

Módszerfejlesztés Fourier-transzformációs közeli infravörös
technika (FT-NIR) alkalmazási körének kibővítésére élelmiszeripari
mintákon

Doktori értekezés

Szigedi Tamás

Témavezetők: Dr. Fodor Marietta

Dr. Dernovics Mihály

Budapest

2013.

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Felföldi József**
egyetemi tanár, PhD
Budapesti Corvinus Egyetem

Témavezető: **Dr. Fodor Marietta**
habilitált egyetemi docens
Alkalmazott Kémia Tanszék
Élelmiszertudományi Kar
Budapesti Corvinus Egyetem

Dr. Dernovics Mihály
habilitált egyetemi docens
Alkalmazott Kémia Tanszék
Élelmiszertudományi Kar
Budapesti Corvinus Egyetem

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 2013. december 3-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Biacs Péter, DSc

Tagjai

Vozáry Eszter, CSc, Habil.

Turza Sándor, PhD

Opponensek

Salgó András, DSc

Váradi Mária, CSc

Titkár

Jókainé Szatura Zsuzsa, PhD

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	11
1. BEVEZETÉS	14
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	16
2.1. Az elektromágneses sugárzás	16
2.2. Az infravörös sugárzás és molekulák kölcsönhatása	17
2.3. Az infravörös sugárzás és a minta kölcsönhatása	20
2.3.1. Reflexiós mérési mód	21
2.3.2. Transzmissziós mérési mód	22
2.3.3. Transzfleksziós mérési mód	22
2.4. Az infravörös sugárzás analitikai alkalmazása – az infravörös spektroszkópia	23
2.4.1. Történeti áttekintés	23
2.4.2. Műszaki megoldások a közeli infravörös spektroszkópiában	24
2.4.2.1. Fényforrások	25
2.4.2.2. Optikai rendszerek	25
2.4.2.3. Detektorok	27
2.5. A mennyiségi meghatározás általános aspektusai infravörös spektroszkópiánál	28
2.6. Többváltozós becslési függvények – kemometriai alapok	30
2.6.1. Függvény transzformációs műveletek	31
2.6.2. Főkomponens analízis - Principal Component Analysis (PCA)	32
2.6.3. Részleges legkisebb négyzetek módszere – Partial Least Squares (PLS)	33
2.6.4. Neurális hálózatok rendszere-Artificial Neural Networks (ANN)	34
2.6.5. Becslési függvények validálási eljárásai	35
2.6.6. Becslési függvények statisztikai paraméterei	36
2.7. Az infravörös spektroszkópia élelmiszeripari alkalmazásai	38
2.7.1. Minták és komponensek	38
2.7.2. Mintaelőkészítési alapelvek NIR mérésekhez	41
2.7.3. Vizsgált élelmiszercsoportok	42
2.7.3.1. Sütőipari termékek	42
2.7.3.2. Szárasztészta	43
2.7.3.3. Sajtok	44
2.7.3.4. Zöldségfélék	47

3. CÉLKITŰZÉS	50
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	52
4.1. Vizsgált minták	52
4.1.1. Sütőipari termékek	52
4.1.2. Szárzészta	52
4.1.3. Sajt	53
4.1.4. Keresztesvirágúak (<i>Brassicales</i>) rendjébe tartozó zöldségek	53
4.1.5. Pillangósvirágúak (<i>Fabaceae</i>) családjába tartozó hüvelyesfélék	53
4.2. Az alkalmazott minta-előkészítési technikák bemutatása	54
4.3. Referenciamódszerek	54
4.3.1. Fehérjetartalom meghatározása	54
4.3.2. Zsírtartalom meghatározása	55
4.3.3. Tojástartalom meghatározása	55
4.3.4. Cukortartalom meghatározása	56
4.3.5. Összes energia-tartalom meghatározása	56
4.4. Alkalmazott szoftverek és statisztikai módszerek	56
4.4.1. Spektrum-transzformációs műveletek	57
4.4.2. Főkomponens analízis (PCA)	57
4.4.3. Részleges legkisebb négyzetek módszere (PLS)	57
4.5. FT-NIR/NIT spektrométer	57
5. EREDMÉNYEK	60
5.1. Sütőipari termékek	60
5.1.1. Fehérjetartalom meghatározása	60
5.1.1.1. Dumas módszer alkalmazása	60
5.1.1.2. FT-NIR módszerfejlesztés	61
5.1.2. Zsírtartalom meghatározása	64
5.1.2.1. Weibull-Stoldt módszer alkalmazása	64
5.1.2.2. FT-NIR módszerfejlesztés	65
5.1.3. Cukortartalom meghatározása	68
5.1.3.1. Szabványmódszer alkalmazása	68
5.1.3.2. FT-NIR módszerfejlesztés	68
5.2. Szárzészta	71
5.2.1. Zsírtartalom meghatározása	71
5.2.1.1. Weibull-Stoldt módszer alkalmazása	71
5.2.1.2. FT-NIR módszerfejlesztés	72

5.2.2. Tojástartalom meghatározása	75
5.2.2.1. Meghatározás számolással	76
5.2.2.2. FT-NIR módszerfejlesztés	77
5.3. Sajtminták	80
5.3.1. Fehérjetartalom meghatározása	80
5.3.1.1. Kjeldahl módszer alkalmazása	80
5.3.1.2. FT-NIR módszerfejlesztés	80
5.3.2. Zsírtartalom meghatározása	84
5.3.2.1. Schmid-Bondzynski-Ratzlaff-féle módszer alkalmazása	84
5.3.2.2. FT-NIR módszerfejlesztés	85
5.4. Keresztesvirágúak – <i>Brassicaceae</i> család <i>Brassica</i> nemzetsége	88
5.4.1. Fehérjetartalom meghatározása	88
5.4.1.1. Kjeldahl módszer alkalmazása	88
5.4.2. Zsírtartalom meghatározása	92
5.4.2.1. Módosított Weibull-Stoldt módszer alkalmazása	92
5.4.2.2. FT-NIR módszerfejlesztés	93
5.5. Pillangósvirágúak – <i>Fabales</i> rendhez tartozó <i>Fabaceae</i> család	96
5.5.1. Fehérjetartalom meghatározása	96
5.5.1.1. Kjeldahl módszer alkalmazása	96
5.5.1.2. FT-NIR módszerfejlesztés	97
5.5.2. Zsírtartalom meghatározása	101
5.5.2.1. Módosított Weibull-Stoldt módszer alkalmazása	101
5.5.2.2. FT-NIR módszerfejlesztés	102
5.5.3. Összes energia-tartalom meghatározása	105
A <i>Fabaceae</i> minták összes energia-tartalmának meghatározására irányuló kísérleteket	
Spanyolországban végeztem el, ahová csak 80 mintát vittem magammal, ebből fakad az eredeti	
darabszám csökkenése az előző fejezetben bemutatotthoz képest	105
5.5.3.1. Adiabtikus kaloriméter alkalmazása	105
5.5.3.2. FT-NIR módszerfejlesztés	106
6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	112
7. ÖSSZEFOGLALÁS	114
MELLÉKLETEK	122

Rövidítések jegyzéke

<u>Rövidítés</u>	<u>Angol megfelelő</u>	<u>Magyar megfelelő</u>
A	Absorbance	abszorbancia
ANN	artificial neural networks	mesterséges neurális hálózatok
AOAC	Association of Official Analytical Chemists	Analitikai Kémikusok Hivatalos Szövetsége
AOTF	acousto optical tunable filter	akusztó-optikusan hangolható szűrő
BIAS	-	szisztematikus hiba
CAH	Codex Alimentarius Hungaricus	Magyar Élelmiszerkönyv
DER1	first derivative	első derivált
DER2	second derivative	második derivált
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	enzimhez kötött immunoszorbens eljárás
FIR	far infrared	távoli infravörös
FTIR	Fourier-transform infrared	Fourier-transzformációs infravörös
FTIR-ATR	Fourier transform infrared Total attenuated reflectance	Fourier-transzformációs teljes csillapított reflexió
FT-NIR	Fourier-transform near infrared	Fourier-transzformációs közeli infravörös spektroszkópia
IR	Infrared	infravörös
LED	laser emitting diode	fény kibocsátó dióda
LS-SVM	least squares support vector machines	legkisebb négyzetek módszerén alapuló támogató algoritmus
MIR	middle infrared	középső infravörös
MLR	multiple linear regression	többszörös lineáris regresszió

mPLS	modified partial least squares	módosított részleges legkisebb négyzetek módszere
MSC	multiplicative scatter correction	többszörös szóródási korrekció
MSZ	-	Magyar Szabvány
NIR	near infrared reflectance	közeli infravörös reflexió
NIRS	near infrared spectroscopy	közeli infravörös spektroszkópia
NIT	near infrared transmittance	közeli infravörös transzmisszió
PAT	process analytical technology	folyamat analitikai technika
PC	principal component	főkomponens
PCA	principal component analysis	főkomponens analízis
PCR	principal component regression	főkomponens regresszió
PLS	partial least squares	részleges legkisebb négyzetek módszere
R^2	-	determinációs együttható
Rank	number of PLS factors	PLS faktorok száma
RMSECV	root mean square error of cross-validation	kereszt-validáció átlagos négyzetes hibája
RMSEE	root mean square error of estimation	becslés átlagos négyzetes hibája
RMSEP	root mean square error of prediction	becslés átlagos négyzetes hibája
RPD	residual prediction deviation	reziduális becslési eltérés
SD	standard deviation	szórás
SECV	standard error of cross-validation	keresztvalidáció hibája
SEL	standard error of laboratory	referencia módszer hibája
SEP	standard error of prediction	becslés hibája

SNV	standard normal variate	standard normál változó
SSE	sum of square error	hibák négyzetösszege
sz.a.		szárazanyag
USDA	United States Department of Agriculture	Egyesült Államok Mezőgazdasági Minisztériuma
UV	ultra violet	ibolyántúli fény
VIS	visible	látható fény

1. Bevezetés

Az élelmiszerek beltartalmi paramétereinek vizsgálata az élelmiszeriparban a gyártás és forgalmazás alapját képezik legyen szó minőségi vagy mennyiségi meghatározásról. A termékeknek és a gyártóknak meg kell felelni a hatóság és a fogyasztók oldaláról támasztott szigorú szabályozásnak és magas minőségi követelményeknek. A fizikai és kémiai paraméterek meghatározása, ellenőrzése a Magyar Élelmiszekönyvben (Codex Alimentarius Hungaricus) rögzítettek alapján laboratóriumban végezhető el klasszikus fizikai vagy kémiai eljárásokkal. Ezek rendszerint nagy munkaerő-, idő- és költségigényűek mindemellett a meghatározásokhoz használt vegyszerek magas környezeti terhelést jelentenek.

