



Élelmiszertudományi Kar

GYÜMÖLCSÖK PENÉSZES ROMLÁSÁNAK ELŐREJELZÉSE

Sági-Kiss Virág
doktori értekezése

Készült a Budapesti Corvinus Egyetem
Alkalmazott Kémia Tanszékén
Budapest, 2012

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fodor Péter
Egyetemi tanár, az MTA doktora
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

Témavezetők: Dr. Fodor Péter
Egyetemi tanár, az MTA doktora
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

Héberger Károly
Tudományos tanácsadó, címzetes egyetemi tanár
Kémiai Kutatóközpont

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2012. június 5-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke:

Fekete András, DSc

Tagjai:

Hoschke Ágoston, CSc

Kemény Sándor, DSc

Sarkadi Livia, DSc

Szepesváry Pál, CSc

Opponensek:

Baranyai László, PhD

Németh Zsolt, PhD

Titkár:

Hegedűs Attila, PhD

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Ábrajegyzék	3
Táblázatjegyzék	5
Rövidítések jegyzéke	6
1. FEJEZET. BEVEZETÉS	9
2. FEJEZET. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	13
2.1. Mérési és mintavételi módszerek	15
2.1.1. Élelmiszerek illékony alkotóinak mintavételi lehetőségei	15
2.1.2. A szilárd fázisú mikroextrakció használata élelmiszerek illékony alkotóinak mintavételezésére	18
2.1.3. Élelmiszerek illékony alkotóinak mérési lehetőségei	19
2.1.4. A gázkromatográfiás tömegspektrometriás kapcsolt rendszer élelmiszerek illékony alkotóinak mérésére	23
2.2. Gyümölcsök illékony szerves vegyületei	27
2.2.1. Az alma illékony szerves vegyületei	28
2.2.2. A szilvák illékony szerves vegyületei	31
2.2.3. Az almák és szilvák rövid jellemzése	33
2.3. A gyümölcsök penészgombás romlása	34
2.3.1. A gyümölcsök tárolása	34
2.3.2. Az alma romlásának mikrobiológiája	35
2.3.3. A <i>Penicillium expansum</i> illékony vegyületei	36
2.4. Metabolitok azonosítása	39
2.4.1. Illékony szerves vegyületek összehasonlításának lehetőségei	39
2.4.2. Többváltozós statisztikai módszerek	42
2.4.2.1. Főkomponens-elemzés	44
2.4.2.2. Önszerveződő idegháló	45
2.4.2.3. Támogató vektor gép elvén alapuló regresszió	45
2.5. Kísérlettervezés	46
3. FEJEZET. A MEGOLDANDÓ FELADATOK ISMERTETÉSE	49
4. FEJEZET. ANYAG ÉS MÓDSZER	51
4.1. Az analitikai rendszer beállításai	52
4.2. Felhasznált programok	53
4.3. Adatelőkészítés	54
4.4. Anyagok és mikroorganizmusok	55
5. FEJEZET. ANALITIKAI MÓDSZERFEJLESZTÉS SZILVÁK PENÉSZGOMBÁS ROMLÁSÁNAK HATÁSÁRA KELETKEZŐ ILLÉKONY VEGYÜLETEK MÉRÉSE	57
5.1. Az SPME mintavétel optimalálása	58
5.2. Anyag és módszer	62
5.3. Az egészséges és romlott szilvák által kibocsátott illékony szerves vegyületek változásának elemzése	64
5.4. Többváltozós összehasonlítás	70
5.5. Következtetés	71

6. FEJEZET. <i>P. EXPANSUMMAL FERTŐZÖTT ALMÁK ÁLTAL KIBOCSÁTOTT ILLÉKONY VEGYÜLETEK VÁLTOZÁSA</i>	73
6.1. Anyag és módszer	74
6.2. A kibocsátott illékony vegyületek áttekintése	76
6.3. A romlás becslésének lehetőségei szerves illékony vegyületek alapján PLS módszerrel	80
6.4. A romlott gyümölcsök megkülönböztetésében fontos szerves illékony vegyületek kiválasztása SOMs módszerrel	82
6.5. A kibocsátott szerves illékony vegyületek becslésének lehetőségei az eltelt idő alapján.	85
6.6. Párhuzamos almás kísérletsorozatok összehasonlítása	86
6.7. Következtetések.	89
7. FEJEZET. <i>ALMÁK ÉS SZILVÁK ILLÉKONY VEGYÜLETEINEK VÁLTOZÁSA B.CINEREA ÉS P. EXPANSUM HATÁSÁRA.</i>	91
7.1. Anyag és módszer	92
7.2. A kibocsátott illékony szerves vegyületek ép és romlott alma esetén	93
7.3. A kibocsátott illékony szerves vegyületek oltott szilvák esetére	96
7.4. Botrytis cinerea-val oltott szilvák fontos illékony vegyületei	99
7.5. Következtetés	101
Új tudományos eredmények (Tézisek)	103
Összefoglalás	105
Summary	107
Köszönetnyilvánítás	109
A dolgozathoz kapcsolódó publikációk listája	111
Irodalomjegyzék	113

Ábrajegyzék

1. ÁBRA: ILLÉKONY VEGYÜLETEK (A) DIREKT ÉS (B) PURGE AND TRAP MINTAVÉTELÉNEK LEHETSÉGES ELRENDEZÉSEI.....	16
2. ÁBRA: AZ SPME MINTAVÉTELI TECHNIKA.....	16
3. ÁBRA: E-ORR ÉS MSE-ORR ALAPJÁN TÖRTÉNŐ ELTARTHATÓSÁG BECSLÉSE. AZ ÁBRA EREDETI FORMÁBAN, ENGEDÉLLEL KERÜLT ÁTVÉTELRE, LISZENSZ SZÁMA: 2896420153055.....	21
4. ÁBRA: FŐKOMPONENS-ELEMLÉSI AZ (A) SPME-GC-MS, JOBB OLDALON (B) A E-ORR VÁLTOZÓIVAL. AZ ÁBRA EREDETI FORMÁBAN, ENGEDÉLLEL KERÜLT ÁTVÉTELRE, LISZENSZ SZÁMA: 2896451401603	22
5. ÁBRA: GC-MS KAPCSOLT RENDSZER.	23
6. ÁBRA: TERPÉNSZÁRMAZÉKOK, IZOPRÉN EGYSÉG(A), AZ AZONOS ÖSSZEGKÉPLETŰ A GERANIOL (B), CITRONELLÁL (C) ÉS MENTOL(D).	28
7. ÁBRA: AZ ALMA AROMAKOMPONENSEIRŐL MEGJELENT CIKKEK SZÁMA ÉVEK SZERINT LEBONTVA. AZ EREDMÉNYEK A SCOPUS ADATAIT TÜKRÖZIK.....	29
8. ÁBRA: (A) ‘GOLDEN DELICIOUS’ ÉS (B) ‘GRANNY SMITH’ ALMA (FOTÓ: WWW.FOTOSEARCH.COM).....	33
9. ÁBRA: JAPÁN TÍPUSÚ SZILVA (FOTÓ: WWW.FOTOSEARCH.COM).....	34
10. ÁBRA: A METABOLIKUS ÚTVONALAK ÁTTEKINTÉSE A PENÉSZGOMBÁK FŐ ILLÉKONY VEGYÜLETEINEK SZINTÉZISÉRE VONATKOZÓAN [SCHNURER ET AL. 1999, LARSEN ET AL. 1994].	36
11. ÁBRA: A METABOLITOK KEMOMETRIAI FELDOLGOZÁSÁNAK ÁLTALÁNOSÍTOTT FOLYAMATÁBRÁJA	41
12. ÁBRA FÜGGETLEN VÁLTOZÓK ÉS FŐKOMPONENSEK KAPCSOLATA	44
13. ÁBRA: A SVM REGRESSZIÓ ELVÉNEK ÖSSZEFOGLALÁSA.	46
14. ÁBRA: A MINTAVÉTELI ELRENDEZÉS	56
15. ÁBRA: AZ ELŐKÍSÉRLETEK SORÁN MÉRT NORMÁL ALKÁN KONCENTRÁCIÓKKAL ARÁNYOS CSÚCSSTERÜLETEK.	61
16. ÁBRA.: 1A ÉS 1B AZ OLTOTT AGAR, 2A ÉS 2B A KONTROLL AGAR, 3A ÉS 3B AZ OLTOTT SZILVA, 4A ÉS 4B JELŰ MINTÁK A KONTROLL SZILVÁT JELÖLIK.	63
17. ÁBRA: AZ ALKÁN KOMPONENSEK CSÚCS ALATTI TERÜLETE A SZILVA RENDSZERBEN.....	64
18. ÁBRA: A KONTROLL SZILVÁK TELJES ION KROMATOGRAMJAI FELÜLRŐL LEFELEÉ HALADVA: 2. NAP, 3. NAP, 4. NAP (1. KÍSÉRLET).	65
19. ÁBRA: KÉT PÁRHUZAMOS KONTROLL SZILVA TELJES ION KROMATOGRAMJA AZ ELSŐ NAPON.	65
20. ÁBRA: A VÁLTOZÓK ELOSZLÁSA A MÁSODIK SZILVÁS KÍSÉRLETSSOROZATBAN.	66
21. ÁBRA: KÉT ROMLOTT ÉS EGY EGÉSZSÉGES SZILVA KROMATOGRAMJA.	67
22. ÁBRA: AZ ÉP ÉS ROMLOTT SZILVÁK MEGKÜLÖNBÖZTETÉSÉBEN FONTOS VEGYÜLETEK TÖMEGSPEKTRUMAI. A FÜGGŐLEGES TENGELYEN A RELATÍV GYAKORISÁG, A VÍZSZINTES TENGELYEN AZ M/Z ÉRTÉKEK TALÁLHATÓK. AZ EGYES KOMPONENSEK SZÁMOZÁSA MEGFELEL A 21. ÁBRA SZÁMOZÁSÁNAK.	68
23. ÁBRA: A SZTIROL LEGJELLEMZŐBB TÖMEGE A 104, EGY EGÉSZSÉGES ÉS EGY ROMLOTT SZILVA MINTÁBAN.....	69
24. ÁBRA: A KETTES ÉS HÁRMAS SZINTEN ROMLOTT SZILVA ÉS AGAR MINTÁK AZ ELSŐ ÉS A MÁSODIK FŐKOMPONENS SÍKJÁRA VETÍTVE.	71
25. ÁBRA: A SZTIROL (A) ÉS AZ 1-METOXI-METILBENZOL (B) MOLEKULÁJA.	72
26. ÁBRA: AZ ILLÉKONY VEGYÜLETEK MÉRÉSÉHEZ ALKALMAZOTT MODELKÍSÉRLETI ELRENDEZÉS.	74
27. ÁBRA: SPECIÁLIS OLTÓKACS.	75
28. ÁBRA: ROMLOTT ÉS ÉP ALMA FÉNYKÉPE 1 HÉT UTÁN.....	75
29. ÁBRA: EGÉSZSÉGES ÉS ROMLOTT ALMA TELJES ION KROMATOGRAMJA. 2-2 PÁRHUZAMOS OLTÁS (KÜLÖN ÜVEGBEN OLTOTT ÉS MINTÁZOTT).	77
30. ÁBRA: EGÉSZSÉGES ÉS ROMLOTT ALMA TELJES ION KROMATOGRAMJÁNAK EGY RÉSZLETE. FENT: OLTOTT, LENT: KONTROLL.....	77
31. ÁBRA: NÉHÁNY VEGYÜLET KONCENTRÁCIÓJÁNAK VÁLTOZÁSA. ABSZCISSZA: A NAPOK SZÁMA, ORDINÁTA: KONCENTRÁCIÓ.	79
32. ÁBRA: A VALÓS ÉS A BECSÜLT ÉRTÉKEK A PLS REGRESSZIÓ ESETÉN.....	80
33. ÁBRA: CSAK A FERTŐZÖTT MINTÁK BETANÍTOTT SOM TÉRKÉPEI, A ROMLÁSI FÁZISOK SZERINT SZÍNEZVE: (A) A ‘BEST MATCHING UNIT’ A ROMLÁSI FÁZIS SZERINT JELÖLVE ÉS (B) A ‘BEST MATCHING UNITS’ A OLTÁSTÓL ELTETT NAPOK SZÁMA SZERINT SZÍNEZVE. A JELÖLÉSEK: EGÉSZSÉGES (H) ; ELSŐ ROMLÁSI FÁZIS (S1) ; MÁSODIK ROMLÁSI FÁZIS (S2)	83
34. ÁBRA: KÉT ÖSSZETEVŐ SÍKJA, A SZÍNEZÉS AZ ADOTT HEXÁHOZ TARTOZÓ MINTABELI INTENZITÁSSAL ARÁNYOSAN VÁLTOZIK.	83

35.	ÁBRA: A MEGKÜLÖNBÖZTETÉSBEN FONTOS VEGYÜLETEK TÖMEGSPEKTRUMAI ÉS ELOSZLÁSA. KÉKKEL A KONTROLL MINTÁK, PIROSSAL A FERTŐZÖTT MINTÁK SZEREPELNEK	84
36.	ÁBRA FOLYTATÁSA: A MEGKÜLÖNBÖZTETÉSBEN FONTOS VEGYÜLETEK TÖMEGSPEKTRUMAI ÉS ELOSZLÁSA. KÉKKEL A KONTROLL MINTÁK, PIROSSAL A FERTŐZÖTT MINTÁK SZEREPELNEK.	85
37.	ÁBRA: AZ SVM ÉS A PLS REGRESSZIÓ KALIBRÁCIÓ EGYENESEI.	86
39.	ÁBRA. A PÁRHUZAMOS OLTÁSOKBÓL SZÁRMAZÓ VEGYÜLETEK KONCENTRÁCIÓI AZ IDŐ FÜGGVÉNYÉBEN.....	88
40.	ÁBRA. AZ ELSŐ ÉS A HARMADIK KÍSÉRLET. A PIROSSAL A ROMLOTT A ZÖLDDEL AZ EGÉSZSÉGES MINTÁKAT JELÖLTÜK. A LILA JELÖLŐK A SZÁL ÜRES LEFŰTÉSÉNEK KROMATOGRAMJAI. A SZÁMOK PEDIG AZ OLTÁSTÓL ELTELT NAPOK SZÁMÁT.	88
41.	ÁBRA: A ROMLOTT (FELÜL) ÉS AZ EGÉSZSÉGES (ALUL) ALMA VOC-INEK KROMATOGRAMJAI 12 NAPPAL A FERTŐZÉS UTÁN.....	93
42.	ÁBRA: AZ ALMÁK LÉGTERÉBŐL MÉRT ILLÉKONY VEGYÜLETEK FŐKOMPONENS-ELEMZÉSE.	95
43.	ÁBRA: <i>B. CINEREÁVAL</i> ÉS <i>P. EXPANSUMMAL</i> OLTOTT, ROMLOTT ALMÁK ÉS KONTROLL ALMÁK VOC-INEK KROMATOGRAMMAI.	96
44.	ÁBRA: <i>B. CINEREÁVAL</i> ÉS <i>P. EXPANSUMMAL</i> OLTOTT ROMLOTT ALMÁK ÉS KONTROLL ALMÁK VOC-I.	97
45.	ÁBRA: A SZILVA MINTÁK LÉGTERÉBŐL MÉRT ILLÉKONY VEGYÜLETEK FŐKOMPONENS-ELEMZÉSE.	98
46.	ÁBRA: A BOTRYTIS CINEREÁVAL OLTOTT SZILVÁK VOC-I AZ ELSŐ KÉT FŐKOMPONENS SÍKJÁRA VETÍTVE.	99
47.	ÁBRA: X TENGELY: PC1 (47,19%), Y TENGELY: PC2(15,73%), Z TENGELY: PC3 (13,18%).	100
48.	ÁBRA: A ROMLOTT ÉS ÉP SZILVA MEGKÜLÖNBÖZTETÉSÉBEN FONTOS TÖMEGSPEKTRUMOK.	101

Táblázatjegyzék

1. TÁBLÁZAT: AZ ILLÉKONY KOMPONENSEK MÉRÉSÉRE ALKALMAZHATÓ NÉHÁNY MINTAVÉTELI TECHNIKA PARAMÉTEREI WILKES ÉS MUNKATÁRSAI SZERINT. A TÁBLÁZAT ENGEDÉLLEL KERÜLT ÁTVÉTELRE, LISZENSZ SZÁMA: 2896460183496.....	17
2. TÁBLÁZAT: AZ ELVÁLASZTÁSHOZ HASZNÁLT OSZLOP ÉS A FÚTÉSI PROGRAM PARAMÉTEREI NÉHÁNY KÖZLEMÉNY ALAPJÁN.	25
3. TÁBLÁZAT: 'GOLDEN DELICIOUS' ALMA AROMAKOMPONENSEI NÉHÁNY PUBLIKÁCIÓ ALAPJÁN.....	30
4. TÁBLÁZAT: KÉT JAPÁN SZILVA FAJTA ILLÉKONY VEGYÜLETEINEK CSÚCS ALATTI TERÜLETEI ÉS KOVÁTS INDEXEI GOMEZ ÉS MUNKATÁRSAI SZERINT. N.A.: NINCS ADAT.	31
5. TÁBLÁZAT: DG 18 AGARON OLTOTT <i>P. expansum</i> ÁLTAL KIBOCSÁTOTT ILLÉKONY SZERVES VEGYÜLETEK [MATYSIK ET AL. 2008, 2009].....	37
6. TÁBLÁZAT: NÉHÁNY PÉLDA AZ ILLÉKONY METABOLITOK ÉLELMISZER ANALITIKAI ELEMZÉSÉNél HASZNÁLT STATISZTIKAI MÓDSZEREKBől.	43
7. TÁBLÁZAT: A KÍSÉRLETI TERV FAKTORAI, ÉS SZINTJEI.	59
8. TÁBLÁZAT: A KÍSÉRLETI TERV BEÁLLÍTÁSAI, ÉS EREDMÉNYEI.	59
9. TÁBLÁZAT: A FAKTOROK HATÁSAI.	60
10. TÁBLÁZAT: A SZILVA ILLÉKONY KOMPONENSEINEK KÍSÉRLETI A PARAMÉTEREI. *: A PONTOSÍTÁS ÉRDEKÉBEN AZ 'S' AZ SECUNDUM, MÁSODPERC.	63
11. TÁBLÁZAT: A ROMLÁS VIZUÁLIS JELEI ALAPJÁN TÖRTÉNŐ CSOPORTOK LÉTREHOZÁSA.	70
12. TÁBLÁZAT: AZ ALMÁK MÉRÉSÉRE HASZNÁLT KÍSÉRLETEK RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA.	74
13. TÁBLÁZAT: AZ ALMAMINTÁKNÁL TALÁLT CSÚCSOK. A NEGYEDIK OSZLOPBAN A PROGRAM ÁLTAL MEGADOTT SZÁZALÉK JELZI A SZOFTVERBEN TALÁLT TÖMEGSPEKTRUMOKKAL VALÓ EGYEZÉS VALÓSZÍNŰSÉGÉT.	81
14. TÁBLÁZAT: A MINTAELEMSZÁMOK ELOSZLÁSA A MINTÁK TÍPUSA ÉS A ROMLÁS VIZUÁLIS JELEI ALAPJÁN	82
15. TÁBLÁZAT: A KÍSÉRLETI ELRENDEZÉS RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA	92
16. TÁBLÁZAT: ALMA AROMAKOMPONENSEK AZ IRODALOMMAL ÖSSZEVETVE.	93
17. TÁBLÁZAT: AZ ELSŐ FŐKOMPONENST LEGINKÁBB MEGHATÁROZÓ VEGYÜLETEK	95
18. TÁBLÁZAT: AZ ALMA ÉS SZILVA MINTÁKBAN EGYARÁNT FONTOS SZEREPET JÁTSZÓ VEGYÜLETEK	98

Rövidítések jegyzéke

ANN	Artificial Neural Network	mesterséges idegháló
ANOVA	Analysis of variance	varianciaanalízis
AMDIS	Automated Mass Spectral Deconvolution And Identification System	automatizált, tömegspektrumokat összetevőire bontó és azonosító szoftver
CA	Controlled Atmosphere	szabályozott légkör
CAR	Carbowax	carbowax
DHE	Dynamic Headspace Extraction	dinamikus gőztér extrakció
DTE	Direct Thermal Extraction	direkt termikus extrakció
DVB	Divynil Benzene	divinil-benzol
E-orr	Electronic Nose	elektronikus orr
FID	Flame Ionization Detection	lángionizációs detektálás
GC	Gas Chromatography	gázkromatográfia
IC	Ion Chromatography	ion kromatográfia
IMS	Ion Mobility Spectrometry	ion mobilitást mérő spektrometria
IUPAC	International Union of Pure And Applied Chemistry	tiszta és alkalmazott kémia nemzetközi uniója
HCA	Hierarchical Cluster Analyzes	hierarchikus fürtelemzés
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia
HS	Headspace	gőztér
MLR	Multiple Linear Regression	többszörös lineáris regresszió
MS	Mass Spectrometry	tömegspektrometria
MSE-orr	Mass Spectrometry Nose	tömegspektrometriás elektronikus orr
MVA	Multivariate Analysis	többváltozós elemzés
MVOC	Microbial Volatile Organic Compound	mikrobiális szerves illékony vegyület
MVR	Multivariate Regression	többváltozós regresszió
LDA	Linear Discriminant Analysis	lineáris diszkriminancia elemzés
PA	Polyacrylate	poliakrilát
PC	Principal Component	főkomponens
PCA	Principal Components Analysis	főkomponens-elemzés
PDMS	Polydimethylsiloxane	polidimetil-sziloxán
PLS	Partial Least Squares	parciális legkisebb négyzetek
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis	parciális legkisebb négyzetek elvén alapuló diszkriminancia analízis
P&T	Purge-And-Trap	kihajtás és csapdázás
RSD	Relative Standard Deviation	relatív szórás
SEP	Standard Error of Prediction	a becslésre jellemző reziduális szórás
SEM	Standard Error of The Mean	átlag szórása

SFE	Supercritical Fluid Extraction	szuperkritikus folyadék extrakció
SOM	Self Organizing Map	önszervező idegháló
SPME	Solid-Phase Microextraction	szilárd fázisú mikroextrakció
SPME-GC-MS	Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass spectrometry	szilárd fázisú mikroextrakciós mintavétellel kapcsolt gázkromatográfiás tömegspektrometria
SVM	Support Vector Machine	támogató vektor gép
SVR	Support Vector Regression	támogató vektor gép elvét használó regresszió
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction	az előrejelzés hibája
TD	Thermal Desorption	termikus deszorpció
TOF-MS	Time Of Flight Mass Spectrometry	repülési idő alapján mérő tömegspektrometria
VOC	Volatile Organic Compound	illékony szerves alkotó/vegyület

1. FEJEZET. BEVEZETÉS

A betakarítás utáni veszteségek mind zöldségek, mind gyümölcsök esetében nagy gondot okoznak, ugyanis fajtától és a tárolókban alkalmazott technológiától függően a veszteség elérheti akár a 10-40%-ot is [Hitka 2011]. A veszteségek adódhatnak egyrészt a növény légzéséből és párologtatásából, nagyobb részben pedig a patogén mikrobák tevékenységéből. A penészgombák nemcsak minőségi romlást eredményezhetnek, de termelhetnek az egészségre veszélyes mikotoxinokat is. Gyümölcsök esetén elsősorban a penészgombák jelentenek különösen nagy gondot [Pitt et al. 2009]. Az élelmiszeripari alapanyagok szabályozott légterű (controlled atmosphere, CA) tárolása megoldással szolgált néhány gyümölcs és zöldség eltarthatóságának növelésére. A légtér összetételének szabályozása előnyös a mikrobiális romlás visszaszorítása érdekében. Nagy páratartalom mellett a légzés intenzitása csökken, ha az O_2 koncentráció csökken és a CO_2 koncentráció növekszik, mely körülmények közt akár 8-10 hónapon át tárolni lehet a termékeket, hermetikusan lezárt térben. Ez esetben azonban a termék ellenőrzése nehézkessé válik, és a tulajdonos gyakran hónapok múlva szembesülhet a veszteségekkel. Nagy előrelépést jelentene tehát egy olyan mérőrendszer, mellyel ipari méretű szabályozott légterű tárolókban könnyen, olcsón, hatékonyan és gyorsan előre lehetne jelezni az esetleges mikrobiális romlást.

A szakirodalomban már bizonyították [Matysik et al. 2009], hogy az egyes mikroorganizmusok által kibocsátott illékony szerves vegyületek (volatile organic compound, VOC) megfelelő mérési körülmények között alkalmasak az adott faj azonosítására. Ahhoz, hogy ebből az elméleti lehetőségből egy iparilag alkalmazható mérőrendszer feltételeit megteremtjük, nem egy fajt kell azonosítani hanem a lehető legtöbbre jellemző módszert kell alkalmazni. Két út van, vagy a légtérből vett minták folyamatos (on-line), automatizált összevetése vagy olyan jelző (marker) vegyületek alkalmazása, amelyek általánosak minden vagy több olyan romlásra amely az adott terménnyel kapcsolatban előfordulhat, vagy általánosak egy adott mikrobára különböző termények esetén.

A mikrobiális metabolitok keresése közben nem ismerjük előre azokat a vegyületeket, amelyeket kimutatni szeretnénk, ez az úgynevezett 'untargeted' vagy 'non-targeted' (nem-célzott) analitikai feladat. Ilyen esetekben az egyik és leggyakoribb módszer a kézi kiértékelés, azonban a természet által produkált bonyolult VOC mintázatok esetében ez nagyon időigényes feladat. Különböző többváltozós statisztikai módszerek használhatók az illékony vegyületek mért adathalmazának összevetésére. A legnagyobb probléma a mikrobiális illékony vegyületek kutatásával a termelt vegyületek nagy száma, és hogy mind mennyiségük mind minőségük

nagyban függ a környezeti hatásoktól. Ez mind a kísérletek tervezését, mind a különböző kutatások eredményeinek összevetését megnehezíti, a kivitelezés elképzelhetetlen valamilyen automatizált kiértékelés nélkül. Ezért minden olyan kutatás időszerű amely ezen kísérletek adatfeldolgozását lerövidíti vagy egyáltalán lehetővé teszi. Az én kísérleti megközelítem abban tér el a szakirodalomban talált tanulmányoktól, hogy egyszerre több gyümölcsmintát és több törzset alkalmazok a romlás modellezésére. A bevett gyakorlattal ellentétben nem csak a romlott és nem romlott minták által kibocsátott VOC-ket vizsgáltam, hanem ezek változásai során keresem a marker vegyületeket.

Az illékony vegyületek analitikai mérési lehetőségeinek és a marker vegyületek felismerésének fejlesztése nem csak az élelmiszeriparban hasznos, régóta kutatják a markereket rákos sejtek korai felismerésére [Zhang et al. 2010], mikrobiális biológia fegyverek gyors kimutatására [Uithoven et al. 2000] vagy éppen egészség monitorozás [Roux et al. 2011]. A klasszikus mikrobiológiai módszerek, a sejtek növekedési ideje miatt több napba telnek. Az antitestek felismerését felhasználó módszerek szintén legalább több órába kerülnek. Nem véletlen, hogy a mikrobák gyors kimutatásának bármilyen lehetősége nagy figyelmet kelt, mint a mikrobák elemi összetételének, vagy manapság a mikrobák által kibocsátott illékony szerves vegyületek detektálása [Zolotov 2011].

A bevezetésben említettem meg, hogy mivel a kutatási téma aktív, több olyan angol kifejezéssel találkozni a dolgozatban aminek a magyar megfelelőjével lehet vitatkozni. A szaknyelvben az új, idegen szavak magyar megfelelői lassan szűrődnek át, és sokszor különböző csoportok különböző kifejezéseket használnak. Ez a probléma főleg a többváltozós statisztikai fejezetnél jelentkezik. Ahol csak lehetett a 2001-ben kiadott Kemometria könyv [Horvai et al. 2001] alapján választottam a dolgozatban használt kifejezéseket, vagy jelöltem a névválasztás alapjául szolgáló közleményt. Ahol erre nem volt lehetőségem, ott irányelvként minél magyarosabb és az angol kifejezés értelmét minél jobban visszaadó kifejezést kerestem, akkor is ha az hosszú definíciókat eredményezett.

2. FEJEZET. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A kellemetlen szag legalább olyan feltűnő kísérője az élelmiszerek romlásának, mint a szemmel látható jelek. A kezdetektől fogva segít az embernek a kevésbé látható, belülről rothasztó patogének felismerésében. Ez a szag a mikrobák által termelt illékony komponensek keveréke, melyek detektálása évek óta kutatott terület a metabolomika tudományágán belül. A rendszerbiológia nevű tudományág egyik képviselője a metabolomika, a tudományágba tartoznak az úgynevezett „omikák” (omics), mint a jól ismert genomika vagy proteomika. Ezek olyan kutatási stratégiát képviselnek, amelyben nem egy feltételezést bizonyítunk be, hanem az adatbázisok tömkelegében keres mintázatot, korrelációt, azt nézi, mi és hogyan változik az adott növényi vagy állati szervezetben.

A mikrobiális metabolitok keresése közben nem ismerjük előre azokat a vegyületeket, amelyeket kimutatni szeretnénk, ez az úgynevezett 'untargeted' vagy 'non-targeted' analitikai feladat. Az ilyen, nem előre kiválasztott vegyületek mérésére irányuló elemzések általában szembe mennek a bevett analitikai gyakorlattal. Nem arra törekednek, hogy a mérendő minta alkotóelemeit elválasszák a mátrixtól hanem, hogy minél hübb képet kapjanak az aktuális minta tartalmáról. Az analitikai cél minél több információ rögzítése a mintából. Napjainkban egyre több kutatás foglalkozik a metabolikus folyamatok során termelődő anyagok elemzésével. Az elemzések másik megközelítési módja, amikor előre kiválasztjuk azokat a metabolitokat amelyeket vizsgálni fogunk (targeted). A célzott mérések során az azonosítani kívánt vegyületek egy specifikus csoportjára fókuszálnak, és arra kíváncsiak, hogy ezen anyagok hogyan változnak. Az előre nem meghatározott metabolitok mérése során arra törekednek, hogy lehetőség szerint minél több vegyületet ki lehessen mutatni, és valamiféle ujjlenyomatot vagy mintázatot kapjanak a detektált illékony alkotók alapján [Cevallos-Cevallos et al. 2009].

A növényi VOC-k, azaz az aromakomponensek mérései voltak a növényi metabolomika kutatásának első képviselői. [van Dam et al. 2008]. Az illékony vegyületek hozzájárulnak az íz érzéshez, így mindig is fontos szerepet kaptak az élelmiszeripari kutatásokban, a meghatározásukról szóló irodalom jelentős. A mért VOC-k összevetése a legkülönbözőbb célokkal történhet. Leggyakoribbak a fajta azonosítása [Gomez et al. 1994, Horvat et al. 1992, Solis-Solis et al. 2007, Zhu et al. 2008], a deviancia detektálása [Moalemiyan et al. 2007, Siripatrawan et al. 2007, Moularat et al. 2008, Kushalappa et al. 2002], származási hely megállapítása [Mauriello et al. 2009, Amtmann 2009] minőségi osztályozás [Pongsuwan et al. 2006, Maciejewska et al. 2006], vagy a növények különböző kezeléseinek detektálása [Khan et al. 2008]. A legérdekesebb kérdés hogyan tudjuk összevetni két VOC mérés eredményét, ezzel

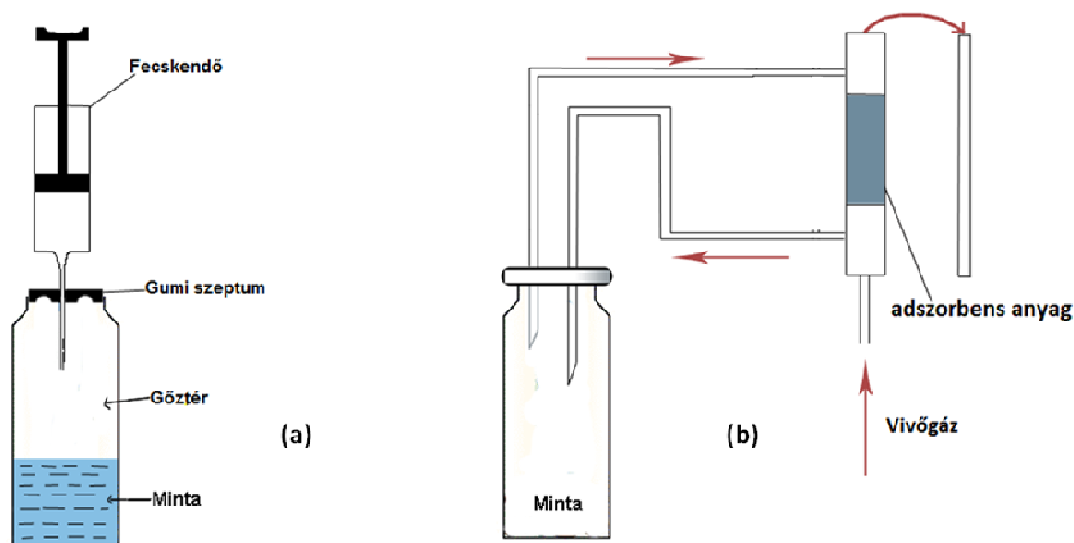
azonban az **Hiba! A hivatkozási forrás nem található.** fejezetben foglalkozom miután áttekintettük a mérési lehetőségeket.

2.1. Mérési és mintavételi módszerek

2.1.1. Élelmiszerek illékony alkotóinak mintavételi lehetőségei

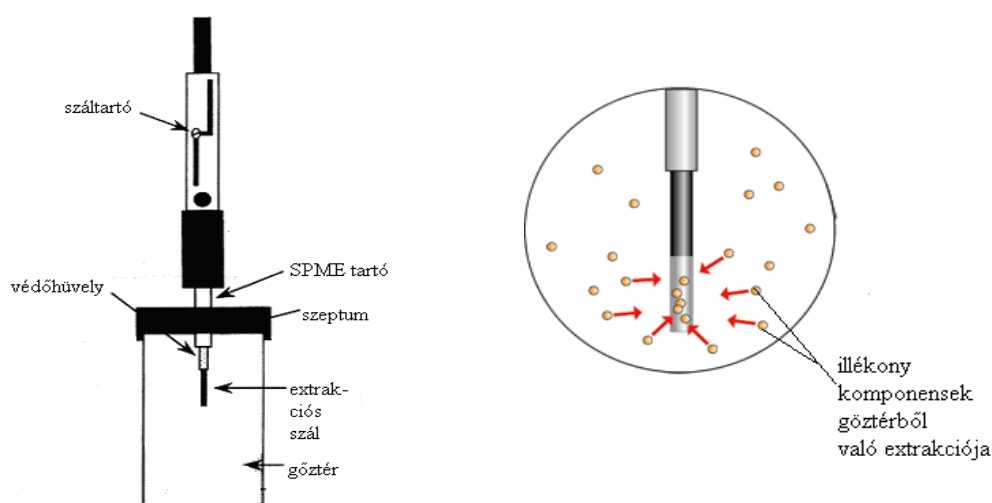
Élelmiszerminták előkészítése aromakomponensek gázkromatográfiás (gas chromatography, GC) méréséhez általában munkaigényes. Ha nem a légtérből veszünk mintát, az első lépés a minta homogenizálása, amely valamilyen darabolási vagy turmixolási lépéssel kezdődik. Ezt követi a többszörös folyadék-folyadék extrakció, centrifugálás, szárítás vagy párologtatás. A felhasznált eszközök általában egyszerűek, azonban az egész folyamat sok időt vesz igénybe. Sok illatkomponens, főleg a biogén aminok és az oxidációval keletkezett aldehidek kromatográfiás csúcsainak alakja elnyúló (tailing) a gázkromatográfiás mérésekben. Ezt termikus szétesés vagy az oszlop aktív helyeivel történő kölcsönhatás okozhatja. Ezek a problémák származékképzéssel csökkenthetők, így a mintaelőkészítés gyakran tartalmaz egy ilyen lépést is. Azonban ez a reakció további bizonytalanságot visz a mennyiségi meghatározásba és bonyolítja a végrehajtást [Wilkes et al. 2000].

A minták gőzterének (headspace) elemzése, azaz a minta feletti légtérből való mintavétel ugyan jóval lecsökkenti a mérhető komponensek körét, de ez a szelektivitás előnyt is jelenthet a vizsgálatok során. Az egyik legelterjedtebb mintavételi elrendezés a direkt injektálás. Ahogy az 1/a ábrán is látható, egy szeptummal lezárt mintatartóból fecskendő segítségével bizonyos gázmennyiséget kiszívunk a gőztérből és ezt az analizátorba juttatjuk [Mitra 2004, Dean 1998]. A másik gyakorta használt lehetőség az 1/b ábrán látható „kihajtás” és „csapdázás” (purge and trap, P&T) mintavétel egy lehetséges elrendezése. Ezt más néven dinamikus gőztér extrakciónak (dynamic headspace extraction, DHE) is nevezik. A folyamat során az illékony vegyületeket kifújatják a mintából egy állandó inert vivőgáz árammal (ami általában hélium) és egy szorpciós csapdába gyűjtik, ahol a vegyületek adszorbeálódnak egy arra alkalmas felületre pl. TENAX [Karlshoj et al. 2007] vagy C₁₈ [Mitra 2004, Dean 1998].



1. ábra: Illékony vegyületek (a) direkt és (b) purge and trap mintavételének lehetséges elrendezései

Számos más, itt nem részletezett módszer mellett, egy manapság már elterjedt lehetőség a minta gőztérének elemzésére az szilárd fázisú mikroextrakció (solid phase microextraction, SPME). A kanadai Pawliszyn professzor és munkatársai által 1989-ben kifejlesztett technika új lehetőségeket teremtett az illékony vegyületek kis mennyiségű mérésére [Pawliszyn 2001]. A technika egy nagy fajlagos felülettel rendelkező, vékony szorbens réteggel bevont szálon alapul (2. ábra). A bevonat kerülhet a kapilláris külső vagy belső falára. A szálat a mintaoldatba vagy annak gőztérébe merítve a mérendő alkotók megoszlanak a folyadék- vagy a gőzfázis és az extrakciós szál között.



2. ábra: Az SPME mintavételi technika

Az, hogy az SPME nem igényel szerves oldószer használatot, rendkívül fontos a mai labortechnikában. Az SPME technika fő analitikai előnyei, hogy lényegesen lerövidíti a mintaelőkészítést és kicsi koncentrációk ($0,1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$) esetén is kiválóan alkalmazható. Azonban ez a technika nem a teljes kinyerésre törekszik, mert ez egy egyensúlyi extrakciós módszer. Az adszorpció egyensúly beállta után a mikroextrakciós szálát a GC-s injektorba helyezve az adszorbeálódott vegyületek hő hatására deszorbeálódnak. A kötődés hatékonyságát befolyásoló tényezők a deszorpció idő, -hőmérséklet, extrakciós idő, pH, sótartalom, gáztér kevertetése és nem utolsósorban a szál anyagi minősége. Hátránya, hogy mennyiségi meghatározás esetén minden vegyületre egyéni kalibráció szükséges. Az ehhez szükséges adatkezelés gyakran ugyanannyi időt vesz igénybe, mint amit a mintaelőkészítéssel megtakarítottunk.

1. táblázat: Az illékony komponensek mérésére alkalmazható néhány mintavételi technika paraméterei WILKES és munkatársai szerint. A táblázat engedéllyel került átvételre, liszensz száma: 2896460183496.

mintavételi technika	minta halmazállapota	szükséges minta mennyiség (g)	érzékenység	mintaelőkészítési idő (min)
direkt injektálás	folyadék/szilárd	0.1–10	mg/kg	5–10
P&T TD	gáz / folyadék / szilárd	5–1000	$\mu\text{g}/\text{kg}$	10–30
SPME	gáz/folyadék	0.1–10	ng/kg	5–10
oldószer extrakció	folyadék/szilárd	0.1–10	$\mu\text{g}/\text{kg}$	30+
SFE	folyadék/szilárd	0.1–10	$\mu\text{g}/\text{kg}$	10–60
DTE	szilárd	0.1–10	$\mu\text{g}/\text{kg}$	1–2

Az SPME élelmiszerminták esetében különösen lerövidíti a mintaelőkészítési időt a csapdázós, oldószeres extrakciós módszerekhez képest (1. táblázat). Ez különösen igaz illat és szag alkotók esetén [Sérot et al. 2003]. Hátrányai közé tartozik a reprodukálhatóság növelésében kritikus szerepet játszó automata mintavevő készülék, mely ugyan kereskedelmi forgalomban kapható, de a kialakítása korlátozza a felhasználás területeit [Zhang et al. 2008], csak bizonyos típusú mintavevő edényekre alkalmazható. Hátránya még az SPME technikának, hogy az adszorbeálódott alkotó mennyisége nem csak a bevonat vastagságán múlik, hanem a vizsgálandó alkotó megoszlási hányadosán, amely általában növekszik a molekula tömeggel és a forrásponttal. Az SPME technikával gyűjtött molekulák mennyisége Tholl és munkatársai szerint nem elég ahhoz, hogy ismeretlen vegyületek szerkezeti meghatározására használjuk [Tholl et al. 2006].

Az SPME szál törékeny ezért van egy tartója, ami védőhüvelyként funkcionál, ennek a segítségével lehet beszúrni a megfelelően felmelegített injektorba, így jut a vizsgálandó minta a gázkromatográfba. Az injektálás akkor hatékony, mennyiségi és viszonylag pillanatszerű (tizedmásodpercnél kevesebb), ha az injektor hőmérséklet 50-70 °C-kal magasabb, mint a bevitt minta legmagasabb forráspontú vegyületének forráshőmérséklete. A gázkromatográfiában a minél kisebb félértékszélességű csúcsok feltétele, hogy analizálandó vegyületek hirtelen megkötődjenek az oszlopon, majd az áramlásuk dugószerű legyen. Az SPME szálról történő lefűtés ennek a feltételnek megfelel. Az SPME szálon lévő szorbens réteg idő múlásával elhasználódik, egy szál körülbelül 100-150 mérésre alkalmas. A szál lefűtésével, tisztításával a magasabb forráspontú anyagok elpárologtathatók, azaz megszüntethető a szál visszamaradó memóriája.

