	0.43	0.87	0.37
	羊源	0.09	0.90	0.15
长短轴比率	猪源	0.31	0.72	0.48
	鸡源	0.38	0.82	0.30
	牛源	0.50	0.69	0.37
	羊源	0.20	0.89	0.23

由表 3 可知,基于显微组织特性的鸡肉骨粉的 PLS - DA 判别分析结果均优于其他种属来源的肉骨粉样品。不同的显微组织特性中,基于周长特性

2.3 基于骨颗粒显微组织特性的不同种属肉骨粉鉴别

表 2 为分集后校正集和独立验证集骨颗粒显微组织特性的数据统计分析结果。

数据的鸡肉骨粉判别分析效果最好,识别率高于 0.90,拒绝率高于 0.80,相应的独立验证集的正确判别率为 0.93。其次为基于面积特性的分析效果,鸡肉骨粉的识别率为 0.90,独立验证集的正确判别率为 0.93,但拒绝率稍差为 0.68。长轴长度、短轴长度及其比率的分析结果表明,基于长轴特性的判别分析较好,鸡肉骨粉的独立验证集正确判别率为 0.81,其次为基于短轴的分析结果,独立验证集正确判别率为 0.74,而基于长短轴比率的不同种属肉骨粉的识别率、拒绝率均较低,难以进行不同种属肉骨粉的鉴别分析。

进一步将面积、周长、短轴和长轴长度两两组合,建立基于骨颗粒腔隙特性中的 PLS - DA 判别分析模型,并计算独立验证集的判定结果,见表 4。

由表 4 分析,同时基于 2 个特性参数组合对不同种属肉骨粉进行鉴别分析时,基于“面积 + 周长”特性数据的鉴别分析结果优于基于单一特性数据的结果,鸡源肉骨粉的识别率、拒绝率和独立验证集判别正确率分别为 0.93、0.81 和 0.93。而基于其他特性组合的分析结果均低于基于单一特性的结果。因此,研究推荐基于骨颗粒腔隙的“面积 + 周长”特性数据进行肉骨粉中鸡源即非哺乳动物源的鉴别分析,模型的判别正确率高于 0.9。PINOTTI 等^[12]基于线性判别式分析研究表明,基于面积的鸡源判别分析正确率仅为 0.7,基于“面积 + 短轴长度”特性数据的线性判别式分析结果最好,鸡源肉骨粉的判别正确率为 0.8,远低于本研究的判别分析效果。

在有效鉴别分析出鸡源肉骨粉的基础上,进一步探讨基于所获取的腔隙面积特性数据进行不同哺

乳动物来源肉骨粉样品的鉴别分析,PLS - DA 判别分析结果见表 5。

表 4 基于典型特性组合的不同种属肉骨粉 PLS - DA 判别分析结果

Tab.4 Species discrimination results of PLS - DA based on combined parameters				
评价指标	肉骨粉样品	识别率	拒绝率	正确判别率
面积 + 周长	猪源	0.48	0.73	0.48
	鸡源	0.93	0.81	0.93
	牛源	0.44	0.81	0.37
	羊源	0.06	0.95	0.23
面积 + 短轴长度	猪源	0.40	0.75	0.44
	鸡源	0.85	0.63	0.89
	牛源	0.15	0.85	0.00
	羊源	0.08	0.95	0.23
面积 + 长轴长度	猪源	0.41	0.81	0.64
	鸡源	0.81	0.71	0.81
	牛源	0.14	0.85	0.37
	羊源	0.10	0.88	0.19
周长 + 短轴长度	猪源	0.53	0.73	0.44
	鸡源	0.93	0.80	0.93
	牛源	0.44	0.81	0.37
	羊源	0.03	0.97	0.27
周长 + 长轴长度	猪源	0.42	0.83	0.52
	鸡源	0.90	0.81	0.81
	牛源	0.51	0.80	0.37
	羊源	0.19	0.90	0.19