A terhelés csökkentésére törekvő módszerek, úgynevezett zöld kémiai eljárások kb. egy évtizede jelentek meg új irányvonalként az élelmiszeranalitikában. Céljuk, hogy a klasszikus mérési módszereket felváltsák illetve alternatívát kínáljanak az ellenőrzést végzők számára. A fent említett csoportba tartozik a közeli infravörös technika (NIR) is, mely roncsolásmentes gyorsvizsgálati módszerként terjed egyre szélesebb körben.

A NIR méréstechnika az 1960-as években vált ismertté a mezőgazdaságban gabonák minőségellenőrzése kapcsán. Az azóta eltelt 50 év alatt oly mértékű fejlődés mutatkozott mind műszerek, mind pedig a szoftveres támogatás terén, hogy napjainkban a gabonatermesztők kombájnjaira telepített készülékekkel a betakarítás pillanatában tudomást szereznek az alapanyag legfontosabb minőségi paramétereiről. Az alkalmazási területek a meghatározható komponensek és mintamátrixok körét tekintve egyre gyarapodnak, mivel egy mérés költsége jóval kevesebb a laboratóriumi meghatározásától. Fontos, hanem legfontosabb előnye a méréstechnikának az azonnali válasz, mely a termelőüzemekben, gyártósorokon a legfontosabb elvárás. A berendezések egyszerű kialakítása lehetővé teszi akár a gyártásközi folyamatellenőrzést és a mérési eredménytől függően az azonnali szabályozást is. A technikai fejlesztések eredményeképpen ma már elérhetőek a piacon olyan kézi készülékek is, melyekkel az állattenyésztéssel kapcsolatos eredetvizsgálatot az élő állatokon el lehet végezni, ezt nevezik 'on farm' technikának.

A gyors rutinanalízisek végrehajtása megkönnyíti a gyártók munkáját, a vásárlók megfelelő tájékoztatását szolgálja, ezért a dolgozat célja olyan becslési függvények felállítása közeli infravörös spektroszkópia használatával, melyek a későbbiekben alapul szolgálhatnak különböző élelmiszerek beltartalmi paramétereinek vizsgálatához.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az elektromágneses sugárzás

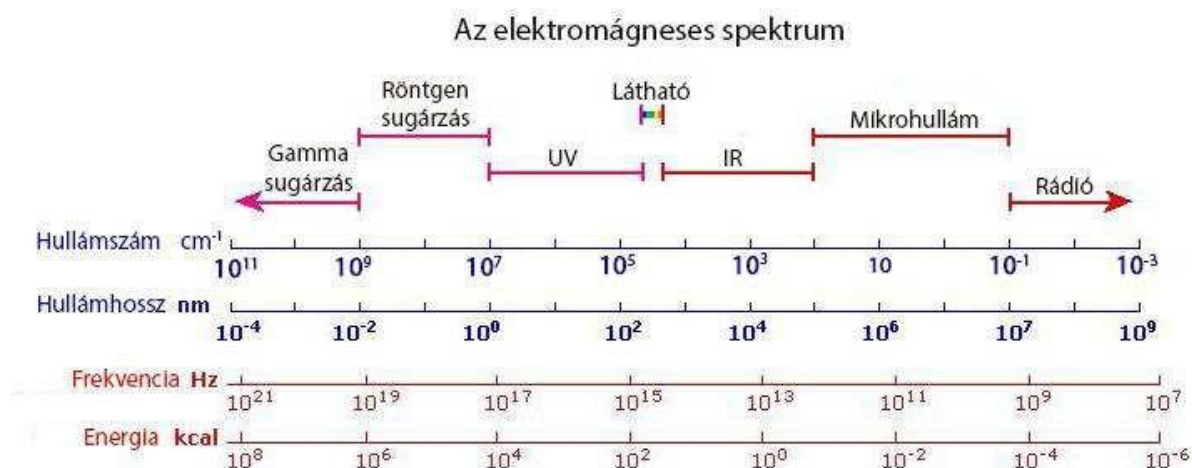
Az elektromágneses mező átfogó elméletének matematikai kidolgozása J. C. Maxwell skót fizikus nevéhez fűződik (1873). Maxwell számításai szerint az elektromos töltéstől elszakadó, térben tovaterjedő elektromágneses mező – más néven elektromágneses sugárzás – a transzverzális hullámok tulajdonságaival rendelkezik. Elméletéből arra is lehetett következtetni, hogy a fény is elektromágneses hullám.

Maxwell elmélete mindaddig feltételezés maradt, amíg H. Hertz német fizikusnak 1888-ban kísérletekkel sikerült igazolnia az elektromágneses hullámok létezését és azok Maxwell által „megjósolt” tulajdonságait: a visszaverődést, a törést, az interferenciát, az elhajlást és a polarizációt. Az elektromágneses hullámok hullámhossz (vagy frekvencia) szerinti sorozatát teljes elektromágneses színeképnek nevezzük.

Az elektromágneses sugárzás energiája és frekvenciája között arányos kapcsolat van az $E = h \cdot \nu$ összefüggés értelmében, ahol az arányossági tényező a Planck-féle állandó ($h = 6,6 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$). A sugárzás frekvenciája (ν) és hullámhossza (λ) közötti kapcsolatot a $\nu = \frac{c}{\lambda}$, a frekvencia (ν) és a

hullámszám ($\tilde{\nu}$) közötti kapcsolatot a $\nu = c \cdot \tilde{\nu}$ kifejezéssel adhatjuk meg, amely kifejezésekben c a fényterjedési sebessége vákuumban (Pokol, 2011).

Az elektromágneses sugárzás spektrumának tartományait a hullámhossz, frekvencia illetve az energia függvényében az 1. ábrán mutatom be.



1. ábra: Az elektromágneses sugárzás tartományai

(<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/UV-Vis/spectrum.htm>, 2011)

Az infravörös sugárzás széles spektrumát közeli = NIR ($\lambda = 780 - 2500$ nm, $E = 2,5 \cdot 10^{-19} - 1,9 \cdot 10^{-19}$ J), középső = MIR ($\lambda = 2,5 - 25 \mu\text{m}$, $E = 1,9 \cdot 10^{-19} - 6,6 \cdot 10^{-21}$ J) és távoli = FIR ($\lambda = 25 - 300 \mu\text{m}$, $E = 6,6 \cdot 10^{-21} - 6,6 \cdot 10^{-22}$) tartományra osztják (Pokol, 2011).

2.2. Az infravörös sugárzás és molekulák kölcsönhatása

Szerves molekulák vizsgálata

Az infravörös sugárzás energiája ahhoz elegendő, hogy a molekulák rezgési átmeneteit illetve az ezekre szuperponálódó forgási átmeneteket gerjesszük.

A legalább három atomos molekulák rezgési és forgási állapotának megváltozása akkor jelenik meg az infravörös spektrumban, ha megváltozik a molekula dipólus momentuma is. A dipólusmomentum a pozitív töltés és a töltések közti távolság szorzata. Egy kétatomos molekulában a dipólusmomentum a kötés poláris jellegének a mértéke, vagyis az átlagos elektrontöltés eltolódása valamelyik atom felé. Egy többatomos molekulában a dipólusmomentum az egyes kötések dipólusmomentumainak vektoriális összege. Ha a dipólusmomentum nem változik, az infravörös spektrumra az adott rezgés nem lesz hatással (nem „IR aktív”). A spektrumban kialakult sávok száma a molekula szimmetriájától függ. Minél kisebb a szimmetria, annál több sáv figyelhető meg az infravörös spektrumban. A sávok

jellemző helyét a spektrumban (hullámhosszát) a molekulát alkotó atomok tömege, az atomok közötti kötések típusa és a molekulát alkotó atomok által kialakított környezet határozza meg.

A molekulák rezgései lehetnek vegyértékrezgések illetve deformációs rezgések. A vegyértékrezgések esetén a kovalens kötések hossza változik periodikusan a kötés irányában, így megkülönböztetünk aszimmetrikus és szimmetrikus vegyértékrezgést. A deformációs rezgések esetén csak a kötőszögek változnak periodikusan. Típusai szerint megkülönböztetünk a molekula síkjában és a síkra merőleges deformációs rezgéseket. A síkban deformációs rezgések közé tartozik az ún. ollózó (*scissoring*) és kaszáló (*rocking*) rezgés. Az ollózó rezgés szimmetrikus, míg a kaszáló rezgés aszimmetrikus. A síkra merőleges deformációs rezgések a torziós (*twisting*) és bólogató (*wagging*) rezgéstípusok. A torziós rezgés aszimmetrikus, síkra merőleges, míg a bólogató szimmetrikus, síkra merőleges rezgéstípus. A felsorolt rezgéstípusokat normálrezgéseknek nevezzük. A fent említett típusokonkívül megkülönböztetünk még vázrezgéseket is, melyek hasonlóképpen csoportosíthatók, mint a normálrezgések. A vázrezgések között megkülönböztetünk váz vegyértékrezgést, a gyűrű síkjában végbemenő deformációs vázrezgést valamint a gyűrű síkjára merőleges deformációs rezgést.