2.1.2. A szilárd fázisú mikroextrakció használata élelmiszerek illékony alkotóinak mintavételezésére

Page és Lacroix tanulmányukban az SPME rendszer teljesítményét vizsgálták, egy 33 halogénezett vegyületből álló mintaoldaton (illó és félig illó környezeti szennyezők) [Page et al. 1993]. Az SPME érzékenységét és szelektivitását hasonlították össze a hagyományos gőztér elemzés módszerével. Összességében a hagyományos gőztér analízis kevesebb információt adott az alkotókról, mint az SPME. Ennek egyik oka a kimutatási határ, például a tri- és hexaklorobenzol kimutatási határa SPME esetében kevesebb, mint 5 ng/kg volt, míg hagyományos gőztér elemzésnél ez jóval nagyobb. Két ugyanolyan körülmények között felvett kromatogram között jól látszik a különbség a mintavételi rendszerben. Az SPME mindenféle illó és nem illó vegyület extrahált, míg a hagyományos gőztér extrakció az illékonyabb vegyületekre nagyobb kromatográfiás csúcsot eredményezett. Érdekes eredményük, hogy különbséget találtak két egyforma bevonatú SPME szál között. Javaslatuk szerint a sztenderdek és a mintákat ugyanazzal a szállal kell mérni. Méréseik alapján a gázkromatográfba való bevezetés közben a szilikon szeptum átlyukasztása közbeni anyagvesztés elérheti az 5 %-ot. Ezen megfigyelések összességében arra intenek, hogy még óvatosabban kezeljük a kapott eredményeket.

SPME mintavételi technikát használtak eper, málna, áfonya, banán és mangó VOC-nek méréséhez [Ibáñez et al. 1998]. A vizsgálathoz a kinyerési hatásfokot egy 8 vegyületből álló sztenderd elegyen tesztelték. Az SPME kinyerési hatásfoka 10,7 %-tól (3-metil-butanol) 45,3%-ig (etil-hexanoát) változott, a relatív szórás (relative standard deviation, RSD) pedig 5-15% között. Következtetésükben azonban megállapítják, hogy bár a kinyerési hatásfok nem túl

jó, mégis használható az SPME mintavétel, mert reprodukálható és gyors. A nem célzott vegyületeket kereső technikákban elhanyagolható az a tény, hogy nem minden vegyületet mintázunk ugyanolyan hatékonysággal, ha ezt reprodukálhatóan tudjuk megtenni, azaz a rendszer mindig ugyanazt a „hibát” tartalmazza.

Az SPME szál legjellemzőbb tulajdonsága a szorbensréteg, ezt a mérendő vegyületek polaritásához kell választani. A szál anyaga lehet szilárd adszorbens vagy a kapilláris gázkromatográfiás kolonnák gyártásánál használt úgynevezett polimer folyadék. Az extraháló fázis térfogata (filmszerűen felhordott anyag) nem éri el az 1 µl-t. Illékony vegyületek mérésére a szakirodalomban leggyakrabban használt bevonatok: divinil-benzol/karbowax/poli-dimetil-sziloxán (DVB/CAR/PDMS), PDMS/DVB, CAR/PDMS, PDMS, CAR/DVB, poliakrilát (PA). Ferreira és munkatársai 2009-es tanulmányukban *Rosaceae* családból származó alma aromakomponenseinek mintavételi hatásfokát vizsgálták különböző SPME szálak és egyéb más kísérleti paraméterek esetén [Ferreira et al. 2009]. A DVB/CAR/PDMS és a PDMS/DVB bevonatú szálakkal érték el legnagyobb extrakciós hatékonyságot, azaz ezekkel a szálakkal detektálták a legtöbb vegyületet. A PDMS bevonatú szállal 24 vegyületet tudtak csak kimutatni, míg a DVB/CAR/PDMS és a PDMS/DVB bevonatú szálakkal 58 ill. 53 vegyületet. Azon kívül, hogy a mért vegyületek számában is jelentős különbséget találtak, a különböző kémiai csoportok közt is különbségeket mutattak ki. Savak, magasabb szénatomszámú alkoholok, karbonilok, észterek, és terpének csoportjára bontva vizsgálták a hatékonyságot. A PDMS/DVB bevonat csak az észterek esetében teljesített jobban, mint a PDMS/DVB/CAR, és csak karbonil vegyületek esetében rosszabbul. Viszont az RSD-k ennek a két bevonatnak az esetében körülbelül két, háromszor nagyobbak voltak a többi bevonathoz viszonyítva, sajnos csak ábráról lehet leolvasni az értékeket, számszerűsítve nincs a publikációban. Nem igazolja a nagyobb szórást egy másik optimáló kísérlet, ahol PDMS/DVB, CAR/PDMS, PDMS, Stableflex és PA bevonatok közül szintén a PDMS/DVB ért el kimagasló eredményt, a mért VOC-k darabszámát tekintve. Azonban a 4 mérési pontból számított szórás (SEM) nem volt jellemzően nagyobb mint a többi bevonat esetében (adatok szintén csak error bar formájában adottak). A kinyerési hatásfokok ebben a tanulmányban 50% felett voltak [Pontes et al. 2009].

2.1.3. Élelmiszerek illékony alkotóinak mérési lehetőségei

Az illékony aromakomponensek klasszikus, kézenfekvő és leggyakoribb mérési módszere a gázkromatográfiás elválasztás tömegspektrometriás detektorral kapcsolva. Mikroák tömegspektrometriás detektálási lehetőségeiről már két köny is megjelent, igaz a

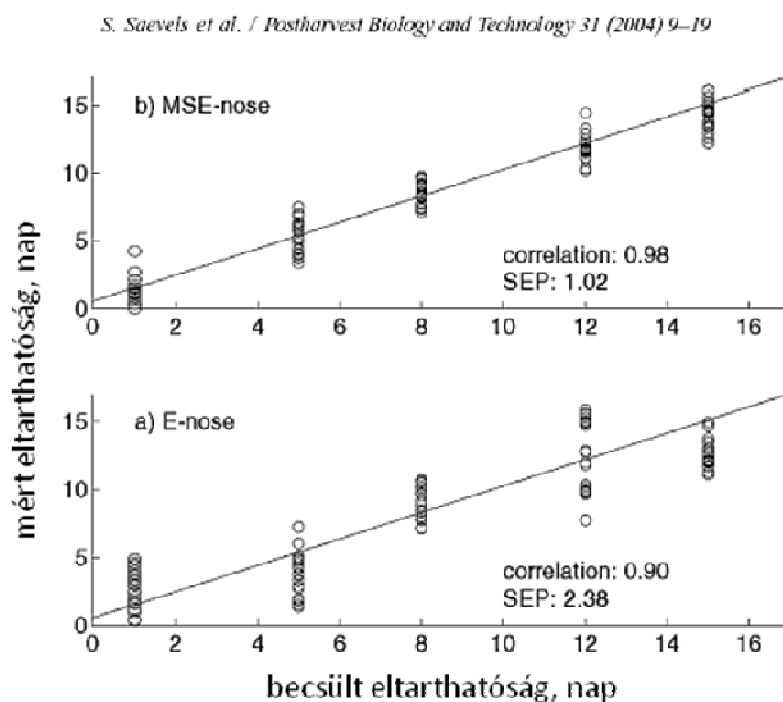
folyadékfázisú markere fókuszálva [Wilkins et al. 2006, Comstock et al. 1993]. Kisebbszámban ugyan, de léteznek alternatív mérési technikák. Romlás nyomonkövetésének tekintetében használtak gázkromatográfiás elválasztást követően lángionizációs detektort is, elsősorban a mennyiségi meghatározásban [Elke et al. 1999, Kushalappa et al. 2002].

A fotoionizációs, lángionizációs és száraz elektrolitikus vezetőképesség mérő detektor (dry electrolytic conductivity detector) együttes alkalmazása hordozható GC-s készülékkel érdekes kombináció. A mérések pontosságát és a kimutatási határt öt cél vegyületre számolva fejlesztették. Az épületek légteréből SPME módszerrel vették a mintát, a mérendő légszennyező anyagok: benzol, toluol, etil-benzol, *m*-, *p*-xilol és hexán. A mérési technika alkalmasnak bizonyult ng/kg-s koncentrációk kimutatására már 1 perces mintavétellel, ami a hordozható GC-s készülékkel együttvéve legalább tized részére csökkenti a teljes mintavételi és mérési időt és majdnem valós idejű megfigyelést tesz lehetővé [Jia et al. 2000].

Érdekes megoldás az elválasztás nélküli detektálás. Egy 2009-ben megjelent tanulmányban penészgombák növekedését követték nyomon a VOC-k alapján ion mobilitást mérő spektrométer (ion mobility spectrometer, IMS) segítségével. A mérésre egy hordozható GC-s készüléket használtak, gőztérből való mintavétellel egybekötve. 3 különböző faanyagot vizsgáltak, kettő penészgombával oltott csoportot és egy kontroll csoportot. A penészgombával oltott és nem oltott fa minták felvett ionmobilitás spektrumai különböztek. Az ionmobilitás spektrumból a legtöbb spektrum csúcsot sikeresen társították valamilyen illó vegyülethez, ugyanezeket a mintákat GC-MS-el mérve az összes kromatográfiás csúcsot azonosították. Mind az illékony metabolitok összetétele és a mennyisége változott a penészgombák növekedése során [Hubert et al. 2010].

Az illékony alkotók detektálásának egy meghatározó kutatási ága a szenzorrendszerek, úgynevezett elektronikus orr (E-orr) alkalmazása. Az elektronikus orr élelmiszeranalitikában való használatáról már 1998-ban megjelent egy összefoglaló cikk [Schaller et al. 1998]. Azóta is folyamatosan igyekeznek olyan megbízható mérőrendszert készíteni, amely kiválthatja az érzékszervi vizsgálatok egy részét. Az elektronikus orrot sikeresen alkalmazták többféle élelmiszeri alapanyag esetén, pl. alma minták patulin termelésének ellenőrzésére [Karlshøj et al. 2007], penészgombák jelelétének vizsgálata épületek légteréből [Kuske et al. 2005], almák tárolásbeli különbözőségének felderítésére [Saevels et al. 2004], barackfajták megkülönböztetésére [Solis-Solis et al. 2007] és pékáruk rimlásának korai kimutatására [Marin et al. 2007]. Meglátásom szerint az E-orr romlás detektálási kutatásokban a probléma, hogy

csak egy adott rendszerre lehet betanítani az elektronikus orrot, nem azonosítja a talált aromakomponenseket, így a kapott információt nem lehet felhasználni más kutatásokban, és a többváltozós statisztikai módszerek elkerülhetetlenek, így azokat a készülékhez tartozó szoftverbe kell építeni, mely az árat és bonyolultságot növeli, a vásárlási hajlandóságot csökkenti. Habár a rövid elemzési idő vitatatlan előny, ugyanahhoz a dilemmához vezet, mint az SPME esetén, azaz a mérés gyorsítása árán az adatkiértékelés ideje annyira megnőhet, hogy összességében időt veszünk. Azonban gyorsaságát és egyszerűségét 1-1 jól behatárolt feladatra jól ki lehet használni, pl. csomagolt lelmiszerek miniaturizált romlásdetektálási szenzorrendszerek területén.

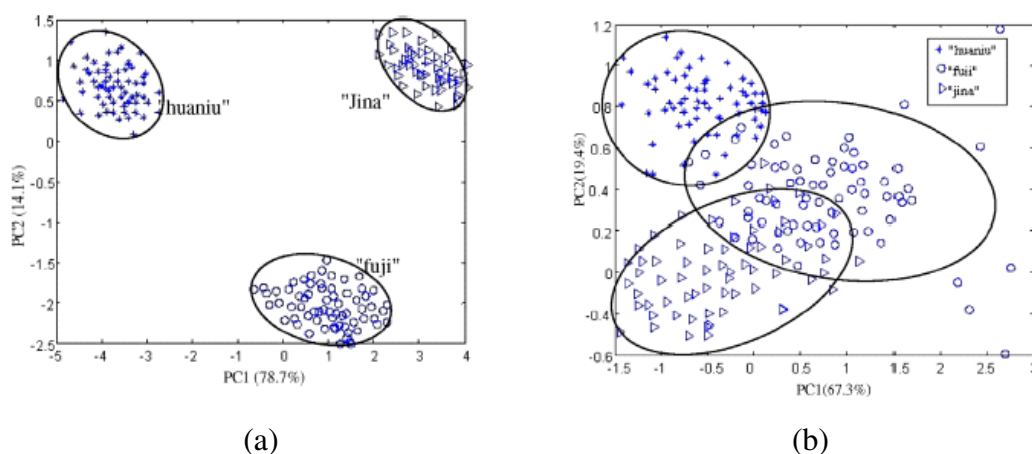


3. ábra: E-orr és MSE-orr alapján történő eltarthatóság becslése. Az ábra eredeti formában, engedéllyel került átvételre, liszensz száma: 2896420153055.

Érdemes felhívni a figyelmet arra a nevezéktani problémára is, hogy sok közleményben az elektronikus orr valójában egy tömegspektrométert takar. E-orr, GC-MS és tömegspektrometrián alapuló elektronikus orr (MSE-orr), VOC mérési képességének összehasonlítását végezték [Saevels et al. 2004]. A vizsgálatban az almákat háromféle különböző körülmény között tárolták 8 hónapon keresztül, az elektronikus orr nem tudott különbséget tenni almák VOC-i alapján a különböző tárolási körülmények közt, míg az MSE-orr és a GC-MS egyértelműen különbséget tudott tenni. Mind az E-orr, mind az MSE-orr alapján előre lehetett jelezni az eltarthatóságot a parciális legkisebb négyzetek elve (partial least squares, PLS) alapján felállított regressziós modell segítségével, azonban az MSE-orr esetén a

becslésre jellemző reziduális szórás (Standard Error of Prediction, SEP) értéke 1,02 nap, míg MSE-orr esetében 2,38 nap. Ez azt jelenti, hogy ezt a becslést alkalmazva 1,02 vagy 2,38 napot tévedünk-e. A 3. ábrán, a korrelációs érték (correlation) a PLS regresszió r^2 értéke. Azt már az olvasóra bízom, hogy eldöntse, az MSE-orr a tömegspektrometriás vagy az elektronikus orr kategóriához tartozik.

Hasonló összehasonlító elemzést találhatunk E-orrként alkalmazott ólomoxid gázszenzorsor és GC-MS mérések esetére almák VOC elemzésénél [Zou et al. 2008]. A mért eredményeket főkomponens-elemzéssel (Principal Component Analysis, PCA) dolgozták fel. A 4. ábrán láthatók kék színnel jelölve a mintákhoz tartozó pontok az első és a második főkomponens síkjára vetítve. A tengelyeken zárójelben megtalálható, hogy az összes variancia hány %-át magyarázza az adott főkomponens. A három különböző almafajta-hoz tartozó minták tisztán elkülönülnek a GC-MS mérésekkel (4./a), míg a szenzoros eredmények esetében (4./b) a minták a csoportok közt kissé átlapolnak a cikk következtetése alapján. Azonban ha figyelembe vesszük, hogy a két főkomponens (principal component, PC) az összes variancia majdnem 90%-át magyarázza, és a csoportok nem különülnek el megfelelően a főkomponens-elemzés alapján, az E-orr nem megfelelő a fajták megkülönböztetéséhez. A tanulmányban egyszerűsítették a GC-MS eredmények PCA elemzését, mivel nem az összes mért vegyületet tekintették változónak, csak a 22 legnagyobb csúcsintenzitásút. A „zaj” ilyen csökkentése a vizuális elválasztást hatékonyabbá teszi.

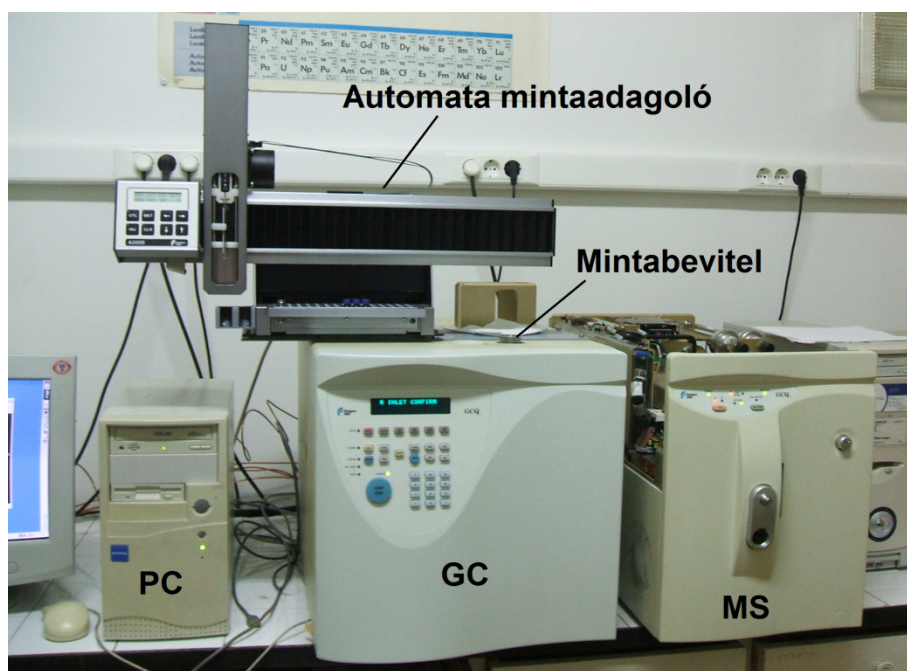


4. ábra: Főkomponens-elemzés az (a) SPME-GC-MS, jobb oldalon (b) a E-orr változóival. Az ábra eredeti formában, engedéllyel került átvételre, lizensz száma: 2896451401603

2.1.4. A gázkromatográfiás tömegspektrometriás kapcsolt rendszer

élelmiszerek illékony alkotóinak mérésére

A gázkromatográfia illékony és illékonyra tehető vegyületek elválasztására alkalmas módszer. Az eljárás során az alkotók az álló és mozgó fázisra vonatkozó megoszlási együttható alapján különböző mértékben kötődnek az álló fázishoz. Ebből adódóan az analizálandó komponensek különböző retenciós időkkal érkeznek az oszlopról, az állófázishoz kevésbé kötődő vegyületek retenciós ideje (retention time, jele: t_R vagy RT) kisebb lesz, míg a jobban kötődőké nagyobb. Hátránya a technikának, hogy csak gáz halmazállapotú mintát tudunk vele vizsgálni, ezért az eredetileg szilárd vagy folyékony mintát először el kell párologtatni. Ennek megfelelően csak olyan vegyületek mérésére alkalmas a módszer, amelyek bomlás nélkül elpárologtathatók. Illóolajok analízisére már régóta használják a szakirodalomban, elég ha Kováts Ervin híres [Kováts 1958] közleményére gondolunk, melyben a Kováts-féle retenciós index (Kovats retention index) néven ismert mutatószám bevezetését javasolta. Egy GC-MS kapcsolt rendszert láthatunk az 5. ábrán.



5. ábra: GC-MS kapcsolt rendszer.

A tömegspektrometria során a molekulákból ionokat képezünk és vákuumban fajlagos tömegük (részecske tömege/a részecske töltéseinek száma, jele: m/z) szerint mérjük őket elektromos vagy mágneses mezők segítségével. Tömegfelbontás szerint megkülönböztetünk kis- és nagyfelbontású készülékeket. A tömegspektrométerek közül VOC-k detektálásra általában kislebontású tömegspektrometriás detektort használtak és használnak ma is a szakirodalomban

[Vikram et al. 2005, Krokida et al. 2006, Mu et al. 2007, Reis et al. 2009, Boulanger et al. 2001]. Azonban egyre több tanulmány jelenik meg nagyfelbontású tömegspektrométerrel is [Ong et al. 2008, Aprea et al. 2011, Elss et al. 2006, Frenich et al. 2009]. Az ok valószínűleg az, hogy a nagyfelbontású készülékeket magas költségük miatt szerkezetazonosításra, vagy nagy molekulatömegű anyagok vizsgálatára használják gyakrabban. A mért VOC-k általában 400 m/z alatt találhatók, és kémiai felépítésükről van feltételezésünk, így azonosításuk a kisfelbontású tömegspektrométerrel is megoldható a kívánt pontossággal. Ha valamelyik kutatócsoport metabolomikai kutatásokra adja a fejét, először legegyszerűbb egy kisfelbontású GC-MS-el kezdeni. Másik ok, hogy a nagyfelbontású készülékek sokszorosan több adatot termelnek, mint a kisfelbontásúak, így a gyors mintaelőkészítés, mintavétel és méréssel megtakarított idő elvész a kiértékelésnél. Az SPME mintavétel kiválóan alkalmas a GC-MS mérésekhez.

Az SPME-GC-MS mérést sikeresen alkalmazták megannyi élelmiszer minta VOC-inek összehasonlító elemzésére. Például banán érése során keletkező illékony aromakomponensek mennyiségének mérésére [Vermeir et al. 2009], kiviből préselt lé illékony vegyületeinek feltérképezésére [Figoli et al. 2009]. Találhatunk arra is példát, hogy érzékszervi tulajdonságok leírására használták ezt a technikát például főtt burgonya esetében [Blanda et al. 2009]. 'Red Delicious' almák gőzterének vizsgálatakor azt hasonlították össze, hogy van-e különbség a kezeletlen és a forrázott almák között. A tanulmány eredménye szerint nem változtak meg minőségileg a fő illékony alkotók, bár a felületi kezelésen átesett almákban ezen anyagok mennyisége kevesebb volt [Paliyath et al. 1997]. Vízmintákból ftalát észtereket illetve fungicideket, közvetlenül a folyadékfázisból való mintavétellel mértek [Penalver et al. 2000]. SPME mintavételi technikát alkalmaztak dehidratált burgonya minták légterének mintavételére [Rudell et al. 2008] is. A cél a rosszul felügyelt élelmiszerkezeléshez tartozó vegyületek felderítése volt, és a módszer alkalmasnak bizonyult a feladat megoldására. Azonban automata rendszer hiányában belső sztenderdet, egyéni kalibrációs görbéket kellett készíteni minden olyan alkotóra, amelynek szerepe volt a megkülönböztetésben.

SPME-GC-MS módszerrel vizsgálták mangók penészgombás VOC-inek detektálási lehetőségeit [Moalemiyan et al. 2007]. A tanulmányban elsőként bizonyították, hogy a GC-MS profil alapján különbséget tudnak tenni a mangók antraknózis és „szárfelőli rothadás” betegségei közt. A 38, jobbára minden ismétlésben jelentkező vegyületből az 1-pentanolt a *Lasiodiplodiával* oltott mangókhoz, míg a tujolt a *Colletotrichummal* oltott mangókhoz társította. Habár a keresztvalidáció alapján a diszkriminancia elemzés a minták csak 67, ill.

75%-át sorolta jó helyre. Új-zélandi kutatók frissen fogott lazacminták romlási folyamatainak nyomonkövetésére fejlesztettek ki gázkromatográfiás módszert [Wierda et al. 2006]. Az SPME, GC-MS mérést a friss halak és a romlott halak gőzterének elemzésére használták, a mintákat 100 napig tárolták. Különbséget mutattak ki levegőn való és 40:60 arányú CO₂:NO₂-n való tárolás közt. Az alkoholok és aldehidek közül azonosítottak olyanokat, amelyek a lazac frissességéhez kötődnek: ciklopentanol, Z-2-pentén-1-ol, 1-pentén-3-ol, és 1-octén-3-ol, hexanal, octanal, E-2-penténal, és E-2-hexénal. A lazac romlott állapotához pedig a sztirol, ecetsav, etil-benzol, propil-benzol és 3-metil-butánsav vegyületeket társították.

Az elválasztás szempontjából kritikus paramétereket a 2. táblázatban foglaltam össze. A táblázatban olyan cikkek szerepelnek ahol növények aromakomponenseit, és/vagy mikroorganizmusok illékony anyagcseretermékeit mérték.

2. táblázat: Az elválasztáshoz használt oszlop és a fűtési program paraméterei néhány közlemény alapján.

oszlop típus	oszlop kezdeti és vég hőmérséklete (°C)	felfűtési sebesség (°C/perc)	tisztítási szakasz	injektor hőmérséklete (°C)	hivatkozás
Rtx®-5MS Crossbond	50 - 280	8	-	250	[Pellati et al. 2005]
HP-5MS	40 - 300	3 és 8	300 °C / 15 min	250	[Mu et al. 2007]
HP-5	40 - 200	10	200 °C / 5 min	260	[Zou et al. 2008]
CP-Wax	45 - 240	8 és 2	-	260	[Romeo et al. 2007]
DB-Wax	50 - 220	4	220 °C/ 3 min	250	[Elss et al. 2006]
HP-INNOWax	60 - 230	20	230 °C/ 6 min	250	[Krokida et al. 2006]
DB-624	50 - 190	10	190 °C/ 20 min	260	[Fries et al. 2006]
SPB-5	50 - 200	3	-	225	[Vikram et al. 2004a]
SPB-5	50 - 200	vegyes	200 °C/ 5 min	225	[Vikram et al. 2006]
SPB-5	50 - 200	3	200 °C/ 2 min	225	[Vikram et al. 2005]
SPB-5	50 - 200	3	-	225	[Prithiviraj et al. 2004]
HP-5	40 - 240	vegyes	240 °C/ 5 min	250	[Saevels et al. 2004]

A különböző gyártók, cégek különböző neveket adnak az ugyanolyan összetételű kromatográfiás oszlopoknak, az SPB-5, HP-5, Rtx-5MS és HP-5MS jelölésű oszlopok összetétele: 5% difenil (diphenyl) és 95% dimetil-polixiloxán (dimethylpolysiloxane). Ez az oszlop összetétele miatt csak kissé poláros, általában szénhidrogének mérhetőek vele, de polárosabb oxigéntartalmú vegyületekre is használják. VOC-k elválasztására hatékonyabbak más dimetil-polixiloxán alapú töltetek, például a polárisabb polietilén glikol polimerek, mint a CP-Wax, HP-INNOWax és DB-Wax nevű oszlopok [Tholl et al. 2006]. Azonban az 5% difenil tartalmú oszlopok a legelterjedtebbek a VOC elemzés terén, mivel hosszabb az élettartamuk, a

töltet nehezebben szakadozik le az oszlop belső faláról. A detektálás során zavaró sziloxánok leválását keresztkötésekkel (Crossbond) is elősegíthetik.

A tömegspektrometria során az elválasztott ionok intenzitását folyamatosan mérve egy 'ionáram intenzitás – fajlagos tömeg' függvényt kapunk. A legintenzívebb ion intenzitására normált, úgynevezett karakterisztikus tömegspektrum minden molekulára egyedi, de csak elméletileg. Gyakorlatban az izomerek tömegspektruma annyira kicsit tér el egymástól, hogy gyakran a mérési hiba elfedi a különbségeket, mely alapvető probléma illékony markerek keresésénél, ugyanis sokszor az izomerekben rejlik a különbség. A minőségi azonosításra a karakterisztikus tömegspektrumból épített spektrumkönyvtárakat használhatjuk. Szerkezeti izomerek esetén, a retenciós indexek összehasonlítása segít az azonosításban, mivel a szerkezet a megoszlási hányadost befolyásolja, így a retenciós indexek különböznek. A retenciós indexek és/vagy a tömegspektrumok összehasonlítása a spektrumkönyvtárakkal általában még nem tekinthető megbízható azonosításnak. A helyes azonosításhoz legalább két különböző polaritású oszlopon felvett csúcsok Kováts indexe szükséges és a tömegspektrum egyezése a megfelelő sztenderddel. Ezenkívül elterjedt az álláspont, hogy ioncsapdás tömegspektrometriás készülékek esetében kevésbé jó az egyezés a tömegspektrometriás könyvtárakkal, így az azonosítás félrevezethető lehet [Tholl et al. 2006].

A tömegspektrometria esetében a mennyiségi azonosítást az ionizáció természete nehezíti meg. A tömegspektrometriás detektálás eredményeként intenzitás jelet kapunk. Elektronsokszorozó detektor esetében azt, hogy hány darab gerjesztett ion érkezett a detektorba és az mekkora jelet generál. A beérkezett ionok száma pedig már terhelt a mintavétel, az elválasztás és a gerjesztés útján felmerülő bizonytalanságokkal. Így a kapott jel nyilvánvalóan készülékfüggő. A mennyiségi elemzéshez kalibrációs görbéket alkalmazunk, mivel sem az ionizáció sem az SPME esetében nem egyforma a hatásfok a különböző vegyületekre elméletileg minden vegyülethez külön kalibrációs görbére van szükség. A VOC elemzésekben mért nagy számú vegyület esetén ez kivitelezhetetlen. Járulékos probléma az illatkomponensek esetében a koncentráció tartomány. Egyes vegyületek koncentrációi a kimutatási határ környékén mozognak míg másoké olyan nagy, hogy az oszlopot is túlterhelik. A detektorok szűk lineáris tartománya miatt általánosított kalibrációs görbék nem vehetők fel. Így az összes aromakomponens mennyiségi meghatározásának lehetősége korlátozott, a gyakorlatban a kalibrációs görbék felvétele csak néhány kiválasztott vegyületre alkalmazható egy kísérleten belül. A nem-célzott kutatások esetében ezért csak fél-mennyiségi (semi-quantitative) meghatározást végeznek a legtöbb esetben.

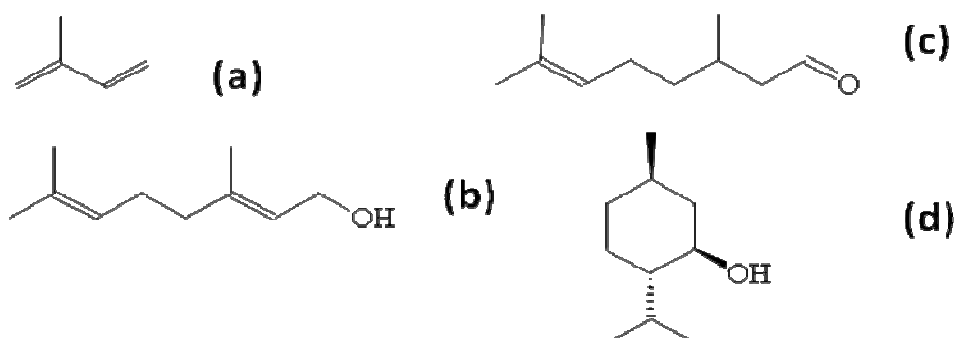
A különböző közleményekben megadott fél-mennyiségi adatok különböző információt jelentenek. Lényege, hogy a nem kalibrált ionintenzitás információkat csak 1-1 vegyület különböző mintákban mért, egymással való összehasonlításra használhatjuk fel. Ennek az illat-analitikai gyakorlatban általános módja, hogy a gázkromatográfiásan detektált vegyületek csúcsterület összegét 100 %-nak tekintve az egyes vegyületek súlyát, fontosságát az összterület százalékában adja meg [Amtmann 2009]. Egy másik lehetséges mód, hogy a kapott intenzitás, vagy csúcs alatti terület értékeit csoportokba sorolják, a mennyiségi skálából minőségit készítenek. Például Olaszország déli és északi vidékeiről származó borászatokból izolált vad *Saccharomyces cerevisiae* élesztő törzseinek változatosságát tanulmányozták [Mauriello et al. 2009]. Az adatok kiértékeléshez fürtelemzést használtak. Ehhez a változókat úgy hozták létre, hogy a koncentráció értékeket egyszerűsítették, az egyes vegyületekhez tartozó csúcsmagasság értékeket 4 kategóriába sorolták. Az izolált élesztő törzsekkel oltott borok VOC-i alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a délről származó törzsek több VOC-t termelnek, amelyek között jellemző savakat is találtak.

2.2. Gyümölcsök illékony szerves vegyületei

Az élelmiszerek aromakomponensei alapvetően meghatározzák elfogyasztásuk élményét, így a vásárlási hajlandóságot is. Nem véletlen, hogy az élelmiszerüzletek polcairól alig tudunk olyan terméket választani, amelyek címkéjén ne szerepelne természetes vagy mesterséges hozzáadott aromakomponens. A Magyar Élelmiszerkönyv [Magyar Élelmiszerkönyv 1994] szerint "az aromaanyag ízesítő tulajdonsággal rendelkező meghatározott kémiai anyag." Az aromaanyagokon belül igen sokféle vegyületet különböztetnek meg a szakemberek. A különféle felépítésű savakon, alkoholokon, aldehideken kívül nagy jelentőségük van az úgynevezett észtervegyületeknek, amelyek kis molekulatömegű savak és alkoholok összekapcsolásával nyerhetők. Az aromaészterek kis koncentrációban kellemes illatú és ízű, illékony anyagok. Egyik legegyszerűbb felépítésű képviselőjük, az etil-acetát, mely vegyület és rokonai szinte minden gyümölcsben kimutathatók [Rothe 1987].

Másik jelentős csoport a terpénszármazékok, melyek között sok illékony képviselőt találunk. A terpének a növényi másodlagos anyagcseretermékek legnagyobb kémiai csoportja. A terpének izoprén (C_5H_8) egységekből felépülő molekulák. Az 6. ábrán látható monoterpénalkoholok 2 izoprén egységből épülnek fel, ide tartozik a rendkívül jellegzetes illatú mentol is. A 3 izoprén egységből felépülő szeszkviterpének $C_{15}H_{24}$ összegképletűek és általában illékonyak, de még a 4 izoprénből felépülő diterpének ($C_{20}H_{32}$) is lehetnek illékonyak szobahőmérsékleten. Egyes

szervezetekben a terpének váza tovább módosul. Az élő szervezetben a triterpén szkvalénből szintetizálódik a szteránváz. Könnyen elképzelhető, hogy az egyes izoprén egységekből mennyi variáció épülhet fel már 3-4 egység esetén is, melyek csak konfigurációjukban térnek el, összegképletük, így molekulatömegük is egyforma, izomerek. Ezért a terpének tömegspektrometriás detektálása nehéz feladat. Az aromakomponensek összehasonlító elemzése során a legtöbb publikációban csak a meghatározott összegképletükkel találkozunk, vagy hozzávetőleges azonosítást kísérelnek meg.

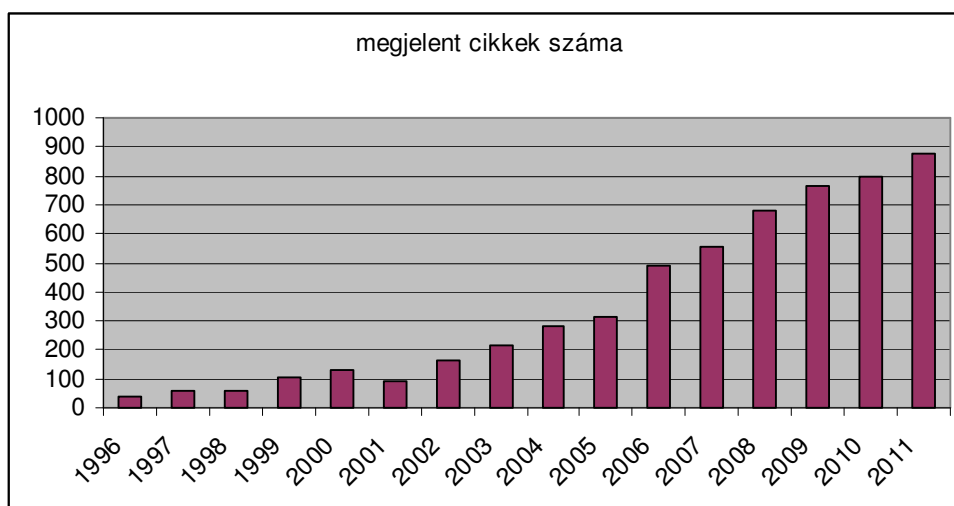


6. ábra: Terpénszármazékok, izoprén egység(a), az azonos összegképletű a geraniol (b), citronellál (c) és mentol(d).

A terpének nemcsak igen fontos vegyületek a növények életében, de éppoly változók is. Egy olasz tanulmányban pl. alma és cseresznye fák illékony vegyületeit vizsgálták különböző évszakokban [Rapparini et al. 2001]. A linalool kivételével minden terpén mennyisége nőtt a gyümölcsérés idejére. A legnagyobb intenzitású vegyületek az α -pinén, a kamfén, β -mircén, csak ebben a gyümölcsérés szakaszban jelent meg. A szénhidrát-kibocsátás a betakarítási szakaszban volt a legkisebb, viszont a terpének kibocsátása a legnagyobb. Azonban nem csak gyümölcsök VOC-jei lehetnek, mert mikroorganizmusok másodlagos anyagcseretermékei közt is gyakran megtalálhatjuk a terpéneket [Elke et al. 1999].

2.2.1. Az alma illékony szerves vegyületei

Az alma aromakomponenseiről számos cikket találunk a szakirodalomban. A Scopus keresési eredménye 2012 januárjában az: „(apple) AND [(aroma profile) OR (volatile organic compound)]” kifejezésre összesen 5613 találatot adott. Az első publikáció 1996ból származik, mivel a Scopus adatbázisa 1996-ban kezdte rögzíteni a közleményeket. A 7. ábrán látható az érdeklődés folyamatos növekedése, újabban már 800 közleményben írnak évente az almák aromakomponenseiről.



7. ábra: Az alma aromakomponenseiről megjelent cikkek száma évek szerint lebontva. Az eredmények a Scopus adatait tükrözik.

Felmerülhet a kérdés, hogy miért ilyen sok a közlemény ebben a témakörben? A téma jelentőségén kívül, a válasz az, hogy a mért VOC-k sohasem egyeznek pontosan a különböző tanulmányokban. Az nyilvánvaló, hogy a kibocsátott VOC-k függenek attól, hogy milyen fajta almát mérek, azaz a genetikai sajátságtól [Baldwin et al. 1991]. Habár már 1920-ban végeztek kísérleteket alma aromakomponenseinek azonosítására, nagyszabású kísérletben elsőként 1985-ben bizonyították, hogy különböző fajtájú almák esetében nem ugyanazok a vegyületek okozzák az „alma illatot”. A mérésekhez 40 fajtát vizsgáltak [Cunningham et al. 1986].

Azonban ugyanannak a gyümölcsnek ugyanaz a fenotípusa még nem ugyanazokat a VOC-ket fogja kibocsátani. Élő rendszerben a VOC-k igen érzékenyek a különböző környezeti tényezőkre, mint a betakarítás előtti kezelések: pl. a gyümölcsfa permetezése, betakarításkori érettség, és betakarítás utáni műveletek, azaz a tárolás körülményei, amelyekről a 2.3.2. fejezetben lesz szó. A nem célzott komponensek mérésének nehézségeihez járul még hozzá a tárgyalt analitikai módszerek sokszínűsége és végül a választott kiértékelési módszer. Három különböző GC-MS elemzés eredményei láthatók a 3. táblázatban. Mindhárom oszlopban a ‘Golden Delicious’ alma illékony szerves vegyületei találhatók. A táblázatot Ender Ágnes diplomázó hallgatóval készítettük közösen, az ő diploma [Ender 2010] és TDK dolgozatában is szerepel. Ugyan sok vegyület megtalálható mindhárom kutatásban, ez az összehasonlítás azt sugallja, hogy az eredményeket óvatosan kell kezelni. Nincs lehetőség az egyes fajtákra jellemző összes VOC előzetes ismeretére.

3. táblázat: 'Golden Delicious' alma aromakomponensei néhány publikáció alapján.

	[Song et al. 1996]	[Lopez et al. 2000]	[Karlsjoj et al. 2007]
2-metil-butil-acetát	x	x	x
2-metil-butil-2-metil-butanoát	x	x	
2-metil-butil-2-metil-propionát	x		
2-metil-propil-acetát	x	x	x
metil-pentanol	x	x	
4-metoxi-allil-benzol	x		
6-metil-hept-5-én	x		
butanol	x	x	x
butil-2-metil-butanoát	x		x
butil-acetát	x	x	x
butil-butanoát	x	x	x
butil-hexanoát	x		x
butil-pentanoát	x		
butil-propionát	x	x	x
etil-2-metil-butanoát	x	x	x
etil-3-metil-butanoát		x	
etil-acetát	x	x	x
etil-butanoát	x	x	x
etil-hexanoát	x	x	x
hexanol	x	x	x
hexil-2-metil-butanoát	x		
hexil-acetát	x	x	x
hexil-butanoát	x	x	x
hexil-hexanoát	x		x
hexil-propionát	x	x	x
metil-2-metil-butanoát	x		
metil-acetát	x	x	x
metil-butanoát	x		
metil-butanol	x	x	x
oktil-acetát	x		
α -farnzén	x	x	x
pentil-acetát	x	x	
propil-acetát	x	x	x
propil-oktanoát	x		
pentil-butanoát			x
pentil-acetát			x
propil-butanoát			x
propil-propionát	x		x
ilangén			x

2.2.2. A szilvák illékony szerves vegyületei.

Szilvák aromakomponenseinek mérése nem annyira népszerű kutatási téma, mint az almáké. Az első cikk 1974-ben jelent meg a témában, ebben a *Prunus salicina* 'Santa Rosa' fajtáját vizsgálták. A cikk szerint az acetát észterek domináltak az illékony vegyületek közt, de meghatározó mennyiségű laktont is találtak. Egy 1981-es közleményben a linalool és etil-butanoát voltak a legfontosabb VOC-k az európai szilva esetében (*Prunus Domestica*). Majd 1992-ben jelent meg a következő tanulmány *Prunus salicina* és *Prunus americana* fajtákról (HORVAT, R.J., et al., 1992). Ebben (E)-2-hexénal, butil-acetát, butil-butanoát és a γ -dodekalakton voltak a legmeghatározóbb VOC-k. 1992-ben és 1993-ban két összehasonlító cikk jelent meg, amelyekben már japán szilva fajták illékony vegyületei is szerepeltek. A *Prunus salicina* Lindl, két japán szilva fajta, és a *Prunus simonii* Lindl faj illékony vegyületeit vizsgálták [Gomez et al. 1994, Gomez et al. 1993]. Az elválasztás DB5-MS oszlopon történt, a vegyületeket a saját könyvtárban talált tömegspektrumokkal összevetve azonosították, melyek a legtöbb esetben rendelkezésre álló sztenderdekkel erősítettek meg. A kísérletben 12 alkoholt, 6 szénhidrátot, 10 aldehidet, 7 ketont, 21 észtert és 4 laktont azonosítottak. A 6 szénatomos szénhidrátok és alkoholok hexanal, 2-hexénal, hexanol, 2-hexénol, és 3-hexénol, ez összhangban van Ismail kísérleteivel, melyben megállapította, hogy a C₆ komponensek nagyban hozzájárulnak a szilvák jellemző illatához. A 60 azonosított vegyület közül a japán szilvára vonatkozóak a 4. táblázatban találhatóak.