由表 5 分析可知,基于面积、周长及其组合特性对不同种属哺乳动物(猪、牛、羊)肉骨粉进行鉴别分析时,基于组合特性的判别分析结果优于基于单一特性的结果,但得到的最优正确判别率仅为 0.65,判别模型的识别率和拒绝率均难以满足鉴别分析要求,这和 OTTOBONI 等^[13]箱线图比较分析的研究结果一致。从生物学上分析,家禽属于鸟纲,而猪、牛、羊均属于哺乳纲偶蹄目(动物类别差异较小),不同类别动物生长周期、饲养方式等均不相

同,因此本研究中基于动物骨颗粒表面腔隙的显微组织特性可以较好地鉴别出鸡源样品,却难以进一步鉴别分析不同哺乳动物源性样品。

表 5 基于面积与周长特性的不同种属哺乳动物源肉骨粉 PLS - DA 判别分析结果

Tab.5 PLS - DA results of different species of mammal MBM based on area and perimeter characteristic				
评价指标	肉骨粉样品	识别率	拒绝率	正确判别率
面积	猪源	0.22	0.73	0.48
	牛源	0.19	0.78	0.11
	羊源	0.66	0.52	0.65
周长	猪源	0.18	0.89	0.56
	牛源	0.49	0.72	0.37
	羊源	0.70	0.57	0.62
面积 + 周长	猪源	0.18	0.84	0.52
	牛源	0.43	0.74	0.37
	羊源	0.72	0.59	0.65

3 结束语

针对目前国际通用的饲料中动物源性成分检测显微镜标准方法的难点问题:完全依赖于检测人员的经验以及难以进一步判定所检出肉骨粉颗粒的种属来源,研究探讨了基于骨颗粒显微图像处理的不同种属肉骨粉的鉴别分析。研究表明,猪、鸡、牛、羊肉骨粉骨颗粒腔隙的面积、周长和长短轴数据均为正态分布,且不同种属之间均有显著性差异,具有较大的种属鉴别分析的潜力。偏最小二乘判别分析和独立验证表明,基于骨颗粒腔隙的面积、周长及其组合特性数据可以有效进行鸡源和哺乳动物源肉骨粉的鉴别分析,模型的判别正确率均达 0.93。其中基于面积和周长组合特性数据的鉴别分析结果优于基于单一特性数据的结果。而基于骨颗粒显微图像处理,很难进一步对不同哺乳动物(反刍动物和猪)源性肉骨粉进行鉴别分析。

参 考 文 献

1 GB/T 20193—2006 饲料用骨粉及肉骨粉[S]. 2006.

2 PRINCE M J, BAILEY J A, BARROWMAN P R, et al. Bovine spongiform encephalopathy[J]. Revue Scientifique et Technique, 2003, 22(22):37 - 60.

3 BELLORINI S, STRATHMANN S, BAETEN V, et al. Discriminating animal fats and their origins: assessing the potentials of Fourier transform infrared spectroscopy, gas chromatography, immunoassay and polymerase chain reaction techniques [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2005, 382(4):1073 - 1083.

4 FUMIÈRE O, VEYS P, BOIX A, et al. Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs[J]. Biotechnology Agronomy Society & Environment, 2009, 13(3):59 - 70.

5 NOELIA Tena, JUAN Antonio Fernández Pierna, ANA Boix, et al. Differentiation of meat and bone meal from fishmeal by near-infrared spectroscopy: extension of scope to defatted samples[J]. Food Control, 2014, 43:155 - 162.

6 EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Directive EC/126/2003 on the analytical method for the determination of constituents of animal origin for the official control of feedstuffs[S]. Official Journal European Union, 2003, 339:78 - 84.