Vizsgáljuk meg, hogyan alakul ki egy infravörös spektrum, s milyen tényezők hatásával kell számolnunk.

Jellemzően a C-H, C-C, C=C és C≡C kötések vegyérték illetve deformációs rezgései hozzák létre az infravörös színeképet. A szénláncban kapcsolódó szubsztituensek elektron vonzó/küldő hatását vizsgálva megállapítható, hogy az elektronvonzó csoportok a szomszédos kötések vegyértékrezgéseit megnövelik, hiperkonjugáció, induktív és mezomer effektusok jönnek létre. Amennyiben a szénláncban a térben közel levő atomok/atomcsoportok kapcsolódnak, ezek akadályozzák egymás elmozdulását, hullámhossz csökkenést/frekvencia (hullámszám) növekedést figyelhetünk meg.

A szénláncban található kötéstípusok hatását vizsgálva megállapítható, minél nagyobb a kötésenergia, annál nagyobb energia szükséges a vegyértékrezgés gerjesztéséhez, tehát a kötésekhez tartozó sávok annál kisebb hullámhossznál/nagyobb hullámszámmal jelennek meg. A C-C kötések tartománya jellemzően 1100 - 1300 nm ($9090 - 7700 \text{ cm}^{-1}$), a C=C kötésekhez tartozó sávok 1600 - 1700 nm ($6250 - 5880 \text{ cm}^{-1}$) tartományban, a C≡C kötések sávjai 2100 - 2300 nm ($4760 - 4350 \text{ cm}^{-1}$) tartományban, míg az Ar-H kötésekhez tartozó sávok 2750 – 3000 nm ($3640 - 3330 \text{ cm}^{-1}$) tartományban jelennek meg. Delokalizált kötést tartalmazó vegyületekben a kötésrend határozza meg a frekvenciát. Izolált, konjugált kettős kötést is tudunk így módon azonosítani.

A hidroxilcsoportnak három színeképsávja van az infravörös tartományban. Az első a vegyértékrezgés, a második a síkbeli deformációs rezgés a harmadik a síkra merőleges deformációs rezgés. Ezen

rezgéstípusok megjelennek az alkoholok, fenolok és karbonsavak infravörös színeképében. Az OH csoportra jellemző, hogy intra és intermolekuláris elhelyezkedés esetén is elnyelése van az infravörös tartományban.

Az NH kötések sávjai szélesebbek, mint a többi vizsgált funkciós csoporttá, mivel a nitrogénatom konjugációs hajlama nagy. A molekulát felépítő atomok térbeli elhelyezkedése nagy szerepet játszik a konjugáció mértékének alakításában, ezért az NX-típusú molekulák érzékenyek a gerjesztésre, intenzív színeképsávokat létrehozva ezzel. Az NH kötések képesek vegyértékrezgésre például a primer aminokban, inter és intramolekuláris vegyértékrezgésre a hidroxilcsoporthoz hasonlóan valamint deformációs rezgésekre az aminok, iminek és sóik színeképében. Az N-H deformációs rezgésekhez tartozó sávok primer aminoknál erősek és 1590 – 1650 nm ($6290 - 6060 \text{ cm}^{-1}$) tartományban találhatók. Szekunder aminok deformációs rezgéseinek abszorpciós sávjai 1550 – 1650 nm ($6450 - 6060 \text{ cm}^{-1}$) tartományban közepes intenzitásúak. A C-N vegyértékrezgésekhez tartozó sávok primer aminoknál közepesen erősek és 1040 – 1080 nm ($9620 - 9260 \text{ cm}^{-1}$) hullámhossznál találhatók. Szekunder aminok abszorpciós sávjai 1140 – 1180 nm ($8770 - 8470 \text{ cm}^{-1}$) körül közepes intenzitásúak.

A karbonil-csoportok vegyértéksávja a C=O kötés vegyértékrezgésének tulajdonítható. Keto-enol tautóméria esetében összetettebb spektrummal kell számolni. A karbonilcsoportok vegyértékrezgései 1630 - 1850 nm ($6130 - 5400 \text{ cm}^{-1}$) között erősen abszorbeálnak, a C=O vegyértékrezgés gyakran a spektrum legintenzívebb sávja.

A karbonsavak színeképét az OH, C=O, és C-O kötések együttesen alakítják ki a karboxil-csoportban.

A nitrogén-oxigén kötések tartalmazó csoportok közül a nitrocsoport vegyértékrezgéseinek színeképe jelenik meg az infravörös tartományban 1350 nm és 1550 nm (7410 cm^{-1} és 6450 cm^{-1}) közelében. Az S-H és S-S kötések rezgései gyengék, bár a tiolcsoportnak 1700 - 1800 nm ($5880 - 5550 \text{ cm}^{-1}$) között van elnyelési sávja.

A molekulák között kialakuló hidrogénkötések révén asszociátumok jönnek létre. A híg oldatokban az intermolekuláris hidrogénkötések felbomlanak, ilyenkor a monomer molekulák vannak túlsúlyban. Az OH kötés energiája megnő, az ehhez tartozó OH és NH sávok ~ 2780 és 3330 nm ($\sim 3600 \text{ cm}^{-1}$ és 3000 cm^{-1}) élesek. Töményebb oldatok esetében a kialakuló hidrogénkötések miatt az oxigén-hidrogén kötéserősség csökken, ezért a monomer sáv frekvenciája csökken $\sim 3030 \text{ nm}$ -re ($\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$), kiszélesedik és intenzitása megnő. Apoláris oldószerrel készült tömény oldatokban, - ahol hidrogénkötés nem alakul ki - polimer asszociátumok nem keletkeznek, emiatt széles sávot figyelhetünk meg $\sim 3030 \text{ nm}$ -nél ($\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$). Az intermolekuláris hidrogénkötéshez tartozó sávok

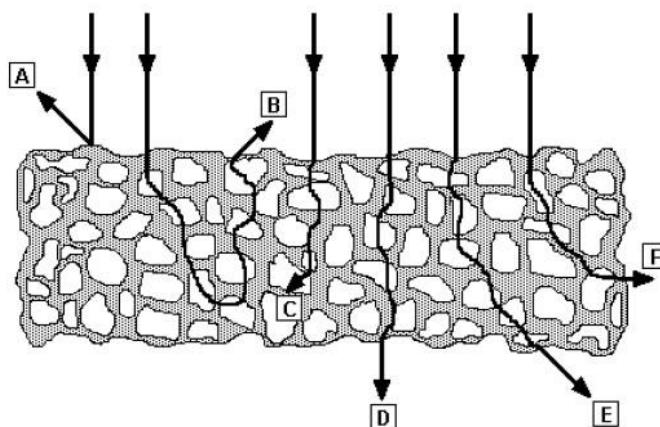
nagyobb frekvenciánál találhatók, kevésbé szélesek. Intramolekuláris hidrogénkötést tartalmazó vegyületek oldatainak spektrumában éles sávot figyelhetünk meg (Mayo és mtsai, 2003).

A felsorolt normálrezgések, ahogy a hullámhossz értékek is mutatják, a közepső infravörös (MIR), úgynevezett analitikai tartományban észlelhetők. A közeli infravörös tartomány gerjesztési energiája nagyobb, mint a MIR tartományé, így ezek a normálrezgések a közeli tartományban nem elkülönülve jelentkeznek, hanem ezek kombinációit illetve egész számú többszöröseit, az úgynevezett felhangokat regisztráljuk. A spektrumban ennek hatására a csúcsok kiszélesednek, átlapolnak egymáson.

A NIR tartományban észlelt jellegzetes elnyelési sávokat az M1. táblázatban foglaltam össze.

2.3. Az infravörös sugárzás és a minta kölcsönhatása

Az infravörös fotonok és a minta kölcsönhatását vizsgálva számos jelenséggel találkozunk (2. ábra).



2. ábra: A fény és az anyag kölcsönhatása (A: felületi (spekuláris) reflexió, B: diffúz reflexió, C: fényelnyelés (abszorpció), D: transzmisszió, E: fényelhajlás, F: fényszóródás)(Burns és Ciurczak, 2008)

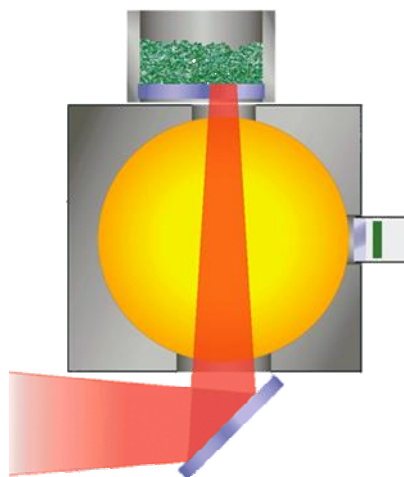
Ha a sugárzás merőlegesen éri a mintát és tökéletes felületi visszaverődést szenved, akkor spekuláris reflexió (A) jelenségéről beszélünk. Diffúz reflexió (B) jelenségével állunk szemben, ha az infravörös sugárzás a mintára merőlegesen érkező a minta fizikai szerkezetétől függően behatol a mintába, majd visszaverődik. Abszorpcióról (C) beszélünk akkor, ha a mintára érkező sugárzás maradék nélkül elnyelődik a mintában. Transzmisszió (D) jelenségét tapasztaljuk akkor, ha a mintára merőlegesen érkező sugárzás többé-kevésbé egyenes úton áthalad a mintán. Fényelhajlás (E) jelensége következik

be akkor, ha a mintára érkező sugárzás nem egyenes vonalban, hanem gyakorlatilag véletlenszerű úton halad át a mintán. A fényszóródás (F) jelensége akkor lép fel, ha a mintára érkező sugárzás behatol a mintába, de csak egy szeletén halad át.