4. táblázat: Két japán szilva fajta illékony vegyületeinek csúcs alatti területei és Kováts indexei Gomez és munkatársai szerint. n.a.: nincs adat.

	fajta		Kováts index
	<i>Blackamber</i>	<i>Friar</i>	
Ketonok			
izoforon	n.a.	1	1059
acetofenon	1,7	n.a.	1065
dihidro- β -jonon	n.a.	0,4	1433
geranil-aceton	4,6	0,6	1449
β -jonon	8,3	3,1	1482
Alkoholok			
(Z)-3-hexén-1-ol	6,4	12,8	849
(E)-2-hexén-1-ol	2,5	5	858
hexanol	32,9	12,3	862
2-etil-hexanol	3,7	0,6	1028
linalool	18	7,6	1104
α -terpineol	n.a.	1,4	1199
nerol	1	n.a.	1251
nerolidol	n.a.	0,7	1562
Aldehidek			
hexanal	19,5	5,9	802
(E)-2-hexénal	n.a.	11,9	848
heptanal	2,5	1,4	898
(E)-2-hepténal	n.a.	0,4	953

(E,E)-2,4-heptadiénal	3,3	n.a.	998
fenil-acetaldehid	28,2	1,3	1045
nonanal	51,1	13,8	1105
β -ciklocitrál	n.a.	1,2	1219
Észterek			
butil-acetát	1,2	0,2	813
(α)-3-hexénil-acetát	16,1	2,8	1005
hexil-acetát	42,7	2,3	1010
(E,Z)-hexénil-acetát	6,4	0,7	1014
(α)-3-hexénil-butanoát	n.a.	0,6	1183
ethyl octanoát	4,7	n.a.	1196
(Z,E)-3-hexénil-2-hexenoát	n.a.	1,2	1228
bornil-acetát	6	0,4	1287
(α)-3-hexénil-hexanoát	13,8	9,4	1376
Laktonok			
γ -dekalakton	3,1	n.a.	1476
γ -dodekalakton	16,1	4,8	1681
Szénhidrátok			
1,4-dimetil-benzol	2,1	0,6	856
1,2,3-trimetil-benzol	2,5	1,7	966
limonén	5,9	1,3	1031
naftalén	4,9	0,9	1186
dietyl-ftalát	4,2	1,1	1585

Kivi gyümölcsök hűtőtárolása közben bekövetkező változásokat VOC profil elemzéssel vizsgálták [Wan et al. 1999]. Az elemzéshez SPME, GC-MS rendszert használtak, az elválasztás DB5 oszlopon történt. Hat olyan vegyületet találtak, amelyeket már korábban közöltek a szakirodalomban kivi gyümölcslé mérése esetén (heptanal, etil-hex-3-énoát, 6-metil-hept-5-én-2-on, ecetsav, *c/t*-2-nonénal (keverék) és *c/t*-2-dekénal (keverék)) és másik 6, kivi esetében új vegyületet (pent-4-énal, *t,t*-nona-2,4-diénal, 2-nonanon, etil-oktanoát, butirolakton és 2-propénil-butanoát) azonosítottak a NIST könyvtár segítségével. Az érett és nem érett kivi minták összehasonlításakor 42 illatot okozó vegyületet találtak. A kivi mintákat 5 hónapon keresztül tárolták zárt, szabályozott légterben 0 °C fokon és a légteret minden nap négyszer cserélték, tehát a vegyületek nem halmozódhattak fel. A 42 vegyület relatív csúcsmagassága a 2. vagy 3. hónaptól kezdve nőtt jelentősen minden mintában. Mind a kezdeti érettség fok, mind a tárolás ideje jelentősen befolyásolta a mért VOC-ket. Megállapították, hogy általánosságban az érés előrehaladása és a hosszabb tárolási idő növeli a VOC-k mennyiségét.

2.2.3. Az almák és szilvák rövid jellemzése



(a)



(b)

8. ábra: (a) 'Golden Delicious' és (b) 'Granny Smith' alma (Fotó: www.fotosearch.com)

A 'Golden Delicious' alma (8/a ábra) tárolhatósága körülbelül 6 hónap megfelelő körülmények biztosításával, szabályozott légterű tárolókban. Az alma héja vékony, könnyen sérül, nincs rajta viaszréteg, az érés kezdetén zöld, majd sárgává válik és a tárolás során ráncosodhat. A 'Granny Smith' alma (8/b ábra) a világon az egyik legkedveltebb fajta [Vikram et al. 2004a]. Héja viaszos bevonatú, fényes és teljes érésben zöld színű, nagy, fehéres paraszemölcsökkel pontozott. A tárolás során keserűfoltosságra, héj- és húsbarnulásra fogékony [Tomcsányi 1987].

A szilva a csonthéjasok közé tartozik, nem utóérő gyümölcs. Sokféle vitamint (A és C vitamin mellett biotint, E-vitamint, és a B vitamin valamennyi változatát), ásványi anyagokat, enzimeket, pektint, cellulózt, antocianint tartalmaz. Az 'Angeleno' (9. ábra), japán-típusú szilvák héja vastag, jól ellenálló a betegségeknek, a gyümölcsök szinte egész évben megvásárolhatók. Könnyű megismerni őket gömbölyű vagy kerekded formájukról, amely viszonylag nagy, színük kékeslila, kékes-vörös, esetleg kékesfekete és hamvas. Kellemes ízét a cukrok és savak megfelelő arányának köszönheti. Mind az almákról, mind a szilvákról általánosságban elmondható, hogy magas a víztartalmuk és nagy a vízáktivitásuk (1 és 0,95 közötti érték). A szilvák glükóz tartalma magasabb, fruktóz- és rosttartalma viszont alacsonyabb, mint az almáknak. Mindkét gyümölcs esetében elegendő a tápanyag és megfelelő a pH érték a penészgombák fejlődéséhez. [Ender 2010, Tomcsányi 1987].



9. ábra: Japán típusú szilva (Fotó: www.fotosearch.com)

2.3. *A gyümölcsök penészgombás romlása*

2.3.1. *A gyümölcsök tárolása*

A gyümölcsök szedés és értékesítés közötti tárolása mindig is nagy érdeklődésre tartott számot, aktuális és fontos kutatási téma. Ezen termények részesedése az élelmiszeripari piacon jelentős. A gyümölcsök minőségének megőrzése a tárolás során kulcskérdés, a termék megromlása pedig anyagi károkkal is jár. A tárolás során külső és belső szöveti elváltozások lépnek fel, amelyeket leegyszerűsítve tárolási betegségeknek nevezünk. A veszteségek csökkentéséhez a romlást okozó bonyolult folyamatok károsító hatását kell megakadályozni. A tárolás alapvető célja a gyümölcsök fogyasztási idejének megnyújtása, a beltartalmi értékek jobb megőrzése, az apadási veszteség csökkenése, az élettani betegségek csökkentése. A tárolhatóság idejét a tárolási eljárás nagyban befolyásolja [Tóth 2001].

Élelmiszer-alapanyagok eredeti tápértékének megőrzése szempontjából a legjobb tartósító eljárás a hűtés és fagyasztás. A legjellemzőbb eljárások az alábbiak: hűtés és hűtve tárolás atmoszférikus összetételű légtérben vagy szabályozott és ellenőrzött összetételű légtérben, gyorsfagyasztás, élelmiszerek fagyos tárolása. A szabályozott légterű tárolást (Controlled Atmosphere, CA) a 7075 számú Magyar Szabvány definiálja [MSZ 7075:2000, 2000]. definiálja. A technológia sokféle gyümölcs és zöldségféléhez alkalmazható, és az évek során ez vált az almatárolás leggyakoribb megoldási módjává szerte a világon, de az elmúlt években sok másféle termék tárolásában is növekvő szerephez jut. A gyümölcsfélék szabályozott légterű tárolása még számos problémakör tudományos és gyakorlati tisztázását igényli, ezek közül az egyik a romlás észlelésének problémája. Gyakran csak előrehaladott állapotban lehet detektálni

a romlást, amikor már a beavatkozás nem csökkenti jelentős mértékben a veszteségeket [Vikram et al. 2004b, Hitka 2011].

A betakarítás utáni veszteségekre valójában nincsen megbízható statisztikai adat, 0-tól 100 %-os extrém veszteséig megtalálhatunk bármit. Természetesen a veszteség a tárolás körülményeitől függ, minél hosszabb a tárolási idő, annál több esély van a veszteségre. CA tárolás esetén a gyümölcsök tárolási idejét csökkentett oxigén és megemelt szén-dioxid szinttel igyekeznek meghosszabbítani. Rengeteg tanulmány készült a különböző tárolási körülmények hatásáról a gyümölcsök minőségére és VOC-ire is [Raffo et al. 2009, Echeverria et al. 2004a, Wang et al. 2003, Khan et al. 2008, Lara et al. 2006, Chu 1992, Lopez et al. 2000]. Például 'McIntosh' és 'Delicious' fajtájú almákra vonatkozóan már 1992-ben bizonyították, hogy a hőmérsékletnek és a légtér összetételének nagy hatása van az almák élettartamára [Chu 1992]. Ezek a körülmények a gyümölcs légzését, és a gyümölcsök számára érést elősegítő hormon, az etilén termelődését lassítják le [Balla et al. 2008].

2.3.2. Az alma romlásának mikrobiológiája

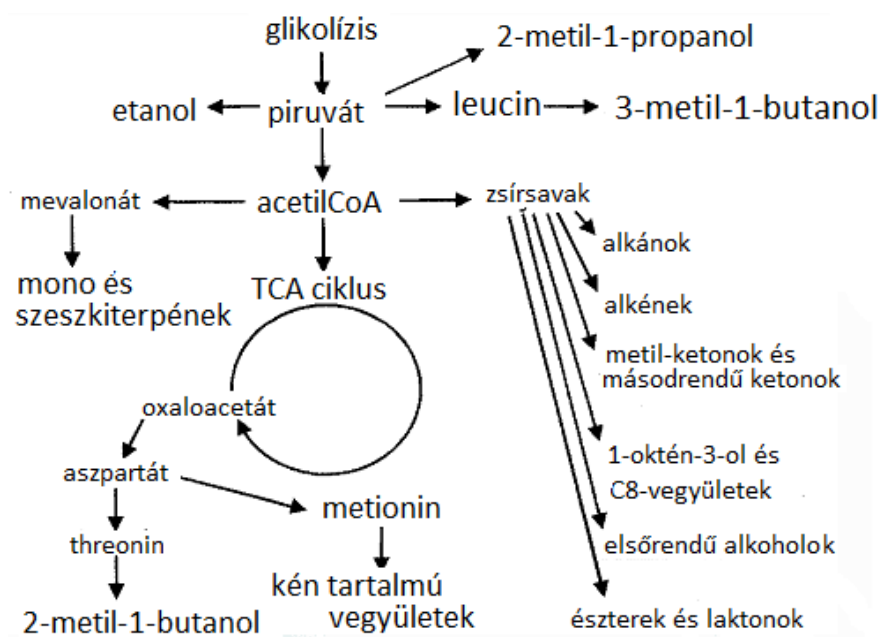
A szilárd és jó oxigén ellátottságú élelmiszerek (ilyenek például a zöldségek, gyümölcsök is) kedveznek a penészgombák növekedésének. A romlás során keletkezhetnek mikotoxinok, allergén - és méreganyagok. A mikotoxinok másodlagos anyagcsere termékek, melyek károsítják az emberi és állati szervezetet. A gyümölcsök mind a termesztés, mind pedig a raktározás során fertőződhetnek a különböző gombák által. A gyümölcsök legjellemzőbb romlásai közé tartozik az úgynevezett kék penészes romlás, és a szürke penészes romlás. Az utóbbit a *Botrytis cinerea*, az előbbi pedig a *Penicillium expansum* okozza. A *Penicillium* kívül a leggyakoribb romlást okozó mikrobák a különböző *Monília* és *Alternaria* fajok [Pitt et al. 2009].

Több vizsgálat alapján behatárolták, hogy milyen penészgombák okozzák a raktározott almák romlását, és milyen arányban fordulnak elő. Az összes penészgombák okozta megbetegedés tekintetében a *P. expansum* 62 %-kal, a *B. cinerea* 23 %-kal, az *Alternaria spp.* 11 %-kal, a *Phylospora obtusa* 2 %-kal, az egyéb gombák pedig szintén 2 %-kal veszik ki a részüket [Rivka 2001, Vikram et al. 2004b, Vikram et al. 2004a]. Más *Penicillium* fajok is előfordulhatnak a tárolt almán, de a gyakorlat azt mutatja, hogy a nemzetségen belül is az előbb említett gomba okozza a legjelentősebb károkat. A *P. expansum* gyakran termelt mikotoxinjai: a patulin és a citrinin, amelyek élelmiszerbiztonsági szempontból is jelentős patogén mikrobává teszik. Kimutatták, hogy a patulin karcinogén és mutagén hatású lehet állati sejtekre [Pitt et al.

2009]. A penészgombák kimutatására számos klasszikus módszer áll rendelkezésre, azonban közös hátrányuk, hogy mindegyiknél szükség van mintavételre, és ez a legtöbb esetben a minta elroncsolásával jár együtt.

2.3.3. A *Penicillium expansum* illékony vegyületei

A *P. expansum* 20-25 °C közötti szobahőmérsékleten nagyon gyorsan szaporodik. A romlás kezdetén fehér konídiumtartók jelennek meg, majd kékes-zölde telepek jönnek létre, melyek körül a gyümölcs barnává és fonnyadtá válik. A kórokozó leggyakrabban sérüléseken át, vagy a kocsánynál fertőz. Miután a micélium átszötte a szöveteket, lágy rothadás jön létre. A héj vörösesre színeződik, könnyen felreped, alatta a hús kásás, folyékony. A megtámadott részekben zöldekkék spóravánkoskák keletkeznek. A *Penicillium* nemzetségre jellemző, hogy nagy mennyiségű, száraz konídiumot (konidiospórát) hoz létre. Ebből adódóan a légtérben nagy gyakorisággal előforduló *Penicillium* konídium, nemcsak a *Penicillium* fajokkal folytatott körültekintő labormunkára hívja fel a figyelmet, hanem magyarázatot szolgáltat arra is, hogy miért olyan nagymértékű a *Penicillium* fajok okozta romlás a különböző termények tárolása során. A penészgombák által termelt illékony vegyületek nem pontosan ismertek számunkra, azonban jó támpontot adnak az ismert metabolikus folyamatok. A 10. ábra alapján feltételezhetjük, hogy milyen kémiai karakterű és méretű vegyületeket mérhetünk penészgombák esetén [Ender 2010].



10. ábra: A metabolikus útvonalak áttekintése a penészgombák fő illékony vegyületeinek szintézisére vonatkozóan [Schnurer et al. 1999, Larsen et al. 1994].

Az 5. táblázatban összegyűjtöttem Matysik és munkatársai által 2008-ban és 2009-ben mért *P. expansum* által termelt illékony vegyületeket. A két tanulmányban a talált 26-ból csak 6 vegyület egyezett: 2-metil-propán-1-ol, 2-metil-bután-1-ol, okt-1-én-3-ol, pent-2-on, okt-3-on, illetve szeszkviterpének [Matysik et al. 2008, 2009]. A többi vegyület csak a 2008-as vagy csak a 2009-es tanulmányban szerepelt. A sejteket mindkét esetben D18 agaron növesztették. Az első esetben az élesztősejtek mellé egy passzív adszorbens mintavevőt helyeztek, majd 4 hét múlva eltávolították és utána a mintavevőből extrahált mintát közvetlen mérték GC-MS-el. A második esetben SPME mintavételt alkalmaztak közvetlenül a növekedő sejtek felett. Mindkét mérésnél ugyanazt az analitikai készüléket, oszlopot, fűtési paramétereket, tömegspektrometriás paramétereket alkalmazták. Az eltérés számottevő. Ha feltételezzük, hogy a méréseket és a kiértékelést jól végezték, akkor vagy a különböző mintavételi módszerek közti összehasonlíthatóság nagyon kicsi vagy a *P. expansum* különböző mutáció közt van ekkora különbség, vagy egyéb környezeti tényezők befolyásolták a penészgombák szaporodását. A mikrobiális VOC-k esetében sincs lehetőség az egyes fajtákra jellemző összes VOC előzetes ismeretére.

5. táblázat: DG 18 agaron oltott *P. expansum* által kibocsátott illékony szerves vegyületek [Matysik et al. 2008, 2009].

Illékony vegyület	Matysik et al., 2008	Matysik et al., 2009
2-metil-furán		x
3-metil-furán		x
2-metil-prop-1-ol	x	x
3-metil-but-1-ol		x
okt-1-én-3-ol	x	x
2-metil-but-1-ol	x	x
pent-2-on	x	x
oktán-3-on	x	x
ciklohexanon		x
3-hidroxi-butanon		x
hex-1-én		x
pentadekén		x
β-pinén		x
limonén		x
dibutil-maleinát,		x
etil-acetát		x
etil-propanoát		x
szeszkviterpének	x	x

pent-1-ol	x	
pent-2-ol	x	
okt-3-ol	x	
2-etil-1-hexanol	x	
1,3-oktadién	x	
hept-2-on	x	
3-metil-anizol	x	
α -terpineol	x	

Tehát a mikrobák VOC elemzésénél is hasonló bizonytalanságokkal állunk szemben, mint az aromakomponenseknél. Természetesen itt is különbözik a VOC-k minőségi és mennyiségi összetétele törzsenként és fajtánként, sok kutatás célja épp a genetikai különbség detektálása [Nilsson et al. 1996, Sunesson et al. 1996, Schwalbe et al. 1999, Elke et al. 1999, Griffith et al. 2007]. Az egyik legkorábbiiban, 1995-ben 47 *Penicillium* törzs VOC-it detektálták adott törzsre jellemző vegyületek után kutatva [Larsen et al. 1995]. *P. expansum* esetében 7 VOC-t mértek: az izobutanolt, izopentanolt és az 1-metoxi-3-metil-benzolt sztenderdekkel megerősítetve azonosították, míg a β -pinént, zingiberént (zingiberene), α -bergamotént (α -bergamotene) és a β -biszabolént (β -bisabolene) pedig csak a referenciatömegspektrum alapján azonosították. Lényegében majdnem mind a 47 törzsre találtak egyénileg jellemző vegyületet. Az általuk említett korábbi kutatásokban úgy tűnt az etanol, izobutanol, izopentanol, 1-oktén-3-ol, ketonok és terpének azok a vegyületek amelyeket sok különböző faj termel különböző körülmények között is. Így a *P. expansum*ra jellemző biztosan azonosított vegyület az 1-metoxi-3-metil-benzol. A környezeti tényezők, mint a vízaktivitás, pH, levegő összetétele, keverés, és hőmérséklet itt is nagyban befolyásolják az illékony metabolitok minőségi és mennyiségi tulajdonságait. Ebben a kutatásban is bizonyították, hogy az illékony vegyületek összegyűjtésére használt módszernek is jelentős hatása van a meghatározásra.

A penészgombák illékony alkotói és a mezőgazdasági árucikkek kapcsolatáról egy összefoglaló cikk jelent meg 1998-ban [Jelen et al. 1998]. A tanulmány az *Aspergillus*, *Penicillium*, és *Fusarium* törzsek (a legfontosabb romlást okozó törzsek gabona esetében) illékony vegyületeken alapuló penészgombás szennyezettségének értékelési módszereit hasonlítja össze. Az itteni szerzők szerint is, a penészgombák által termelt illékony alkotók karakterisztikusan jellemző markerek lehetnek a penészgomba jelenlétére.

2.4. Metabolitok azonosítása

2.4.1. Illékony szerves vegyületek összehasonlításának lehetőségei

Tekintsük, át milyen lehetőségek vannak a GC-MS-el detektált VOC-k összehasonlítására. Alapvető módszer, hogy a kromatográfus egymás mellé tesz két kromatogramot és a különbözőnek észlelt kromatográfiás csúcsokat kézi kiértékeléssel összehasonlítja a tömegspektrumok alapján, majd azonosítja őket. A használható eredmény egy táblázat, melynek sorai valamilyen vegyületek, vagy vegyület fragmensek, esetleg egyéni tömegek, oszlopai az egyes minták, és a cellákban a csúcs alatti terület, vagy intenzitás szerepel. Az azonosított csúcsok intenzitásáról, vagy csúcs alatti területéről diagrammokat, táblázatokat készítenek és/vagy felhasználják többváltozós statisztikai értékelésben. A dolgozat eddigi részében, mint a legtöbb ma található publikációban, a csúcsok kézi kiértékelésével kapott változókat használták a statisztikai értékeléshez.

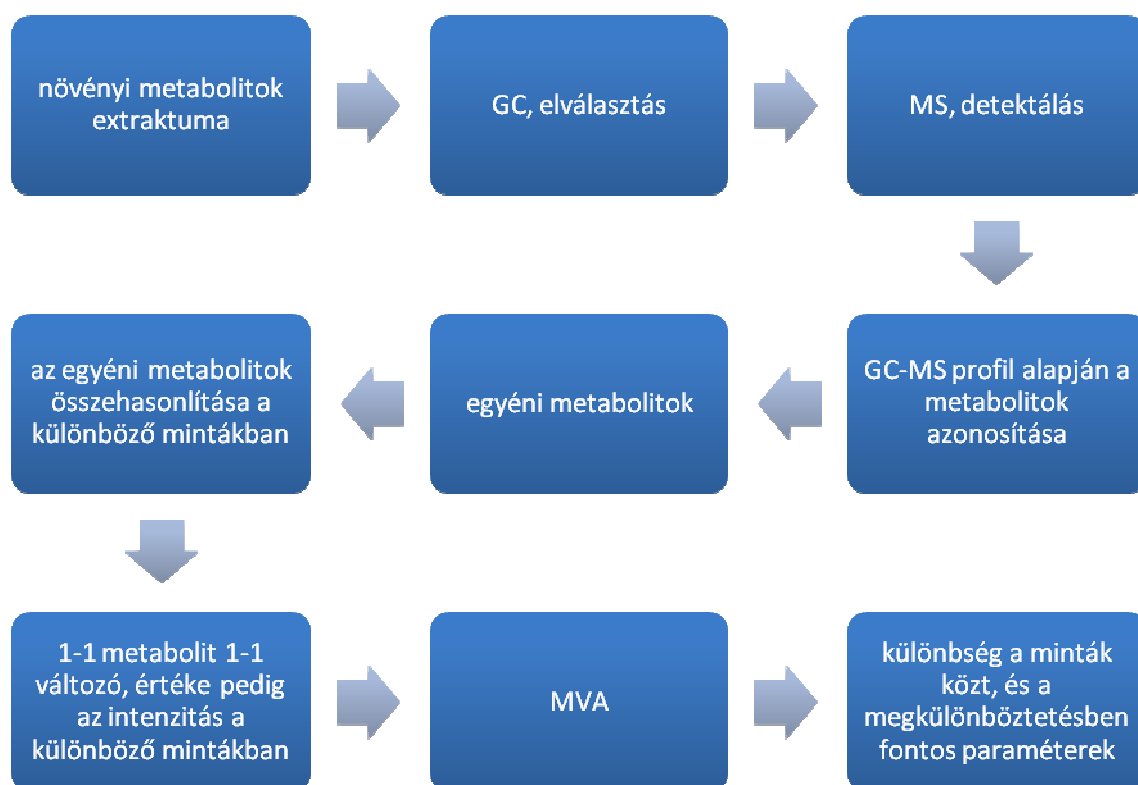
Ha nem csak néhány kromatográfiás csúcs van a mintában, akkor a kézi kiválogatás igen sok időt vesz igénybe. Egy vizsgálat során például a vegyületek mintázatát tanulmányozták az emberi izzadságszagban [Penn et al. 2007]. Összesen 965 kromatogramot kaptak, átlagosan 241 kromatográfiás csúccsal. A cikk szerzői kiszámították, hogy ennek az adatmennyiségnek a kézi kiértékeléséhez, azaz az egyes kromatográfiás csúcsok tömegspektrumainak egymással való összevetéséhez 19 évre lett volna szükség, ha évente 45 héten keresztül heti 50 órát dolgoznak és egy csúcsra körülbelül 5 percet számolunk. A kézi csúcskiválogatás legnagyobb hátránya nem az időhiány, hanem az, hogy ha élő személy végzi a csúcsok összevetését, akkor nagyban függ az eredmény az adott kutató tapasztalatától és tudásától. A kis jel/zaj arányú kromatográfiás csúcsok a sok zaj miatt vagy kiesnek az értékelésből, vagy kevesebb az esély a helyes azonosításra a referenciaspektrumokkal való összevetés alapján. Nem tökéletes elválasztás esetén pedig a csúcsok szabad szemmel csak sok munkával és gyakorlattal választhatók szét, koelúció esetén pedig ez lehetetlen új mérések nélkül.

Egyik lehetőség a csúcsok vizuális összehasonlításának lehetőségének javítása a kromatogramok átalakításával. Csokoládé minták nagyfelbontású GC-MS kromatogramjainak összehasonlítása során azt állapították meg, hogy a vegyületeket amelyek a szennyezett csokoládé minta rossz illatáért voltak felelősek, lehetetlen szemmel azonosítani ilyen komplex minták esetén [Fay et al. 1995]. Ezért olyan algoritmust fejlesztettek ki az egyes ionok ábrázolására alapozva, amellyel szemrevételezéssel meg lehetett állapítani az rossz ízért

felelős vegyületeket. A probléma, hogy ez a rendszer csak ezekre a szennyezőkre és ebben az élelmiszermintában működik jól.

Amtmann és munkatársai mézek aromakomponenseit használták annak felderítésére, hogy az adott virág aromakomponensei megtalálhatók és jellemzőek-e a belőlük készült mézre [Amtmann 2009]. A kutatásokhoz a kettős normálás módszerét használták alkánok homológ sorának rögzítésével. Az így kapott „aromagrammok” már vizuálisan könnyebben összehasonlíthatók. Sikerült olyan módszert kidolgozniuk, amely az alapját képezheti mézek eredetvizsgálatának. A hárs, bodza és aranyvessző méz esetében találtak a vonatkozó virágokkal közös marker vegyületeket. „Ezek a *Tilia* esetében a kaporéter, hárséter és a krizanténon. A *Sambucus* esetében a közös vegyületek közül markernek fogadták el a következőket: transz-rózsaoxid, hotrienol. A *Solidago* méz azonosítására alkalmas vegyületek a következők voltak: δ -elemén, β -elemén, α -amorfén, germakrén-D, δ -kadinén. A sóvirág- és a levendulaméz esetében nem volt a méznek és a virágnak olyan közös vegyülete, amely egyedülálló módon bizonyíthatná kapcsolatukat.” Sikeresen alkalmaztak hasonló módszert néhány jellemző magyar élelmiszer eredetének vizsgálatára [Korány et al. 2005].

A másik lehetőség az automatikus csúcsfelismerés, metabolit azonosítás. Az azonosítás itt nem azt jelenti, hogy megmondható az egyes tömegspektrumok mely vegyülethez társíthatók, hanem az algoritmus valamilyen kritériumok alapján kiválasztja azokat a jellemző információcsomagokat a GC-MS rendszerben rögzített összes adathból amelyek valószínűleg egy vegyülethez tartoznak. Erre a feladatra a kereskedelmi forgalomban kapható szoftverek általában statisztikai programcsomaggal együtt állnak rendelkezésre, mely az azonosított metabolitok segítségével meg is keresi az egyes minták közti különbségeket. A 11. ábrán szerepel az ilyen algoritmusok egyszerűsített vázlata. A gyakorlatban vannak különböző kereskedelembe kapható és egyénileg fejlesztett szoftverek is, ezeknek széles gyűjteménye található meg egy 2007-es összefoglaló cikkben [Katajamaa et al. 2007], mely mintegy 29 algoritmusról számol be. A legtöbb eljárás, az adatfeldolgozás szempontjából hasonló, HPLC-MS adatokkal kidolgozott metabolomikai módszereket használja. Az automatikus módszer esetén is előfordulnak hibák, a legnagyobb kihívás az adatok megfelelő bemutatása, ugyanis különböző paraméterek függvényében különböző eredmények keletkeznek.



11. ábra: a metabolitok kemometriai feldolgozásának általánosított folyamatábrája

Egyik kereskedelembe kapható korlátozottan használható lehetőség a Waters cég Markerlynx szoftvere. Alma aromakomponenseinek elemzésénél használták SPME mintavétellel egybekötött GC-TOF-MS adatok átalakítására [Aprea et al. 2011]. Négy különböző almafajta illékony alkotóinak profilját rögzítették. A Markerlynx a teljes tömegtartományban rögzített adatokból „retenciós idő – tömeg” párokat, változókat alkot, minden ilyen párhoz pedig egy intenzitás adat tartozik minden mért mintában. Egy-egy vegyülethez sok ilyen „retenciós idő – tömeg” változó tartozhat, attól függően hány jelentős fragmense van. Az így kapott adattáblára sikeresen alkalmazták a PCA, PLS-DA módszert a fajtákra a jellemző markerek kiválasztására.

El lehet végezni ugyanezt MetAlign szoftver (<http://metalign.nl>) segítségével is. Egy tanulmányban 94 paradicsom fenotípust vizsgáltak [Jansen 2009], ezekből 198 metabolitot mértek, melyekből több mint 20.000 egyéni molekula fragmens intenzitás mintázatát vizsgálták a különböző mintákban többváltozós módszerek segítségével. Hierarchikus fürt elemzés módszerével megállapították mely metabolitok származnak ugyanabból a biokémiai prekursorból. Napjainkban a hierarchikus fürt analízis már beépült néhány gyártó kereskedelmi szoftverébe, pl. hasonló metabolit származás kereső található meg a Waters cég egy másik termékében a Metabolynx-ban.

Az előbb részletezett tanulmány a különböző fenotípusokhoz társítható ismeretlen vegyületeket az illékonyra tehető vegyületek körében célozta meg. Azonban a hasonló kutatásokban gyakoribb, hogy HPLC-MS elemzést alkalmaznak ezért a hozzájuk kapcsolódó szoftverek is elterjedtebbek, de sok esetben alkalmazhatók GC-MS adatokra is. Fellelhető szoftverek például AMDIS (<http://www.amdis.net/>), MetaQuant [Bunk et al. 2006], TagFinder [Luedemann et al. 2008], MetabolitDetector, [Tsugawa et al. 2011], MassBank [Horai et al. 2010] Bonyolítja alkalmazásukat, hogy legtöbb a retenciós indexek segítségével igazítja egymáshoz a kromatográfiás csúcsokat, így szükséges a normál alkánok homológ sorának felvétele ugyanabban a kromatogramban amiben a minta van.

2.4.2. Többváltozós statisztikai módszerek

A metabolit azonosítás után a második kritikus kérdés a meglévő változók közül azoknak a kiválasztása, amelyek fontosak a minták megkülönböztetésében. A többváltozós adatelemzés különböző csoportosító és osztályozó módszereket kínál. A csoportosító eljárások a nem felügyelt eljárások (unsupervised pattern recognition) közé tartoznak. A nem felügyelt eljárások az összes mintából kiindulva, a változók értékei alapján a különböző mintákhoz tartozó kromatogramokat próbálja viszonylag homogén csoportokba rendezni. [Horvai et al. 2001, Berrueta et al. 2007]. Az elemzés indulásánál tehát még nem rendelkezünk csoportokkal, az eljárás végére viszont csoportokhoz jutunk. Az ilyen eljárásokat két fő céllal használják a VOC-k mérése esetén. Annak megjelenítésére, hogy van, vagy nincs különbség két csoport között és annak felderítésére, hogy melyek azok a változók amelyek ebben a különbségben fontos szerepet kapnak. Ha sok változónk van, ami tipikusan a VOC-k elemzése esetén, egyik megoldás hogy csökkentjük a változók számát. Ahhoz hogy megértsük és be tudjuk mutatni a kísérleteink eredményét két vagy három dimenziós formába kell hozni azokat. Ilyen tipikus adatredukciós módszer a PCA és a fürtelelemzés.

Az osztályozó eljárásokat más néven felügyelt eljárásoknak (supervised pattern recognition) hívják. A csoportosított minták objektumaira kiszámítja a különböző csoportokhoz való tartozás valószínűségeit, így az adott mintatérben megítélhetjük a csoportosítás jóságát. Ebben az esetben az elemzés előtt volt ismeretünk arról, hogy mely minták mely csoportokba tartoznak. A kérdés, hogy a csoportok kialakításában mely változók játszottak szerepet, és ezek alapján a változók alapján helyesen tudjuk-e besorolni az ismeretlen mintákat. PCA-hoz hasonlóan adatredukciós céllal is végezhetjük az elemzést. Miután sikerült minél több

vegyületet összegyűjteni a mintavétel során, ebben a lépésben minden olyan vegyülettől megszeretnénk szabadulni, amelynek nincs szerepe az általunk vizsgált különbségben.

Az osztályozó eljárások közül a diszkriminancia elemzés a megfigyeléseket a mintatérből egy olyan diszkrimináló térbe viszi át, ahol a csoportok a lehető legjobban elkülönülnek, és kiválasztjuk azokat a változókat, amelyek a csoportok különbözőségét magyarázzák. A szeparáló eljárások azokat a hiperfelületeket keresik, amelyek elválasztják egymástól a minta osztályait feltételezve, hogy az azonos osztályokban szereplő elemek “közel”, a különböző osztályokban szereplők pedig távol helyezkednek el egymástól [Horvai et al. 2001].

A regressziós feladatokban két vagy több változó közti matematikai összefüggést keressük. Egyenes illesztés esetén az összefüggés alapján becsült függő változók értékeit (az egyenes pontjait) összevetve a megfigyelésekkel megtudhatjuk mennyire jó modellt készítettünk. Az összevetésre különböző kritériumai vannak, az egyik ilyen a PLS. A módszert azért hívják a legkisebb négyzetek elvének, mert az egyenest úgy illesztjük a ponthalmazra, hogy az egyenes és a pontok közötti eltérések négyzetének összege minimális legyen.

Többféle osztályozó, csoportosító és becselő többváltozós módszer létezik, ezek közül az élelmiszerminták VOC-k értékeléséhez használhatók közül néhányat a 6. táblázatban mutatok be.

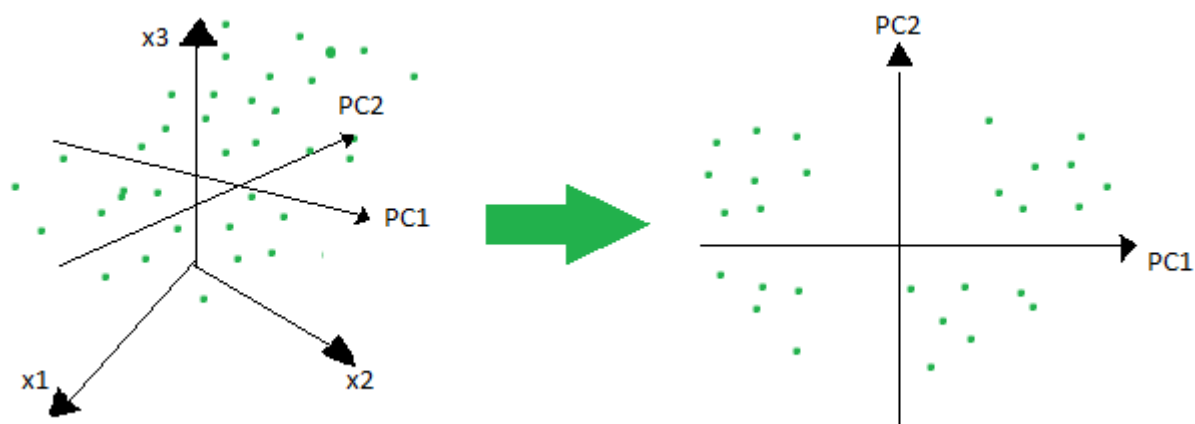
6. táblázat: Néhány példa az illékony metabolitok élelmiszer analitikai elemzésénél használt statisztikai módszerekből.

Minta, az analízis célja	Elválasztás és detektálás	Adatkezelés módja	Hivatkozás
Durain növény VOC-k elemzése.	GC-MS	PCA	[Chin et al. 2007]
Alma, fény által indukált anyagcsere változások a héjban.	GC-MS	PCA	[Rudell et al. 2008]
Durain növény, VOC-k változása hűtőtárolás során.	GC-TOF MS	PCA	[Voon et al. 2007]
<i>Salmonella typhimurium</i> mal fertőzött disznóhús, VOC-k a fertőzés detektálására.	GC-MS	PCA, ANOVA	[Xu et al. 2010]
Füstölt lazac romlásában fontos szerepet játszó VOC-k azonosítása.	GC-MS	MVR	[Jørgersen 2001]
Paradicsom által kibocsátott VOC-k elemzése.	GC-MS	PCA,HCA	[Tikunov et al. 2005]
Oszták alma fajták megkülönböztetése VOC-k alapján.	HS-GC-FID	PCA, Bayesian elemzés, LDA	[Abrodo et al. 2010]
A délutáni eső, relatív páratartalom és a	GC-MS	korrelációanalízis	[Vallat et al. 2005]

hőmérséklet hatása a fák VOC kibocsátására.			
Illathoz kötődő enzimaktivitás vizsgálata almák érése során.	GC-MS	PCA	[Echeverria et al. 2004b]
Alma <i>P. expansum</i> romlásának MVOC elemzése.	GC-MS, E-orr	PCA, PLS regresszió	[Karlshej et al. 2007]
Friss zöldségen <i>Salmonella typhimurium</i> által okozott romlás előrejelzése.	GC-MS	LDA, ANN	[Siripatrawan et al. 2007]
Borok minőségi ellenőrzése előre kiválasztott választott alkoholok és észterek alapján.	GC-MS	diszkrimináló függvény elemzés	[Maciejewska et al. 2006]
Különböző fajták megkülönböztetése alma aromakomponenseik alapján.	GC-MS és szenzorok	PCA, PLS	[Zou et al. 2008]

2.4.2.1. Főkomponens-elemzés

A főkomponens-elemzés egy adatstruktúra-elemző módszer, melynek lényege, hogy az eredetileg korrelált független változók lineáris kombinációiként új korrelálatlan független változókat hozunk létre (12. ábra). Az új független változókat nevezzük főkomponenseknek, ezek egymásra merőlegesek. Az első főkomponenst úgy hozzuk létre, hogy az adatokban levő variancia lehető legnagyobb részét magyarázza, a második az elsőre merőleges és a második legtöbb varianciát magyarázza és így tovább. Az eredeti változók által kifeszített teret a főkomponensek segítségével alacsonyabb dimenziójú térbe vetítjük, remélve, hogy ily módon csoportosulásokat, kiugró értékeket fedezünk fel [Horvai et al. 2001].



12. ábra Független változók és főkomponensek kapcsolata

Az eredeti adatmátrixot felírhatjuk két mátrix szorzataként:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T \quad [1]$$

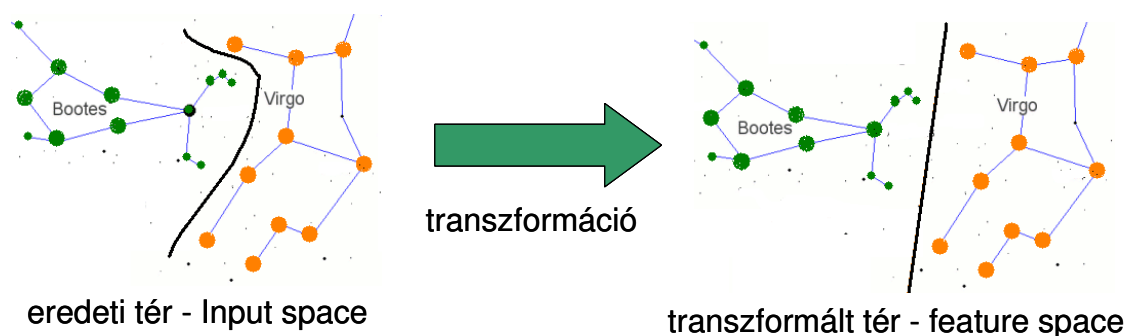
ahol $\mathbf{X}$ az adatmátrix, ami n sorból (esetek, objektumok) és p oszlopból (változók, tulajdonságok) áll. $\mathbf{T}$ az ún. főkomponens mátrix, ami az $\mathbf{X}$ mátrix vektorainak vetítése egy kisebb dimenziós altérbe a $\mathbf{P}^T$ vetítési mátrix segítségével, és ez megadja az objektumok koordinátáit a $\mathbf{T}$ hipersíkban. A $\mathbf{T}$ mátrix oszlopai a főkomponens vektorok (scores), a $\mathbf{P}$ mátrix sorai pedig a főkomponens-együttható vektorok (loadings). (Az irodalmak egy része a score és a loading kifejezéseket felcserélve használja.)

2.4.2.2. Önszerveződő idegháló

A PCA mellett az adatok bemutatására használható módszer az önszervező idegháló (Self Organizing Maps, SOMs), mely egy nem felügyelt módszer, a mesterséges ideghálózatok egyik típusa. Kevésbé ismert és használt kémiai mintázatfelismeréssel kapcsolatos problémák megoldásához. Ennek egyik oka lehet, hogy a kereskedelmi forgalomban elérhető szoftverek közül kevés tartalmazza. Vitathatatlan előnye, hogy míg a PLS-DA, LDA és a többi többváltozós módszer főleg akkor működik jól ha két csoport van, a SOMs főleg több csoport esetén hatékony. Másik előnye hogy a használt megjelenítésben a csoportok akkor is jól elkülönülhetnek, amikor a PCA-ban a főkomponensekre vetített minták átlapolódnának a sok adatpont miatt. Vizualizációra általában az U-mátrixot használják, amelyben a mintákat hatszög alakú mezők képviselik, a hatszögek színezése megfelel a szomszédtól való távolságnak [Brereton 2009].

2.4.2.3. Támogató vektor gép elvén alapuló regresszió

A támogató vektor gép (support vector machine, SVM) elvét felhasználó regressziós módszer (support vector regression, SVR) nem felügyelt „tanulási” módszer. Az SVM regresszió úgy működik, hogy a PLS regresszióval szemben, nem egy olyan matematikai összefüggést próbál találni, amely kellőképpen leírja minták függését az adott változóktól, hanem a mintákat úgy transzformálja, hogy azok lineárisan elválaszthatók legyenek (13. ábra).



13. ábra: A SVM regresszió elvének összefoglalása.

Az utóbbi 10 évben az SVM tanulási folyamatán alapuló osztályozó és regressziós eljárások az analitikai adatokra is egyre inkább használatosak. Különösen a lineárisan nem elválasztható adathalmazok esetén érdemes az SVR használatát megfontolni. Biológiai, orvosi és környezetvédelmi többváltozós tanulmányokban általában nem várhatjuk el hogy az adatok lineárisan szétválaszthatók legyenek. Azonban az SVR alkalmazásánál is a túlillesztés lehetőségét szem előtt tartva, és azt elkerülve kell alkalmazni.

2.5. Kísérlettervezés

A kísérletezés, a próbálgatás az egyik “legizgalmasabb” kutatói tevékenység. De a kísérletezés és a próbálgatás nem ugyanazt a fogalmat jelenti. Egy kísérletben szándékosan változtatunk egy vagy több változót, faktort, hogy hatását megfigyeljük a minőséget jellemző egy vagy több válasz változón. „A (statisztikai) kísérlettervezés (Design of Experiment) egy hatékony eljárás a kísérletek megtervezésére és elemzésére úgy, hogy a kapott adatok valós és objektív következtetések levonását tegyék lehetővé. A kísérletterv (Experimental Design) a részletes, a beállításokat, sorrendet tartalmazó kísérleti terv, amelynek még a kísérletek elvégzése előtt rendelkezésre kell állnia.”