- 3 杨玉芬. 日粮纤维对于猪不同生长阶段消化生理和生产性能的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2001.
- 4 BERROCOSO J, MENOYO D, GUZM N P, et al. Effects of fiber inclusion on growth performance and nutrient digestibility of piglets reared under optimal or poor hygienic conditions[J]. *Journal of Animal Science*, 2015, 93(8):3919–3931.
- 5 王利, 孟庆翔, 任丽萍, 等. 近红外光谱快速分析技术及其在动物饲料和产品品质检测中的应用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(6):1482–1487.
WANG L, MENG Q X, REN L P, et al. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) and its application in the determination for the quality of animal feed and products[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2010, 30(6):1482–1487. (in Chinese)
- 6 李军涛. 近红外反射光谱快速评定玉米和小麦营养价值的研究[D]. 北京:中国农业大学, 2014.
- 7 CHOI S W, CHANG S L, CHANG H P, et al. Prediction of nutrient composition and in-vitro dry matter digestibility of corn kernel using near infrared reflectance spectroscopy[J]. *Journal of the Korean Society of Grassland & Forage Science*, 2014, 34(4):277–282.
- 8 檀其梅. NIRS 对 11 种饲料原料常规成分测定结果的可靠性评估[D]. 合肥:安徽农业大学, 2008.
- 9 李婷婷. 玉米 DDGS 营养价值预测模型研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2013.
- 10 滑荣, 韩建国, 齐晓, 等. 近红外漫反射光谱法预测紫花苜蓿草颗粒营养价值[J]. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(12):2826–2829.
HUA R, HAN J G, QI X, et al. Research on predicting the nutrition value of pelletized alfalfa by near infrared reflectance spectroscopy[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2008, 28(12):2826–2829. (in Chinese)
- 11 VAN SOEST P, MOORE A. New chemical methods for analysis of forages for the purpose of predicting nutritive value[J]. *Proceedings of the IX International Grassland Congress*, 1965:424.
- 12 MURRAY I. Forage analysis by near infrared spectroscopy[M]//Davies A, Baker R D, Grant S A, et al. *Sward measurement handbook*. 2nd Ed. Cheshire: The British Grassland Society, 1993: 285.
- 13 熊本海, 罗清尧, 赵峰, 等. 中国饲料成分及营养价值表(2015 年第 26 版)制订说明[J]. *中国饲料*, 2015(21):23–33.
- 14 熊本海, 罗清尧, 赵峰, 等. 中国饲料成分及营养价值表(2015 年第 26 版)(续)[J]. *中国饲料*, 2015(22):34–39.
- 15 李民赞. 光谱分析技术及其应用[M]. 北京:科学出版社, 2006.
- 16 褚小立, 王艳斌, 陆婉珍. 近红外光谱定量校正模型的建立及应用[J]. *理化检验:化学分册*, 2008, 44(8):796–800.
CHU X L, WANG Y B, LU W Z. Establishment and application of calibration model for NIR spectroscopy[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis*, 2008, 44(8):796–800. (in Chinese)

(上接第 352 页)

- 7 EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Directive EC/152/2009 methods of analysis for the determination of constituents of animal origin for the official control of feed[S]. *Official Journal European Union*, 2009, 54: 103–107.
- 8 EUROPEAN COMMISSION (EC). Commission Regulation (EU) No 51/2013 Amending Regulation (EC) No 152/2009 as regards the methods of analysis for the determination of constituents of animal origin for the official control of feed[S]. *Official Journal European Union*, 2013, 20: 33–43.
- 9 GIZZI G, VON H C, BAETEN V, et al. Determination of processed animal proteins, including meat and bone meal, in animal feed [J]. *Journal of AOAC International*, 2004, 87(6):1334–1341.
- 10 PINOTTI L, CAMPAGNOLI A, TOGNON G, et al. Microscopic method in processed animal proteins identification in feed: applications of image analysis[J]. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*, 2004, 8(4):249–251.
- 11 PINOTTI L, CAMPAGNOLI A, MAGGIONI L, et al. Selection of new markers for animal by-products characterization by classical microscopy[J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2010, 6(Supp. 1):339–341.
- 12 PINOTTI L, FEARN T, GULALP S, et al. Computer image analysis: an additional tool for the identification of processed poultry and mammal protein containing bones[J]. *Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2013, 30(10):1745–1751.
- 13 OTTOBONI M, CHELI F, AMATO G, et al. Microscopy and image analysis based approaches for the species-specific identification of bovine and swine bone containing material[J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2014, 13(2):124.
- 14 CAMPBELL M R, BRUMM T J, GLOVER D V. Whole grain amylose analysis in maize using near-infrared transmittance spectroscopy [J]. *Cereal Chemistry*, 1997, 74(3):300–303.
- 15 ABBAS O, PIerna J A F, CODONY R, et al. Assessment of the discrimination of animal fat by FT-Raman spectroscopy[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2009, 924–926(1):294–300.