A felsorolt jelenségek közül az infravörös spektroszkópia a diffúz reflexió, a transzmisszió és a két folyamat kombinációjaként értelmezhető transzflexió jelenségét használja fel.

2.3.1. Reflexiós mérési mód

Ezt a mérési elrendezést jellemzően szilárd halmazállapotú porított, átlátszatlan minták vizsgálatára használjuk. A fénysugár merőlegesen behatol a mintába majd minden irányban visszaverődik. A visszaverődés típusa alapján megkülönböztetünk felületi reflexiót és diffúz reflexiót. A felületi reflexió esetén a fotonok a minta felületéről verődnek vissza, míg diffúz reflexió esetén a minta belső rétegeibe jutva (1 – 6 mm) verődnek vissza. Reflexiós mérési elrendezéssel történő vizsgálatoknál az 1100 – 2500 nm-ig terjedő közeli infravörös tartományt használjuk. A továbbiakban az általam használt Bruker MPA FT-NIR/NIT (Ettlingen, Németország) készülék reflexiós mérési elrendezésén keresztül mutatom be a diffúz reflexiós mérési lehetőséget (3. ábra).

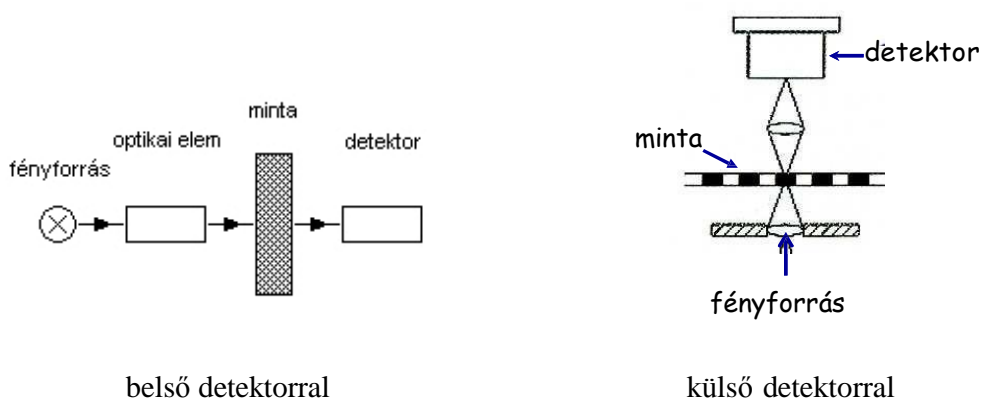


3. ábra: Diffúz-reflexiós mérés az MPA készülékben (OPUS, 2007)

A 3. ábra a készülék diffúz reflexiós mérési elrendezését szemlélteti. A mintáról visszaverődő sugarak egy gömbfelületre érkeznek (integrálógömb), melyből egy kilépő résen át a detektorba jutnak. Az integrálógömb belsejét vékony aranyréteggel vonják be, mert az aranyak az infravörös tartományban nincs elnyelése, így a reflektált fény veszteség nélkül a detektorba jut.

2.3.2. Transzmissziós mérési mód

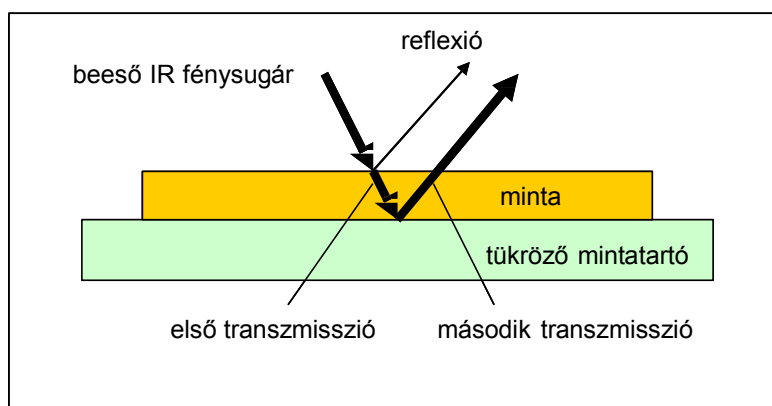
Transzmissziós mérési technikát elsősorban folyadékok illetve kolloid jellegű minták mérése során alkalmazzák (4. ábra). A minta jellegétől függően más és más a készülék kialakítása. Folyadékok esetében különböző optikai úthosszal jellemezhető átfolyó küvettás rendszert alkalmazunk belső detektorral (pl. InGaAs), míg sűrűbb, nem folyós minták esetében (pl. húsok, pástétomok, krémek) forgó petricsészés mintatartót használunk külső detektorral (pl. Si dióda). A közeli infravörös sugárzás 800 – 1100 nm-éig terjedő tartománya alkalmas transzmissziós mérési elrendezéssel történő vizsgálatok elvégzésére, tekintettel arra, hogy a sugárzás energiája ebben a tartományban nagyobb, így átjut a mintán, ami jelen esetben a meghatározás lényege.



4. ábra: Transzmissziós mérési elrendezés

2.3.3. Transzfleksiós mérési mód

Ez a mérési elrendezés ötvözi a reflexiós és a transzmissziós mérési elrendezés technikai megoldását (5. ábra). A mintán átbocsájtott fény egy tökéletesen reflektáló felületen (tükröző mintatartó) visszaverődve újra átjut a mintán kétszeresére növelve ezzel az úthosszt, majd a detektorba jut.

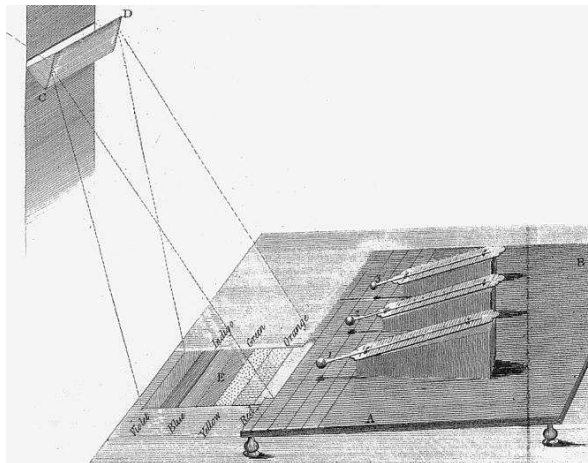


5. ábra: A transzfleksiós mérés elve (saját ábra)

2.4. Az infravörös sugárzás analitikai alkalmazása – az infravörös spektroszkópia

2.4.1. Történeti áttekintés

Sir Frederic William Herschel angol csillagász 1800-ban végzett kísérletei során arra volt kíváncsi, hogy mi okozza a napsugarak melegségét. Egy üvegprizma segítségével felbontotta a napfény fehér fényét, majd befeketített hőmérők segítségével megmérte a hőmérsékletüket.



6. ábra Herschel kísérlete

(www.astro.umontreal.ca/~paulchar/grps/histoire/newsite/sp/great_moments_e.html)

Feljegyzéseiben beszámol arról, hogy a hőmérséklet a lila színtől egészen a vörösig emelkedett. A vörös szín alatti területen is elvégezte a mérést és azt tapasztalta, hogy a hőmérséklet azon a területen is tovább emelkedett. Mivel ez a tartomány már kívül esik az emberi szem által látható tartományon, ezért Herschel a vörös alatti, azaz infravörös (infrared) nevet adta neki (Burns és Ciurczak, 2008).

Abney és Festing 1881-ben megállapították, hogy az abszorpciós sávok atomcsoportokhoz kapcsolódnak, nem az egész molekulához majd 1885-ben megépítettek egy fotométert és elkezdtek a látható tartományban méréseket végezni folyadékmintákkal (Osborne és Fearn, 1986).

1901-ben Coblentz a saját maga által épített és kalibrált spektrométerével spektrumokat gyűjtött és táblázatokat készített arról, hogy a különböző hullámhosszakon (1000-1600 nm-es tartomány) hogyan abszorbeálják az infravörös fényt az egyes anyagok.

Az 1950-es években megjelent műszerek az elektromágneses spektrum tartományait (UV, VIS, IR) egyszerre pásztázták (Davies, 2005).

Az 1950-es évektől Karl Norris amerikai kutató által publikált eredmények hozták meg az infravörös technika számára a sikert. Egy 1963-ban publikált közleményükben lisztminták víztartalmát vizsgálták. A kutatócsoport a mérések során azt tapasztalta, hogy a minták fehérjetartalma zavarja a

meghatározást, melyből azt a következtetést vonták le, hogy a technikával e makrokomponens vizsgálata is elvégezhető. További kutatásaikban szójaminták vizsgálata során a nyerszsír jelenléte okozta a problémát, így hamar kiderült, hogy a közeli infravörös tartomány víz-, fehérje- és nyerszsírtartalom meghatározására is alkalmas (Norris és Hart, 1965; Kaffka, 2008).

Az 1970-es években megjelentek a piacon a különböző hullámhossz szűrőkkel ellátott készülékek, melyeket a gabonaiparban alkalmaztak. A NEOTEC CORP. (Silverspring, MD) alkalmazottja, Stokes 1979-ben megjelent összefoglalójában a technika on-line alkalmazásáról számol be szójaliszt fehérjetartalmának meghatározásáról (Stokes, 1979). 1980-ban már monokromátorral ellátott készülékeket gyártottak, melyeket kémiai elemzésekre használtak. Ugyancsak a 80-as évek elejére tehető a kemometria megjelenése, mely nagyban segítette a közeli infravörös technikával nyert adatok kiértékelését.