Az optimális paramétereket nem célszerű az összes lehetséges beállítás „kipróbálásával” meghatározni, hanem bizonyos, lehetőleg kis számú kísérleti beállítás mellett vizsgáljuk az elért minőséget és ezek alapján következtetünk a helyes gyártási beállításra. Ezeket az elvégzendő kísérleteket kell megtervezni, hogy minimális költséggel és idővel a lehető legtöbb információhoz jussunk. Az optimáló kísérlettervezésben a független változóknak az optimális működési tartományát jellemző értékeit keressük. A változókat egyszerre változtatjuk, így egy-egy kísérlet minden vizsgált változó hatásáról nyújt információt.

A független változókat faktoroknak nevezik, beállított értékeit szinteknek. A teljes faktorterv azt jelenti, hogy minden faktort minden szinten megvizsgálunk, ha p faktort 2 szinten

vizsgálunk, és minden beállításnál egyetlen kísérletet végzünk a kísérleti terv $N=2^p$ pontot tartalmaz. Mivel minden faktorhoz csak 2 szint tartozik, és 2 pontra csak egyenest lehet illeszteni, a kapott modell lineáris modell. Ha a faktorok közt nem lép fel kölcsönhatás, azaz az egyik faktor hatása azonos a másik faktorok mindkét szintjén, akkor az illesztett modell 2 faktor esetén egy sík egyenlete. Az értékelés során a nullhipotézisünk az, hogy a faktoroknak nincs hatása (valódi értékük nulla), és nincs közöttük kölcsönhatás. Ha igaz a nullhipotézis, a becsült értékek csupán a véletlen műveként térnek el zérustól, azaz zérus várható értékű normális eloszlást követnek.

A kísérleti beállítások szintjeit kódolt formában célszerű megadni:– (alsó szint) és + (felső szint). A kísérleti terv mátrixa az egyes kísérleti beállításhoz tartozó faktorkombinációkat adja meg kódolt értékekkel. A többfaktoros kísérleti tervek célszerűen ortogonális elrendezésűek. Az ortogonális kísérleti terv előnye, hogy az egyes faktorok hatása egymástól függetlenül becsülhető. A kódolt megadás előnye még, hogy a különböző nagyságrendű változók értékeiből származó egyenlőtlenségeket megszünteti. A kísérleti tervet meghatározott szabályok szerint redukálhatjuk, ezzel ún. rész-faktortervet (részleges faktoros tervet) állítunk elő.

Leggyakrabban polinomiális modellt illesztünk az eredményekre. Kétszintű kísérleteknél az egyes faktorok csak első hatványon szerepelhetnek. A matematikai modell általános alakja:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \dots + \beta_{12} x_1 x_2 + \dots + \varepsilon \quad (1) \quad [2]$$

amelyben y a célparaméter valamely beállításnál mért értéke, β_1 stb. a faktorok lineáris hatásainak együtthatói, β_{12} stb. az egyes faktorok közötti kölcsönhatások együtthatói a modellben, ε a kísérleti hiba. A kísérleti hiba tartalmazza az y mérési hibája mellett a figyelembe nem vett (vizsgálatba be nem vont) többi faktor (köztük a kézben nem tartható faktorok) ingadozásának hatását is.

A regressziós összefüggés kifejezi, hogy az egyes faktorok egyenként milyen mértékben változtatják a célparaméter értékét az átlagértékéhez képest, valamint két- és többfaktoros kölcsönhatásaik milyen mértékű változást eredményeznek. Más megfogalmazásban a kísérleti eredményekből a faktorok hatásait akarjuk megtudni. Kétszintű kísérlet esetében egy faktor hatása azt jelöli, hogy mekkora változás következik be a célparaméter átlagos értékében, ha az adott faktor szintjét az alsó szintről a felső szintre változtatjuk. A regressziós összefüggés együtthatói az egyes faktorok egységnyi változtatásának tulajdonítható változást fejeznek ki.

Ebben az esetben a faktorhatás a megfelelő regressziós együttható értékének kétszerese
[Kemény Sándor 2000, Deák-Kemény 2004].

3. FEJEZET. A MEGOLDANDÓ FELADATOK ISMERTETÉSE

A bevezetésben említett mérőrendszer, mellyel ipari méretű szabályozott légterű tárolókban előre lehetne jelezni az esetleges mikrobiális romlást nem fér bele egy doktori munka kereteibe. Ahhoz, hogy egy iparilag alkalmazható mérőrendszer feltételeit megteremtsük, valamilyen automatizált módszert kell alkalmazni. Én a marker vegyületek alkalmazását választottam, ez esetben a cél, olyan vegyületek felkutatása, amelyek általánosak minden vagy több olyan romlásra amely az adott terménnyel kapcsolatban előfordulhat, vagy általánosak egy adott mikrobára különböző termények esetén. Az út egy modellrendszeren keresztül vezet, melyben lehetőség van kidolgozni a VOC-k mérésének és feldolgozásának lehetőségét, és közös marker vegyületeket keresni. Célul tűztem ki a VOC-k mérési rendszerének tulajdonságait és befolyásoló tényezőit megvizsgálni és különböző adatelemzési módszereket vizsgálni a későbbi felhasználás tekintetében.

Ehhez a feladathoz a dolgozatban a következő kérdéseken keresztül kerestem választ:

- Milyen aromakomponenseit tudjuk lemérni az egészséges gyümölcsöknek? Mennyire állandóak az aromakomponensek egy kísérleten ill. több kísérletsorozaton keresztül?
- Van-e szignifikáns és állandó különbség a teljesen romlott és egészséges minták közt? Mely vegyületek fontosak a megkülönböztetésben? Mely statisztikai módszerrel lehet ezeket hatékonyan meghatározni?
- *Penicillium expansum* oltott almák és szilvák esetén van-e olyan marker vegyület, amely azonos mindkét gyümölcs esetében?
- *Penicillium expansum* és *Botrytis cinerea*val oltott gyümölcsök esetén van-e olyan marker vegyület, amely közösen megtalálható?
- A megkülönböztetésben jelentős vegyületek felhasználhatók-e a romlás előrejelzésére?

4. FEJEZET. ANYAG ÉS MÓDSZER

Ebben a fejezetben azokat a módszereket ismertetem, amelyek főbb változtatások nélkül, minden kutatási részfeladatban egyaránt alkalmaztam.

Az esetenkénti eltéréseket a megfelelő fejezetek tartalmazzák, az adott mintához kapcsolódó kiegészítésekkel együtt.

A téma multidiszciplinaritása miatt két másik kutatócsoporttal együttműködve születtek az eredmények. Ezek 2 diplomamunka, 1 TDK dolgozat, 2 PhD dolgozat, 3 folyóiratcikk, 4 poszter és 3 előadás eredményeihez járultak joggal. A mikrobiológia rendszer kidolgozását és minták előkészítését a Budapesti Corvinus Egyetem Mikrobiológia Tanszékének munkatársai végezték Dr. Maráz Anna vezetésével. A többváltozós statisztikai módszerekhez az adattáblát és a módszerek egy részét a Bristol Egyetem, Centre for Chemometrics munkatársai segítségével készítettük Prof. Richard Brereton vezetésével. Az eljárások részletei a hivatkozott közleményekben megtalálhatók, itt csak a munkám megértéhez szükséges információkat részletezem.

Ennek megfelelően az ígék esetében az egyes szám első személy és a többes szám első személy gyakran váltakozik a dolgozatban. Az adatfeldolgozás jellegzetesen olyan tevékenység, amely önmagában nem létezhet. A kísérletek megtervezéséért és a feladat kivitelezéséért én voltam felelős, de a doktoranduszi munkám során a méréseket szinte minden esetben másokkal együtt végeztem. A minták előkészítése a Mikrobiológia Tanszékén történt, a kész mintákat a mintavevő edényben elhelyezve átszállítottuk az Alkalmazott Kémia Tanszékre ahol a mérések történtek. Az 5. fejezettől eltekintve egy-egy kísérletsorozatban legalább 8-10 napon át naponta több mint 8 órát igényelt a mintavétel a megfelelő számú adat elérése érdekében. Így a méréseket legtöbb esetben, beleértve a modellrendszer optimalizálását is, a két diplomázó hallgatóval felosztva végeztem. Kézi adatfeldolgozás esetén egyedül dolgoztam. A kromatogramok összehasonlítását és adattáblák létrehozását Sim Siong Fong végezte Matlab programmal (The Mathworks, Inc., Natick, MA). Ezek során az algoritmust különböző paramétereit (kromatográfiás csúcsok átlagos félértékszélessége, tömegspektrometriás csúcsok detektálási határa, tömegspektrumot egyezőségének elfogadási határa, stb.) közös munkával optimalizáltuk, melyek során több száz kromatográfiás csúcsot manuálisan ellenőriztem le különböző mintákban. Ezek után különböző többváltozós módszereket testeltem a különböző kísérletek összevetésére marker vegyületek keresése céljából. Ezek közül Sim Siong Fong végezte a 6. fejezetben található SOMs és SVR számításokat, melyeket az eredmények reprezentálása érdekében elengedhetetlenek, a hozzá tartozó ábrák a közös publikációból származnak.

4.1. Az analitikai rendszer beállításai

A méréseket GCQ gázkromatográfiás készülékkel és GCQ elektronion-csapdás (Electron Trap) tömegspektrometriás detektorral végeztem (Finnigan Mat., USA). Vivőgázként „6.0-ás”, tehát

99,9999 % tisztaságú héliumot (Linde) használtam. A hélium 5,2 bar-on lép be a rendszerbe, az áramlási sebessége 40 ml/perc. Az elválasztást Rxi-5ms kapilláris oszloppal (Restek) végeztem, a töltet összetétele 5 % difenil és 95 % dimetil-polisziloxán. Az oszlop hosszúsága 30 m, a belső átmérője 1,25 mm, bevonatának vastagsága 0,4 μm . A fűtési program paraméterei a következők: az oszlop kezdeti hőmérséklete 40 °C 3 percig, a felfűtési sebesség 12 °C/min, az oszlop végső hőmérséklete 235 °C. Az injektálás splitless módban történt, ezután 1 percig kinyitottuk a split ágat. A tömegspektrometriás paramétereket az irodalom alapján választottam ki, a transzfer line hőmérséklete 275 °C, az ionforrás hőmérséklete 180 °C. A vizsgált m/z tartomány: 40-350 m/z, az elektronokat 70 eV feszültségen bombázza.

Mintavételre minden esetben 65 μm vastagságú PDMS-DVB bevonatú szálát használtam (Supelco, Bellafonte). A száltartó eszközt (SPME holder) szintén a Supelco gyártotta. A mintavétel lépései a következők. Beszúrtam a tartó hüvelyét a szeptumon keresztül, kitoltam a szálát, rögzítettem, hogy ne csússzon vissza. Az extrakciós idő (30 perc) letelte után visszahúztam a szálát a tartóba. Közvetlenül ezután a GC 250 °C -os injektorába szúrtam a hüvelyt, újra kitoltam a szálát és így hagytam a deszorpciós időnek megfelelően. A szál működési tartománya 200 - 270 °C. Minden új szálát a gyártó javaslata szerint kondicionáltunk, amely 30 perc 250 °C-on.

4.2. Felhasznált programok

Az adatgyűjtést és molekulák azonosítását GCQ (Finnigan Mat, GCQ 2.0) programmal végeztük. Ez a szoftver nem alkalmas több minta együttes megjelenítésére vagy kezelésére. Az eredetileg gyűjtött (*.ms) fájlok az Excalibur (Finnigan, v.2.02) szoftver segítségével több program által használható formátumba (common data file, *.cdf) konvertálhatók. Az adatok manuális ellenőrzésére az AMDIS (<http://www.amdis.net/>, v.2.70) és az Excalibur) szoftvereket használtam. Az irodamlomban talált komponések összehasonlítását a saját adataimmal, jellemzőm/z alapján egy saját fejlesztésű Microsoft Excel makróval végeztem. A főkomponens-elemzéseket és a kísérleti terv kiértékelését a Statistica program felhasználásával készítettem el (Statistica 6 StatSoft, Inc., www.statsoft.com).

A kromatográfiás csúcsok hozzávetőleges azonosítása NIST 2.0 referenciaspektrumokat tartalmazó könyvtárral történt. Azonosításra, a „reverse fit” paramétert használtuk, mely annak a mértékét becsli, hogy az adott tömegspektrum melyik, a könyvtárban tárolt tömegspektrummal egyezik leginkább. Tökéletes (100 %-os) illeszkedést akkor kapnánk, ha a minta tömegspektrumában minden egyes tömeg csúcs jelen lenne a könyvtár

tömegspektrumában és az intenzitásuk is pontosan megegyező lenne. Jó illeszkedést (80-90 %) akkor kapunk, ha a minta minden jelentős (ahol jel van és nem zaj) tömeg csúcsára van egy megfelelő tömeg csúcs a tömegspektrométer könyvtárában és az adott tömeg csúcsnál ezek közel azonos intenzitásúak. Rosszabb (70 % alatti) illeszkedés esetén vannak olyan tömeg csúcsok, amelyek nincsenek benne a tömegspektrométer könyvtárában [Heather 1995]. Ahol az azonosítás bizonytalan volt és erre lehetőség adódott, ott a „reverse fit” beállítás alapján legjobban illeszkedő csúcsok közül az irodalomban fellelhető retenciós indexek vagy retenciós idők alapján választottam ki a legmegfelelőbb komponenst. A nevezéktan néhány esetben eltérhet a mai szabályozástól, mivel a program az 1996-os IUPAC (International Union of Pure And Applied Chemistry, tiszta és alkalmazott kémia nemzetközi uniója) szerint készült.

4.3. Adatelőkészítés

A kromatogramokból készített adattáblák sorai a különböző mintákat tartalmazzák, oszlopai a különböző mért vegyületeket, a cellákban pedig a kromatográfiás csúcs alatti területek szerepelnek. A kromatogramokon az aszimmetrikus parciális legkisebb négyzetek módszert alkalmazva először háttér korrekciót hajtottak végre [Boelens et al. 2004], majd egymáshoz igazították őket [Wong et al. 2005], végül a csúcsokat összepárosították a tömegspektrumuk alapján [Dixon et al. 2006]. Ez az eljárás megfelel annak, mintha egy kromatográfus fogna egy darab papírt és felírná milyen kromatográfiás csúcsokat tapasztalt, milyen retenciós idővel és milyen tömegspektrummal. Aztán elővenne egy második kromatogramot és összehasonlítja az első kromatogramban lévő csúcsokkal, és ahol egyezést talál, azokat feljegyzi a megfelelő helyre. Aztán feljegyzi azokat is, amik nem voltak az első kromatogramban és így tovább építve egy adattáblát. Az adattábla létrehozásánál több paramétert optimaltunk azzal a céllal, hogy a csúcsok összehasonlításánál a szoftver elég érzékeny legyen a különböző csúcsok megkülönböztetéséhez, de azokat se keverje össze, amelyeknél a jel/zaj arány kicsi így az egymással való összehasonlításnál nem pontos a tömegspektrumok egyezése.

A dolgozatban nem törekszem a pontos mennyiségi meghatározásra, a kromatográfiás csúcs alatti integrált használok fél-mennyiségi adatként. Azaz a statisztikai értékelésekben felhasználom, és a dolgozat további részében koncentrációként vagy koncentrációval arányos mérőszámként hivatkozok rá az egyszerűség végett, azonban kalibrációs görbék hiányában nem rendelék hozzá pontos koncentráció értékeket.

A többváltozós statisztikai módszerekben használt adattáblákban a kapott csúcs alatti területek gyökeit használtuk, mivel a cél nem a nagy koncentrációjú hanem a változó koncentrációjú

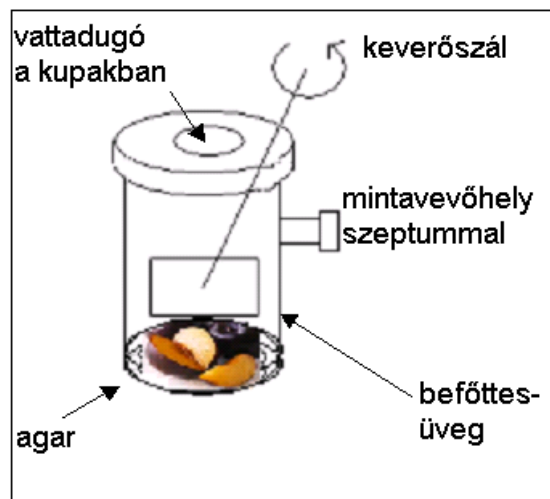
vegyületek kiválasztása. Mivel nem lehet kézben tartani a minta mennyiségét az SPME mintavétel során, a különböző mintákat egyforma összegre súlyoztuk. PCA és SOMs számítások esetén a változók sztenderdizáltak, hogy minden változónak egyenlő esélye legyen, attól függetlenül mekkora a koncentrációja.

Az azonosítás során gyakran felmerült jelenség, hogy egy mérésen belül ugyanazon alkotó (vegyület név) sokszor több helyen jelentkezik, látszólag azonosítási hibaként. A tömegspektrométer nem képes különbséget tenni a konformációs izomerek közt, és különösen a szeszkviterpének esetében sokfajta izomer felléphet. A megoszlási hányados azonban függ a szerkezettől, így a kromatográfiás retenciós idejük különböző ezeknek a konformereknek, így tudjuk, hogy több vegyületről van szó. A dolgozat nem törekszik a mért vegyületek azonosítására minden esetben, a kérdés hogy a romlás mennyire detektálható, az ebben szerepet játszó alkotók megfelelő azonosítása egy másik dolgozat anyaga lenne. A minőségi meghatározást autentikus sztenderdek vásárlásával lehet elvégezni. Dolgozatomban nem használtam referencia anyagokat így azokban az esetekben ahol az azonosítás nem eléggé biztos csak az összegképletet használom, vagy ha a referenciakönyvtárral kapott vegyület valószínűtlen, akkor 'azonosítatlan komponens'-nek hívom.

4.4. Anyagok és mikroorganizmusok

A felhasznált mikroorganizmus a *P. expansum* (P1) és *B. cinerea* (P2) (származás: Japán szilva, BCE, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék Törzsgyűjtemény). Ezeket a törzseket a korábbi kísérletekben szelektív táptalajok segítségével izolálták japán szilváról [Sturm 2008]. Az egész dolgozat során ezekkel a törzsekkel dolgoztunk. Modellgyümölcs a japán szilva és az alma melyeket a piacról szereztünk be.

A minták mintavevő csonkkal ellátott hagyományos, 720 ml-es vagy 1200 ml-es befőttesüvegben tároltuk (14. ábra). A mintavevő nyílás szeptummal (poli-tetra-fluoro-etilén szilikon (polytetrafluoroethylene silicone), 20 mm, Supelco) van ellátva. A mikrobák fejlődéséhez levegőre van szükséges, ezért az üveg nem teljesen zárt, a kupakban vágott nyílásban steril vattadugó biztosítja a szellőzést. A kísérletek alatt a mintákat 21 ± 2 °C szobahőmérsékleten tároltuk. A keveréshez házi készítésű keverőt alkalmaztunk. A 14 ábrán látható módon, a kupakokon 1 kör alakú lyuk található a parafadugón keresztülszúrt keverőpálca rögzítésére.



14. ábra: A mintavételi elrendezés

5. FEJEZET. ANALITIKAI MÓDSZERFEJLESZTÉS SZILVÁK PENÉSZGOMBÁS ROMLÁSÁNAK HATÁSÁRA KELETKEZŐ ILLÉKONY VEGYÜLETEK MÉRÉSE

Ebben a fejezetben az illékony vegyületek mintavételére alkalmazott modellrendszer tulajdonságairól lesz szó. Kiválasztom azokat az illékony szerves vegyületeket, amelyek különbséget tesznek egy romlott és egy egészséges szilva közt.

Publikálva:

V. Sági-Kiss and P. Fodor, Development of a SPME-GC-MS method for spoilage detection in case of plums inoculated with *Penicillium Expansum*, *Acta Alimentaria*, Vol. 40 (Suppl.), pp. 188–197 (2011)

Sági-Kiss Virág, Fodor Péter, Pomázi Andrea, Maráz Anna, 2009. Predicting mouldy spoilage in storehouses based on microbial metabolic profiling, Conference of Chemical Engineering '10, Veszprém, Hungary, 27-29 April 2010, abstract: Conference Proceeding, page 103

5.1. Az SPME mintavétel optimalizálása

Mint az irodalmi részből kiderült a mintavétel kritikus lépés illékony vegyületek esetében, ezért ennek paramétereit külön kísérleti tervvel optimalizáltam. A párhuzamos oltások és ismétlések miatt 8 üvegből kell mintát venni legalább naponta ahhoz, hogy a metabolitok változását nyomon kövessük. Olyan mintavételezés kell, ami elsősorban gyors. Az irodalomban felsorolt példák alapján az SPME mintavételi eljárás megfelel ennek a követelménynek, és a pontossága elég a nem-célzott kutatásokhoz. A gyorsaságon kívül a leghasznosabb, hogy a minta közvetlenül felhasználható gázkromatográfiás mérésben. Az SPME hatékonyságát befolyásoló paraméterek közül nem mindegy változtatható szabadon. Az extrakció hőmérséklete szobahőmérséklet, hiszen a mintákat roncsolás nélkül nem lehet melegíteni. A mintavételi eljárás során optimalizáltam az alkalmazott extrakciós időt, keverést, deszorpciós időt és hőmérsékletet, ennek eredményeit ismertetem az alábbiakban.

Az „Anyagok és Módszer” fejezetben leírt mintatartó rendszert használtuk a levegőből való mintavétel optimalizálására is. A szilva minta nem alkalmas az optimális kísérleti beállítások meghatározására, mivel a VOC-k folyamatosan változnak benne. Ezért ehhez a feladathoz sztenderd vegyületet, a 13 szénatomszámú normál alkánt, a tridekánt (C_{13}) használtam. A tridekán retenciós ideje várhatóan a mért VOC-k retenciós idejének átlagánál lesz, így ennek a sztenderdnek a koncentrációját választottam függő változónak.

Vizsgálataim során analitikai tisztaságú vegyszerekkel (Sigma Aldrich) dolgoztam. A sztenderd oldatot 1 μ l heptadekánból (C_{17}), és 1 μ l tridekánból (C_{13}) készítettem széndiszulfidban oldva, (CS_2) 5 ml végtérfogatig. A sztenderdek retenciós idejét és tömegspektrumát előzetesen folyadékinjektálással határoztam meg. A sztenderd oldatból 2-2 μ l-t fecskendeztem be a mintavevő szeptumon keresztül az üres befőttesüvegekbe. A kísérleti tervnek megfelelő mérések előtt a mintatartó rendszert szobahőmérsékleten inkubáltam néhány órát és az SPME szálát üres lefűtéssel megtisztítottam (az esetlegesen a szálon koncentrált szennyeződések elpárologtatása céljából). Az egyes kísérleti beállításoknak megfelelő mérések közt, az SPME szálát szobahőmérsékletre hűtöttem vissza.

7. táblázat: A kísérleti terv faktorai, és szintjei.

név	jel	mértékegység	skála	alsó szint (-)	felső szint (+)	centrum-pont (0)
extrakciós idő	t_{ext}	min	folytonos	15	22.5	30
deszorpciós idő	t_{desz}	min	folytonos	2	3.5	5
deszorpciós hőmérséklet	T_{desz}	°C	folytonos	200	225	250
keverés	keverés	-	minőségi	0	1	-

A kísérleti terv négyfaktoros és kétszintes. A 2^{4-1} -es részfaktor terv 8 beállítást jelentene, de mi centropontokat is adunk a tervhez, hogy pontosabb képet kapjunk és ellenőrizhessük a lineáris modell helyességét. Mivel az egyik faktor (keverés) nem mennyiségi skálán mozog, nem lehet „elfelezni”, így a 2 centerpont helyett 4-et alkalmaztam. A „keverés” nevű faktornak 2 szintje volt, 1 ha alkalmaztam keverést, azaz 1 percen keresztül forgattam a keverőlapátot, 0 ha nem. A mérési beállításokat és az eredményeket a 8. táblázatban foglaltam össze. A mérési beállításokat véletlen összekeverés (random) módon végeztük, a mérések időbeli sorrendje szerepel az első oszlopban.

8. táblázat: a kísérleti terv beállításai, és eredményei.

y		Transzformált faktorok				Természetes egységekben			
$C_{13}/1000000$	Sorszám	t_{ext}	t_{desz}	T_{desz}	keverés	t_{ext}	t_{desz}	T_{desz}	keverés
17.7	1	+	-	-	+	30	2	200	1
35.8	2	+	+	+	+	30	5	250	1
19.2	3	0	0	0	+	22,5	4	225	1
4.25	4	-	+	-	+	15	5	200	1
27.1	5	+	-	+	-	30	2	250	0
18.3	6	-	-	+	+	15	2	250	1
4.56	7	-	-	-	-	15	2	200	0
19.3	8	+	+	-	-	30	5	200	0
16.6	9	0	0	0	+	22,5	4	225	1
14.9	10	0	0	0	-	22,5	4	225	0
11.2	11	-	+	+	-	15	5	250	0
7.44	12	0	0	0	-	22,5	4	225	0

A tervben a kétfaktoros (elsőrendű) kölcsönhatásokat vettük figyelembe. A mért intenzitásokat 1.000.000-val osztottam, az eredmény egyszerűbb feldolgozása miatt. A faktorok hatásának vizsgálatát variancia analízis (ANOVA) segítségével végeztük. A kiértékelés legfontosabb eleme a hatások (effects) táblázat (9. táblázat). A táblázatot a Statistica program felhasználásával készítettem el (Statistica 6 StatSoft, Inc., www.statsoft.com) és az adatok

hitelessége miatt az eredeti angol szöveggel illesztettem be. Első oszlopban az adott faktor hatása látható a kimenő változóra. A pozitív hatás azt jelenti, hogy az adott faktor felső szintjén nagyobb a C_{13} koncentrációja mint az alsón, míg a negatív hatás ennek az ellenkezőjét jelenti. A táblázatban csak a teljes átlagot és az első faktort (extrakciós idő, t_{ext}) emeltük ki piros színnel, ami azt jelzi, hogy a p érték kisebb, mint a konvenció szerinti 0,05. Tehát elutasítjuk azt a nullhipotézist, hogy az extrakciós időnek nincs hatása a tridekán mért intenzitására $\alpha=0,05$ szignifikanciaszintnél. A deszorpciós hőmérséklet p értéke 0,097, ami azt jelenti, hogy 10 %-os szignifikanciaszinten a deszorpciós hőmérsékletnek is jelentős szerepe van az adszorbeálódott vegyületek mennyiségére. Az alsó árom sorban a kölcsönhatások tlálhatók, melyeknek nincs szignifikáns hatásuk. A 9. táblázat „Curvatr” (görbület) sora sem szignifikáns, azaz a lineáris modell adekvát, nincs szükség másodfokú tervre. Ennek ellenőrzését a centrumpontok tették lehetővé.

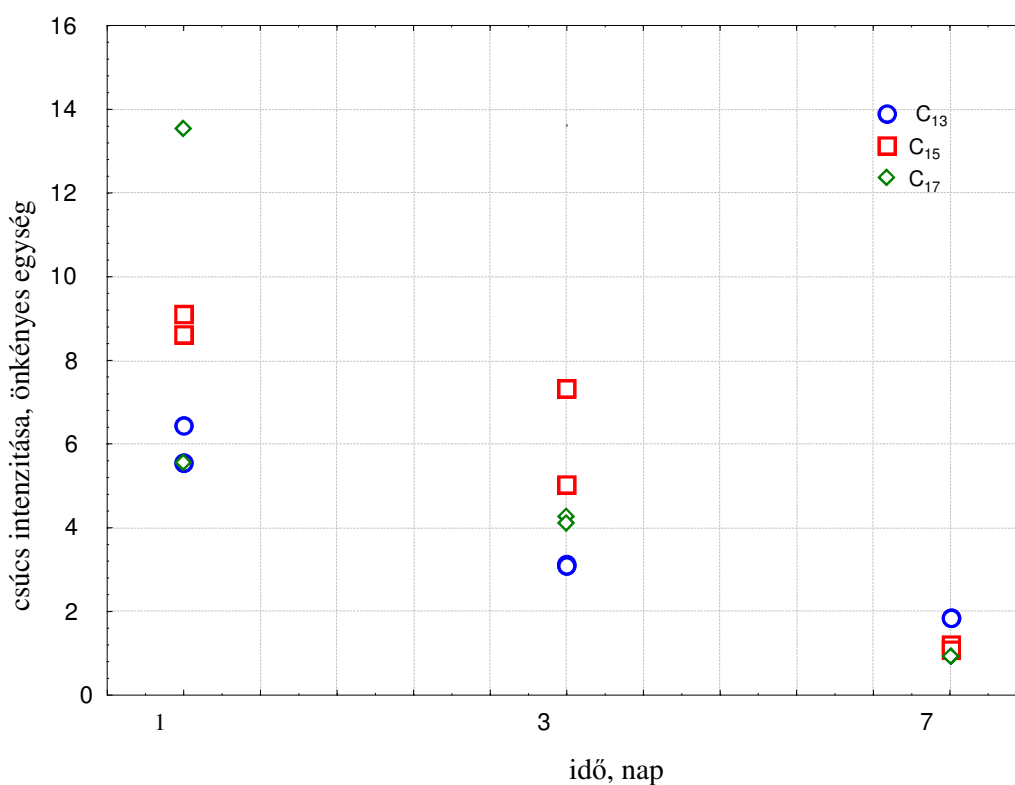
9. Táblázat: A faktorok hatásai.

Factor	Effect	Std.Err.	t(3)	p
Mean/Interc.	16.02625	1.914063	8.372898	0.003573
Curvatr.	-4.30750	6.630507	-0.649649	0.562227
(1) t_{ext}	12.89750	3.828125	3.369143	0.043438
(2) t_{desz}	-1.77750	3.828125	-0.464327	0.674034
(3) T_{desz}	9.14750	3.828125	2.389551	0.096781
(4)keverés	3.33333	3.125651	1.066444	0.364430
1 by 2	1.92750	3.828125	0.503510	0.649252
1 by 3	-1.19750	3.828125	-0.312816	0.774905
1 by 4	-2.42250	3.828125	-0.632816	0.571797

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy jelentős hatása van az extrakciós időnek és deszorpciós hőmérsékletnek, míg a deszorpciós időnek, a keverésnek és a faktorok kölcsönhatásának nincs. Az egyes faktorok hatásait ábrázolva kölcsönhatás nem tapasztalható.

Ezekből a kísérletekből azt a következtetést is levonhatjuk, hogy az SPME mintavétel szórása nagy, melyet a hatások 95%-os konfidenciaintervalluma is jelez. A kutatás természetét figyelembe véve fél-mennyiségi adatokat mérni, hiszen csak azt akarjuk eldönteni, hogy egy-egy vegyület megjelenik vagy nem, nő a koncentrációja vagy csökken a romlás előrehaladtával. Gyakorlati szempontból a legjobb amit tehetünk, hogy a legérzékenyebb paramétereket (amiket ebben a szakaszban vizsgáltam: extrakciós idő, keverés, deszorpciós idő és hőmérséklet) a lehető legpontosabban állítjuk be, és mindig pontosan ugyanúgy járunk el a mérések során, így feltételezve hogy a hibák is állandóak maradnak.

Viszont a fél-mennyiségi mérések esetében is célszerű, ha valamilyen állandó intenzitással párolgó illékony vegyület vagy illékony vegyületeket kibocsátó anyag van a légtérben, hogy ahhoz viszonyítsunk. Ez belső sztenderd alkalmazásával érhető el, azonban nehéz olyan vegyületet találni, amely alkalmas ebben a kísérleti elrendezésben. Valami, ami nem zavarja meg az amúgy is érzékeny biológiai rendszert, de állandó intenzitással párolog. Nem véletlen, hogy a belső sztenderd alkalmazásáról nem egyértelműek az irodalmi adatok, egyes cikkek szerint szükséges, mások szerint nem. Belső sztenderd szükségességét alátámasztja az a tény is, hogy az SPME szál öregszik, a gyártó instrukciói alapján 100 mintavételre alkalmas, azonban nem tudjuk mikor, és mennyire kezd el csökkenni a mintavételi hatékonysága. Alternatív megoldásként minden kísérleti mintatartó üveghez fecskendeztem 10 µl C₁₃, C₁₅, C₁₇ keveréket, azonban ezeknek a vegyületeknek a jelével nem korrigáltam a többi csúcsot, csak megfigyelésre alkalmazom őket. Ezeket ábrázolva a különböző kísérletsorozatokban az idő függvényében megállapíthatom, hogy van-e a szokásostól eltérő változás.



15. ábra: Az előkísérletek során mért normál alkán koncentrációkkal arányos csúcsterületek.

Az előkísérletek során megpróbáltunk olyan belső sztenderdet kiválasztani, ami az alapvető követelményeken kívül megfelelő illékonyságú ahhoz, hogy SPME-vel mintavételezhető legyen, de ne illanjon el korán a modellből. A 15. ábrán látható a befecskendezett alkánok koncentrációjának a csökkenése, abban az esetben ha csak ezek találhatók a befőttesüvegben.

Ez alapján a gyümölcsminták által kibocsátott vegyületeknél is feltételezhetjük, hogy a csökkenés nem feltétlenül jelenti a kibocsátás csökkenését. Mivel a légtér inhomogenitása lehet a koncentrációk csökkenésének egyik oka, úgy döntöttem keverést fogok alkalmazni a mintavétel előtt a gyümölcs minták esetén, annak ellenére, hogy ez a faktor nem volt szignifikáns az optimálás során.

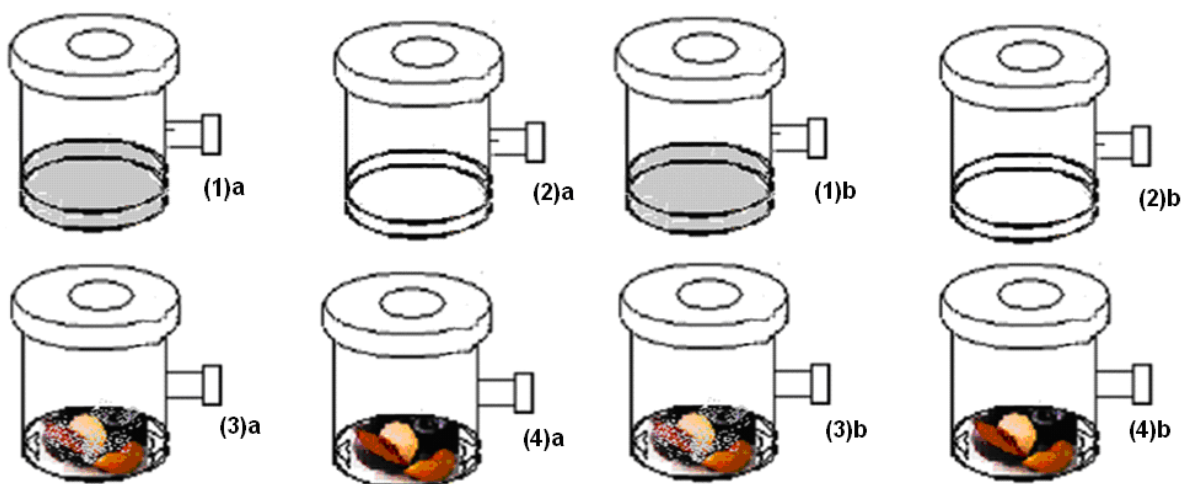
Ennek másik oka, hogy feltételeztük, hogy minimális légmozgás tapasztalható a CA tárolókban. Enélkül az előrejelző rendszer nem is működne. Jansen paradicsom növények *botrytises* fertőzéséhez szükséges VOC-k mennyiségét tanulmányozta kis légtérű üvegházak esetén [Jansen et al. 2010, Jansen 2009]. A modellrendszere alapján arra a következtetésre jutott, hogy minimális légmozgás szükséges a mintavevő rendszer sikeressége érdekében.

5.2. Anyag és módszer

A modellgyümölcs ebben a kísérletsorozatban a japán szilva (*Prunus Salicina*), 'Autumn Sweet' fajtája. A szilvákat feldaraboltuk és fagyasztott állapotban tároltuk a következő felhasználásig, így biztosítva hogy ugyanazt a fajtát vizsgáljuk. A darabolás azért szükséges, hogy megindulhasson a romlás, mivel a japán szilva rendkívül ellenálló a mikroorganizmusokkal szemben. A szilvákat agarral szilárdítjuk majd a megfelelő kísérleti beállítás szerint kezelik. Négy különböző kísérleti elrendezésben vettük fel a kromatogramokat (16. ábra), mindegyik 1-1 különböző mintát, különböző üveget jelent. Minden kísérleti elrendezést megismételtünk, így összesen 8 üveg, azaz 8 minta állt rendelkezésre, a párhuzamos oltásokat (a) ill. (b) betűvel jelöltük. Az agar összetételével és a *Penicillium* törzskultúrával kapcsolatos további információk a fejezethez kapcsolódó közleményben találhatók meg [Sagi-Kiss et al. 2011].

1: oltott agar: *P. expansum* törzsszel fertőzve, 2: kontroll agar

3: oltott szilva: *P. expansum* törzsszel fertőzve, 4: kontroll szilva



16. ábra.: 1a és 1b az oltott agar, 2a és 2b a kontroll agar, 3a és 3b az oltott szilva, 4a és 4b jelű minták a kontroll szilvát jelölik.

Két különböző kísérletsorozatot értékeltem ki ebben a kísérleti elrendezésben. A különbségeket a 10. táblázatban közlöm. Ezek kivételével az „Anyag és Módszer” fejezetben ismertetett paraméterekkel történtek a mérések. A második kísérletsorozatban a romlás lassabb volt, mivel az oltás csíraszámuk kisebb volt.

10. táblázat: A szilva illékony komponenseinek kísérleti a paraméterei. *: a pontosítás érdekében az 's' az secundum, másodperc.

	1. kísérlet	2. kísérlet
maximum hőmérséklet a fűtési program során [°C]	250	235
romlás nyomonkövetésének időtartama [nap]	4	7
rögzített kromatogram száma [db]	24	32
felvételi sebesség [s/db]*	0,5	0,21
oltásnál használt csíraszám [cfu/ml]	10^7	10^4

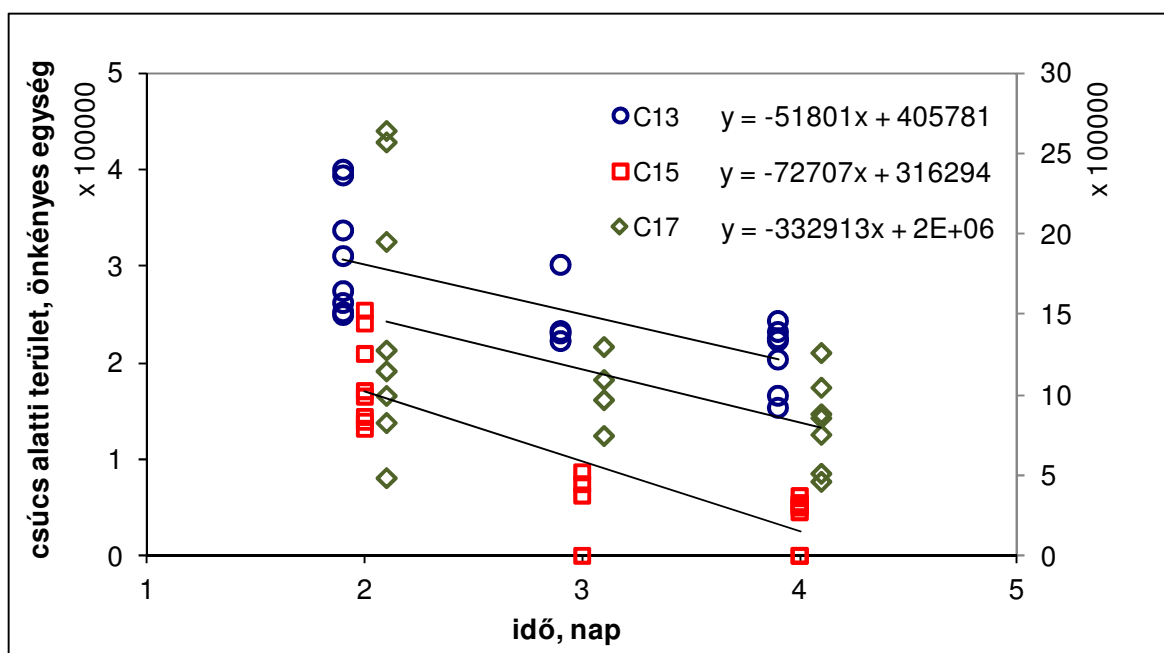
A két kísérletsorozat közt a legjelentősebb különbség a rögzített értékek számában van. A felvételi sebességet 0,5 s/db-ról 0,21 s/db-ra módosítottuk, így a második kísérletsorozatban 2,4-szer annyi pont van egy kromatográfiás csúcsban, mint az elsőben. A tömegspektrométer pásztázó üzemmódjában 0,21 s/db felvételi sebesség azt jelenti, hogy másodpercenként majdnem 5-ször detektálja a gép a teljes tömegspektrumot (vagyis +/-0,5 Da felbontással végigmegy a 40 és 350 m/z érték közti ionokon, ez 310 mérés). A két kísérletsorozatból egy adattáblát készítettem, a felvételi sebesség változtatása miatt a csúcs alatti területeket korrigáltam.

A mérések előtt és után minden nap elvégeztük az SPME szál „üres” lefűtését, azaz a mintavétel nélküli deszorpciót és kromatográfiás fűtési programot. Az SPME szál üres

kromatogramjai zajos háttérrel mutattak, ezek zömmel valószínűleg a szeptumból származó ftalátok és az oszlop úgynevezett vérzéséből (bleeding) származó sziloxán származékok voltak.

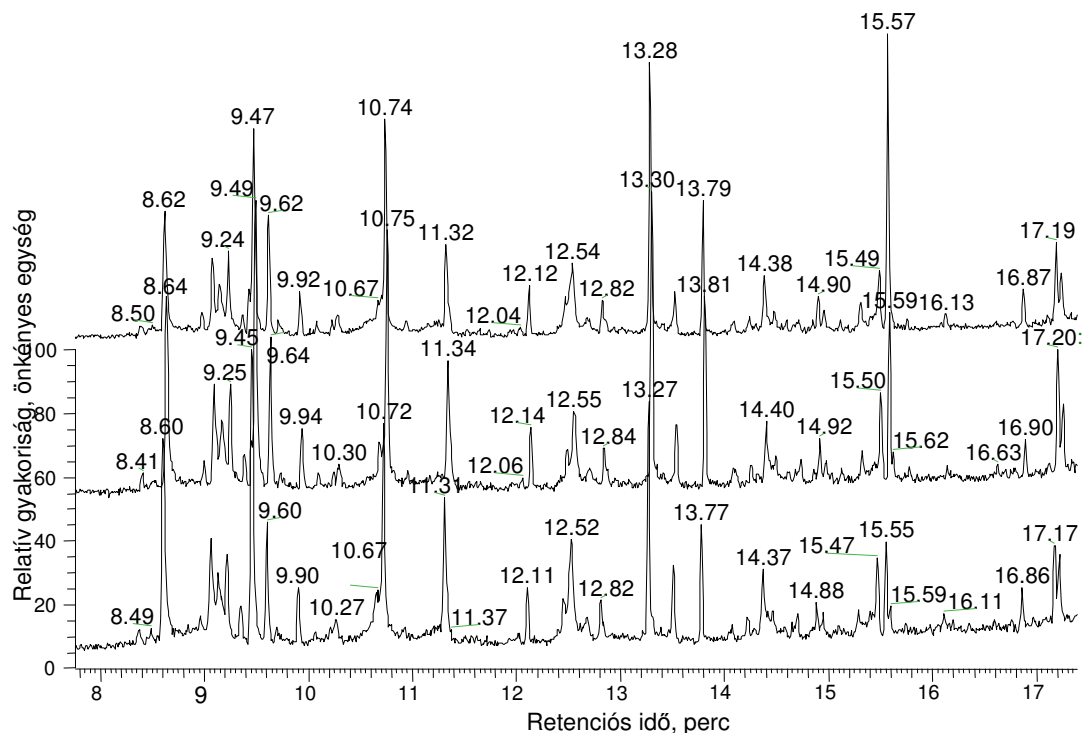
5.3. Az egészséges és romlott szilvák által kibocsátott illékony szerves vegyületek változásának elemzése

A gyümölcsök mellék minden kísérleti mintatartó üveghez fecskendeztem 10 µl C₁₃, C₁₅, C₁₇ keveréket. A 17. ábrán látható mindhárom alkán koncentrációja csökkent, az első nap nem szerepel az ábrán. Az ábrán a jobb oldali tengelyen a C₁₇ koncentrációja található, a bal oldalin a C₁₃ és C₁₅. Az ábrából képet kaphatunk a csökkenés mértékéről és az ismételések szórásáról, amely a 2. nap esetén 20%, 26% ill. 54 %, a 4. nap esetén: 17%, 12% ill. 34% a C₁₃, C₁₅, C₁₇ soorendjében. Az össze értékre számítva a relatív szórást pedig: . Habár a mért értékek nagy szórását tapasztaljuk, a tendenciát meg lehet állapítani. A nagy szórás oka az is lehet, hogy a csúcsösszepárosító algoritmus ezekkel a beállításokkal 1-1 esetben nem működik jól. Ezért ebben a két kísérletsorozatban a koncentrációval arányos görbe alatti területeket manuális integrálással ellenőriztem. A minőségi azonosítást pedig nem csak 1-1 változóra, de 1-1 változó esetében az összes mintára elvégeztem.



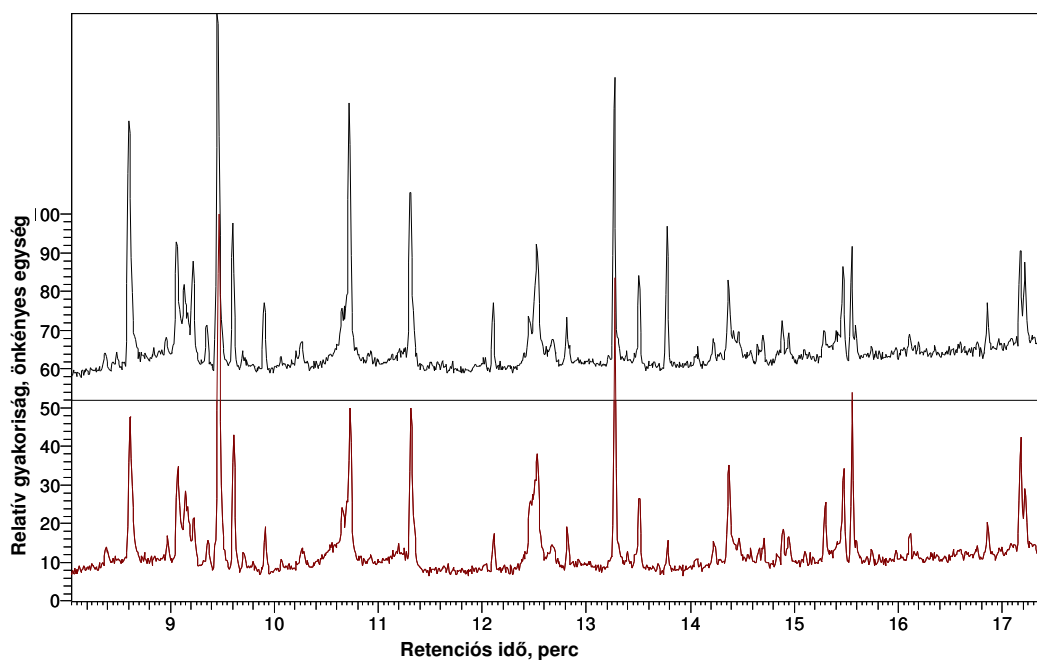
17. ábra: Az alkán komponensek csúcs alatti területe a szilva rendszerben.

Vizuális vizsgálat alapján, az aromakomponensek viszonylagosan állandóak maradtak a 4 nap alatt (18. ábra). A 30 perces kromatogramból a legjellemzőbb a 8 és 17 perc közti szakasz. A második kísérlet fűtési programja 19,25 percnél éri el maximumát, a 235 fokot, e felett nem értékeltem a kromatogramot.



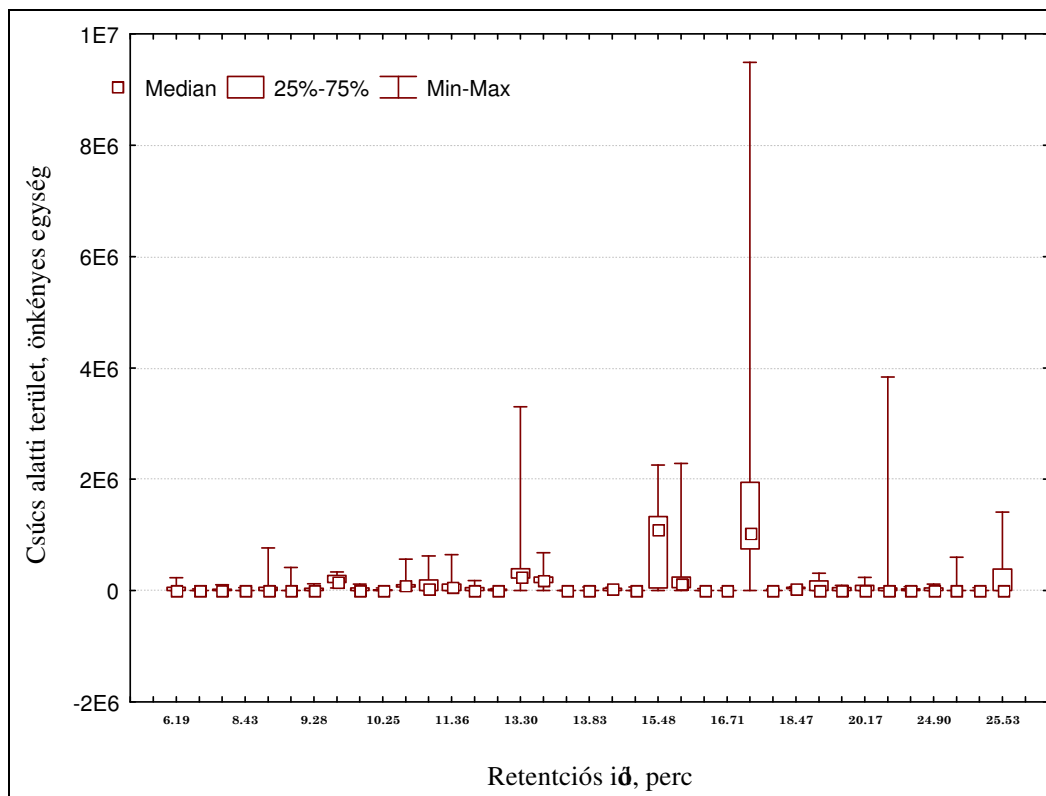
18. ábra: A kontroll szilvák teljes ion kromatogramjai felülről lefelé haladva: 2. nap, 3. nap, 4. nap (1. kísérlet).

A kontroll szilvákban párhuzamos mintáinak kromatogramjaiban nem növekedett vagy csökkent a VOC-k koncentrációja (19. ábra), ugyanez igaz az oltott szilvák párhuzamos méréseire. A két különböző üvegből származó minta vizuálisan átfed.



19. ábra: Két párhuzamos kontroll szilva teljes ion kromatogramja az első napon.

Alkoholokat, aldehideket, észtereket, terpéneket és terpénszármazékokat találtunk a *P. expansum* oltott szilva légterében. A méréshez választott oszlop (Rxi – 5ms) elsősorban szénhidrogének mérésére alkalmas, azonban az 5 % difenil poláros rész elég ezeknek az oxigéntartalmú VOC-knek a mérésére. A mérendő tömegtartomány esetén előnyös lenne a tömegspektrumokat olyan nagy molekulatömegű vegyületekig mérni, amelyeknél már biztos, hogy illékonyak legyenek szobahőmérsékleten. Azonban ioncsapdás készülékeknel nem érdemes nagyobb m/z tartományt mérni a szükségesnél, mert a felvételi sebesség függ ettől. A mért adatokból kiderült, hogy a 0,5 s/db nem szolgáltat elegendő mennyiségű pontot egy csúcs megrajzolásához, hogy abból a többváltozós statisztikai módszerekhez használható adattáblát készítsünk az automatikus csúcsösszepárosító algoritmussal, viszont a 0,21 s/db igen. A beállított 40-350 m/z elegendően nagy tartománynak bizonyult, ennél nagyobb vegyületek már kis valószínűséggel illékonyak szobahőmérsékleten.

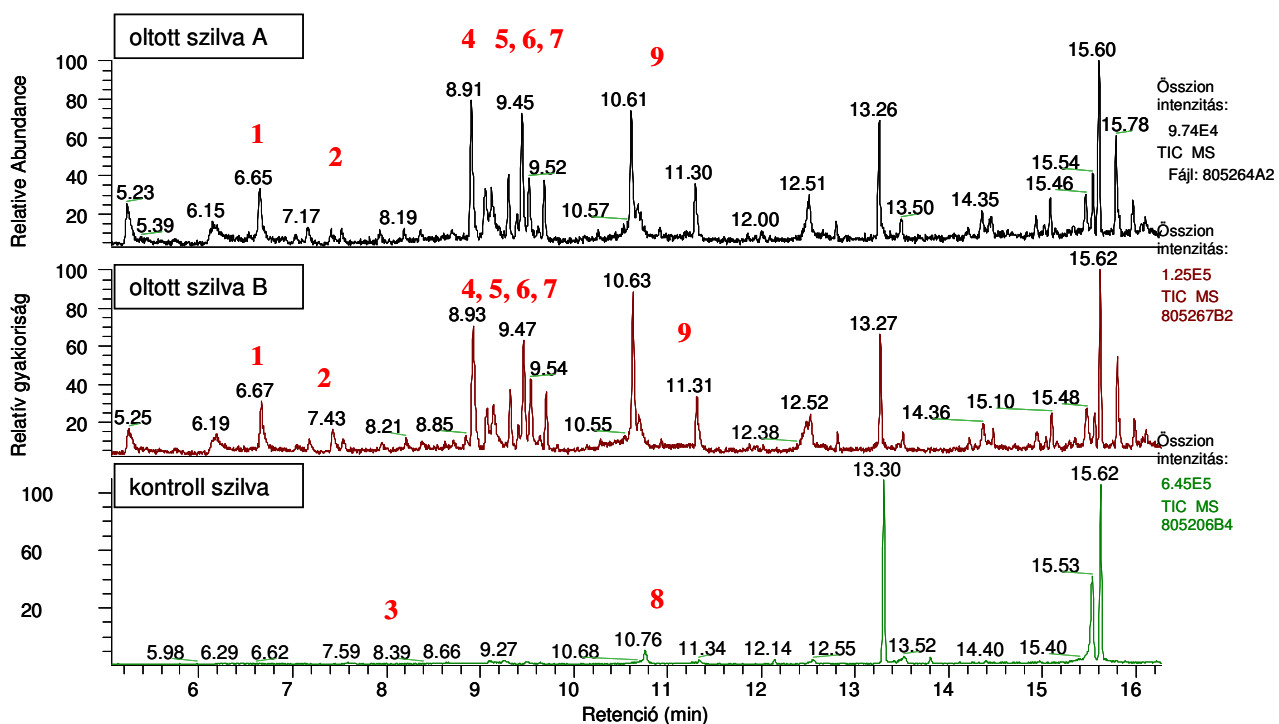


20. ábra: A változók eloszlása a második szilvás kísérletsorozatban.

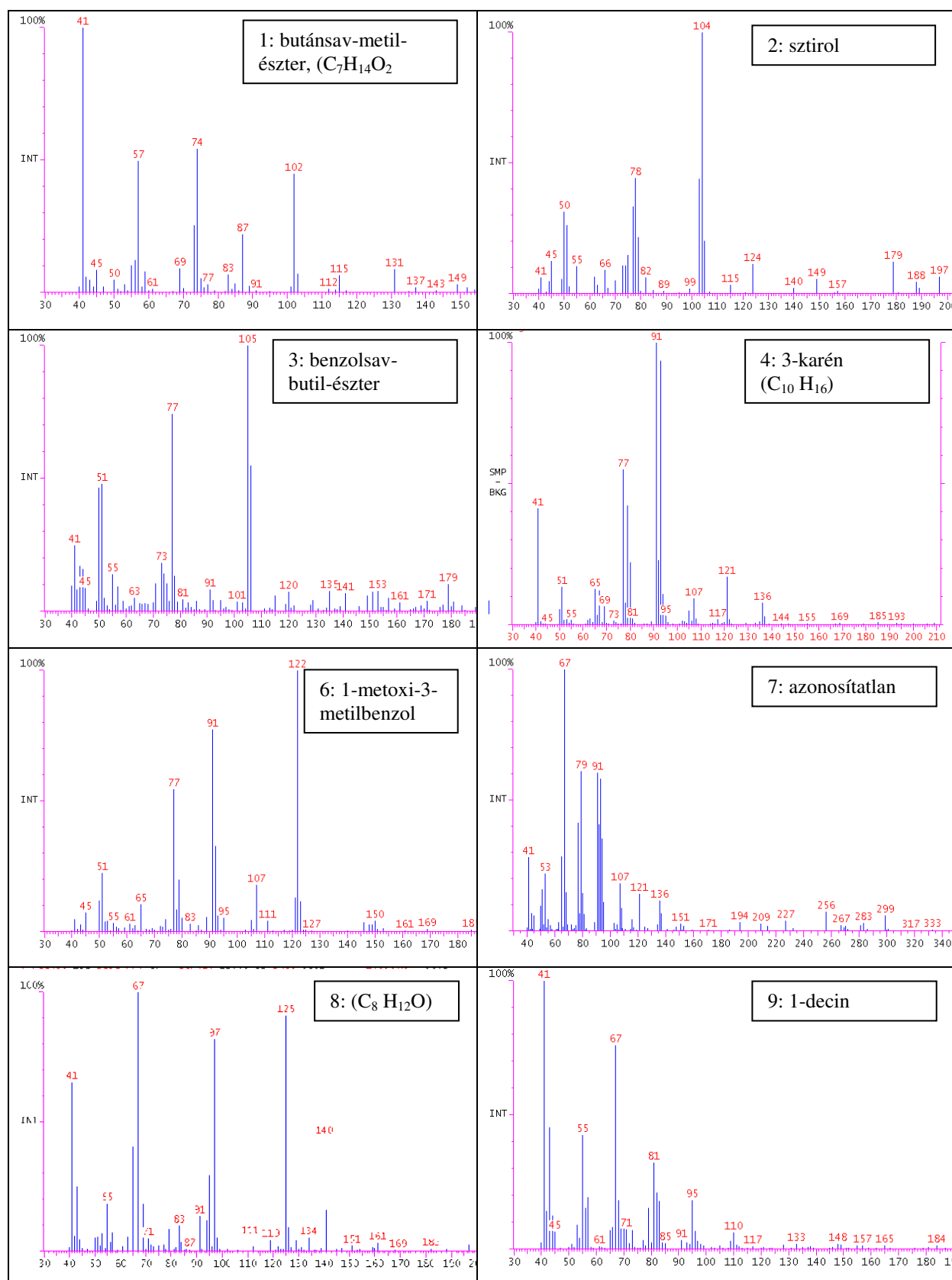
A második kísérlet esetében használható volt az algoritmus, a 20. ábrán látható hogy igen nagy a különbség a mért VOC-k koncentrációi közt, a változókat sztenderdizálni kell. Az eloszlásuk nem normális, hiszen a skála az egyik oldalon rögzített, a koncentráció nem lehet kisebb 0-nál, de sokszor 0. Az statisztikai analízishez 27 mintát használtam. A különböző romlottsági fokokat szabad szemmel állapítottuk meg. Ez alapján, a szilvákon és az agaron egyforma

gyorsasággal növekedtek a mikrobák, szennyezésnek nyoma nem volt. A kontroll gyümölcsök és kontroll agar mindvégig változatlan maradt. A romlás már a második napon megindult, ez köszönhető az oltáskor használt nagyon magas mikroba számnak.

A második kísérletsorozat esetében kiválasztottam egy kontroll szilva kromatogramját az első napról, és egy fertőzött szilvát a 7. napról. A manuális vizsgálat alapján a 21. ábrán feltüntetett 10 vegyület fontos ennek a két kromatogramnak a megkülönböztetésében. Az ábrán már csak azokat tüntettem fel, amelyek nem valamely állandó vegyület (oszlopvérvzés, sztenderd) csúcsai. Illetve, amelyek a párhuzamos oltások esetében ugyanolyan voltak, bár ez a feltétel minden egyes vegyület esetében igaznak bizonyult. A két párhuzamos oltásból származó romlott almák VOC-inak kromatogramjaiból megállapíthatjuk, hogy a két romlási folyamat hasonló sebességgel ment végbe a két különböző mintatartó üvegben. A kromatogram 11 perc utáni szakaszában a különbségek főleg csak terpénekből és terpénszármazékokból származnak, amelyeket itt nem tárgyalok. A 21. ábra jól tükrözi a detektálható különbségeket és a párhuzamos oltások egyezőségét.

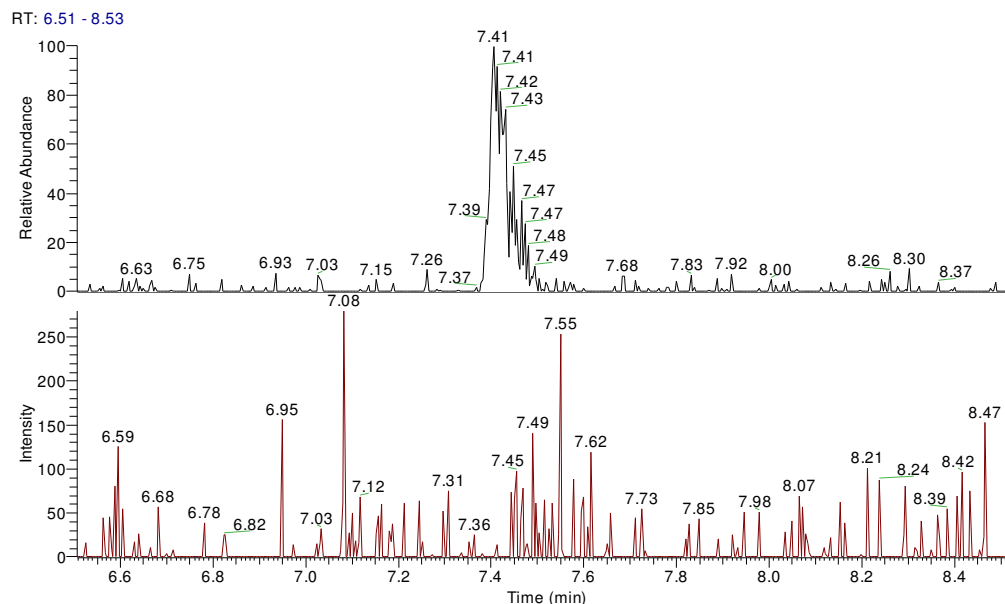


21. ábra: Két romlott és egy egészséges szilva kromatogramja.



22. ábra: Az ép és romlott szilvák megkülönböztetésében fontos vegyületek tömegspektrumai. A függőleges tengelyen a relatív gyakoriság, a vízszintes tengelyen az m/z értékek találhatóak. Az egyes komponensek számozása megfelel a 21. ábra számozásának.

A második kísérletben talált vegyületeket ellenőriztem az első kísérlet kromatogramjaiban is. Az 1,4 diklór-benzol koncentráció az idő előrehaladtával egyenletesen nőtt mind az oltott szilva mind az oltott agar mintájában. Azonban ugyanígy nőtt a kontroll szilva és agar mintákban is. A 22. ábra 6. csúcsa, a 1-metoxi-metibenzol viszont csak a *P. expansum*-el oltott szilva mintákban jelent meg. Ezt a vegyületet a kontroll szilvákban egyáltalán nem detektáltuk. Másik olyan vegyület, amely csak az oltott mintákban jelent meg, a 21. ábra 2. csúcsa, a sztirol. Nagyon kis koncentrációban van jelen, így a csúcs alatti területek integrálja bizonytalan, azonban a jelenléte egyértelmű a legjellemzőbb csúcsa, a 104-es alapján (23. ábra). A metil-linoleátot csak az oltott szilvákban detektáltuk az oltott agaron és a kontroll mintákon nem. Ennek a vegyületnek nagyobb volt a jelintenzitása, mint az előző kettőnek, azonban az azonosítása a legkevésbé egyértelmű. Végül találtunk még egy azonosíthatatlan aromás vegyületet, aminek a koncentrációja a szilva mintákon nő az agaron csökken.



23. ábra: A sztirol legjellemzőbb tömege a 104, egy egészséges és egy romlott szilva mintában.

A 4. napon különböző diterpének ($C_{10}H_{16}$) jelentek meg nagy koncentrációban az oltott szilván. Ezek valószínűleg p-cimén és az α -terpinolén. Ezeken kívül a következő komponenseket azonosítottam még a mintában: etil-acetát, limonén, fenil-etil-alkohol, hexanal, hexénal, izopropanol, hexanol, sztirol, cisz-6-nonénol, benzil-aldehid, 1-metoxi-3-metilbenzol, citronellol, nezil-alkohol, t-butyl-tiofén, benzofenon, egy azonosíthatatlan $C_{10}H_{16}$ vegyület, 5 azonosíthatatlan $C_{15}H_{24}$ vegyület, undekén-1-ol, undekanal, 2-tridekanal.

5.4. Többváltozós összehasonlítás

Azokat a csúcsokat használtam az elemzéshez, amelyek legalább két típusú (oltott/kontroll, szilva/agar) mintában megjelentek. Volt olyan csúcs is, amely csak 1-1 napon jelent meg az adattábla szerint. Ezeket egyenként manuálisan ellenőriztem és minden esetben valamilyen hibát fedeztem fel, ez lehet szennyezés, de legtöbb esetben a csúcsösszefűző algoritmus rossz eredményre jutott, egy kromatográfiás csúcsból két „vegyületet” képzett, ez főleg a kimutatási határ közelében lévő, vagy koelúciós csúcsokra volt jellemző. Végül összesen 37 csúcsot válogattam ki a kiértékeléshez. Ebből legkevesebb a kontroll szilvában volt, 26 darab, amely nem meglepő, hiszen fagyott szilvákról volt szó. A legtöbb, 35 vegyület, az oltott szilvában volt megtalálható. Kontroll szilvák esetében a csúcs alatti területek nem változtak a 4 napos vizsgálat alatt.

A két sorozatból manuális úton készítettem egy redukált adattáblát a vizualizáció érdekében. A vegyületek közül 12 olyat válogattam ki, amelyeknek szerepük lehet a csoportosításban. Ezek között szerepel olyan, amely megjelenik és olyan is, amelyik eltűnik az idő előrehaladtával.

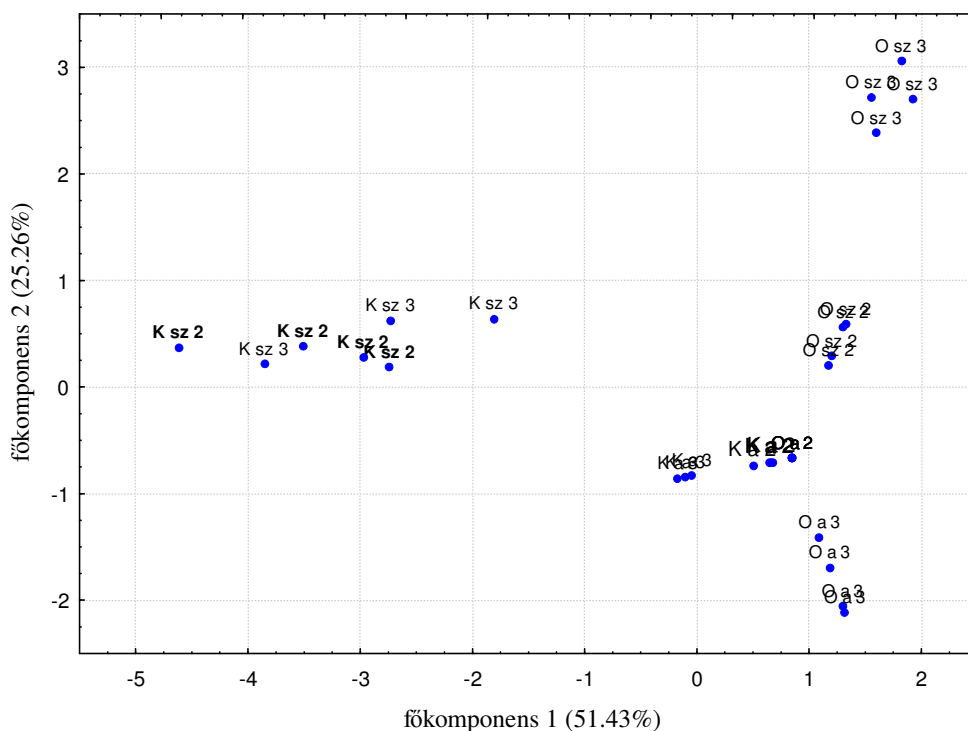
A különböző napokon különböző romlási állapotba kerültek a minták, így a csoportokat a vizuális megfigyelés alapján készítettem. A csoportokat a 11. táblázat: A romlás vizuális jelei alapján történő csoportok létrehozása. 11. táblázat tartalmazza.

11. táblázat: A romlás vizuális jelei alapján történő csoportok létrehozása.

oltástól eltelt napok száma	1. sorozat megfigyelés	Csoport	2. sorozat megfigyelés	Csoport
1.		nincs mérés	Semmi	'O sz 1'
2.	Fehér por	'O sz 2'		nincs mérés
3.	Zöldes, fehér por	'O sz 3'	Fehér por	'O sz 2'
4.	Zöld réteg	'O sz 4'		nincs mérés
5.			Zöldes, fehér pöttyök	'O sz 3'
6.				nincs mérés
7.			Zöld réteg teljesen elfedi a mintákat	'O sz 5'

A kontroll agar és szilva minták egyes kromatogramjait hozzárendeltem a megfelelő napi romlott mintákhoz így lett: 'K sz 1', 'K sz 2', 'K sz 3', 'K sz 4', 'K sz 5', és 'K a 1', 'K a 2', 'K a 3', 'K a 4', 'K a 5'. A kettes és hármas szinten romlott szilvák mintáival ('O sz 2' és 'O sz 3'-as csoport) elvégeztük a főkomponens-elemzést. A 24. ábrán láthatjuk a mintákat az első két legnagyobb főkomponens síkjára vetítve. Az 24. ábrán a jelek a 11. táblázat rövidítései. Ez alapján látható, hogy mind az oltott és kontroll szilva mind az oltott és kontroll agar elkülönül egymástól. A 2-es és 3-as állapotok jól megkülönböztethetők az oltott minták esetében,

azonban egybeesnek a kontroll minták esetében. Ami megfelel az elvárásainknak, hiszen a kontroll mintáknál az előnyös ha nincs változás az idő függvényében.



24. ábra: A kettes és hármas szinten romlott szilva és agar minták az első és a második főkomponens síkjára vetítve.

A főkomponensek egymástól statisztikai értelemben függetlenek, az ábráról leolvasható, hogy az első két főkomponensnek megfelelő két tengely a mérési eredmények összvarianciájának hány százalékát írja. A kontroll szilvákra vonatkozó pontok a két főkomponens síkjára vetítve a különböző időpontokban is egybe esnek, ez erősíti a kiindulási feltételezést, hogy a kontroll szilvák aromakomponensei állandóak maradnak a mérés során.

5.5. Következtetés

A mérőrendszer alkalmas a szilvák VOC-inek mérésre. Ebben a kísérleti elrendezésben az SPME hatékonyságára az extrakciós idő és deszorpciós hőmérséklet van szignifikáns hatással 10 %-os szignifikanciaszinten. Ezek optimális értékei: 30 perc és 250 °C. A keverésnek ugyan nincs szignifikáns hatása az SPME hatékonyságára azonban a légtér inhomogenitásának csökkentése érdekében alkalmaztam keverést.

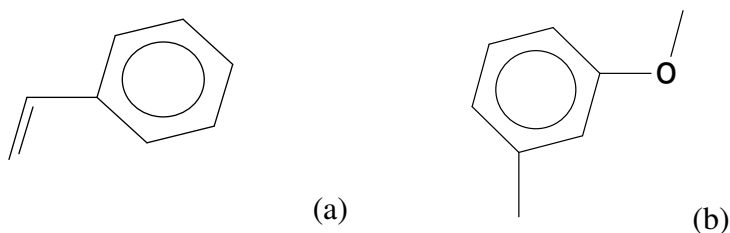
Az eredmények azt mutatják, hogy a szilvák illékony vegyületeinek romlási vizsgálatával találhatunk olyan csúcsokat, amelyek konzisztensen jelentkeznek a romlott szilva mintákban.

Egyes vegyületek megjelennek vagy eltűnnek az idő előrehaladtával. A romlott szilva minták esetében megjelenő vegyületek: butánsav-metil-észter, sztirol, 3-karén ($C_{10}H_{16}$), metoxi-3-metilbenzol, 1-decin és 1 azonosítatlan vegyület.

Sok terpénszármazékot találtunk mind a fertőzött mind az egészséges mintákban. A fertőzött szilvák légterében magasabb koncentrációban találhatók ezek a terpének mint a nem fertőzött minták légterében. A romlás megindulása után közvetlen tapasztaltam a terpénszármazékok növekedését. Ahogy az irodalomban említettem a növények terpén termelését sok tényező befolyásolja, ezért a terpének koncentrációjának növekedése általában még nem elég ahhoz hogy a romlásra következtessünk. Azonban későbbi kutatásokban érdemes figyelmet szentelni ennek a vegyületcsoportnak. A keletkező terpének irodalmi összegyűjtése is nehéz, mivel a legtöbb publikációban csak összefoglalóan terpéneknek, vagy mono-, di- és szeszkviterpéneként közlik őket. Ebben az analitikai rendszerben azonosításuk lehetetlen, csak általánosságban lehet a terpénekről következtetést levonni.

A sztirol és az 1-metoxi-metilbenzol alapján, még a mennyiségi információk nélkül, annak alapján, hogy ezek a vegyületek megtalálhatók-e egy rendszerben vagy nem, meg lehet különböztetni, hogy kontroll vagy oltott szilvához tartoznak-e az egyes légtérből vett minták. Ez igaz, két különböző sebességgel romló szilva kísérletsorozat eredményei esetén is, hiába használtunk kissé más mérési körülményeket a párhuzamos oltások során. A két kísérletsorozat eredményei összevethetők voltak.

Az említett alkotók más *Penicilliumos* kutatásokban is előfordultak [Larsen et al. 1995, Schwalbe et al. 1999], így a továbbiaknak is foglalkozunk velük.



25. ábra: A sztirol (a) és az 1-metoxi-metilbenzol (b) molekulája.

6. FEJEZET. *P. EXPANSUMMAL* FERTŐZÖTT ALMÁK ÁLTAL KIBOCSÁTOTT ILLÉKONY VEGYÜLETEK VÁLTOZÁSA

Ebben a fejezetben a szilva minták mérésénél szerzett tapasztalatokkal
tesztelem a rendszert alma mintákon.
Bizonyítás nyer, hogy az illékony szerves alkotók alkalmasak a romlás
előrehaladottságának becslésére.

Publikálva:

Virág Sági-Kiss, Sim Fong, Andrea Pomázi, Péter Fodor, Károly Héberger, Richard G Brereton, 2009
Pattern recognition and GCMS peak detection as an aid to predicting spoilage in fruit from production of volatile
organic compounds (VOC). Conferentia Chemometrica 2009, Siófok,

Sim S. Fong, Virág Sági-Kiss and Richard G. Brereton, 2010, Self-Organizing Maps and Support Vector
Regression as aids to coupled chromatography: Illustrated by predicting spoilage in apples using volatile organic
compounds, Talanta, 83, 1269-78 (2011)

6.1. Anyag és módszer

12. táblázat: Az almák mérésére használt kísérletek rövid összefoglalása.

kísérletsorozat száma	alma fajta	mért kromatogramok száma	mintavételi napok	minták száma
1	'Granny Smith'	33	1., 2., 3., 4., 5., 6.	2 kontroll 2 fertőzött
2	'Golden Delicious'	37	1., 2., 4., 5., 6., 7.	2 kontroll 1 fertőzött
3	'Granny Smith'	60	1., 2., 3., 4., 5., 7., 8.	2 kontroll 2 fertőzött

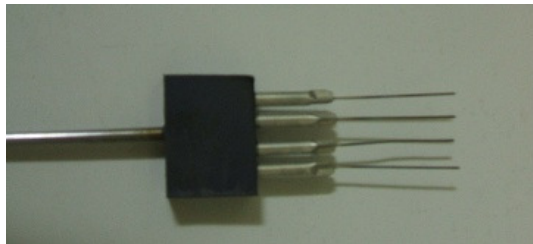
A zöld almákat ('Granny Smith' és 'Golden Delicious') a piacról szereztük be. A fagyasztva tárolt szilváknak nagyon kevés illatkomponense volt, így ehhez a kísérlethez ép, egész alma mintákat választottunk. Az előző kísérletektől eltérően az almák nem fértek bele a 800 ml-es üvegekbe, így a megfelelő mintavételi körülményekhez 1700 ml-es üvegeket alakítottunk át (26. ábra). A minták kevertetése érdekében az üveg közepén, egy fém tartóba helyeztük el az almákat, alá pedig mágneses keverőt tettünk. Ezt minden mintavétel előtt 1 percig használtuk, minimális légáram biztosítására a légtérben.



26. ábra: Az illékony vegyületek méréséhez alkalmazott modellkísérleti elrendezés.

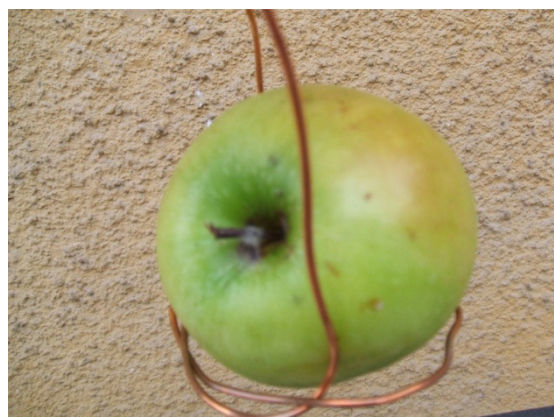
Felhasznált mikroorganizmus a *P. expansum*, az oltás részletei és a sterilizációs eljárás fejlesztésének lépései Romaszky Cecília diploma dolgozatában olvashatók [Romanszky 2009]. A *P. expansum* törzsoldatban a második szilvás kísérletsorozatnak megfelelően a sejtek száma 3×10^6 , ez biztosított ugyanis megfelelő sebességű romlást. A cél az volt, hogy hozzávetőlegesen 1 hét alatt szaporodjanak el teljesen a mikrobák, így a napi mintavétellel követhetjük a romlást. A párhuzamos mérésekhez két *P. expansum*-el fertőzött és két oltatlan, kontroll almát használtunk. Az oltást a fényképen (27. ábra) látható négyágú „villa” segítségével végeztük. Ez az eszköz az ismételhetőség és összehasonlíthatóság miatt hasznos. A

szuszpenzióba mártott villa az alma felszínétől körülbelül 0.5 cm mélységig hatolt be. Minden almán 12 szúrás található, összesen 48 sebet ejtve az alma felső részén.



27. ábra: Speciális oltókacs.

Mivel ép almákat vizsgáltunk ebben a kísérletben, ezeket sterilizálni kell, hogy a kontroll alma végig egészséges maradjon, a fertőzött almán pedig csak a *P. expansum* szaporodjon. A sterilizálási eljárás általában hőkezelést jelent, amely roncsolja az almát is. Úgy kell megválasztani az eljárást, hogy a mikrobák még elpusztuljanak, de az alkalmazott eljárás ne befolyásolja túlságosan a kibocsátott VOC-ket. Minél kíméletesebb a sterilizálási eljárás, minél jobban elkerüljük a szövetek károsodását, annál jobban közelítjük a tárolás során tapasztalható természetes körülményeket. Forró vizes majd steril desztillált vizes lemosás után a sterilizálást nedves gőzben végeztük (hőmérséklete: 60 °C, időtartama: 20 perc). Ahogy a 28. ábra szemlélteti, 1 hét után a kontroll almán semmilyen elváltozást nem tapasztaltunk, sőt még 1 hónappal a mérések után is teljesen zöld, sima felszínű és kemény maradt az alma. Azaz a sterilizálási eljárás, nem roncsolta túlságosan az almát. Ez alapján a kontroll almákról feltételezzük, hogy végig egészségesek maradtak, ez a VOC háttér miatt fontos információ.



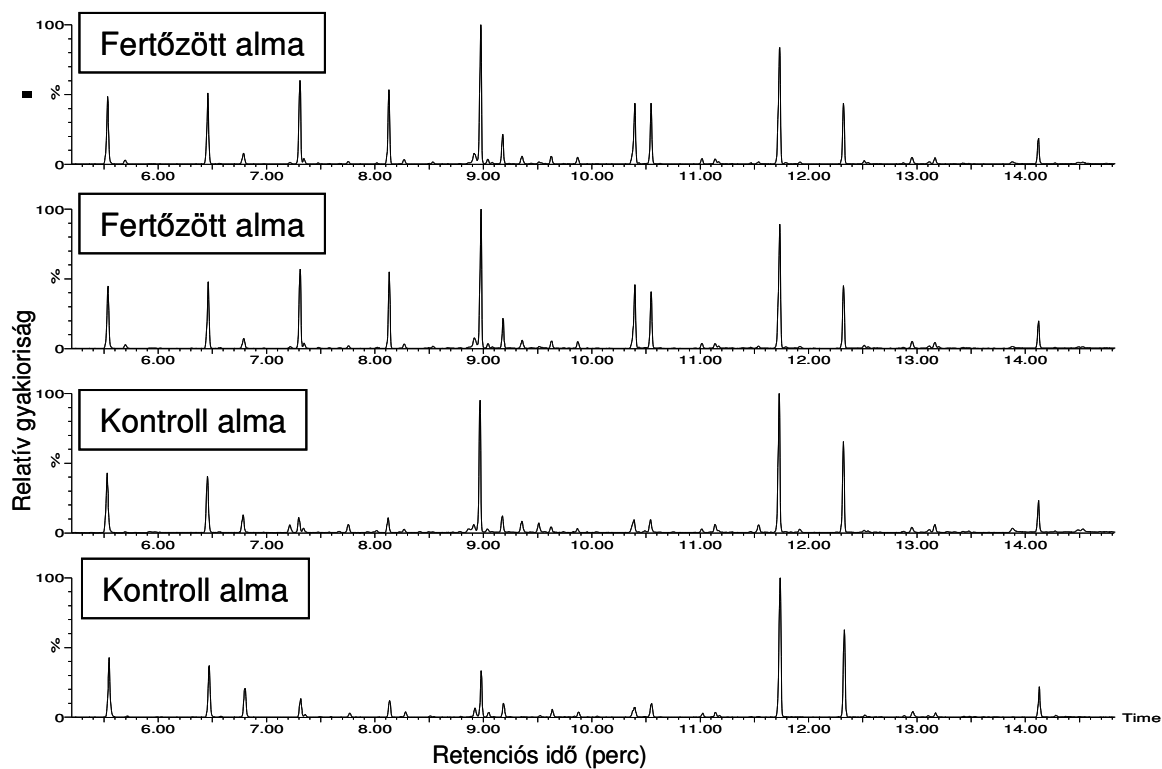
28. ábra: Romlott és ép alma fényképe 1 hét után.

Szobahőmérsékleten 23 ± 2 °C-on, normál megvilágításban tároltuk a mintákat. A mintavételi paraméterek az ötödik fejezetben leírtak szerint történtek, egyedül a deszorpciós idővel történt változás. A deszorpció kevesebb, mint 1 perc alatt lejátszódik, mivel a szobahőmérsékleten illékony komponensek feltételezhetően pillanatszerűen elpárolognak a 250 °C-os injektorban.