Az 1990-es években egyre szélesebb körben kezdték alkalmazni a közeli infravörös technikát az addig jól bevált gabonaipari felhasználáson kívül. Ma már az ipar számos ágában ismert az alkalmazása, így az élelmiszer- (alapanyag- és feldolgozott késztermékek), gyógyszer-, festék-, textil-, műanyag-, kőolaj- és autóipar területén. Különleges alkalmazási területként kell megemlítenünk a bűnügyi technikát a helyszíni azonosítással, az állatgyógyászatban alkalmazott diagnosztikai eljárásokat, a műemlékvédelmet illetve a régészeti vizsgálatokat (Botonjic-Sehic és mtsai, 2009; Topolaglu és Günes, 2010).

2.4.2. Műszaki megoldások a közeli infravörös spektroszkópiában

A következő fejezetben a közeli infravörös spektroszkópia műszeres hátterét mutatom be, részletesen kitérek az alkalmazott fényforrásokra, optikai bontó és leképező elemekre valamint a leggyakrabban alkalmazott detektortípusokra. Napjainkban a vásárolók számára a gyártók széles műszerpalettát kínálnak. Természetesen nem mindegy, hogy a műszert milyen célra szeretnénk használni hiszen minden gyártónak vannak célkészülékei adott feladat elvégzésére. Szétválaszthatjuk a készülékeket aszerint, hogy rutin mérőműszerként vagy kutatóműszerként szeretnénk használni. Több gyártó kínál alaplátványokat, melyek aztán különböző kiegészítőkkel fejleszthetők, így más-más célokra is alkalmassá válnak.

2.4.2.1. Fényforrások

A közeli infravörös technikában sugárforrásként az 1960-as években wolfram szál izzókat alkalmaztak, majd a Nernst-izzó használata terjedt el széles körben (Utasi, 1995). A Nernst-izzó 1-3 mm átmérőjű rúd, hossza néhány centiméter. Hideg állapotban nem vezeti az elektromos áramot, azonban ha 800 °C-ra vagy tovább melegítjük izzó állapotban tartható elektromos áram segítségével. Mivel az üzemi állapota az izzó állapot, ezért az élettartama rövid, gyakran kell cserélni. További hátrányként említhető, hogy a mechanikai hatásokra rendkívül érzékeny, a túlhevülés elleni védekezéshez vízhűtést vagy léghűtést használnak. A kvarc-jód illetve kvarc-halogén lámpák elterjedését az egyszerű használat és hosszabb élettartam okozta. A hátránya, hogy a lámpa kisméretű buraja igen érzékeny. Hideg állapotban sem szabad megérinteni mivel az ujjunkról ráakadó zsír- és izzadságnymok beleégnek a kvarcba - törékennyé téve, elhomályosítva azt. Az esetleges szennyeződés robbanásveszélyessé is teheti a lámpát, mivel üzem közben a búra alatt több atmoszféra túlnyomás uralkodik (Holly és Sohár, 1968). A fény emissziós diódák (LED) félvezető diódák, melyekben az injektált töltéshordozók rekombinálódása során jön létre a világítás. A LED-ek hatásfoka az elmúlt években jelentősen nőtt, egyre több iparágban terjed használatuk, elég csak a manapság egyre népszerűbbé váló LED televíziókra gondolni. A lézerek, mint legújabban az infravörös spektroszkópiában sugárforrásként használt eszközök előnye, hogy különböző hullámhossz-tartományra hangolhatók. A nullpont-vándorlás lézerek használatával minimálisra csökkenthető, mivel az eszközök külön elektronikus vezérlővel ellátottak, mely az intenzitást pontosan szabályozza.

2.4.2.2. Optikai rendszerek

Interferencia szűrők

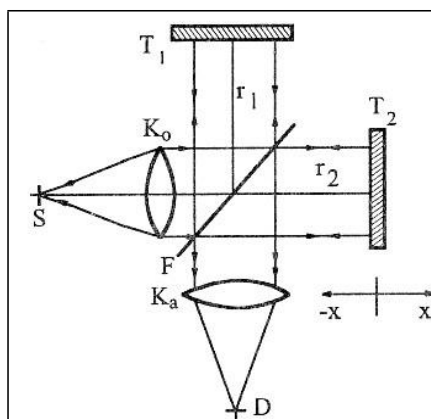
A közeli infravörös tartományban működő szűrős készülékek általában több interferencia szűrővel vannak ellátva, hat és tizenkilenc között változhat a számuk. Ezek a szűrők egy forgó lapos lemezre rögzítettek, mely forgatásával a fényforrásból csak a kívánt hullámhosszúságú fény jut a mintára (Givens és mtsai, 1997). Fontos előnye, hogy a szűrők adott hullámhossz-intervallumban meghatározott időközönként reprodukálhatóan alakul ki a kívánt hullámhossz. Hátrányként említhető, hogy nem csak monokromatikus fényt hoznak létre, hanem felharmonikusok is megjelennek. Ezek kiszűrésére további szűrők beépítése szükséges (Stark és Luchter, 2005).

Diszperziós készülékek

A monokromátorral felszerelt készülékek a fényforrás által kibocsátott folytonos spektrumú fényt hullámhosszaira bontják egy prizma vagy egy optikai rács segítségével. Az optikai rácsok nagy előnye a prizmákhoz képest, hogy nagy pontosságúak (nagyobb felbontás érhető el) és olcsóbbak. Gyakran alkalmaznak a ráccsal egybe építve nagyságrend szűrőket a felharmonikus rezgés kiszűrésére, melyek a teljes hullámhossznak csak egy kis kiválasztott részét engedik át. A belépő rés után a fénysugarat a prizmára vagy a rácsra vezetik, majd a kilépő résen keresztül az érzékelőbe jut (Erős, 1993).

Fourier – transzformációs interferométeres készülékek

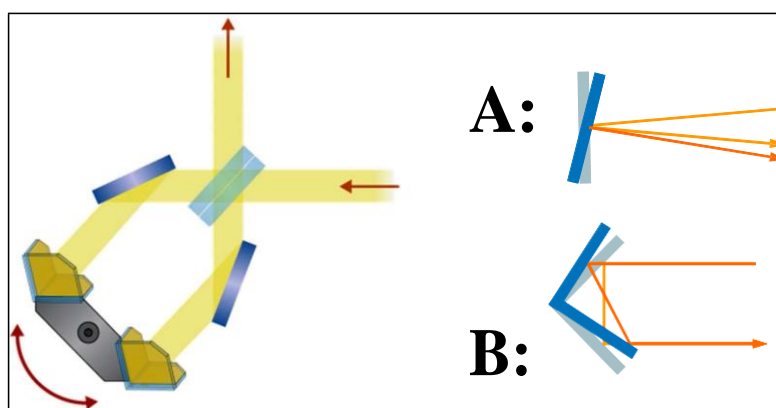
A Fourier-transzformációs készülékeket az különbözteti meg a normál spektrométerektől, hogy a spektrumot nem direkt módon vesszük fel a mintáról, hanem interferogram formájában. Az interferogramot interferométer segítségével kapjuk, majd az interferogramból nyerjük a spektrumot Fourier-transzformációval. Az 7. ábrán látható egy Michelson típusú síktükrös interferométer. Az S fényforrásból érkezik a fénysugár a K_o jelű lencsére. A K_o kollimátor lencse feladata az, hogy a fényforrásból érkező sugarakat párhuzamos nyalábúvá alakítsa. A párhuzamosított fénnyalábok az F félígáteresztő sugárosztóra jutnak. A félígáteresztő tulajdonság azt jelenti, hogy a ráeső sugarak felét átengedi a mögötte található T_2 tükörrre, míg másik felét a T_1 tükörrre továbbítja. A T_1 tükör rögzített, állandó r_1 optikai úthosszal jellemezhető, míg a T_2 tükör mozog, mozgását lézer vezérli, így az r_2 optikai úthossz időben állandóan változik. A tükrökről visszaverődő sugarak a sugárosztón ismét találkoznak, interferálnak és intenzitásuk $0 - 2I$ között változik. A K_a jelű lencse gyűjti be a fénysugarakat és juttatja a detektorba.



7. ábra: Michelson típusú síktükrös interferométer

(www.optique-ingenieur.org/en/courses/opi_ang_m02_c05/co/contenu_23.html)

Az 8. ábra bal oldala egy, a Bruker MPA NIR/NIT készülékben található Rocksolid interferométert ábrázol. Az A jelű rajz a Michelson-típusú interferométerben található síktükröket, míg a B jelű rajz a Rocksolid interferométerben található Cube Corner tükröket ábrázolja. A tükrök elmozdulásával a B esetben az alkalmazott technológiának köszönhetően a sugárnyalábok párhuzamosak maradnak, míg az A esetben elveszítik párhuzamosságukat.



8. ábra: Rocksolid interferométer és A: síktükrő, B: Cube Corner tükrő (OPUS, 2007)

A Fourier-transzformációs készülékek számos előnnyel rendelkeznek a diszperziós készülékekkel szemben. Ilyen többek között, hogy a teljes hullámhossz tartományt detektálják, így nincs információvesztés, a nagy fényenergia és a nagy hullámszám pontosság ($0,01 \text{ cm}^{-1}$ -nél is jobb), nincs szükség résekre. Az interferométer vibrációra valamint hőmérséklet-változásra érzéketlen. Az egyetlen mozgó alkatrész a készülékben a mozgó tükrő az interferométerben (R. Antony Shaw és Mantsch, 1999).