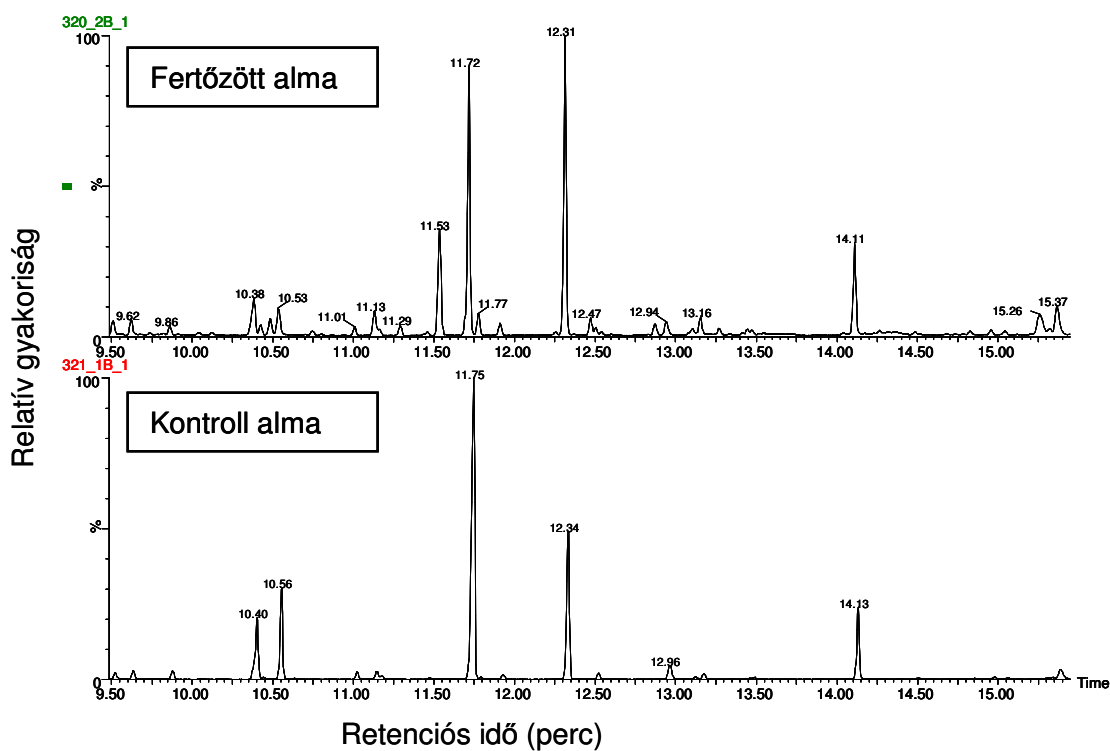
A szálát azonban 20 percig hagytam az injektorban, hogy az egyéb szennyező komponensek is letisztuljanak róla, elkerülve ezzel a minták közti keresztaszennyeződést. A gyártó szerint nincs szükség lefűtésre, de azt tapasztaltam, hogy e nélkül a tisztítási lépés nélkül néhány komponens kis koncentrációban megjelenik a következő kromatogramon is. Az SPME szálra történő adszorpció hőmérsékletfüggő folyamat, ezért miután kivettem a készülékből a szálát, hagytam, hogy szobahőmérsékletűre hűljön vissza, így biztosítva, hogy mindig ugyanazon a hőmérsékleten történjen a mintavétel. A többi mérési paraméter az „Anyag és Módszer” fejezetben megadottak szerint történt.

6.2. A kibocsátott illékony vegyületek áttekintése

Ezek a minták már igen vegyület-gazdagnak bizonyultak, átlagosan körülbelül 100 csúcs/kromatogram sűrűséggel. Először azt határoztam meg, mennyire egyeznek a párhuzamos oltásokból származó minták VOC-inek kromatogramjai. Ehhez 1-1 fertőzött és 1-1 kontroll alma kromatogramját ábrázoltam együtt a 29. ábrán. A párhuzamos oltásokból származó minták VOC-inek kromatogramjai szemrevételezés alapján átfednek, tehát a párhuzamos üvegekben oltott gyümölcsök egyformán romlottak. A romlott és az egészséges minták kibocsátott szerves illékony vegyületei között sok különbséget fedezünk fel. A két különböző mintához tartozó VOC-k kromatogramjaiban ránézésre megjelenő vagy esetleg eltűnő csúcsok biztos információforrások számunkra. Azonban a nyomkövetéshez azt keressünk, hogyan változnak ezen vegyületek koncentrációi, melyek azok, amik már korán megjelennek vagy nagy koncentrációban termelődnek, tehát nem elég csak egy romlott és egy kontroll almát vizsgálni. A másik probléma a manuális kiértékeléssel az, hogy a 30. ábrán, a kromatogram egy nagyított részletén, jól láthatóan a legtöbb különbség a kicsi csúcsokban fedezhető fel. Míg a 29. ábrán 5-6 új csúcs tűnik fel a fertőzött almán szemrevételezés alapján, addig 30. ábrán dupla ennyi.



29. ábra: Egészséges és romlott alma teljes ion kromatogramja. 2-2 párhuzamos oltás (külön üvegben oltott és mintázott).

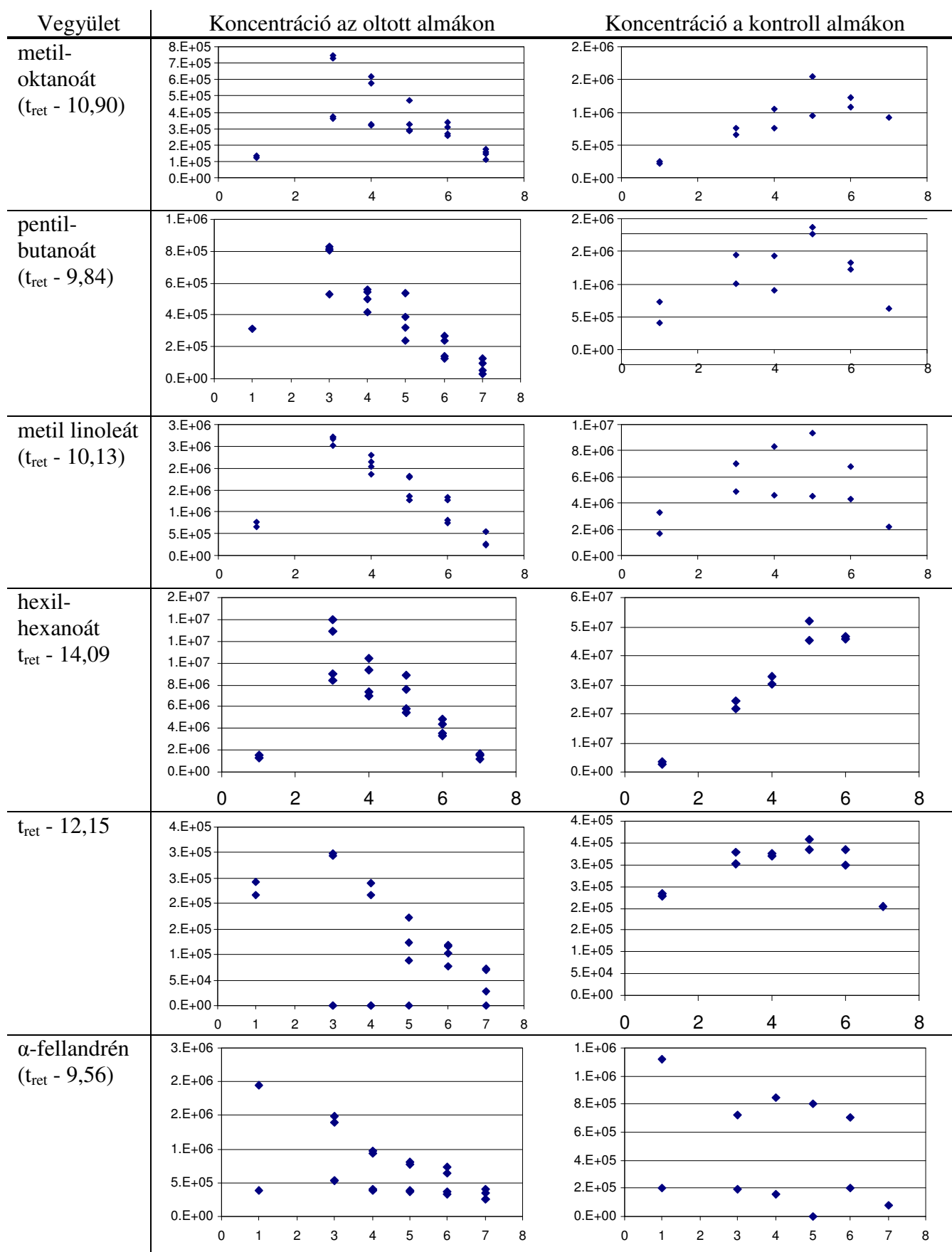


30. ábra: Egészséges és romlott alma teljes ion kromatogramjának egy részlete. fent: oltott, lent: kontroll.

Mindhárom almás kísérletsorozat adatait felhasználva kiválogattunk azokat a csúcsokat amelyek az alma mintákban több mint 75%-ban jelen voltak. Ezeket közül néhányat a mintavétel idejének függvényében ábrázoltam a 31. ábrán. Mindegyik vegyület koncentrációja jelentősen megnő a 3. npra az oltott almák esetén, majd csökken a kísérlet végéig. Ilyen az metil-oktanoát, a pentil-butanoát, a hexil-hexanoát, a metil-linoleát, az α -felandrén és 1 azonosítatlan észter vegyület. Ugyanezek a vegyületeknek a koncentrációja kontroll alma minták esetében folyamatosan, vagy maximumos görbe szerint növekedik, jellemzően az ötödik napig. Az első nap az oltás napja, ekkor a kontroll és az oltott gyümölcs VOC-inek kromatogramjai megegyeznek a legtöbb esetben. Az almák bőrének megsebesítése azonban azonnali választ indukál, pár óra múlva már nem egyformák az oltott és nem oltott alma minták légteréből mért kromatogramok.

A 31. ábrán bemutatott vegyületek zöme észter, és a többi mért észter is az ábrán bemutatottak szerint változik a romlási idő előrehaladtával. A diagrammok alapján egyértelmű, hogy ezek közül a vegyületek közül ki tudunk választani olyanokat, amelyek a romlási idő előrejelzésére alkalmasak lesznek. Azonban a csökkenést nem tartom alkalmasnak a romlás jelzésére ipari tárolókban, hiszen az alma maga is folyamatosan bocsátja ki ugyanazokat a vegyületeket. Nem lehet robosztus jelzőrendszert készíteni belőle kivéve ha az almák nagy számú romlását szeretnénk jelezni.

Ezen kívül almák esetében is sokfajta terpént mértünk, de ezeknek még az ábrázolása is nehéz, mivel a csúcs-összepárosító algoritmus is összekeveri őket ha közel van a retenciós idejük. Tapasztalataink alapján egy-egy minta azonos kromatográfiás csúcsára különböző terpént sikerül azonosítani (NIST könyvtárral való összehasonlítással) a különböző kromatográfiás futások során. A terpének, amelyek megjelennek a romlás során, nagyon kicsit különböznek azoktól, amelyek már amúgyis is az egészséges növényben találhatók. Így a terpének elemzésétől innentől kezdve eltekintek.

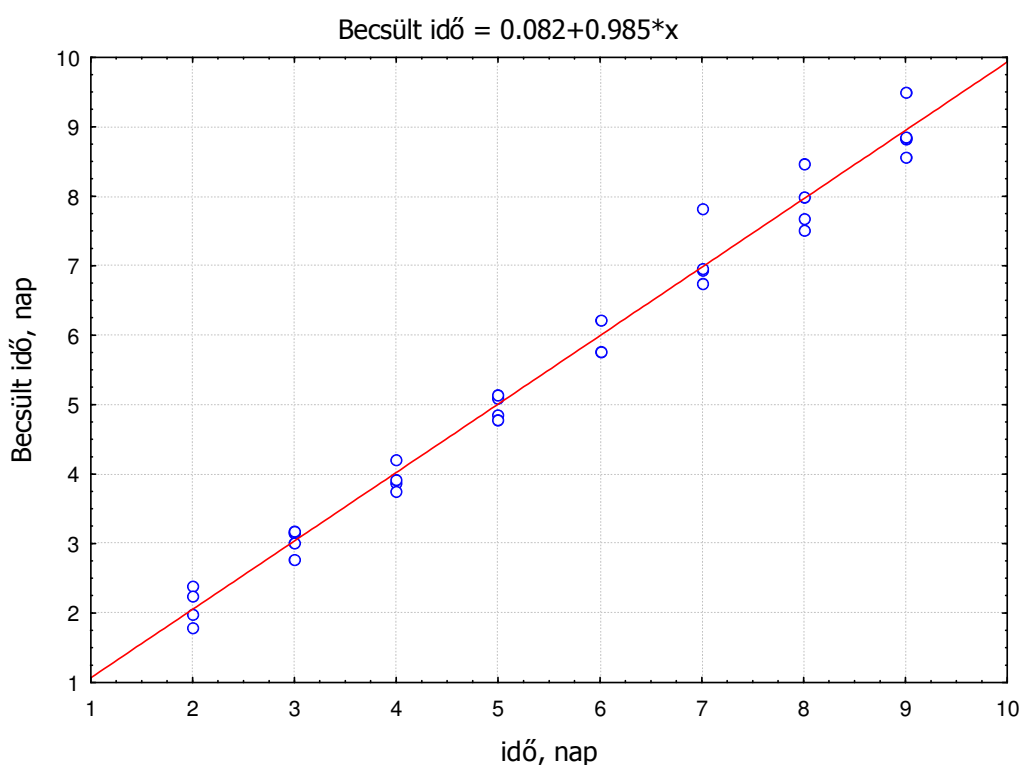


31. ábra: Néhány vegyület koncentrációjának változása. Abszcissza: a napok száma, ordináta: koncentráció.

6.3. A romlás becslésének lehetőségei szerves illékony vegyületek alapján PLS módszerrel

Ebben az esetben az oltástól eltelt idő előrejelzése a cél. A 31. ábra alapján feltételezem, hogy néhány vegyület koncentrációjából meg tudom becsülni a minta romlottsági fokát, azaz a fertőzéstől eltelt időt. Ezt a romlás vizuális jeleivel összevetve megállapíthatom, hogy van-e esély egy előrejelző rendszer kialakítására.

A PLS regresszió esetében a már előre kiválasztott 20 fontos vegyület koncentrációját használtam a becslésre. Az így kapott összefüggés mind a 20 komponens felhasználásával jól becsli az oltástól eltelt időt (32. ábra).



32. ábra: A valós és a becsült értékek a PLS regresszió esetén.

Tehát a kézi kiértékeléssel megtalált nagy koncentrációjú észtervegyületekkel ugyan előre lehet jelezni a romlást ha csak a romlott mintákat tekintjük, de valószínűleg a koncentrációban lévő változást nem tudjuk detektálni ha egészséges gyümölcsök is találhatók a rendszerben. A kis vegyületeket is meg kell vizsgálni, például az ízérzet kialakításában sokszor nem a nagy koncentrációjú vegyületek hanem a mikrokomponensek a meghatározók. A három sorozatban felbukkanó almákhoz köthető vegyületek a 13. táblázatban találhatók meg. A táblázatban az α -fellandrének kétszer szerepel különböző retenciós idővel, ez a terpének előzőekben említett hasonlósága miatt lehetséges.

13. táblázat: Az almamintáknál talált csúcsok. A negyedik oszlopban a program által megadott százalék jelzi a szoftverben talált tömegspektrumokkal való egyezés valószínűségét

Retenciós idő [min]	Melyik sorozat	Azonosított vegyület név	Fit (%)
9,84	1,2,3	pentil-butanoát	84,5
10,13	1,2,3	metil-linoleát	89,0
10,90	1,2,3	azonosítatlan	
14,09	1,2,3	1,2-epoxi-3-metil-hexán	85,5
8,91	1,2,3	2-pireridon	91,2
4,94	1,2,3	1-pentanol	79,3
6,61	1,2,3	azonosítatlan	
6,93	1,3	1,2-epoxi-3-metil-hexán	85,8
4,35	1,3	2-metil-1-butanol	75,6
8,13	1,3	etil-propanoát	82,9
8,28	1,3	butil-butanoát	85,4
9,26	1	hexil-acetát	83,1
9,50	1	1-isopropil-4-metilbenzol	94,3
9,56	1	α -fellandén	89,8
14,59	1	metilén-ciklopentán	86,2
15,38	1	1,3,- <i>p</i> -mentadién	83,8
12,15	1	4-piroil-acetát	83,1
12,63	1	2-pireridon	88,5
14,93	1	kariofillén	91,8
11,55	2	α -fellandén	88,8
9,47	2	terpinolén	93,3
13,27	3	azonosítatlan	
4,05	3	azonosítatlan	
5,07	3	metil-butanol	70,8
5,88	3	propil-propanoát	88,5
14,32	1,2	4-metil-1-pentanol	85,4
12,03	1,2	anetol	97,4
7,89	2,3	hexánsav-metil-észter	95,7

6.4. A romlott gyümölcsök megkülönböztetésében fontos szerves illékony vegyületek kiválasztása SOMs módszerrel

14. táblázat: A mintaelemszámok eloszlása a minták típusa és a romlás vizuális jelei alapján

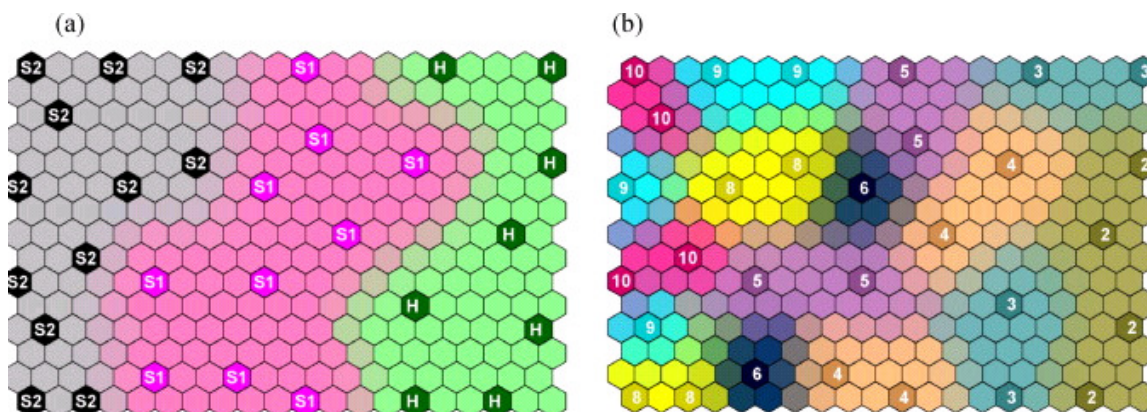
Minta		Oltástól számított napok							
		2.	3.	4.	5.	6.	8.	9.	10.
Fertőzött	<i>Minták száma</i>	4	4	4	4	2	4	4	4
	<i>Megfigyelés</i>	ép	ép	ép, első fázis	első fázis	első fázis	második fázis	második fázis	második fázis
Kontroll	<i>Minták száma</i>	4	4	4	4	2	4	2	4
	<i>Megfigyelés</i>	ép	ép	ép	ép	ép	ép	ép	ép

Ebben az alfejezetben csak a harmadik kísérletsorozattal foglalkozom, melyben 58 kromatogramot rögzítettünk. Mind a kontroll, mind az oltott minták légteréből naponta vettünk mintát, kivéve a hetedik napon. A mintavételeket kétszer ismételtük, a hatodik és kilencedik nap kivételével. A minták kinézetéről minden nap készült feljegyzés, ezek alapján 3 csoportba soroltuk a mintákat (14. táblázat). Egészséges, ép kinézetű, kicsit romlott (első fázis, fehéres színű penész telepekkel), nagyon romlott (második fázis, zöldes színű penész telepekkel). Az algoritmussal kapott adattáblából eltávolítottuk azokat a vegyületeket, amelyek nem szerepeltek többször, mint 5, mert ezek valószínűleg nem használhatók majd előrejelzésre, lehetnek a csúcspárosító algoritmus vagy az analitikai mérés miatt keletkezett „mű” vegyületek. Az elemzésben végül egy 58 sorból (minták) és 200 oszlopból (változók, egyedi vegyületek) álló táblázatot használtunk.

A minta típusok és a romlás fázisa szerint a minták megkülönböztethetők a betanított SOMs térképek szerint (33. ábra). Az ábrán látható csoportok jelentőségét akkor értjük meg, ha belegondolunk abba, hogy egy folyamatos romlási eseményből készítettünk csoportokat. A második és harmadik napos minták még egészségesek, a romlás a 4. napon kezdődött, fehéres porszerű pici pöttyök lepték el a gyümölcsöket. Ezek a minták tartoznak a „romlás első fázisa” csoportba. Később, a 8. naptól kezdve a zöldes gócok is megjelentek a gyümölcsök felületén, innentől kezdve a minták a „romlás második fázisa” csoportba tartoznak. Az ábrán csak a fertőzött almák mintái láthatók. A paraméterek optimalizálásának részletei a kapcsolódó publikációban találhatók [Fong et al. 2011].

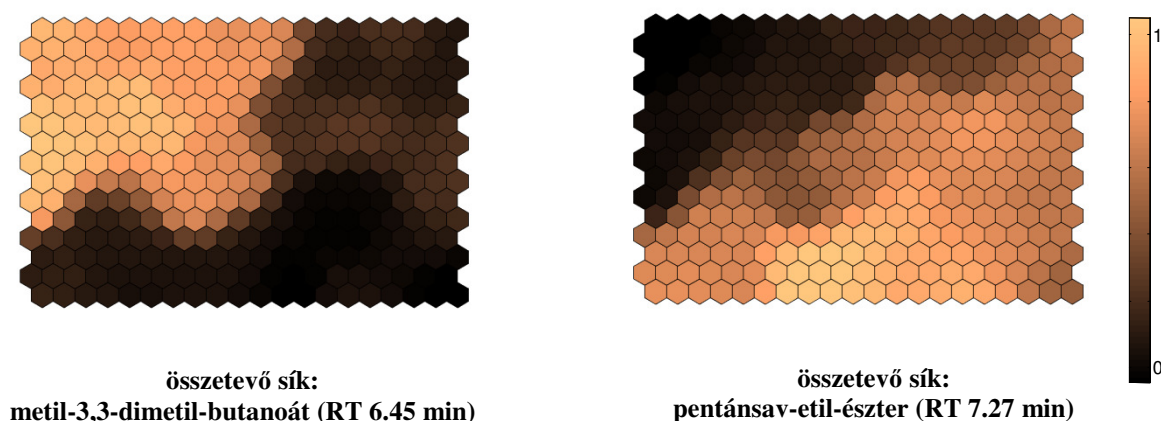
A SOMs módszere alkalmasnak bizonyult arra, hogy kiválasszuk azokat a vegyületeket amelyek a romlási fázisok szerinti megkülönböztetésben fontosak, még akkor is ha semmiféle

előismerettel nem rendelkezünk a mintáról. Ezek: metil-3,3-dimetil-butanoát, etil-hexanoát, 1-metoxi-3-metil-benzol, pentánsav-etil-észter, hexil-propanoát, sztirol és fenil-ecetsav.



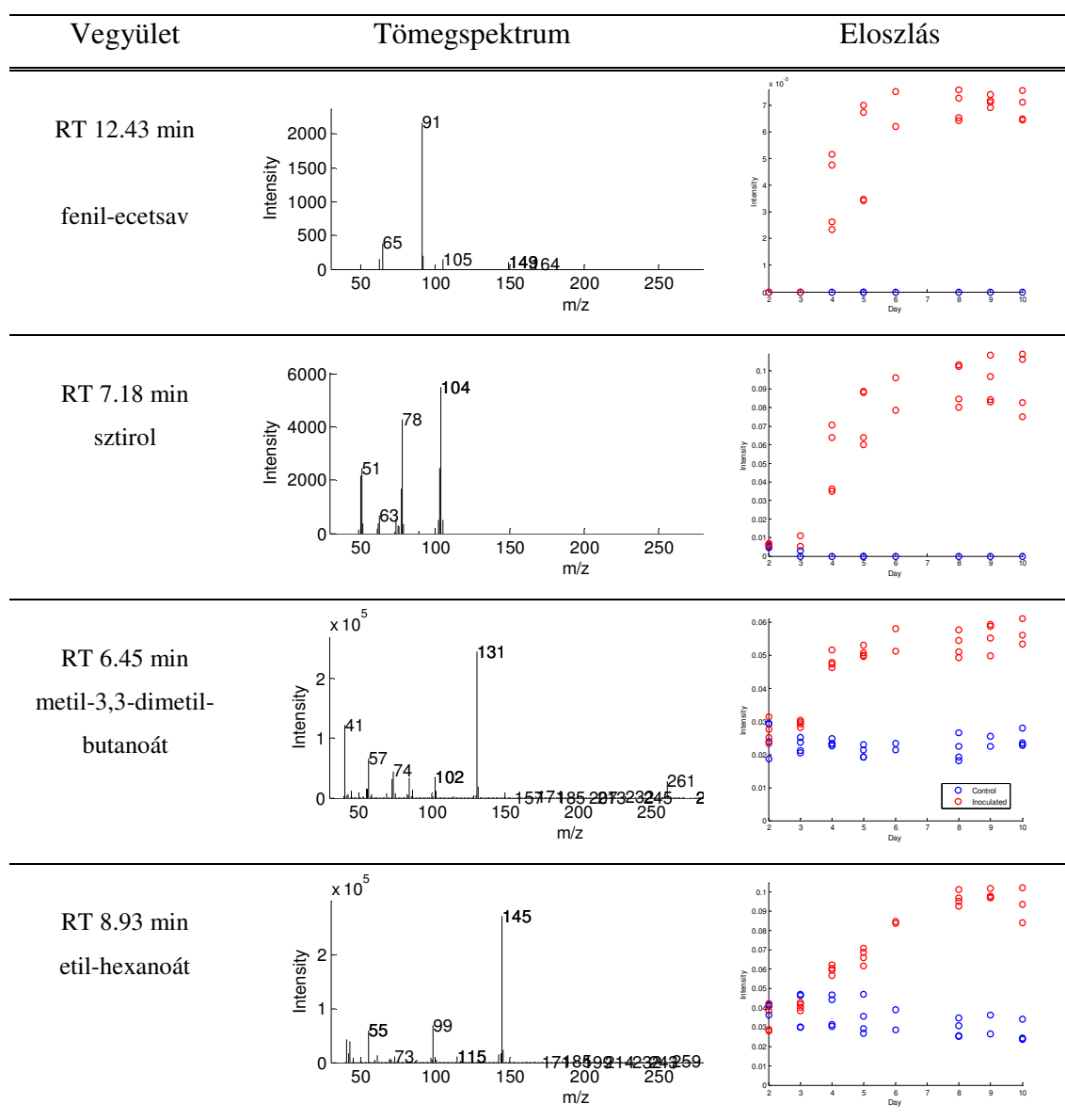
33. ábra: Csak a fertőzött minták betanított SOM térképei, a romlási fázisok szerint színezve: (a) a 'best matching unit' a romlási fázis szerint jelölve és (b) a 'best matching units' a oltástól eltelt napok száma szerint színezve. A jelölések: Egészséges (H) ■; első romlási fázis (S1) ■; második romlási fázis (S2) ■.

Az egyes térképek mögött az összes változó (itt vegyület) síkja megtalálható, azaz 200 összetevő sík (component plane), mely 1-1 vegyülethez tartozik. A fontos változókat meghatározhatjuk, ha a minták térképen való eloszlását összehasonlítjuk az egyes változók intenzitásának eloszlásával az adott összetevő síkban. Az 34. ábrán bemutatok két példát az összetevő síkokra. A sötét szín azt jelenti, hogy magas az intenzitás, a világosabb szín azt, hogy alacsonyabb. Ezt összevetve a a 33. ábrán található, minták megjelenítésére használt térképpel levonhatjuk a következtetést, hogy a metil-3,3-dimetil-butanoát a kontroll almáknál van nagyobb koncentrációban, míg a pentánsav-etilészter az oltott almák esetében.

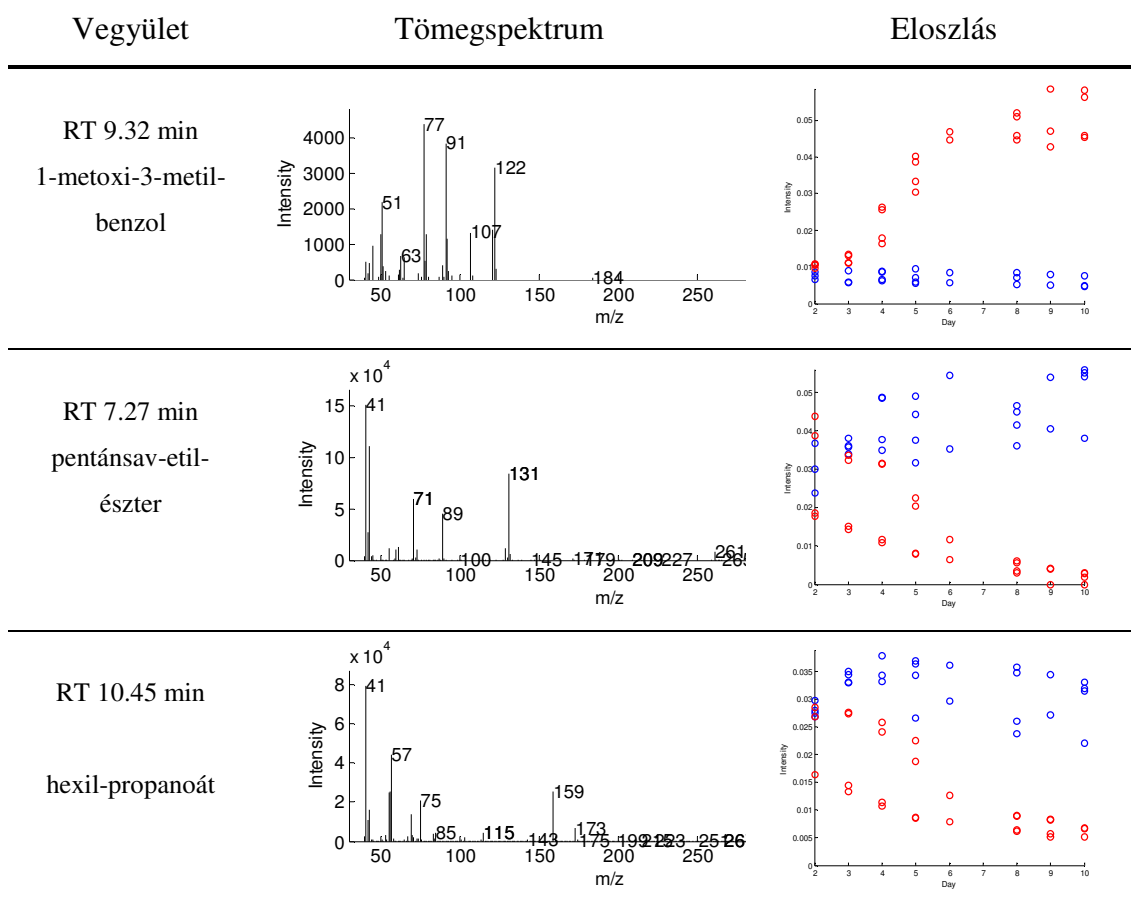


34. ábra: Két összetevő síkja, a színezés az adott hexához tartozó mintabeli intenzitással arányosan változik.

A sztirol és a 1-metoxi-3-metil-benzol előfordulását már említettem a korábbi kutatásokban, azonban a többi itt felsorolt vegyületet is megtalálhatjuk az irodalomban. A pentánsav-etil-észter [Garcia et al. 2000] és a hexil-propanoát [Moalemiyan et al. 2007] koncentrációja csökken, míg metil-3,3-dimetil-butanoát, etil-hexanoát és 1-metoxi-3-metil-benzol koncentrációja nő a romlás előrehaladtával [Karlshoj et al. 2007]. A sztirol és fenil-ecetsav koncentrációja szintén nő, ráadásul ezek nem találhatók meg a kontroll mintákban. A felsorolt vegyületek nagyon ki koncentrációban találhatók meg a többi illatkomponenshez terpénhez, vagy észterhez képest. Ezen vegyületek retenciós idejét, tömegspektrumait és eloszlását a kontroll és az oltott mintákban a 36. ábrán tekinthetjük meg.



35. ábra: A megkülönböztetésben fontos vegyületek tömegspektrumai és eloszlása. Kékkel a kontroll minták, pirossal a fertőzött minták szerepelnek



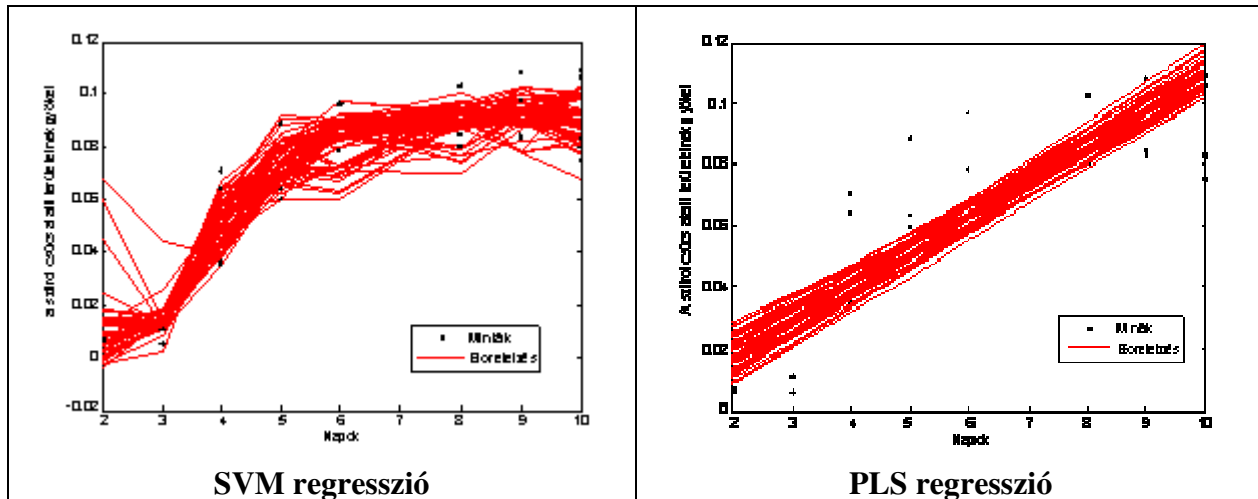
36. ábra folytatása: A megkülönböztetésben fontos vegyületek tömegspektrumai és eloszlása. Kékkel a kontroll minták, pirossal a fertőzött minták szerepelnek.

6.5. A kibocsátott szerves illékony vegyületek becslésének lehetőségei az eltelt idő alapján.

Ezek után a kibocsátott VOC-k koncentrációit becsültük az oltástól eltelt napok száma alapján. A becslésre a támogató vektor gép (support vector machine, SVM) elvén működő regressziós módszert használtuk. A függő változó a sztirol koncentrációja. A 37. ábrán látszik, hogy a lineáris modell nem ad megfelelő becslést, míg az SVM regresszió az optimált a paraméterekkel megfelelően modellezi a görbét. A 37. ábra jobb oldalán az 1 komponens felhasználó PLS regresszió látható a lineáris modell szemléltetése érdekében. A pontok elhelyezkedése csak kissé nem lineáris, így a PLS regresszió predikciós hibája csak kétszer annyira rossz mint az SVM regresszióé. SVM regresszió esetében az RMSEP (az előrejelzés hibája, root mean squared error of prediction) 0,0109, koncentráció egységben. Ez a koncentráció a csúcs alatti területek gyökeinek a sorokra normalizált értéke. Ez a sztirol átlagos koncentrációjának (ugyanígy a csúcs alatti területek gyökeinek a sorokra normalizált értékét

tekintve) 17,68 %-a. Ez a becslés relatív hibája. A PLS regresszió esetében az RMSEP 0,0205, azaz a sztírol átlagos koncentrációjának 33,17%-a a becslés hibája.

A piros vonalak az optimálás során kipróbált egyenleteket jelzik. A változók optimálása során 100 betanító/validáló (training/test) adattáblát használtunk, ennek részletei a kapcsolódó publikációban [Fong et al. 2011] és a Sim Sion Fong PhD értekezésében található meg.



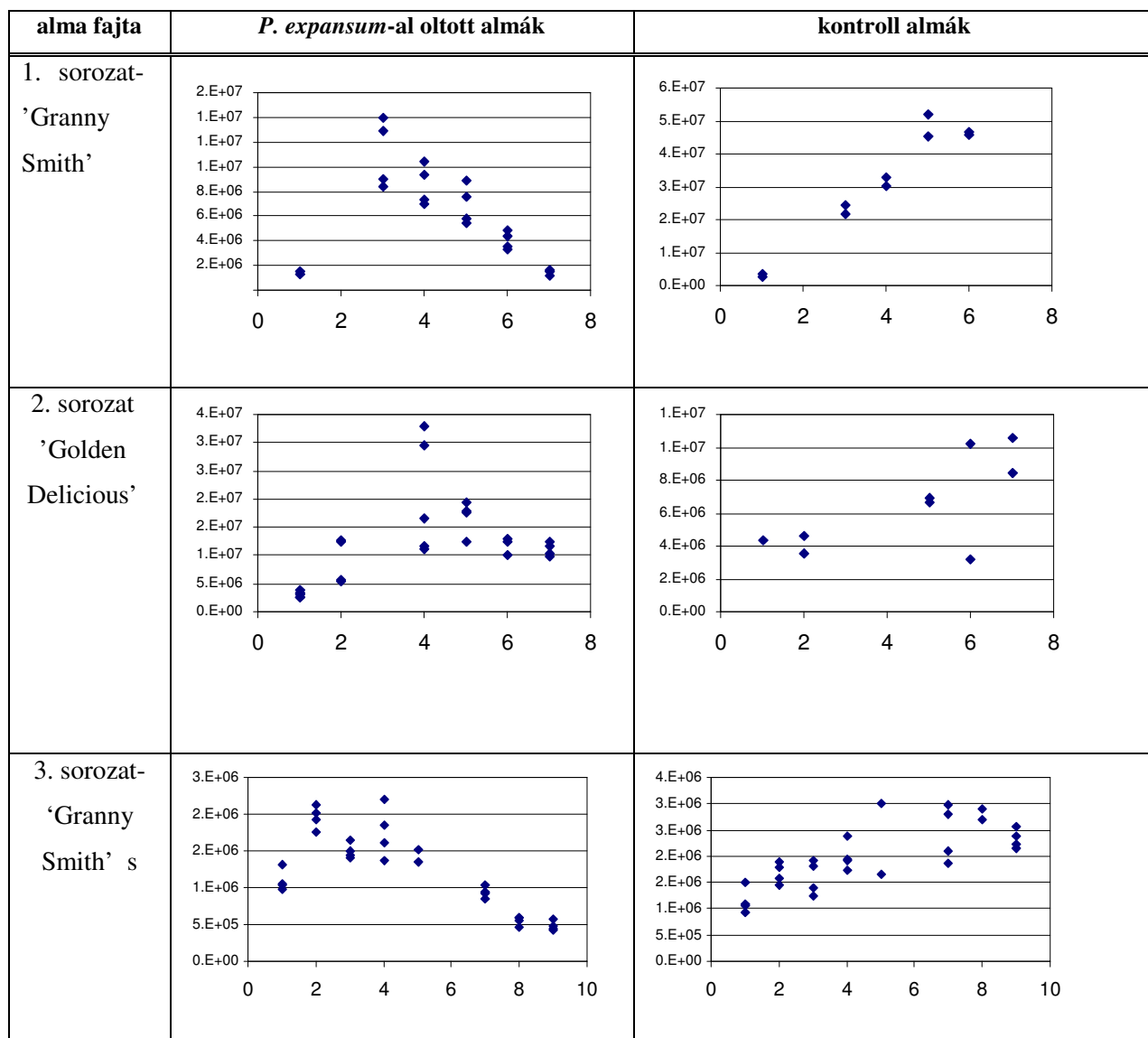
37. ábra: Az SVM és a PLS regresszió kalibráció egyenesei.

6.6. Párhuzamos almás kísérletsorozatok összehasonlítása

A manuális kiértékelés során, hasonlóan az MVA módszerhez, először eltávolítottam a nyilvánvalóan redundáns csúcsokat. Ez esetben azokat, amelyek nem találhatók legalább 5 mintában, a párhuzamos oltások során nem következetesen jelennek meg, ill. amelyek túl kicsik. Azaz kisebbek voltak, mint a legnagyobb csúcs intenzitásának 10%-a (ez a kimutatási határ közelében lévő csúcsok kizárását jelenti, hogy elkerüljük az ebből adódó hibát, illetve ezek a vegyületek nagyobb légtérben valószínűsíthetően nem lennének alkalmasak az azonosításra). A számunkra valószínűleg nem hasznos csúcsok kizárása után 93 vegyület maradt. Főkomponens-elemzés módszerével próbáltunk csoportosulásokat keresni az egyes minták között. Az első elemzés során, amikor együtt vizsgáltuk az alma és szilva mintákat, azt az eredményt kaptuk, hogy az alma és szilva mintákat jobban el lehet különíteni egymástól, mint fertőzött és az egészséges gyümölcsöket, ezért külön hajtottuk végre az elemzést.

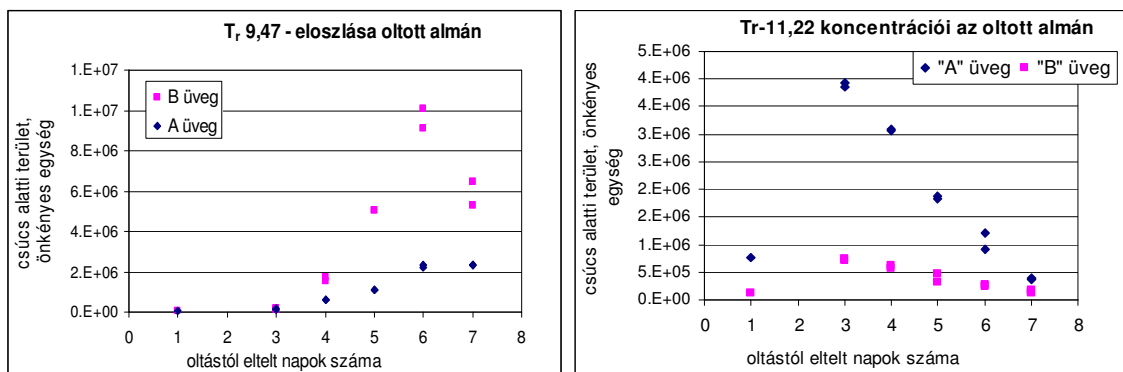
Először megvizsgáltam az alfejezetben korábban fontosnak ítélt vegyületeket, mindhárom kísérletsorozat tekintetében. Általában elmondható, hogy a tendencia ugyanaz, a három sorozatban, attól függően hány napig vettünk mintát a görbe maximumos vagy folyamatosan növekvő lesz (3938. ábra). A három kísérlet közül az első és a harmadik fajta alma volt

egyforma, de a betakarítás előtti és utáni kezelésekről nem tudunk semmit, így nem várjuk el az egyforma VOC-ket. Így tökéletes a kísérleti rendszer arra, hogy a romlás előrejelzésére használható VOC-nek az általánosítási lehetőségeit vizsgáljuk.



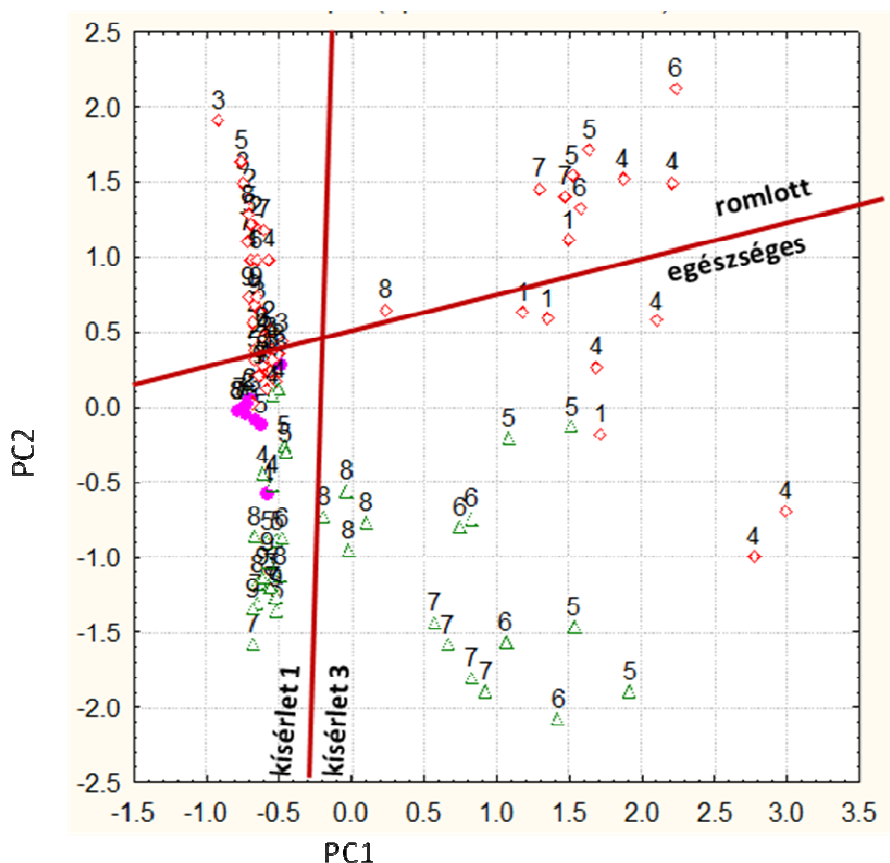
38. ábra: A RT 14,09 vegyület eloszlása az oltott és kontroll almákon a három kísérletsorozatban. Vízszintes tengelyen a napok száma, függőleges tengelyen a csúcs alatti terület (önkéntes egység).

Minden oltást ismételtünk, így kaptunk 2 pontot. Minden üvegből kétszer vettünk mintát. A 39. ábra alapján jól látható, hogy 1-1 napon az egy üvegből vett minták ismétlései jóval kevésbé különböznek egymástól, mint a két párhuzamos oltás. Az ismétléseknél az SPME mintavétel, a GC-MS rendszer és a csúcsfelismerés hatása is szerepet játszik, ezek együttes hatása kevésbé jelentős az eredményre, mint maga a minta különbözősége. Még akkor is, ha azt várnánk, hogy ezek a párhuzamos oltások egyformák legyenek, attól függően hány mikroba került a táptalajra gyorsabban el tudnak szaporodni.



39. ábra: A párhuzamos oltásokból származó vegyületek koncentrációi az idő függvényében.

A két 'Granny Smith' fajtájú alma kísérletsorozat VOC-inek koncentrációit használtam együtt a fontos vegyületek megkeresésére. A 40. ábrán látható, hogy az egyes és kettes főkomponens síkjában ábrázolva az alma mintákat kétféle csoportosulást találunk. Az első főkomponens szerint elválík a két kísérletsorozat, (az első sorozat mintái a piros függőleges vonaltól balra találhatók) míg a második főkomponens csoportosítja az egészséges és a romlott gyümölcs mintákat, nem nagyon jól.



40. ábra: Az első és a harmadik kísérlet. A pirossal a romlott a zölddel az egészséges mintákat jelöltük. A lila jelölők a szál üres lefűtésének kromatogramjai. A számok pedig az oltástól eltelt napok számát.

A probléma, hogy az első két főkomponens együtt sem magyarázza a mintákban lévő összvariancia több, mint 30%-át az. Mivel a második főkomponens különbözteti meg a romlott/nem romlott mintákat, meghatároztam, mely vegyületek járulnak hozzá leginkább ennek a komponensnek a kialakításához. A következő komponensek nőnek a romlás előrehaladtával: etil-izobutanoát, -1-metoxi-3-metil-benzol; hexánsav-metil-észter; benz-etanol; pentánsav-etil-észter; etil-hexanoát; csökkenek: benzaldehid-2,4,5-trimetil; 3-ciklohexén-1-metanol- α , α ,4-,trimetil; maximumos görbét mutat: sztirol, hexiletanoát, butánsav-1-metilhexil-észter.

6.7. Következtetések.

Az alma minták sokféle illékony szerves vegyületet bocsátottak ki. Ezek közül a mind a romlott mind a nem romlott minták esetében a leggyakoribbak az észtervegyületek és a terpének voltak. *P. expansum* hatására bekövetkezett romlás során egyes szerves illékony komponensek koncentrációja növekedett másoké csökkent. A pentánsav-etil-észter [Garcia et al. 2000] és a hexil-propanoát [Moalemiyan et al. 2007] koncentrációja csökkent a *P. expansum*mal fertőzött mintákban a romlás előrehaladtával, míg metil-3,3-dimetilbutanoát, etil-hexanoát és 1-metoxi-3-metilbenzol koncentrációja nőtt [Karlshoj et al. 2007].

Az észtervegyületek koncentrációjának változása jelentős és kézi értékeléssel is felfedezhető. Az detektált VOC-k főleg az észtervegyületek alapján alkalmasok a romlási idő előrejelzésére is, PLS módszerrel. Azonban az észtervegyületekkel való jelző rendszer valószínűleg csak akkor működik ha csak a romlott minták vannak a rendszerben, mivel ugyanezek a vegyületek megtalálhatók az ép gyümölcsökön is. Több észter vegyület esetében csak a konformáció változik, ezt érdemes lenne megvizsgálni. Valószínűleg a koncentrációban lévő változást nem tudnánk detektálni egy ipari tárolóban amikor csak pár %-a romlott a terménynek.

A terpének koncentrációja is változott, azonban ezt nem tartom alkalmasnak a romlás jelzésére, hasonlóan az szilva mintán tapasztaltakhoz, az azonosításuk és kromatográfiás csúcsaik egymásnak való megfeleltetése ezzel a GC-MS technikával nehéz, az izomerjeik pedig fajta és körülmény függők. Azonban, más, már a korábbi kutatásokban a romláshoz vagy az almához kötött vegyületek alkalmasak lehetnek.

Mivel az észterek és a terpének a nagy koncentrációjú VOC-k, a kis vegyületeket is meg kell vizsgálni. Néhány alkohol és aldehid is megjelent meg a rendszerben. A három különböző

almás kísérletsorozatban a sztirol és a 1-metoxi-3-metil-benzol volt az a két vegyület amely megjelent a romlás során, az egészséges almákon pedig konstans koncentrációban, vagy kimutatási határ alatt volt. A napok számából 11,78 %-os relatív hibával tudjuk becsülni a sztirol koncentrációját SVR módszerrel.

7. FEJEZET. ALMÁK ÉS SZILVÁK ILLÉKONY VEGYÜLETEINEK VÁLTOZÁSA *B.CINEREA* ÉS *P. EXPANSUM* HATÁSÁRA.

Ebben a fejezetben összehasonlítom a *Penicillium expansum* által
termelt illékony vegyületeket a szilvák és almák esetében.
Megkeresem *Botrytis cinerea*-ra jellemző VOC-ket.

Publikálva:

Virág Sági-Kiss, Sim S. Fong, Andrea Pomázi, Péter Fodor, Richard G. Brereton, Anna Maráz, 2010,
SPME, GC-MS integrated with chemometrics for prediction of fungal fruit spoilage, 7th Aegean Analytical
Chemistry Days, 29 Sept – 03 Okt, Lesvos, Greece

7.1. Anyag és módszer

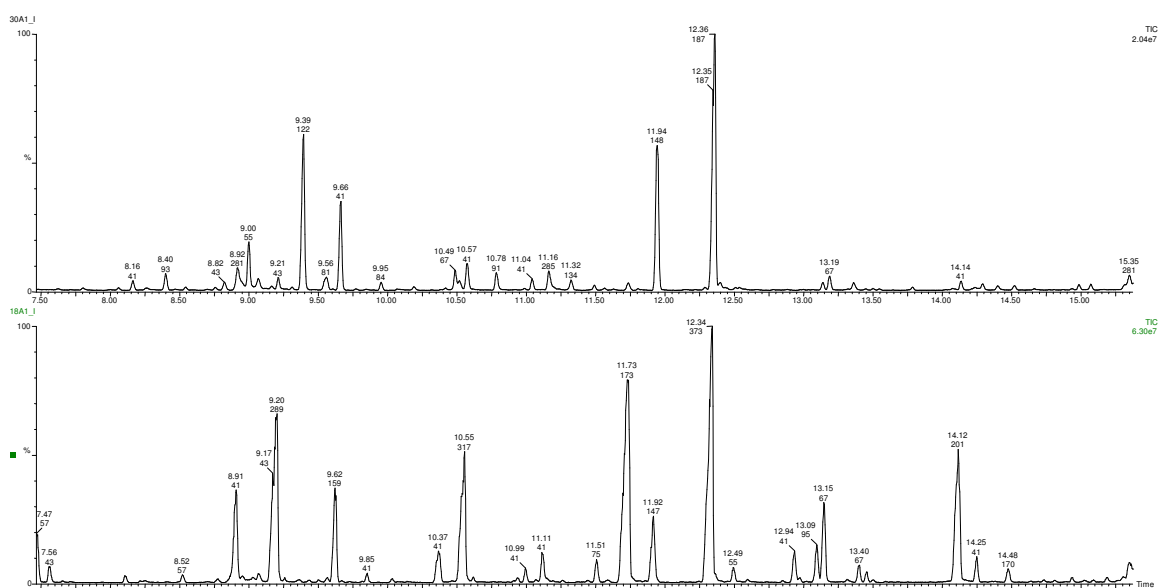
15. táblázat: a kísérleti elrendezés rövid összefoglalása

	első kísérlet	második kísérlet
gyümölcs típusa	Alma	Szilva
minták száma	4	6
penészgomba típusa	<i>P. expansum</i>	<i>P. expansum</i> <i>B. cinerea</i>
az ismételések száma	2 × oltott, 1 × kontroll	2 × oltott, 1 × kontroll
sterilizálási eljárás	gőzölés 60 °C-on, 20 min	10 percig 3%-os hidrogén-peroxidos kezelés
mérés időtartama	14 nap	10 nap

Ebben a kísérletben fagyasztott szilvák helyett ép, egész japán típusú szilvákat választottunk a piacról. A gyümölcsök sterilizálását és oltását Ender Ágnes végezte a Mikrobiológia Tanszéken, Dr. Pomázi Andrea témavezetésével. A diplomamunkája részeként optimalta a sterilizálási eljárást [Ender 2010]. Habár az irodalomban említett tanulmányban [Paliyath et al. 1997] nem találtak különbséget a forrázott és nem forrázott almák VOC-i közt a cél a sterilizálás nélküli állapot minnél jobb megközelítése.

Kísérleteink során az almákat *P. expansum*, a szilvákat *P. expansum* és *B. cinerea* penészekkel oltottuk be. Az oltásokhoz a 6. fejezetben kialakított „villát” használtuk, az ott leírtak szerint. Összesen 12x4, azaz 48 szúrást ejtettünk az almákon, a szilvákon pedig 5x4-et, azaz 20-at. A kísérletsorozat idejének letelte után újabb mintát vettünk a gyümölcsök felületén kinőtt penészekből és oltottuk őket, hogy megbizonyosodhassunk a tenyészetek tisztaságáról. A mintavétel és a mérés az „Anyagok és Módszer” fejezetben meghatározott paraméterek szerint történt.

7.2. A kibocsátott illékony szerves vegyületek ép és romlott alma esetén



41. ábra: A romlott (felül) és az egészséges (alul) alma VOC-inek kromatogramjai 12 nappal a fertőzés után.

A romlott és az egészséges almák VOC-inek kromatogramjai látványosan különböznek egymástól a 42. ábra szerint. Az egészséges alma, nagy széles csúcsai zömmel terpének. Az irodalmi áttekintésben közölt táblázatot összehasonlítottuk azokkal a vegyületekkel, amelyeket azonosítottam. A saját mérésekben zömmel az észterszármazékokat találtuk egyezőnek a 16. táblázatban közölt vegyületek közül. Három olyan észtert azonosítottunk, amelyeket egyik előző ‘Golden Delicious’ VOC-inek elemzése során sem említettek. Ezen kívül sokfajta terpént mértünk, de ezeket az elemzésétől az előző fejezetekben említett okok miatt eltekintek.

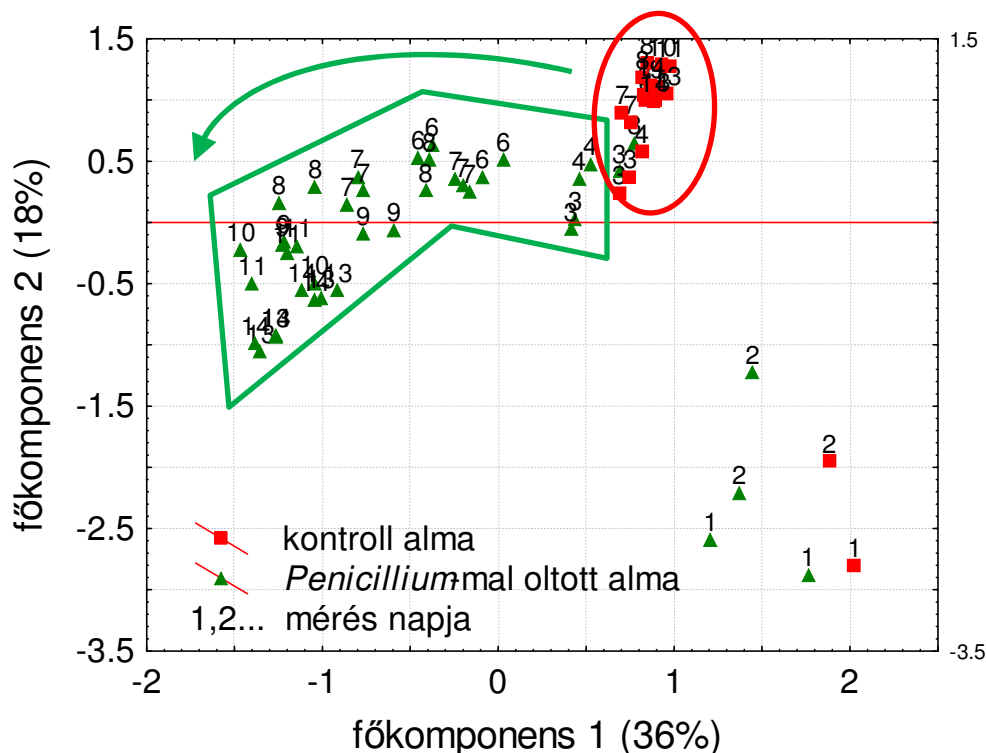
16. táblázat: Alma aromakomponensek az irodalommal összevetve.

	Song et al, 1996	Lopez et al, 2000	Karlshoj et. al, 2007	Saját
2-metil-butil-acetát	X	X	X	
2-metil-butil-2-metil-butanoát	X	X		X
2-metil-butil-2-metil-propionát	X			
2-metil-propil-acetát	X	X	X	
metil-pentanol	X	X		
4-metoxi-allil-benzol	X			
6-metil-hept-5-én	X			
butanol	X	X	X	
butil-2-metil-butanoát	X		X	X
butil-acetát	X	X	X	X
butil-butanoát	X	X	X	
butil-hexanoát	X		X	

butil-pentanoát	x			
butil-propionát	x	x	x	x
etil-2-metil-butanoát	x	x	x	
etil-3-metil-butanoát		x		
etil-acetát	x	x	x	x
etil-butanoát	x	x	x	x
etil-hexaoát	x	x	x	
hexanol	x	x	x	x
hexil-2-metil-butanoát	x			
hexil-acetát	x	x	x	x
hexil-butanoát	x	x	x	x
hexil-hexanoát	x		x	
hexil-propionát	x	x	x	x
metil-2-metil-butanoát	x			
metil-acetát	x	x	x	
metil-butanoát	x			
metil-butanol	x	x	x	x
oktil-acetát	x			
α -farnzén	x	x	x	
pentil-acetát	x	x		
propil-acetát	x	x	x	x
propil-oktanoát	x			
pentil-butanoát			x	x
pentil-acetát			x	x
propil-butanoát			x	x
propil-propionát	x		x	
ilangén			x	x
thujopsén				x

Ezek után összehasonlítottam a mért VOC-k kromatogramjait PCA elemzés segítségével. Az elemzést 20 főkomponensre csináltuk, ebből körülbelül 3-4 főkomponensre van szükség hogy az összes variancia legalább 75%-át magyarázzák. Az első főkomponens a teljes variancia 36%-át magyarázza, a második 18%-át, a harmadik 10%-át és a negyedik 8%-át. Már az első főkomponens mentén is a romlás szerint csoportosulnak a romlott és nem romlott minták (42.ábra). A bal oldalon, zöld keretben található a *P. expansum* fertőzött minták. Ezen belül is jobbról balra emelkedik a napok száma, azaz minél romlottabb a minta annál kisebb az első komponens értéke. A PCA nem különösebben jó időbeli változásokra, ha nem konkrétan elkülönülő csoportokról van szó, hanem a csoportok tagjai közt csak kicsi különbségek vannak, mint ebben az esetben akkor sosem egy egyenes mentén tapasztaljuk a változást, hanem görbe mentén. Az ábra jobb oldalán, piros körrel keretezve található egy szűk csoportban a kontroll almák. Tehát az a feltételezésünk, hogy a kontroll minták illékony vegyületei nem nagyon

változnak a mérés során, beigazolódott. Az első 2 nap mérései ettől viszonylag messze találhatók, ami azt jelzi, hogy azok a minták nagyon különböznek a többitől. Az előző fejezetben felvázolt koncentráció változások alapján ez érthető, mivel az első napi minták esetében a vegyületek koncentrációi mindig kisebbek voltak a többinél. Az adatok megerősítik a feltételezéseinket, hogy az oltás napján a légtérben lévő vegyületek koncentráció eloszlása nem egyenletes.



42. ábra: Az almák légtéréből mért illékony vegyületek főkomponens-elemzése.

Mivel az egyes főkomponensek az eredeti csúcsok lineáris kombinációjaként jöttek létre, az egyes csúcsok koefficiensei alapján ki lehet választani olyan csúcsokat, amelyek a legjobban befolyásolják az adott főkomponenst. Azokat a csúcsokat azonosítottuk, melyeknek koefficiense az első főkomponens esetében sztenderdizáltan 0,8 fölé esett. A 42. ábrán látható módon az első főkomponens alapján meghatározhatunk olyan vegyületeket, amelyek jelezhetik a romlás folyamatát. Ez alapján a 17. táblázatban szereplő anyagok játsszák a legnagyobb szerepet a romlott és a kontroll almák megkülönböztetésben. A táblázatban még megtalálható a sztirol és az etilbenzoát is amelyeket az előző fejezetek alapján választottam.

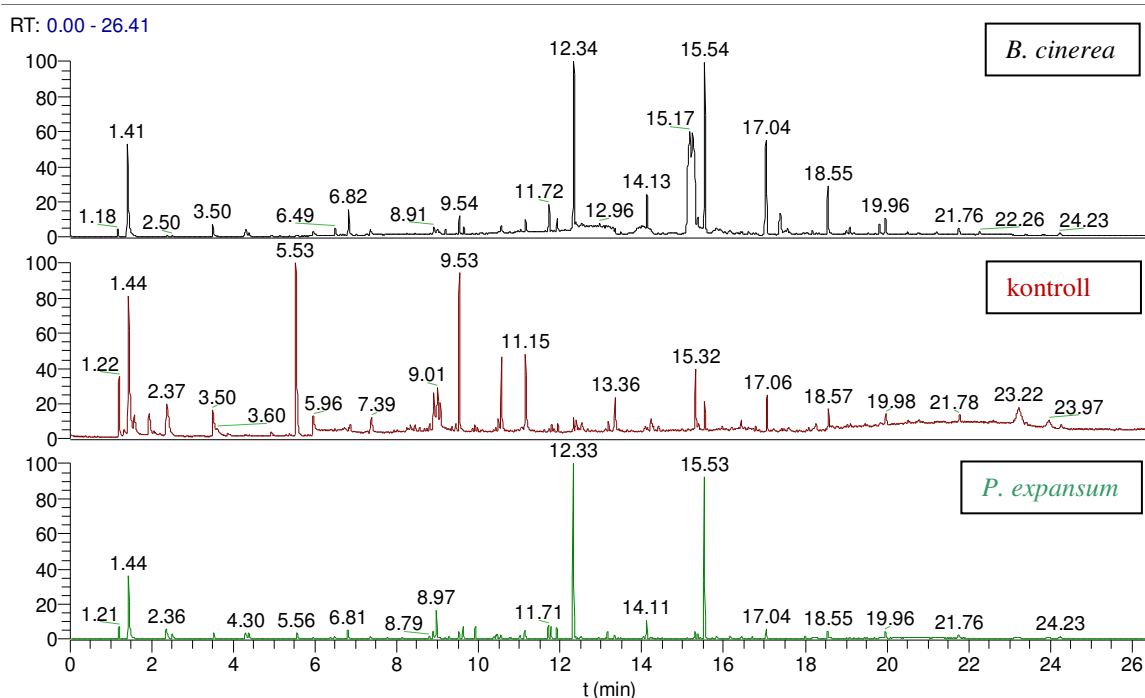
17. táblázat: Az első főkomponenst leginkább meghatározó vegyületek

retenciós idő (perc)	koefficiens	azonosított vegyület név
2,33	-0,91821	azonosítatlan
5,10	-0,89589	3-metil-butirát
5,78	0,80865	izobutil -acetát

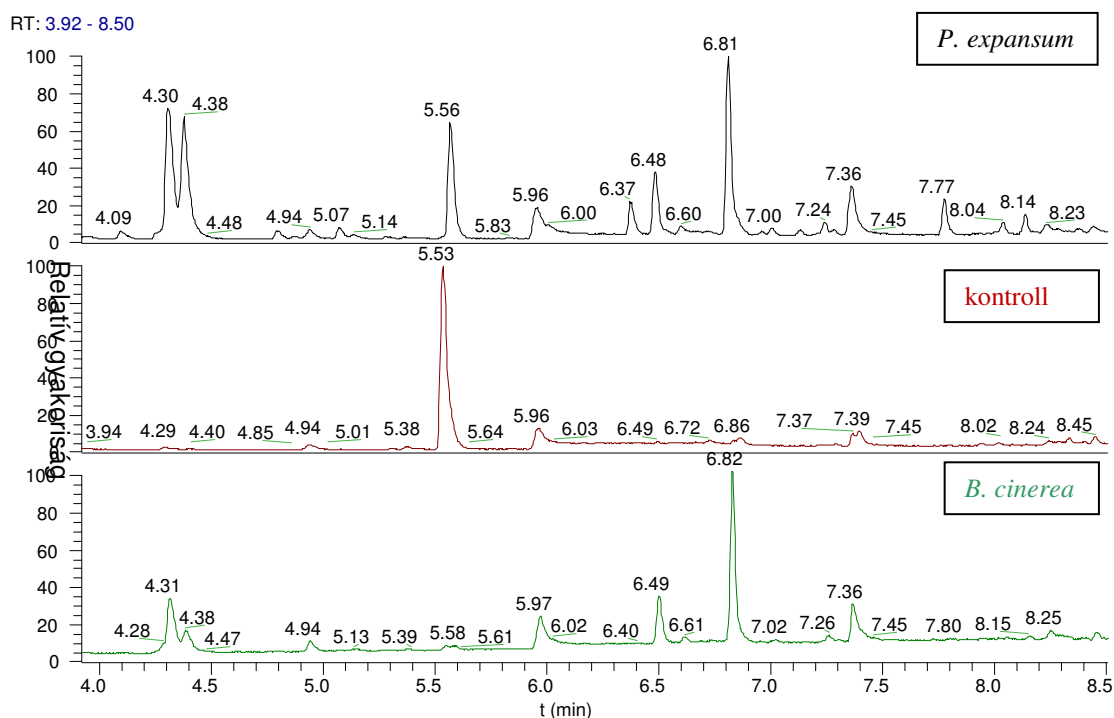
7,34	-0,50823	sztirol
7,56	-0,80586	pentil-acetát
8,00	-0,90602	propil-valerát
9,06	0,88782	butil-butirát
9,33	-0,83327	1-metoxi-3-metil-benzol
9,50	-0,9339	1-terpineol
9,89	-0,9019	azonosítatlan
10,40	0,86889	propil-hexanoát
10,55	0,89494	hexil-propionát
11,74	-0,67355	etil-benzoát
11,50	-0,81267	transz-2-hexenil-hexanoát
12,43	-0,87785	butil-3-metil-butirát
13,30	0,87492	cisz-metil-linoleát
13,42	0,82636	etil-9-dekanoát

7.3. A kibocsátott illékony szerves vegyületek oltott szilvák esetére

Szemrevételezés alapján mind a *P. expansum*, mind a *B. Cinerea* által fertőzött szilvák VOC-i nagyban különböznek a kontrolltól (43. ábra). Ez még látványosabb, ha egy kevésbé nagy koncentrációban jelenlévő vegyületek tartományát vizsgáljuk a kromatogramban (45. ábra).

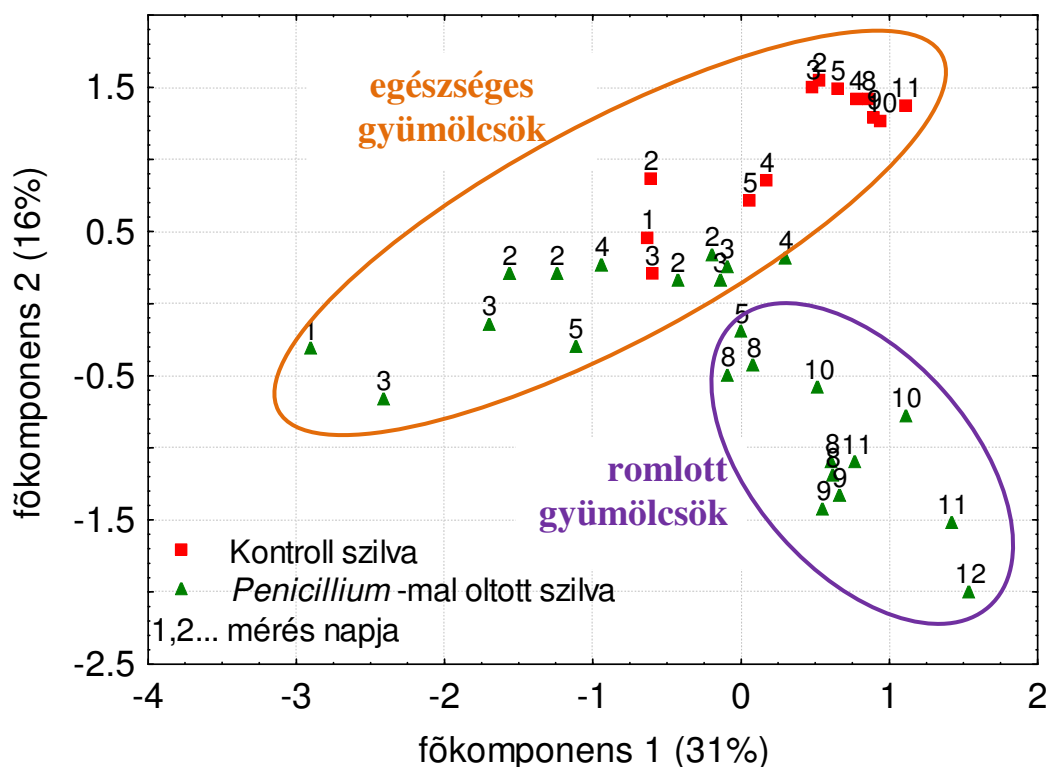


43. ábra: *B. cinerea*val és *P. expansum*mal oltott, romlott almák és kontroll almák VOC-inek kromatogramjai.



44. ábra: *B. cinerea*val és *P. expansum*mal oltott romlott almák és kontroll almák VOC-i.

Miután a szilvák és almák mintáira együtt végeztük el a PCA elemzést hasonló eredményre jutottunk mint az előzőekben. Két különböző kísérletsorozat együttes elemzése során a PCA ábrákon a két kísérletsorozat különbsége elfedi a romlott és nem romlott minták közti különbséget. Ugyanezt tapasztaltuk akkor is amikor *Botrytis* által fertőzötteket és a *P. expansum* által fertőzött szilvákat vizsgáltuk együtt. Ezért kettéválasztottuk a mintákat, hogy megvizsgáljuk, melyek azok a vegyületek, amelyek fontosak a csak *P. expansum* által fertőzött szilvák megkülönböztetésében. A 45. ábrán láthatók a *P. expansum*mal oltott szilva minták. A két csoport egyértelműen elkülöníthető: az egészséges gyümölcsök (ebben benne vannak az első pár napos oltott gyümölcsök mintái is ahol még nem tapasztalható romlás), illetve a romlottak. Mivel a romlás egy folyamat, egyik napról a másikra nem következik be radikális változás az illékony vegyületek összetételében, így az egészséges és romlott gyümölcsök 95 %-os ellipszisei majdnem összeérnek. Ha csak a kontroll gyümölcsöket tekintjük, és az utolsó napon mintavételezett romlott gyümölcsöket, azok teljesen különálló csoportokat képeznek. A romlás első látható jelei a 4. naptól voltak érzékelhetők. Ezek közül hasonlóan az almákon végzett elemzéssel, kiválasztottuk az első főkomponenst legjobban befolyásoló vegyületeket. Azonosítani azonban csak azokat azonosítottuk, amelyek egyaránt fontosak voltak az almák és a szilvák esetében is. Hét olyan vegyület találtunk (18. táblázat), amely egyértelműen jelzi a romlás folyamatát és mindkét gyümölcsnél nagy szerepet játszik.



45. ábra: A szilva minták légtéréből mért illékony vegyületek főkomponens-elemzése.

18. táblázat: Az alma és szilva mintákban egyaránt fontos szerepet játszó vegyületek

Retenciós idő	alma	szilva	azonosított vegyület név
5,78	csökken	csökken	izobutil-acetát
7,34	megjelenő, 7. naptól	megjelenő, 8. naptól	sztírol
9,06	csökken	csökken	butil-butirát
9,33	maximumos görbe 6. naptól	állandó	1-metoxi-3-metilbenzol
10,40	csökken	csökken	propil-hexanoát
11,74	maximumos görbe 6. naptól	maximumos görbe 5. naptól	etil-benzoát
13,42	csökken	csökken	etil-9-dekanoát

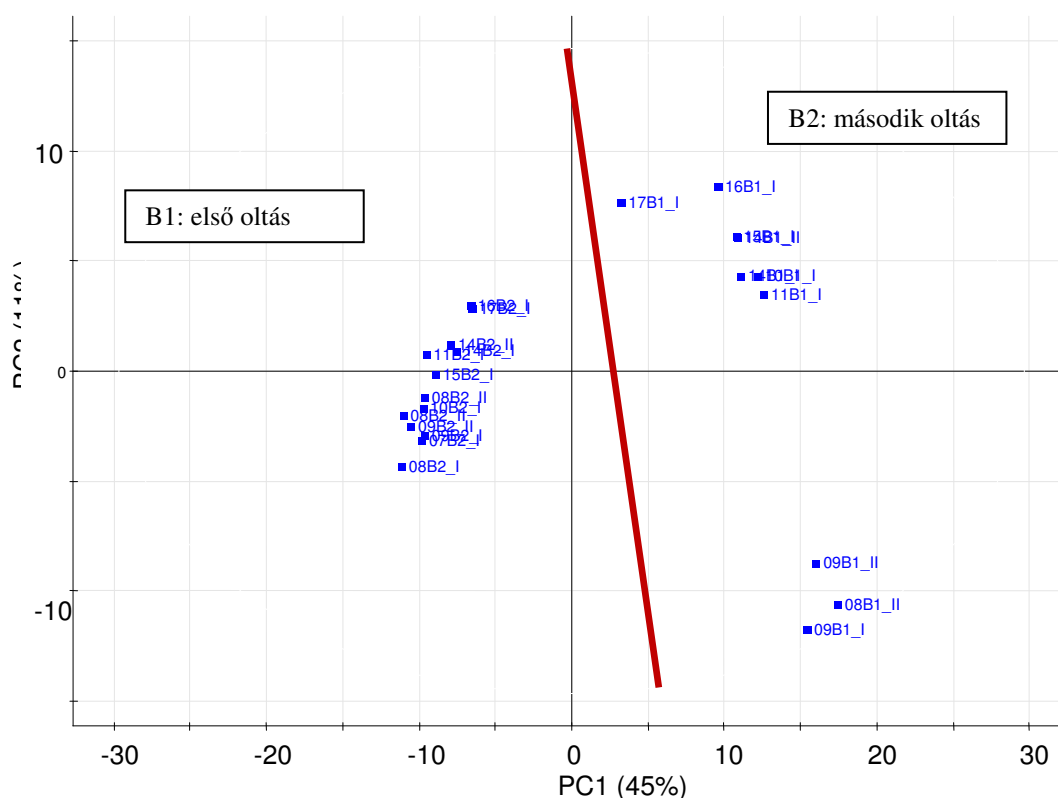
Az idő függvényében ábrázolva a kapott fontos szerepet játszó vegyületek változását, azt figyeltük meg, hogy alma esetében 4 vegyület (izobutil acetát, butil-butirát, propil-hexanoát, etil 9-dekanoát) mennyisége az oltott gyümölcsök esetén csökkent, a kontrollokon pedig közel azonos értéken maradt, vagy enyhén növekedett. Ez a tendencia pontosan megegyezik a 2. fejezetben tapasztalattal.

A vegyületek egy másik része a sztírol, etil-benzoát, 1-metoxi-3-metilbenzol megjelent a romlás előrehaladtával és mennyiségük egy ideig növekedett, majd kissé csökkenni kezdett, valamint a kontroll almákon egyáltalán nem jelentek meg, tehát ezek a *P. expansum* által

termelt szerves illékony vegyületek. Szilva esetében az izobutil-acetát mennyisége a kontroll gyümölcsön, a butil-butirát mennyisége pedig az oltott szilván csökkent az idő előre haladtával, vagyis ezek a vegyületek a gyümölcs aromaanyagai, amit a mikrobák feltételezhetően felhasználnak élettevékenységükhöz.

A propil hexanoát és az etil 9-dekanoát közel azonos mennyiségben volt jelen oltott és kontroll gyümölcsöknél, bár megfigyelhető a kezdeti napokban az oltott gyümölcsöknél egy enyhe növekedés. Az etil-benzoát és a 1-metoxi-3-metilbenzol változása hasonló tendenciát mutat szilva esetében is, mint az almánál, vagyis mennyiségük egy ideig növekedett, majd kissé csökkenni kezdett. A sztirol egyértelmű növekedést mutatott.

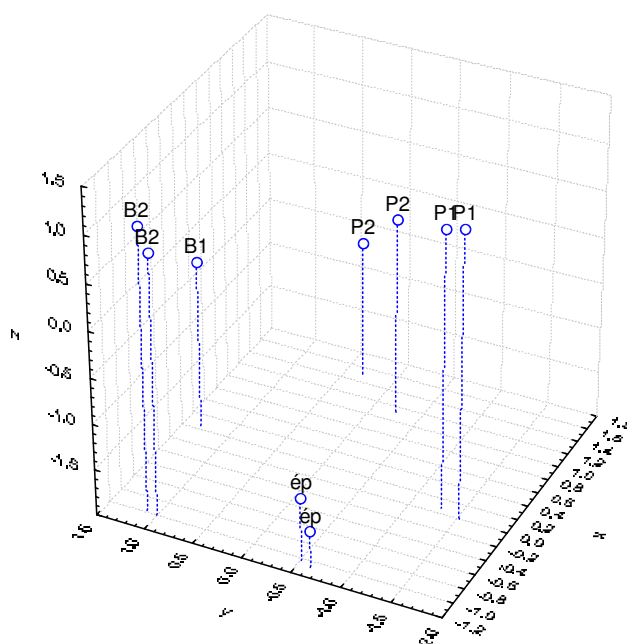
7.4. *Botrytis cinereával oltott szilvák fontos illékony vegyületei*



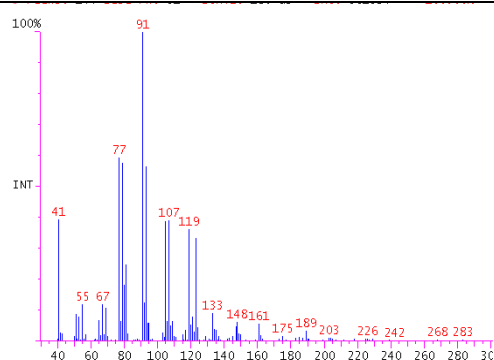
46. ábra: A *Botrytis cinereával* oltott szilvák VOC-i az első két főkomponens síkjára vetítve.

A *Botrytis cinereával* oltott szilva minták egyértelmű csoportokat alkotnak az alapján, hogy melyik üvegből származnak, azaz a párhuzamos oltás nem egyformán sikerült (46. ábra). Ezért csak az egyik oltás eredményeit használtam a kiértékeléshez.

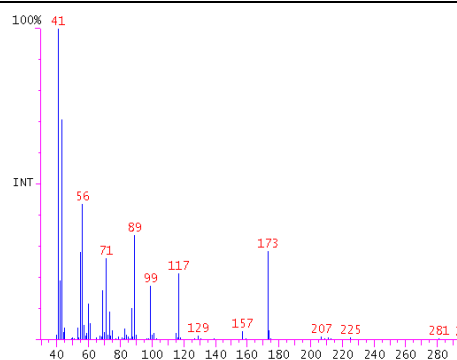
A romlási kísérlet utolsó napján felvett kromatogramokat használtam a romlott *P. expansum*mal (P) és *Botrytis cinerea*val (B) fertőzött szilvák összehasonlítására a kontroll mintával. A 47. ábrán láthatók a minták VOC-it reprezentáló pontok az első három főkomponens síkjára vetítve. A harmadik főkomponensnek van a legnagyobb szerepe a romlott és ép minták megkülönböztetésében. A két romlott egymástól és az egészséges mintától is elkülönül. Az első három főkomponenst meghatározó vegyületek közül a 48. ábrán foglaltam össze azokat amelyek kémiaiag reprezentálhatók.



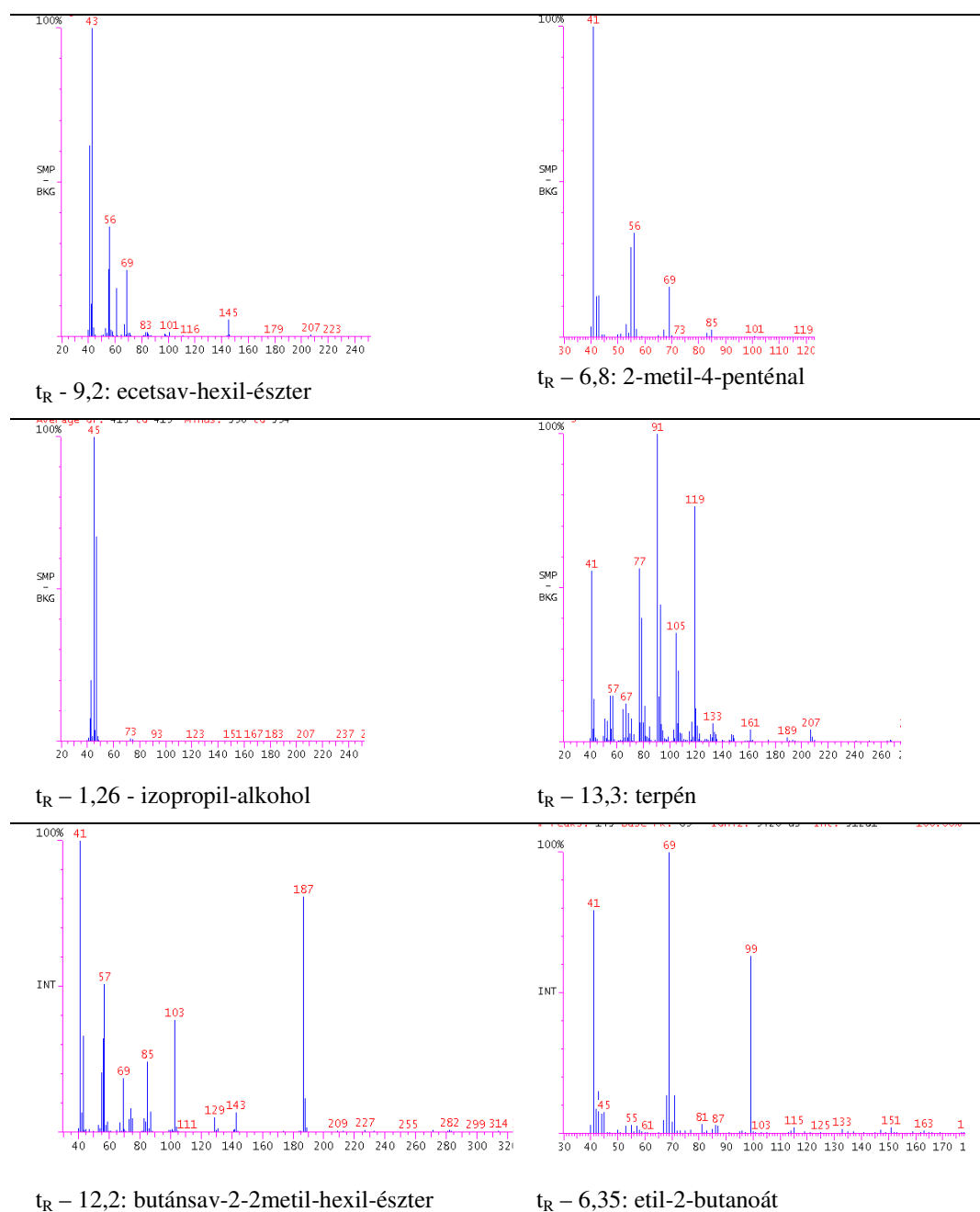
47. ábra: x tengely: PC1 (47,19%), y tengely: PC2(15,73%), z tengely: PC3 (13,18%).



t_R – 15,3: terpén



t_R – 11,4: butil-hexanoát



48. ábra: A romlott és ép szilva megkülönböztetésében fontos tömegspektrumok.