2.4.2.3. Detektorok

A közeli infravörös technikában alkalmazott detektorok a mintáról visszaérkező vagy a mintán átjutott fény intenzitását érzékelik. Diffúz-reflexiós mérések esetén a mintára bocsájtott infravörös sugárzás energiája kisebb, mint transzmissziós elrendezés esetén így érzékeny detektorok használata javasolt. A detektorok válasz sebessége is fontos szempont, hiszen a közeli infravörös technika egyik előnye a gyors válasz, így a több ezer adat feldolgozására a megfelelő kialakítás elengedhetetlen. A hőmérséklet függést is figyelembe kell venni a detektorok kiválasztásánál, mivel vannak olyan típusok amelyek igen érzékenyek a hőmérséklet ingadozásra (pl. PbS detektor, plusz mínusz $0,01 \text{ }^{\circ}\text{C}$). A szilícium-oxid (SiO_2) detektort jellemzően külső transzmissziós mérési elrendezésnél alkalmazzák (Longerich és Ramaley, 1974).

2.5. A mennyiségi meghatározás általános aspektusai infravörös spektroszkópiánál

A közeli infravörös spektrumok (2.2. fejezet) a jellemző kötések normálrezgéseinek kombinációit és felhangjait tartalmazzák, gyakori a csúcsok kiszélesedése és átlapolása. Emiatt az abszorbancia-koncentráció összefüggés kiértékelésénél komplex élelmiszeripari mintáknál a klasszikus Lambert-Beer összefüggés helyett többváltozós lineáris és nem lineáris regressziós modelleket kell alkalmaznunk.

Mielőtt azonban ezt megtennénk, néhány nagyon fontos tényezők kell megvizsgáljunk.

A legkisebb szükséges mintaszám

Első szempontként a mintaszámot emelem ki, mely véleményem szerint a közeli-infravörös spektroszkópiával dolgozó kutatók között is vita tárgyát képezi. Saját tapasztalatom alapján a mintaszám kutatóműhelyenként és „szokásonként” eltérő lehet. Egyesek szerint már 20 vagy 40 mintával (ISO, 2010) is lehet megbízható becslési függvényeket felállítani, míg mások véleménye alapján legalább 100 mintát tartalmazó mintasor használata elvárható (ISO, 2006).

Általános szabályt természetesen nem lehet felállítani. A kísérlet tervezésekor a mintaszám megállapításánál mindenképp figyelembe kell venni a minta-mátrix kémiai összetettségét, fizikai jellemzőit. Élelmiszerminták esetében a fizikai tulajdonságok homogenitása gyakran jól megoldható. Nagyobb gondot okoz ugyanakkor, hogy az élelmiszerek előállítása során alkalmazott technológiai lépések során különböző kémiai, fiziko-kémiai és biokémiai folyamatok játszódnak le, amelyek eredményeként a látszólag egyszerű összetételű élelmiszerminták is komplex mátrixúvá válik.

Klasszikus kémiai eljárások

A klasszikus kémiai eljárásokkal nyert adatok pontossága nagy mértékben befolyásolja a NIRS mérések pontosságát, mivel a kalibráció ezen adatokon alapul. Megemlíteném, hogy a referenciamódszerek reprodukálhatóságát a szabványok rögzítik, így ha adott célkomponensre több módszer érhető el, érdemes rögtön a kisebb szórásút választani (például fehérje meghatározásnál Dumas és Kjeldhal módszer viszonylata).

Elengedhetetlen tehát a kalibráció megkezdése előtt a klasszikus adatok elemzése. Az elemzés alapja a Referencia módszer hibája – Standard error of the reference method (SEL), illetve a referencia adatok szórása (SD) (Mark és Campbell, 2008).

$$SEL = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(Y_{i1} - Y_{i2})^2}{2N}}$$
 ahol N a mintaszám, Y_{i1} az első párhuzamos mérés eredménye az i-edik mintára, Y_{i2} a második párhuzamos mérés eredménye az i-edik mintára.

Mintaelőkészítés

Megfelelő mintaelőkészítéssel (pl. meghatározott lyukméretű szita használatával) kiküszöbölhető a különböző szemcseméretű minták fényszórásából adódó eltérés porított minták vizsgálata esetén. Minél kisebb a szemcseméret, annál kisebb a detektorba jutó fény intenzitása, mivel az apróbbra darált minták fajlagos felülete nagyobb, így jobban szórják a fényt. Ebből következik, hogy a minták fizikai paraméterei a spektrumok lefutására hatással vannak. Ez a spektrumok ábrázolásában úgy jelenik meg, hogy derékszögű koordináta-rendszerben, ahol az y tengelyen az abszorbancia értékeket rögzítjük, eltolódás figyelhető meg a spektrumok lefutásában a durva darálmánytól a finomabb felé. A szemcseméretből fakadó spektrumbeli eltérések csökkentésére szolgál az első derivált függvény-transzformációs művelet.

Spektrumfelvétel

A megfelelő referencia módszer kiválasztása és végrehajtása mellett ugyanolyan hangsúlyt kell fektetni a spektrumok rögzítésének módjára és körülményeire. Folyadék halmazállapotú minták vizsgálata során a minták állandó hőmérsékletének biztosítására kiemelt figyelmet kell fordítani, mivel a hőmérséklet-ingadozás befolyásolja az elnyelést így csúszás figyelhető meg a spektrumban. Az állandó hőmérsékletet különböző temperált mérőcellával, küvettával biztosítják. A hőmérséklet változása szilárd minták vizsgálata során is befolyásoló tényező, elég csak húsminták és egyéb nagy zsírtartalmú állati termékek vizsgálatára gondolni.

További pontatlan spektrumfelvételhez vezethet a minták inhomogenitása. Ennek elkerülésére szintén a megfelelő minta-előkészítés jelenthet megoldást, bár a készülékek különböző műszaki megoldásai is ezt hivatottak segíteni. Ilyen megoldás például a forgó petricsészés kivitelezés, mellyel a betöltött anyag meghatározott sávjáról készül felvétel, majd az adatok összesítéséből átlagspektrum.

Fontos kiemelni, hogy a NIR módszerrel történő mennyiségi meghatározás a technika korrelatív mivoltából adódóan sosem tekinthető döntő módszernek, bár már több szabvány is ezen módszert alkalmazza.

2.6. Többváltozós becslési függvények – kemometriai alapok

A következő fejezetben mutatom be a közeli infravörös spektroszkópia segédtudományaként is ismert kemometria módszereit, a kvalitatív és kvantitatív meghatározás regressziós módszereit, a kalibrálás, validálás folyamatát.

A NIRS kalibrációk, vagyis a becslési függvények felállítása statisztikai, kemometriai szoftverek használata nélkül elképzelhetetlen. Számos szoftver közül választhatnak a felhasználók, melyből egyesek készülékekkel együtt vásárolhatók, mások független gyártók kemometriai szoftverei és megkülönböztetünk szabad forráskódú szoftvereket. A gyártók próbálnak felhasználóbarát, könnyen kezelhető kiértékelő programokat fejleszteni, törekednek a felhasználói igények maximális kielégítésére. A legfőbb probléma, amellyel személyesen is találkoztam kutatásaim során, hogy az egyes készülékekhez tartozó szoftverek egymás közötti átjárhatósága, az adatok átvitele igen bonyolult.

A legtöbb biológiai minta spektruma a közeli infravörös tartományban összetett, hiszen rengeteg az átlapoló spektrum, elmosódó abszorpciós csúcs. Enyhítheti a problémát, de soha nem jelenthet 100%-os megoldást, a megfelelő minta-előkészítés (szárítás, liofilizálás), ám a spektrumok értékeléséhez és becslési függvény(ek) felállításához elkerülhetetlen a többváltozós statisztikai módszerek alkalmazása. A közeli infravörös spektroszkópiás kvantitatív és kvalitatív meghatározásokat nagyban megkönnyíti (sőt sok esetben elkerülhetetlen) a különböző spektrum-transzformációs műveletek alkalmazása. Kísérleteim során valamennyi termékcsoport vizsgálatakor valamely spektrum-transzformációs művelet alkalmazásával jutottam a megfelelő becslési függvényhez.

Összefoglalva, akár kvalitatív akár kvantitatív vizsgálatokat szeretnénk elvégezni szükségünk van a célnak megfelelő szoftverre, szoftvercsomagra. Amennyiben lehetőségünk van egy mintapopulációt megvizsgálni több szoftverrel, hasznos lehet a szoftverek közötti esetleges különbségek és hasonlóságok kimutatására.

2.6.1. Függvény transzformációs műveletek

A különböző függvény transzformációs műveletek alkalmazása a közeli infravörös spektroszkópiában a spektrumok értékelésekor és a becslési függvények felállításakor nélkülözhetetlen. Célja az optikai jelpontosság javítása, a zaj szűrése és a spektrumban jelentkező finom változások kiszűrése a mintára vonatkozó információtartalom növelésének érdekében. Különösen fontos szerepük van a biológiai, élelmiszeripari minták értékelésekor, mivel ezen minták infravörös spektrumai összetettek, bonyolultak.

Deriválás

Különböző fokú derivált spektrum képzése az alapspektrumból diffúz reflexiós mérések esetén a legelterjedtebb transzformációs művelet, mivel alapvonal-eltolódás ezen mérési elrendezés esetén gyakran előfordul. A deriválást azért végezzük, hogy jobban kiemeljük a spektrumrészleteket, elkülönítsük az abszorpciós csúcsokat. A derivált jobban reagál az összetételi változásokra, s kiküszöböli a részecskeméret egyenetlenségeit. Hátránya, hogy felerősíti a zajokat, s alkalmazása akkor sem célszerű, ha pl. a szemcseméret meghatározása a cél.