7.5. Következtetés

Főkomponens-elemzés segítségével kiválasztottam a lehetséges markervegyületeket, azaz a romlott és nem romlott szilva megkülönböztetésében fontos szerves illékony alkotókat, majd összehasonlítottam az almák esetében talált markervegyületekkel. Megállapítottam, hogy a sztirol, etil-benzoát, 1-metoxi-3-metilbenzol mind a szilván, mind az almán csak a *Penicillium expansum* oltott gyümölcsök esetében keletkeznek. Ezek a vegyületek alkalmasak lehetnek későbbi tanulmányokban a penészes rotlás általános becslésének vizsgálatára.

Megállapítottam a *B. cinerea* esetében a romlott és nem romlott szilva megkülönböztetésében fontos illékony szerves vegyületeket, ezek a butánsav-2-2-metil-hexil-észter, hexánsav-butil-észter, ecetsav-hexil-észter, izopropil-alkohol, 2-metil-4-penténal és egy azonosítatlan 15,5 perces retenciós idejű terpén. Ezek közül az izopropil-alkohol, közös a *P. expansum* oltott gyümölcsök esetében detektált vegyületekkel, azonban ez a vegyület nem alkalmas statisztikai becslő modell építésre ebben a modellrendszerben.

Új tudományos eredmények (tézisek)

1. A szilvaminták mintaelőkészítési/mintavételi rendszerének kritikai vizsgálata során elért új tudományos eredmények.8.é

Gyümölcsminták tárolása során bekövetkező romlás nyomonkövetésére létrehoztam egy olyan kísérleti modellrendszert, mely alkalmas az illékony alkotók mintavételezésére és az adatok statisztikai feldolgozásával jelezni a romlást. A romlott szilva minták esetében meghatározó vegyületek: butánsav-metil-észter, sztirol, 3-karén ($C_{10}H_{16}$), metoxi-3-metilbenzol, 1-decín és 1 azonosítatlan vegyület. A sztirol és az 1-metoxi-metilbenzol alapján, még a mennyiségi információk nélkül, annak alapján, hogy ezek a vegyületek megtalálhatók-e egy rendszerben vagy nem, meg lehet különböztetni, hogy kontroll vagy oltott szilvához tartoznak-e az egyes légtérből vett minták. Ez igaz, két különböző sebességgel romló szilva kísérletsorozat eredményei esetén is, hiába használtunk kissé más mérési körülményeket a párhuzamos oltások során.

2. Az almaminták illékony komponenseinek elemzése során elért új tudományos eredmények.

A egészséges alma aromakomponenseinek koncentrációja nem állandó ebben a kísérleti rendszerben, változik az idővel. A változás egységes a különböző vegyületekre, így összevetve a fertőzött almák illékony vegyületeivel, használható az összehasonlításra. Fertőzött almák illékony alkotóinak vizsgálatakor megállapítható, hogy főként az észterek és terpénvegyületek koncentrációi változnak a romlás folyamán. A kísérleti adataink alátámasztják azt a feltételezésünket, miszerint a mikroorganizmusok élettevékenységük során egyes észter vegyületeket elhasználnak, ezért ezek koncentrációjának csökkenése szemben az ép almákon tapasztalt koncentrációnövekedéssel a romlás előrejelzésére használható fel. Parciális legkisebb négyzetek (PLS) elve alapján történő regressziós módszerrel az észtervegyületek alapján az oltástól eltelt idő becsülhető.

3. *Penicillium expansum* fertőzött ‘Granny Smith’ minták illékony szerves vegyületeinek vizsgálata során elért új tudományos eredmények.

Az egészséges és a romlott alma megkülönböztetésben fontos vegyületek közül a pentánsav-etil-észter és a hexil-propanoát koncentrációja csökken a *P. expansum* fertőzött mintákban a romlás előrehaladtával, míg metil-3,3-dimetil-butanoát, etil-hexanoát és 1-metoxi-3-metilbenzol koncentrációja nő. A támogató vektor módszer regressziós változatával (SVR)

modellt építettünk, melyek alapján becsülni lehet a sztirol koncentrációját az oltástól eltelt napok számából.

4. Új tudományos eredmények a *Penicillium expansum*mal fertőzött *Prunus Salinica* minták esetén.

Főkomponens-elemzés segítségével kiválasztottam azokat a szerves illékony alkotókat, amelyek az egészséges és a romlott szilva megkülönböztetésben fontosak, majd az almák esetében talált lehetséges marker vegyületekkel hasonlítottam ezeket össze. Megállapítottam, hogy mind a szilván, mind az almán csak a *Penicillium expansum*mal oltott gyümölcsök esetében keletkeznek a következő marker vegyületek: sztirol, etil-benzoát, 1-metoxi-3-metil-benzol. Mivel ezek általánosan megjelennek az almán és a szilván is, feltételezhetjük, hogy a *Penicillium Expansum* más gyümölcsmintákon növekedve is termelheti őket.

5. Új tudományos eredmények a *Botrytis cinerea*val fertőzött *Prunus Salinica* minták esetén

Megállapítottam, a *Botrytis cinerea* esetében a romlott és az egészséges szilvák megkülönböztetésében fontos illékony szerves vegyületeket, ezek a butánsav-2-2-metil-hexil-észter, hexánsav-butyl-észter, ecetsav-hexil-észter, izopropil-alkohol, 2-metil-4-penténal. Ezek közül csak az izopropil-alkohol közös a *Penicillium expansum*mal oltott gyümölcsök esetében detektált vegyületekkel, azonban az izopropil-alkohol rövid retenciós ideje miatt ebben a modellrendszerben nem használható a romlás előrejelzésére.

Összefoglalás

Doktori dolgozatom célja a szilva és az alma minták penészes romlásának vizsgálata egyedi, marker vegyületek fellelésével. A betakarítás utáni veszteségek csökkentése érdekében napjainkban szabályozott légterű tárolókban raktározzák a gyümölcsöket. Ezen tárolókban a legkézenfekvőbb ellenőrzési módszer a légtér vizsgálata volna. Ideális esetben a légtérből való SPME mintavétellel, majd a minta GC-MS vizsgálatával meg tudjuk mondani, hogy a tárolóban megindult-e valamilyen romlási folyamat vagy nem. A doktori munkám során ennek az elképzelésnek a detektálási és adatfeldolgozási lehetőségeit vizsgáltam.

Korábbi kutatásokban már bizonyították, hogy a VOC-k alapján meg lehet határozni bizonyos mikrobiális törzseket, de a kibocsátott vegyületek nagyban függenek attól, hogy milyen táptalajon (gyümölcsön) növekednek a mikrobák és mik a környezeti tényezők. Az én megközelitésem arra irányul, hogy olyan vegyületeket találjak, amik általánosak több gyümölcsre és több mikrobára.

A vizsgálatokat *P. expansum* és *B. cinerea* penészgombákkal oltott alma és szilva mintákon végeztem. A minták légteréből az illékony szerves vegyületek egy szilárd fázisú adszorpciós felületen kötődnek meg, az SPME mintavevő szálon. A minták a gázkromatográfiás injektorban deszorbeálódtak, az elválasztásra és detektálásra GC-MS kapcsolt rendszert használtam. A kontroll és oltott gyümölcsöket a 4-12 napos tárolás során megfigyelés alatt tartottuk és majdnem minden nap vettünk mintát a légterükből. Szilvák esetében *P. expansum*mal oltott agar és kontroll agar mintákat is vizsgáltunk a romláshoz kötődő marker vegyületek keresésére. Ugyanezzel a mikroorganizmussal almákat is megfertőztünk. Többváltozós statisztikai módszerek alkalmazása elengedhetetlen volt a sikerhez. Változó kiválasztásra PCA és SOMs módszereket, a romlás becslésére PLS és SVR regressziós technikát alkalmaztunk.

A munka során egy modellrendszert, egy adatfeldolgozási és kísérleti módszert fejlesztettem az ismeretlen VOC-k mérésére. Az észterek és a terpének voltak a legfontosabb kémiai csoportok a VOC-k közül mind egészséges mind romlott gyümölcsök esetében. Míg az észterek koncentrációjának csökkenése vagy növekedése jól jellemzi a romlást, addig a terpének nagy száma és változékonysága (izomerek) ebben a GC-MS rendszerben nem alkalmas a romlás előrejelzésre. Mindkét gyümölcs esetében marker vegyületnek bizonyult a sztirol, 1-metoxi-metil-benzol és az etil-benzoát. A markerek már kimutathatók a légtérből a romlás szemmel látható jeleinek megjelenésével egyidőben. Nem találtunk olyan vegyületet amely *P. expansum* és *B. cinerea* esetében is alkalmas lenne romlás előrejelző modell építésére. A penészgombás

romlás kimutatásának lehetőségét bizonyítottuk. A VOC-k alapján a különböző romlási fázisban lévő gyümölcsöket csoportba lehet sorolni.

Summary

Aim of my doctoral thesis was to investigate the volatile organic compounds (VOCs) produced by fungi during the storage of fruit samples. The study was focused on examining *P. expansum* and *B. cinerea* inoculated deterioration of plum and apple samples by individual trace marker compounds. Fruits are stored in controlled atmosphere to reduce post-harvest losses. In order to perform post-harvest quality control of fruits stored in a controlled atmosphere the best way would be to directly monitor the atmosphere.

The ultimate goal is to be able to determine the spoilage process by SPME sampling, GC-MS measurement. This doctoral work investigated the details of volatile organic compounds (VOCs) detection and data processing options. Previous studies have shown that VOCs can be determined on the basis of certain microbial strains, but the compounds largely depend on what kind of medium (fruit) the microbes grow and what are the environmental factors. My approach is designed to find compounds that are common in many fruits and microbes.

Tests for *P. expansum*, *B. cinerea* were performed on mould inoculated apples and plums samples. The samples of volatile organic compounds from the atmosphere of the fruits were absorbed on a solid phase adsorption surfaces (SPME fiber), than were desorbed via a GC injector. For the separation and detection GC-MS hyphenated system was used. The control and inoculated fruits were stored for 4-12 days and samples were extracted from the atmosphere (atmosphere) of each fruit daily. *P. expansum* inoculated agar samples were tested for search of markers associated with spoilage as well. Because of the untargeted nature of the analysis applying multivariate statistics for comparing chromatographic data was crucial for success. Different chemometrical techniques were applied for prediction of fungal fruit spoilage. Principal Component Analysis (PCA) and Self Organising Maps (SOMs) were used to determine the marker compounds. To predict the spoilage time of apple samples PLS and SVR were used on the GC-MS dataset.

A model system, an analytical measurement method and an experimental approach were developed to search for untargeted marker VOCs in air samples. Esters and terpenes were the most important chemical groups both in case of healthy and spoiled fruit amongst the measured VOCs. Changes in the concentration of esters indicate well spoilage in laboratory circumstances, but terpenes are not suitable to make as automated system by GC-MS measurement. Styrene, 1-methoxy-3-ethylbenzene, ethylbenzoate were found in apples and plums in case of both fungus as an indicator of spoilage. Markers are detectable at the first day of visual spoilage. We could not find a compound that was suitable to build a model to forecast

both *P. expansum* and *B. cinerea* induced spoilage. The opportunity of creating an indicator system for fungal fruit spoilage was proven. Healthy and spoiled fruits in different spoilage stage can be distinguished and there is a possibility to make classes based on spoilage stages.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként családomnak szeretnék köszönetet mondani, akik lehetővé tették, hogy idáig eljuthassak; és barátaimnak a folyamatos támogatásért.

Témavezetőimnek, dr. Fodor Péternek, aki tanszékére befogadott és biztosította azt az anyagi és szakismereti háttérrel, melyre munkám épülhetett, dr. Héberger Károlynak az adatok értékelése során nyújtott kiemelkedő tanácsaiért és hogy a mentorom volt a kemometriai tanulmányaim során.

Köszönöm a támogatást az Alkalmazott Kémia Tanszék minden dolgozójának és doktorandusztársaimnak a munkám során nyújtott segítségért, folyamatos rendelkezésre állásért. Különösen dr. Woller Ágnesnek és Gyepes Attila Lobosnak akik a kutatási témával megismertettek, Tömöry Istvánnak, a munkához elengedhetetlen számítógépes háttér kitűnő megteremtését Sárvári Tímeának és Szurduk Sándornénak, aki külföldi utazásaim szervezésében és az elszámolásokban sietettek segítségemre és dr. Dernovics Mihálynak a kutatói élet útvesztőiben nyújtott útmutató tanácsaiért.

A mikrobiológia és biotechnológia tanszéken dr. Maráz Annának és dr. Pomázi Andreának a minták előállításáért és az adatok kiértékelésében nyújtott nélkülözhetetlen szakmai segítségükért.

A Bristol Egyetem Kemometria csoportjának, Prof. Richard Breretonnak, és dr. Sim Siong Fongnak az adattáblák létrehozásában nyújtott szoftveres és elméleti segítségért, amely nélkül az értékelések nem jöhettek volna létre és a közös publikációkért.

A diplomázó hallgatóknak, név szerint Romanszky Cecíliának és Ender Ágnesnek akik szorgalommal végezték azokat a méréseket és kísérleteket, melyek ehhez az értekezéshez is szükségesek voltak.

A Hűtő és Állatiternék technológia tanszéken dr. Hitka Gézának aki szakirodalom gyűjtésében segített. Az Érzékszervi Minősítő Laboratóriumban dr. Kókai Zoltánnak és dr. Sipos Lászlónak, valamint az Alkalmazott Fizikai Tanszéken Kovács Zoltánnak a kemometriai munkámban nyújtott támogatásukért és konzultációs lehetőségeikért.

Végül, de nem utolsósorban az anyagi háttérrel biztosító magyar állami doktori ösztöndíjat, a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KMR-2010-0005 számú projektet és a Budapesti Corvinus Egyetemet említem meg.

A dolgozathoz kapcsolódó publikációk listája

Impakt faktoros cikkek:

S.F.Sim and V.Sagi-Kiss, Multiple Self Organising Maps (mSOMs) for simultaneous classification and prediction: Illustrated by spoilage in apples using volatile organic profiles, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 109 (2011) 57–64

V. Sági-Kiss and P. Fodor, Development of a SPME-GC-MS method for spoilage detection in case of plums inoculated with *Penicillium Expansum*, Acta Alimentaria, Vol. 40 (Suppl.), pp. 188–197 (2011)

Sim S. Fong, Virág Sági-Kiss and Richard G. Brereton, 2010, Self-Organizing Maps and Support Vector Regression as aids to coupled chromatography: Illustrated by predicting spoilage in apples using volatile organic compounds, Talanta, 83, 1269-78 (2011)

Konferencia előadások:

Virág Sági-Kiss, Sim Fong, Andrea Pomázi, Péter Fodor, Richard G Brereton, Anna Maráz, 2009. Prediction of fungal fruit spoilage via detection of volatile organic compounds, 2nd Central European Forum for Microbiology (CEFORM), Keszthely, Hungary, 7-9 October 2009 (English), abstract: Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 56, page 167-168 (előadás összefoglaló)

Sági-Kiss Virág, Fodor Péter, Pomázi Andrea, Maráz Anna, 2009. Predicting spoilage in storehouses based on microbial metabolic profiling, Conference of Chemical Engineering '09, Veszprém, Hungary, 21-23 April 2009 (Hungarian), abstract: Conference Proceeding, page 103. (előadás összefoglaló)

Virág Sági-Kiss, Sim S. Fong, Andrea Pomázi, Péter Fodor, Richard G. Brereton, Anna Maráz, 2010, SPME, GC-MS integrated with chemometrics for prediction of fungal fruit spoilage, 7th Aegean Analytical Chemistry Days, 29 Sept – 03 Okt, Lesvos, Greece (poszter összefoglaló)

Sági-Kiss Virág, Fodor Péter, Pomázi Andrea, Maráz Anna, 2009. Predicting mouldy spoilage in storehouses based on microbial metabolic profiling, Conference of Chemical Engineering '10, Veszprém, Hungary, 27-29 April 2010 (Hungarian), abstract: Conference Proceeding, page 103 (poszter összefoglaló)

Virág Sági-Kiss, Sim Fong, Andrea Pomázi, Péter Fodor, Károly Héberger, Richard G Brereton, 2009 Pattern recognition and GCMS peak detection as an aid to predicting spoilage in fruit from production of volatile organic compounds (VOC). Conferentia Chemometrica 2009, Siófok, (English) , **legjobb poszter díj** (poszter összefoglaló)

Irodalomjegyzék

- Abrodo P. A., Llorente D. D., Corujedo S. J., de la Fuente E. D., Alvarez M. D. G., Gomis D. B. (2010): Characterisation of Asturian cider apples on the basis of their aromatic profile by high-speed gas chromatography and solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, 121 1312-1318. p.
- Amtmann M. (2009): "Különleges fajtamézék botanikai eredetének és illó komponenseinek összefüggése." Budapesti Corvinus Egyetem.
- Aprea E., Gika H., Carlin S., Theodoridis G., Vrhovsek U., Mattivi F. (2011): Metabolite profiling on apple volatile content based on solid phase microextraction and gas-chromatography time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218 4517-4524. p.
- Magyar Élelmiszerkönyv (1-2-88/388 számú előírás): "Az élelmiszerekben található aromaanyagok és az előállításukra szolgáló nyersanyagok." (66/1994 Kormányrendelet)
- Baldwin E. A., Nisperoscarriedo M. O., Baker R., Scott J. W. (1991): Quantitative-analysis of flavor parameters in 6 florida tomato cultivars (lycopersicon-esculentum mill). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 1135-1140. p.
- Balla C., Géza H., Krisztina H., István D. D., Katalin P. F., Jánosné Á., Jánosné A. S., Márta C. N., Gábor J., Klára D. P. H. (2008): "Kajszi és alma szabályozott légterű tárolási technológiájának fejlesztése." *Az alma és a kajszi környezetkímélő termesztésének, szüret utáni kezelésének és feldolgozásának fejlesztése a hevesi térségben.*, 37-42. o. Budapest: Magyar Mezőgazdaság Kft.
- Berrueta L. A., Alonso-Salces R. M., Heberger K. (2007): Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158 196-214. p.
- Blanda G., Cerretani L., Comandini P., Toschi T. G., Lercker G. (2009): Investigation of off-odour and off-flavour development in boiled potatoes. *Food Chemistry*, 118 283-290. p.
- Boelens H. F. M., Dijkstra R. J., Eilers P. H. C., Fitzpatrick F., Westerhuis J. A. (2004): New background correction method for liquid chromatography with diode array detection, infrared spectroscopic detection and Raman spectroscopic detection. *Journal of Chromatography A*, 1057 21-30. p.
- Boulanger R., Crouzet J. (2001): Identification of the aroma components of acerola (*Malpighia glabra* L.): free and bound flavour compounds. *Food Chemistry*, 74 209-216. p.
- Brereton R. (2009): Chemometrics for Pattern Recognition. Wiley.
- Bunk B., Kucklick M., Jonas R., Munch R., Schobert M., Jahn D., Hiller K. (2006): MetaQuant: a tool for the automatic quantification of GC/MS-based metabolome data. *Bioinformatics*, 22 2962-2965. p.
- Cevallos-Cevallos J. M., Reyes-De-Corcuera J. I., Etxeberria E., Danyluk M. D., Rodrick G. E. (2009): Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20 557-566. p.
- Chin S. T., Nazimah S. A. H., Quek S. Y., Man Y. B. C., Rahman R. A., Hashim D. M. (2007): Analysis of volatile compounds from Malaysian durians (*Durio zibethinus*) using headspace SPME coupled to fast GC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 31-44. p.
- Chu C. L. (1992): Postharvest control of San Jose Scale on apples by controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, 1 361-369. p.
- Comstock M. J., Comstock M. J. (1993): "Mass Spectrometry for the Characterization of Microorganisms, Copyright, 1993 Advisory Board, Foreword." *Mass Spectrometry for the Characterization of Microorganisms*, i-iv: American Chemical Society.
- Cunningham D. G., Acree T. E., Barnard J., Butts R. M., Braell P. A. (1986): Charm analysis of apple volatiles. *Food Chemistry*, 19 137-147. p.
- Deák-Kemény V.-K. (2004): Statisztikai elemzések a STATISZTIKA programmal. *Műegyetemi Kiadó, Budapest*, p.
- Dean J. R. (1998): Extraction methods for environmental analysis. John Wiley.
- Dixon S. J., Brereton R. G., Soini H. A., Novotny M. V., Penn D. J. (2006): An automated method for peak detection and matching in large gas chromatography-mass spectrometry data sets. *Journal of Chemometrics*, 20 325-340. p.
- Echeverria G., Fuentes T., Graell J., Lara I., López M. L. (2004a): Aroma volatile compounds of 'Fuji' apples in relation to harvest date and cold storage technology: A comparison of two seasons. *Postharvest Biology and Technology*, 32 29-44. p.
- Echeverria G., Graell J., Lopez M. L., Lara I. (2004b): Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of 'Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 31 217-227. p.
- Elke K., Begerow J., Oppermann H., Kramer U., Jermann E., Dunemann L. (1999): Determination of selected microbial volatile organic compounds by diffusive sampling and dual-column capillary GC-FID - a new feasible approach for the detection of an exposure to indoor mould fungi? *Journal of Environmental Monitoring*, 1 445-452. p.

- Elss S., Preston C., Appel M., Heckel F., Schreier P. (2006): Influence of technological processing on apple aroma analysed by high resolution gas chromatography-mass spectrometry and on-line gas chromatography-combustion/pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry. *Food Chemistry*, 98 269-276. p.
- Ender Á. (2010): "*Penicillium expansum* és *Botrytis cinerea* okozta gyümölcsromlás előrejelzésének lehetőségei illékony komponenseik meghatározásával." Budapesti Corvinus Egyetem.
- Fay L. B., Staempfli A. A. (1995): New approach to processing of gas chromatographic/mass spectrometric data for detection of off flavors in complex mixtures. *Journal of AOAC International*, 78 1429-1434. p.
- Ferreira L., Perestrelo R., Caldeira M., Camara J. S. (2009): Characterization of volatile substances in apples from Rosaceae family by headspace solid-phase microextraction followed by GC-qMS. *Journal of Separation Science*, 32 1875-1888. p.
- Figoli A., Tagarelli A., Cavaliere B., Voci C., Sindona G., Sikdar S. K., Drioli E. (2009): Evaluation of pervaporation process of kiwifruit juice by SPME-GC/Ion Trap Mass Spectrometry. *Desalination*, 250 1113-1117. p.
- Fong S. S., Sági-Kiss V., Brereton R. G. (2011): Self-Organizing Maps and Support Vector Regression as aids to coupled chromatography: Illustrated by predicting spoilage in apples using volatile organic compounds. *Talanta*, In Press, Corrected Proof p.
- Frenich A. G., Vidal J. L. M., Moreno J. L. F., Romero-Gonzalez R. (2009): Compensation for matrix effects in gas chromatography-tandem mass spectrometry using a single point standard addition. *Journal of Chromatography A*, 1216 4798-4808. p.
- Fries E., Puttmann W. (2006): Improvement of HS-SPME for analysis of volatile organic compounds (VOC) in water samples by simultaneous direct fiber cooling and freezing of analyte solution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386 1497-1503. p.
- Garcia C., Martin A., Timon M. L., Cordoba J. J. (2000): Microbial populations and volatile compounds in the 'bone taint' spoilage of dry cured ham. *Letters in Applied Microbiology*, 30 61-66. p.
- Gomez E., Ledbetter C. A. (1994): Comparative-study of the aromatic profiles of 2 different plum species - *prunus-salicina* lindl and *prunus-simonii* l. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65 111-115. p.
- Gomez E., Ledbetter C. A., Hartsell P. L. (1993): Volatile compounds in apricot, plum, and their interspecific hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 1669-1676. p.
- Griffith R. T., Jayachandran K., Shetty K. G., Whitstine W., Furton K. G. (2007): Differentiation of toxic Molds via headspace SPME-GC/MS and canine detection. *Sensors*, 7 1496-1508. p.
- Heather R. (1995): GCQ -MS Műszerkönyv. Finnigan MAT.
- Hitka G. (2011): "Kajszai szabályozott légterű tárolástechnológiájának fejlesztése." PhD értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem.
- Horai H., Arita M., Kanaya S., Nihei Y., Ikeda T., Suwa K., Ojima Y., Tanaka K., Tanaka S., Aoshima K., Oda Y., Kakazu Y., Kusano M., Tohge T., Matsuda F., Sawada Y., Hirai M. Y., Nakanishi H., Ikeda K., Akimoto N., Maoka T., Takahashi H., Ara T., Sakurai N., Suzuki H., Shibata D., Neumann S., Iida T., Tanaka K., Funatsu K., Matsuura F., Soga T., Taguchi R., Saito K., Nishioka T. (2010): MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry*, 45 703-714. p.
- Horvai G., Borosy A. P., Héberger K., Kolossváry I., Lengyel A., Paksy L., Rajkó R., Szepesváry P. (Szerk.: Horvai G.) (2001): Sokváltozós adatelemzés (Kemometria), 356. Budapest: Nemzeti Tankönyvkiadó
- Horvat R. J., Chapman G. W., Senter S. D., Robertson J. A., Okie W. R., Norton J. D. (1992): comparison of the volatile compounds from several commercial plum cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60 21-23. p.
- Hubert T., Tiebe C., Stephan I. (2010): Detection of fungal infestations of wood by ion mobility spectrometry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65 675-681. p.
- Ibáñez E., López-Sebastián S., Ramos E., Tabera J., Reglero G. (1998): Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, 63 281-286. p.
- Jansen R. (2009): "Detection of Pathogen Infection at Greenhouse Scale Through Plant Emitted Volatiles." PhD értekezés, Wageningen University, The Netherlands.
- Jansen R. M. C., Hofstee J. W., Wildt J., Vanthoor B. H. E., Verstappen F. W. A., Takayama K., Bouwmeester H. J., van Henten E. J. (2010): Health monitoring of plants by their emitted volatiles: A model to predict the effect of *Botrytis cinerea* on the concentration of volatiles in a large-scale greenhouse. *Biosystems Engineering*, 106 37-47. p.
- Jelen H., Walsowicz E. (1998): Volatile fungal metabolites and their relation to the spoilage of agricultural commodities. *Food Reviews International*, 14 391-426. p.
- Jia M. Y., Koziel J., Pawliszyn J. (2000): Fast field sampling/sample preparation and quantification of volatile organic compounds in indoor air by solid-phase microextraction and portable gas chromatography. *Field Analytical Chemistry and Technology*, 4 73-84. p.

- Jørgensen L. V. H., H.H.; Dalgaard, P. (2001): Significance of volatile organic compounds produced by spoilage in vacuum-packed cold-smoked salmon (*Salmo salar*) analyzed by GC-MS and multivariate regression. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2376-2381. p.
- Karlschoj K., Nielsen P. V., Larsen T. O. (2007): Prediction of *Penicillium expansum* spoilage and patulin concentration in apples used for apple juice production by electronic nose analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 4289-4298. p.
- Katajamaa M., OreÅiÄ M. (2007): Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Chromatography A*, 1158 318-328. p.
- Kemény Sándor D. A. (2000): Kísérletek tervezése és értékelése. *Műszaki Könyvkiadó*, p.
- Khan A. S., Singh Z. (2008): 1-Methylcyclopropene application and modified atmosphere packaging affect ethylene biosynthesis, fruit softening, and quality of 'Tegan blue' Japanese plum during cold storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133 290-299. p.
- Korány K., Amtmann M. (2005): A practical, theory-supported approach of linear temperature programmed gas chromatographic retention indices used in the recognition experiments of Hungarian food specialties, called "Hungarics". *Journal of Food Composition and Analysis*, 18 345-357. p.
- Kováts E. (1958): Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta*, 41 1915-1932. p.
- Krokida M. K., Philippopoulos C. (2006): Volatility of apples during air and freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 73 135-141. p.
- Kushalappa A. C., Lui L. H., Chen C. R., Lee B. (2002): Volatile fingerprinting (SPME-GC-FID) to detect and discriminate diseases of potato tubers. *Plant Disease*, 86 131-137. p.
- Kuske M., Romain A.-C., Nicolas J. (2005): Microbial volatile organic compounds as indicators of fungi. Can an electronic nose detect fungi in indoor environments? *Building and Environment*, 40 824-831. p.
- Lara I., Graell J., López M. L., Echeverría G. (2006): Multivariate analysis of modifications in biosynthesis of volatile compounds after CA storage of '[Fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 39 19-28. p.
- Larsen T. O., Frisvad J. C. (1994): A simple method for collection of volatile metabolites from fungi based on diffusive sampling from Petri dishes. *Journal of Microbiological Methods*, 19 297-305. p.
- Larsen T. O., Frisvad J. C. (1995): Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycological Research*, 99 1153-1166. p.
- Lopez M. L., Lavilla M. T., Recasens I., Graell J., Vendrell M. (2000): Changes in aroma quality of 'Golden Delicious' apples after storage at different oxygen and carbon dioxide concentrations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 311-324. p.
- Luedemann A., Strassburg K., Erban A., Kopka J. (2008): TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics*, 24 732-737. p.
- Maciejewska M., Miklosy E., Balo B. (2006): Wine differentiation of vineyard management regimes. *Acta Alimentaria*, 35 373-384. p.
- Marin S., Vinaixa M., Brezmes J., Llobet E., Vilanova X., Correig X., Ramos A. J., Sanchis V. (2007): Use of a MS-electronic nose for prediction of early fungal spoilage of bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 114 10-16. p.
- Matysik S., Herbarth O., Mueller A. (2008): Determination of volatile metabolites originating from mould growth on wall paper and synthetic media. *Journal of Microbiological Methods*, 75 182-187. p.
- Matysik S., Herbarth O., Mueller A. (2009): Determination of microbial volatile organic compounds (MVOCs) by passive sampling onto charcoal sorbents. *Chemosphere*, 76 114-119. p.
- Mauriello G., Capece A., D'Auria M., Garde-Cerdán T., Romano P. (2009): SPME-GC method as a tool to differentiate VOC profiles in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Food Microbiology*, 26 246-252. p.
- Mitra S. (2004): Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. John Wiley & Sons.
- Moalemiyan M., Vikram A., Kushalappa A. C. (2007): Detection and discrimination of two fungal diseases of mango (cv. Keitt) fruits based on volatile metabolite profiles using GC/MS. *Postharvest Biology and Technology*, 45 117-125. p.
- Moularat S., Robine E., Ramalho O., Oturan M. A. (2008): Detection of fungal development in a closed environment through the identification of specific VOC: Demonstration of a specific VOC fingerprint for fungal development. *Science of the Total Environment*, 407 139-146. p.
- Mu R. M., Wang X. R., Liu S. X., Yuan X. L., Wang S. B., Fan Z. Q. (2007): Rapid determination of volatile compounds in *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem. by MAE-HS-SPME followed by GC-MS. *Chromatographia*, 65 463-467. p.
- Nilsson T., Larsen T. O., Montanarella L., Madsen J. O. (1996): Application of head-space solid-phase microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted by *Penicillium* species. *Journal of Microbiological Methods*, 25 245-255. p.

- Ong B. T., Nazimah S. A. H., Tan C. P., Mirhosseini H., Osman A., Hashim D. M., Rusul G. (2008): Analysis of volatile compounds in five jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) cultivars using solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOFMS). *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 416-422. p.
- Page B. D., Lacroix G. (1993): Application of solid-phase microextraction to the headspace gas chromatography analysis of halogenated volatiles in selected foods. *Journal of Chromatography*, 648 199-211. p.
- Paliyath G., Whiting M. D., Stasiak M. R., Murr D. P., Clegg B. S. (1997): Volatile production and fruit quality during development of superficial scald in Red Delicious apples. *Food Research International*, 30 95-103. p.
- Pawliszyn J. (2001): Solid-phase microextraction: Theory and Practice. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Pellati F., Benvenuti S., Yoshizaki F., Bertelli D., Rossi M. C. (2005): Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis of the volatile compounds of *Evodia* species fruits. *Journal of Chromatography A*, 1087 265-273. p.
- Penalver A., Pocurull E., Borrull F., Marce R. M. (2000): Determination of phthalate esters in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 872 191-201. p.
- Penn D. J., Oberzaucher E., Grammer K., Fischer G., Soini H. A., Wiesler D., Novotny M. V., Dixon S. J., Xu Y., Brereton R. G. (2007): Individual and gender fingerprints in human body odour. *Journal of the Royal Society Interface*, 4 331-340. p.
- Pitt J. I., Hocking A. D. (2009): "*Penicillium* subgenus *Penicillium*." *Fungi and food spoilage*, edited by Pitt J.I. H. A. D., 223-225: Springer.
- Pongsuwan W., Fukusaki E., Bamba T., Yonetani T., Yamahara T., Kobayashi A. (2006): Prediction of Japanese Green Tea Ranking by Gas Chromatography/Mass Spectrometry-Based Hydrophilic Metabolite Fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 231-236. p.
- Pontes M., Marques J. C., Camara J. S. (2009): Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometric methodology for the establishment of the volatile composition of *Passiflora* fruit species. *Microchemical Journal*, 93 1-11. p.
- Prithiviraj B., Vikram A., Kushalappa A. C., Yaylayan V. (2004): Volatile metabolite profiling for the discrimination of onion bulbs infected by *Erwinia carotovora* ssp *carotovora*, *Fusarium oxysporum* and *Botrytis allii*. *European Journal of Plant Pathology*, 110 371-377. p.
- Raffo A., Kelderer M., Paoletti F., Zanella A. (2009): Impact of Innovative Controlled Atmosphere Storage Technologies and Postharvest Treatments on Volatile Compound Production in Cv. Pinova Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 915-923. p.
- Rapparini F., Baraldi R., Facini O. (2001): Seasonal variation of monoterpene emission from *Malus domestica* and *Prunus avium*. *Phytochemistry*, 57 681-687. p.
- Reis S., Rocha S. M., Barros A. S., Delgadillo I., Coimbra M. A. (2009): Establishment of the volatile profile of 'Bravo de Esmolfe' apple variety and identification of varietal markers. *Food Chemistry*, 113 513-521. p.
- Rivka G.-B. (2001): Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables Development and Control. *Elsevier B.V.*, p.
- Romanszky C. (2009): "Meg lehet-e becsülni az almák penészes romlását szemrevételezés nélkül?" Budapesti Corvinus Egyetem.
- Romeo V., Ziino M., Giuffrida D., Condurso C., Verzera A. (2007): Flavour profile of capers (*Capparis spinosa* L.) from the Eolian Archipelago by HS-SPME/GC-MS. *Food Chemistry*, 101 1272-1278. p.
- Rothe M. (1987): Volatile compounds in food — qualitative data. Suppl. 1 (herausgegeben von H. Maarse) und Suppl. 2 (herausgegeben von H. Maarse und C. A. Visscher) zur 5.Aufl. Division for Nutrition and Food Research TNO, Institute CIVO — Analysis TNO, Zeist 1984 bzw. 1985. Preis: je Suppl. 140, — Dfl. *Food / Nahrung*, 31 38-38. p.
- Roux A. I., Lison D., Junot C., Heilier J.-F. o. (2011): Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clinical Biochemistry*, 44 119-135. p.
- Rudell D. R., Mattheis J. P., Curry E. A. (2008): Prestorage Ultraviolet~White Light Irradiation Alters Apple Peel Metabolome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 1138-1147. p.
- Saevels S., Lammertyn J., Berna A. Z., Veraverbeke E. A., Di Natale C., Nicolai B. M. (2004): An electronic nose and a mass spectrometry-based electronic nose for assessing apple quality during shelf life. *Postharvest Biology and Technology*, 31 9-19. p.
- Sagi-Kiss V., Fodor P. (2011): Development of a SPME-GC-MS method for spoilage detection in case of plums inoculated with *Penicillium expansum*. *Acta Alimentaria*, 40 188-197. p.
- Schaller E., Bosset J. O., Escher F. (1998): []Electronic Noses' and Their Application to Food. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 31 305-316. p.

- Schnurer J., Olsson J., Borjesson T. (1999): Fungal Volatiles as Indicators of Food and Feeds Spoilage. *Fungal Genetics and Biology*, 27 209-217. p.
- Schwalbe R., Moller M., Ostrowski R., Dott W. (1999): Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility. *Chemosphere*, 39 795-810. p.
- Sérot T., Lafficher C. (2003): Optimisation of solid-phase microextraction coupled to gas chromatography for determination of phenolic compounds in smoked herring. *Food Chemistry*, 82 513-519. p.
- Siripatrawan U., Harte B. R. (2007): Solid phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry integrated with chemometrics for detection of Salmonella typhimurium contamination in a packaged fresh vegetable. *Analytica Chimica Acta*, 581 63-70. p.
- Solis-Solis H. M., Calderon-Santoyo M., Gutierrez-Martinez P., Chorr-Galindo S. S., Ragazzo-Sanchez J. A. (2007): Discrimination of eight varieties of apricot (*Prunus armeniaca*) by electronic nose, LLE and SPME using GC-MS and multivariate analysis. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 125 415-421. p.
- Song J., Bangerth F. (1996): The effect of harvest date on aroma compound production from 'Golden Delicious' apple fruit and relationship to respiration and ethylene production. *Postharvest Biology and Technology*, 8 259-269. p.
- Sturm K. (2008): "A Japán szilva romlási folyamatában résztvevő penészgombák izolálása és vizsgálata." diplomamunka, Budapesti Corvinus Egyetem.
- Sunesson A.-L., Nilsson C.-A., Andersson B., Blomquist G. (1996): Volatile metabolites produced by two fungal species cultivated on building materials. *The Annals of Occupational Hygiene*, 40 397-410. p.
- MSZ 7075:2000, Magyar Szabvány: "Szabályozott légterű kamrák gyümölcsök tárolására."
- Tholl D., Boland W., Hansel A., Loreto F., Rose U. S. R., Schnitzler J. P. (2006): Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant Journal*, 45 540-560. p.
- Tikunov Y., Lommen A., de Vos C. H. R., Verhoeven H. A., Bino R. J., Hall R. D., Bovy A. G. (2005): A Novel Approach for Nontargeted Data Analysis for Metabolomics. Large-Scale Profiling of Tomato Fruit Volatiles. *Plant Physiol.*, 139 1125-1137. p.
- Tomcsányi P. (1987): Információk a gyümölcs fajtákról. Mezőgazdasági Kiadó.
- Tóth M. G. (2001): Gyümölcsészet. Nyíregyháza PIRIMON Kiadó.
- Tsugawa H., Tsujimoto Y., Arita M., Bamba T., Fukusaki E. (2011): GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *Bmc Bioinformatics*, 12 p.
- Uithoven K. A., Schmidt J. C., Ballman M. E. (2000): Rapid identification of biological warfare agents using an instrument employing a light addressable potentiometric sensor and a flow-through immunofiltration-enzyme assay system. *Biosensors and Bioelectronics*, 14 761-770. p.
- Vallat A., Gu H. N., Dorn S. (2005): How rainfall, relative humidity and temperature influence volatile emissions from apple trees in situ. *Phytochemistry*, 66 1540-1550. p.
- van Dam N. M., Poppy G. M. (2008): Why plant volatile analysis needs bioinformatics - detecting signal from noise in increasingly complex profiles. *Plant Biology*, 10 29-37. p.
- Vermeir S., Hertog M., Vankerschaver K., Swennen R., Nicolai B. M., Lammertyn J. (2009): Instrumental based flavour characterisation of banana fruit. *Lwt-Food Science and Technology*, 42 1647-1653. p.
- Vikram A., Hamzehzarghani H., Kushalappa A. C. (2005): Volatile metabolites from the headspace of onion bulbs inoculated with postharvest pathogens as a tool for disease discrimination. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie*, 27 194-203. p.
- Vikram A., Lui L. H., Hossain A., Kushalappa A. C. (2006): Metabolic fingerprinting to discriminate diseases of stored carrots. *Annals of Applied Biology*, 148 17-26. p.
- Vikram A., Prithiviraj B., Hamzehzarghani H., Kushalappa A. (2004a): Volatile metabolite profiling to discriminate diseases of McIntosh apple inoculated with fungal pathogens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84 1333-1340. p.
- Vikram A., Prithiviraj B., Kushalappa A. C. (2004b): Use of volatile metabolite profiles to discriminate fungal diseases of Cortland and empire apples. *Journal of Plant Pathology*, 86 215-225. p.
- Voon Y. Y., Hamid N. S. A., Rusul G., Osman A., Quek S. Y. (2007): Volatile flavour compounds and sensory properties of minimally processed durian (*Durio zibethinus* cv. D24) fruit during storage at 4 degrees C. *Postharvest Biology and Technology*, 46 76-85. p.
- Wan X. M., Stevenson R. J., Chen X. D., Melton L. D. (1999): Application of headspace solid-phase microextraction to volatile flavour profile development during storage and ripening of kiwifruit. *Food Research International*, 32 175-183. p.
- Wang L., Vestheim S. (2003): Controlled atmosphere storage of Norwegian grown plums (*Prunus domestica* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 53 33-37. p.
- Wierda R. L., Fletcher G., Xu L., Dufour J. P. (2006): Analysis of volatile compounds as spoilage indicators in fresh king salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during storage using SPME-GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 8480-8490. p.

- Wilkes J. G., Conte E. D., Kim Y., Holcomb M., Sutherland J. B., Miller D. W. (2000): Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *Journal of Chromatography A*, 880 3-33. p.
- Wilkins C. L., Lay J. O. (2006): Identification Of Microorganisms By Mass Spectrometry. John Wiley.
- Wong J. W. H., Durante C., Cartwright H. M. (2005): Application of fast fourier transform cross-correlation for the alignment of large chromatographic and spectral datasets. *Analytical Chemistry*, 77 5655-5661. p.
- Xu Y., Cheung W., Winder C. L., Goodacre R. (2010): VOC-based metabolic profiling for food spoilage detection with the application to detecting Salmonella typhimurium-contaminated pork. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397 2439-2449. p.
- Zhang Y., Li Y., Qiu F., Qiu Z. (2010): Comparative analysis of the human urinary proteome by 1D SDS-PAGE and chip-HPLC-MS/MS identification of the AACT putative urinary biomarker. *Journal of Chromatography B*, 878 3395-3401. p.
- Zhang Z.-M., Wu W.-W., Li G.-K. (2008): A GC-MS Study of the Volatile Organic Composition of Straw and Oyster Mushrooms During Maturity and its Relation to Antioxidant Activity. *Journal of Chromatographic Science*, 46 690-696. p.
- Zhu Y., Rudell D. R., Mattheis J. P. (2008): Characterization of cultivar differences in alcohol acyltransferase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression and volatile ester emission during apple fruit maturation and ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 49 330-339. p.
- Zolotov Y. (2011): Analytical identification of microorganisms. *Journal of Analytical Chemistry*, 67 189-189. p.
- Zou X. B., Zhao H. W. (2008): Comparative analyses of apple aroma by a tin-oxide gas sensor array device and GC/MS. *Food Chemistry*, 107 120-128. p.