Az első derivált spektrumnak ott van lokális maximuma, ahol az eredeti spektrum felfelé irányuló meredeksége maximumot ér el. Ahol az eredeti függvény lefelé irányuló meredeksége maximumot mutat, ott kapjuk a derivált spektrum lokális minimumát. Nulla értéket vesz föl az első derivált spektrum az eredeti spektrum lokális minimumai és maximumai helyén.

Bár kísérleteink nem ezt igazolták, bizonyos minták vizsgálata során sokkal inkább eredményre vezető lehet a második derivált spektrum vizsgálata, melyet az első derivált további deriválásával kapunk. Ahol az eredeti spektrumban csúcs volt, az a második derivált spektrumban völgyként jelentkezik, és viszont. Fontos azonban megemlíteni, hogy magasabb rendű deriváltak alkalmazása felerősítheti a spektrális zajokat így a minor komponensek felismerését megnehezíti. Ugyanakkor a második derivált indokolatlan használata azt a veszélyt is magában rejt, hogy esetleg olyan spektrális információkat is mérési adatként értelmezzünk, amely valójában független a vizsgált tulajdonságtól.

A második derivált alkalmazását elsősorban nagy zsírtartalmú, nehezen homogenizálható minták (pl. húsminták) vizsgálatánál javasolják (Viljoen és mtsai, 2005; Sinelli és mtsai, 2010).

Simítás

A simítás a spektrum szomszédos pontjait átlagoló függvény-transzformáció. A simítási pontok 5-25-ig szabadon választhatóak. A simítás csökkenti a spektrális zajt, viszont ezáltal torzítja a spektrális információkat (Martens és mtsai, 1983).

Többszörös szóródási korrekció

A többszörös szóródási korrekció (multiplicative scatter correction) egy lineáris spektrum-transzformáció, mely a fényszóródás hatásának csökkentésére szolgál. A transzformáció a spektrum értékek korrigálása egy átlagos szóródási értékkel. Ez a spektrum-transzformációs művelet két fő hatást vesz figyelembe: a tényleges szóródást és az alapvonal eltolódást (Geladi és mtsai, 1985).

Standard normál változó

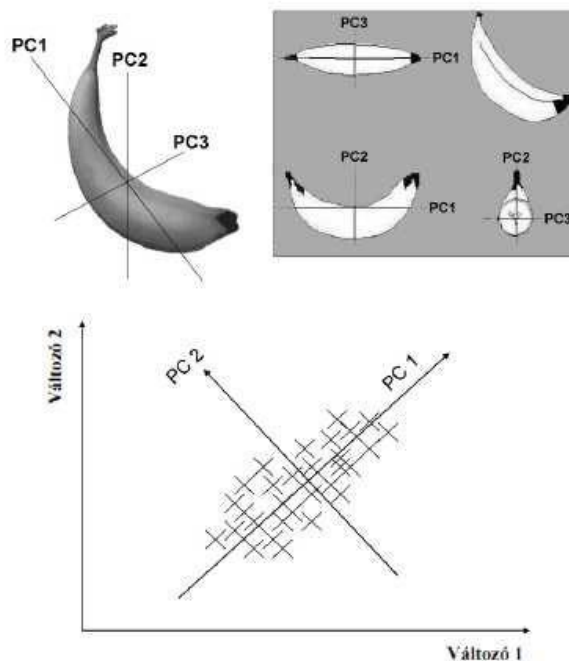
Szóródási korrekciós művelet a standard normál változó (standard normal variate), mely során a spektrumokból egy átlagos intenzitásérték kerül meghatározásra, majd ezt kivonva minden egyes spektrumból kapjuk a transzformált spektrumokat, aztán az intenzitások négyzetes összegét számolja. A négyzetösszegek négyzetgyökével osztja a spektrumot.

Sokszor előfordul, hogy a különböző fokú deriváltakat kombinálják más matematikai művelettel, mint például simítás (smoothing) vagy különböző szóródási korrekciók (Barnes és mtsai, 1989).

2.6.2. Főkomponens analízis - Principal Component Analysis (PCA)

A főkomponens analízist Malinowski vezette be a kémiába 1960 körül főfaktor analízis néven, melyet egyszerűsítésre, adattömörítésre, osztályozásra, becslésre és spektrális kieső minták detektálására használnak (Wold és mtsai, 1987). 1970 után számos közlemény és könyv megjelent a témában (Malinowski és Howery, 1980; Scott Ramos, 1986). A spektroszkópiában a spektrális adatok mátrixából (hullámhosszak és abszorbancia értékek) új változókat generálunk, melyek az eredeti változó lineáris kombinációi. Amelyik lineáris kombináció leírja az eredeti populáció varianciájának legnagyobb hányadát, az lesz az első új változó, azaz az első főkomponens. A második főkomponens a maradó variancia legnagyobb hányadát írja le és merőleges az elsőre. Mindaddig új főkomponens kerül bevezetésre, míg mintapopuláció varianciáját 100%-ban le nem írtuk (Maree és Viljoen, 2011; Sirisomboon és mtsai, 2012; Wu és mtsai, 1997; Wu és mtsai, 2011).

Az 9. ábra a főkomponens analízis metodikáját szemlélteti egy egyszerű példán keresztül. Természetesen elképzelhető végtelen számú főkomponens bevezetése is egy N dimenziós térben, de a gyakorlatban a variancia döntő hányadát néhány főkomponens leírja (Dalmadi és mtsai, 2007).

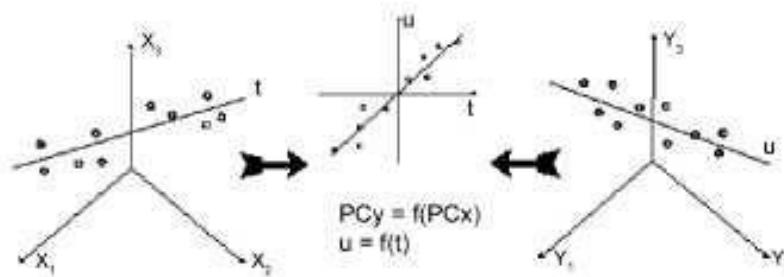


9. ábra: Főkomponensek kiválasztása (Dalmadi és mtsai, 2007)

2.6.3. Részleges legkisebb négyzetek módszere – Partial Least Squares (PLS)

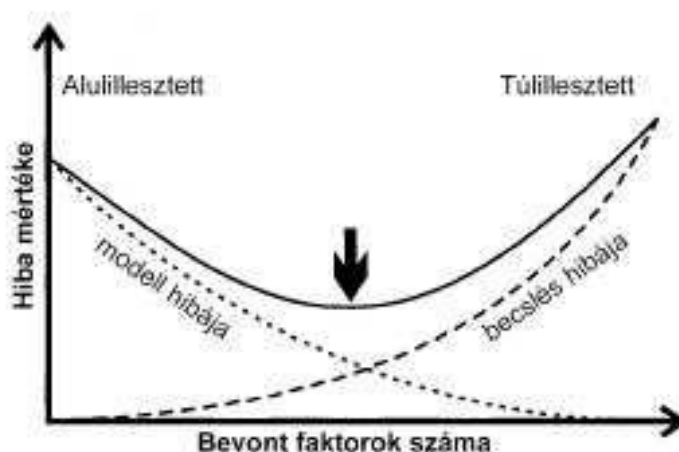
A PLS regresszió a mennyiségi meghatározást segíti elő. Itt nem csupán a rendelkezésre álló spektrális adathalmazt használjuk, hanem hozzárendeljük ezekhez a referencia adatokat (klasszikus meghatározással nyert eredmények).

Ezek után a két adathalmaz közötti összefüggéseket próbáljuk feltérképezni az adatok kovarianciájának maximalizálásával, ez az úgynevezett kalibrációs folyamat (10. ábra). Amennyiben rendelkezésre áll a becslési függvény, lehetőség nyílik független minták ugyanazon paramétereinek meghatározására. A NIR technika korrelatív, összehasonlító, ami azt jelenti, hogy a becslési függvény pontosságát a referencia adatok pontossága határozza meg.



10. ábra: A PLS regresszió elve (Dalmadi és mtsai, 2007)

A PLS regresszió során az ún. PLS faktorok meghatározása a cél. Törekedni kell az optimális faktorszám meghatározására minden vizsgált komponens esetén. Az 11. ábra az optimális faktorszám meghatározását szemlélteti. Ha túl sok faktorral dolgozunk, akkor a modell hibája csökken ugyan, viszont elveszíti robusztusságát, így külső validációt csak nagy hibával tudunk végezni; ez a túlillesztett modell. Ennek ellentettje a túl kevés faktor bevonása, ugyanis ebben az esetben a becslés hibája kicsi viszont a modell hibája nagy; ez az alulillesztett modell (Naes és mtsai, 2004).



11. ábra: Optimális faktorszám megállapítása PLS regresszió során (Naes és mtsai, 2002)

2.6.4. Neurális hálózatok rendszere-Artificial Neural Networks (ANN)

A neurális hálózatok rendszere alkalmas nem lineáris kapcsolatok kezelésére x és y változók között (bemenő és kimenő). Az x és y változókat input és output layernek nevezik a szakirodalomban. Az input rétegben találhatók azok a neuronok, melyek a bemeneti jelet továbbítják a hálózat felé. A két layer között elhelyezkedő rejtett változókat egy vagy több ún. rejtett rétegben (hidden layer) gyűjtjük össze. Ezek szerepe az információk feldolgozása. Az információ az összes bemeneti változóból az

összes rejtett változóhoz csatlakozik, majd a rejtett rétegből minden egyes változó egy kimenő változóhoz csatlakozik (Naes és mtsai, 1993).

2.6.5. Becslési függvények validálási eljárásai

A vizsgálandó komponensre felállított becslési függvények ellenőrzése elkerülhetetlen közeli infravörös spektroszkópiás meghatározások során. Ezeket az eljárásokat nevezzük validációnak, melyek készülhetnek a kalibráló mintasor bizonyos elemeinek felhasználásával illetve független, ismert összetételű minták használatával.

Kereszt-validálás

Az az eljárás, amely során a kalibráló mintasort használjuk ellenőrzésre is, a kereszt-validáció (cross-validation). A kereszt-validáció során a mintapopulációt csoportokra osztjuk, majd ezen csoportokból egyet visszatartunk mindaddig, míg a maradék csoport mintáival megtörténik a kalibráció. Az így kapott becslési függvénnyel próbáljuk megbecsülni a visszatartott csoport tagjainak az értékét úgy, mintha azok független minták lennének. Ez a művelet addig ismétlődik, míg mindegyik csoport egyszer validáló csoport nem lesz. Gyakran alkalmazhatunk egy hasonló eljárási módszert is, mely abban tér el a fent leírt módszertől, hogy a validáló csoportok helyett egy mintát hagyunk ki a kalibrációs sorból erre a célra. A művelet ez esetben is addig ismétlődik, míg mindegyik minta egyszer validáló minta nem lesz. Az első módszert többszörös kihagyásnak (leave multiple out), a második módszert egyszeres kihagyásnak (leave one out) nevezzük (Wu és mtsai, 1997; Tripathi és Mishra, 2009; Togersena és mtsai, 2003; Kamruzzmana és mtsai, 2013).

Teszt validálás

Független mintasorral végzett validálásnak vagy predikciónak nevezzük azt az eljárást mely során a kalibrációs és validációs mintasorunk teljesen elkülönül. A kalibrációs mintasorral létrehozuk a becslési függvényt, melyet a független mintasorral tesztelünk. Ezen minták referencia értékei ismertek. Az értékek meghatározása történhet ugyanolyan klasszikus kémiai módszerrel, mint a kalibráló mintasor referencia értékeinek meghatározása, de lehet például ugyanarra a komponensre vonatkozó egyéb szabványos eljárás is (pl. Kjeldahl és Dumas módszerek).

A mintapopuláció kalibráló/validáló mintasorra történő szétosztása történhet szoftveres megoldással és történhet manuális kiválasztással. Ez utóbbi esetben célszerű úgy kiválasztani a validáló mintasor tagjait, hogy a vizsgált fizikai/kémiai tulajdonság a teljes mérési tartományt lefedje. Mintaszám szempontjából a kalibráló:validáló adatsor 2:1 arányát javasolják általában (Martens és Naes, 2004).

2.6.6. Becslési függvények statisztikai paraméterei

Az alkalmazott statisztikai mutatók részben eltérőek lehetnek kutatócsoportonként, kutatóműhelyenként de előfordul az is, hogy az alkalmazott szoftver korlátai szabják meg a paraméterek elérhetőségét a felhasználó számára. A következő fejezetben az általam használt OPUS 6.5 (Ettlingen, Németország) szoftverben fellelhető, a becslési összefüggések megfelelőségének jellemzésére használt statisztikai mutatószámokat részletezem.

***Különbségek négyzetösszege* -Sum of square error (*SSE*)**

$$SSE = \sum (res_i)^2$$

ahol a „res” érték különbség a tényleges és a becsült adatok között

Nagy SEE érték rossz illeszkedést és egyben rossz becslést jelent.

Determinációs együttható – R^2

A determinációs együttható, mely a valós és becsült adatok varianciát fejezi ki.,

$$R^2 = 1 - \frac{SSE}{\sum (y_i - y_m)^2} \cdot 100$$

ahol y_i a referencia érték és y_m a referencia adatok átlaga.

Ha az illesztett adatok és a valós értékek egyenlők, akkor $R^2=100\%$.

A kereszt-validáció átlagos hibája - Root Mean Square Error of Cross-validation (**RMSECV**)

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{\text{ref}} - y_i^{\text{becs}})^2}{n}}$$

ahol n a kalibrációs minták száma, y_i^{ref} a referencia mérési eredmény az i -edik mintára, y_i^{becs} a becsült mérési eredmény az i -edik mintára.

A teszt validálás átlagos hibája - Root Mean Square Error of Prediction (**RMSEP**)

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{\text{ref}} - y_i^{\text{becs}})^2}{n}}$$

ahol n a validációs minták száma, y_i^{ref} a referencia mérési eredmény az i -edik mintára, y_i^{becs} a becsült mérési eredmény az i -edik mintára.

Pontosság/torzítás - Bias

A bias a a referencia és az optikai mérések átlagának különbségeként definiálható.

$$\text{Bias} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{\text{becs}} - y_i^{\text{ref}})}{n}$$

ahol n a mintaszám, y_i^{ref} a referencia mérési eredmény az i -edik mintára, y_i^{becs} a becsült mérési eredmény az i -edik mintára.

Összefüggés a becslés hibája, a validáló mintasor hibája és a bias között:

$$\text{RMSEP}^2 \approx \text{Bias}^2 + \text{SEP}^2$$

Maradék becslési eltérés - Residual Prediction Deviation (**RPD**)

$$\text{RPD} = \frac{sd}{\text{SEP}}$$

Ahol sd a referencia minták szórása, a SEP_{bias} a validálás bias-szal korrigált becslési hibája. Számítása a következő összefüggés alapján történik:

$$SEP_{\text{bias}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^{\text{ref}} - y_i^{\text{becs}} - \text{bias})^2}{n-1}}$$

Értéke minőségi jellemzője a becslési függvénynek. Megítélésében az irodalmi adatok eltérnek egymástól (Williams, 1987).

2.7. Az infravörös spektroszkópia élelmiszeripari alkalmazásai

2.7.1. Minták és komponensek

A közeli infravörös spektroszkópia élelmiszeriparban elterjedt alkalmazásainak teljes áttekintése meghaladná a dolgozat korlátozott terjedelmét, ezért a következő fejezetben csak a főbb élelmiszertípusok vizsgálatát és az azokból NIR technikával becsülhető komponensek vizsgálatát mutatom be.

Élelmiszergyártáshoz felhasznált alapanyagok közül egész tojások minőségellenőrzésére fejlesztettek készüléket az USDA munkatársai. A készüléket úgy tervezték, hogy csak a 900 nm-ig terjedő közeli infravörös sugárzást használták a meghatározásokhoz (Brandt és mtsai, 1953). Más kutatók már különböző mintaelőkészítési eljárásokat is alkalmaztak a vizsgálataikhoz, például porlasztva szárítást (Wehling és Pierce, 1988) illetve liofilezést (Dalle Zotte és mtsai, 2006). Magyar kutatók tartósítási eljárások alkalmazását vizsgálták tojásfehérjén közeli infravörös technikával (Seregély és mtsai, 2006). HOU és mtsai (Hou és mtsai, 2009) tojások minőségi paramétereinek (légbuborék magasság, légbuborék átmérő, alaki index, tojásfehérje minősége és tömeg) előrejelzésére fejlesztettek módszert FT-NIR technikával. A becslési függvényeket PLS regresszióval állították fel, majd független mintasorral validálták azokat. Azt a következtetést vonták le, hogy a felsorolt paraméterek közül a tömeg, az alaki index és a tojásfehérje minőségének meghatározására fejlesztett módszerek nem elégségesek, további vizsgálatok szükségesek ezen paraméterek meghatározására.

A tej és tejalapú élelmiszerek bemutatásánál ebben a fejezetben a sajtok vizsgálatára nem térek ki, mert arról a 2.7.3.3. fejezetben részletesen írok. Tejek makrokomponenseinek vizsgálata NIR technikával már az 1970-es években elkezdődött (Ben-Gera és Norris, 1978) és azóta is folyamatosan bővül mind a mintamátrixot mind pedig a komponensek körét tekintve. Tejporok vizsgálata is kedvelt kutatási téma mind nemzetközi mind pedig a magyar kutatók körében. NIR technikával ezen élelmiszerek vizsgálata

optimális, mivel mintaelőkészítés nélkül azonnal elvégezhető. Víz, fehérje és laktóztartalom meghatározására állítottak fel becslési összefüggéseket Bear és mtsai (Bear és mtsai, 1983), míg Barabássy és Kaffka (Barabássy és Kaffka, 1993) szintén víz, zsír, fehérje, laktóz és hamutartalom együttes meghatározását célozta tejpor, savó és tejfehérje koncentrátum keverékeiből. Növényi alapanyaggal (szója, borsó és búza izolátummal) 0-5%-ban szennyezett (hamisított) tejpороk felderítésére dolgoztak ki módszert Maraboli és mtsai (Maraboli és mtsai, 2002) MLR regresszióval. A spektrumok és a felállított becslési összefüggések alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a technika alkalmas esetleges hamisítás monitorozására. Wu és mtsai (Wu és mtsai, 2007) tejpороk zsírtartalmának meghatározására dolgozott ki összefüggést a teljes infravörös illetve a közeli és középső infravörös tartományokat használva transzmissziós mérési elrendezéssel. Az eredményeik alapján elmondható, hogy a teljes infravörös tartomány használata során jobb összefüggéseket kaptak. Kutatásuk hasznos lehet spektrális szenzor fejlesztéséhez. Egy évvel később szintén Wu és mtsai (Wu és mtsai, 2008) tejpороk fehérjetartalmának meghatározására állított fel becslési összefüggéseket két regressziós technikát (LS-SVM és PLS) összehasonlítva. Az LS-SVM módszer becslési pontosságát jobbnak találták illetve a középső infravörös régiót szintén alkalmasabbnak minősítették fehérjetartalom meghatározására a közeli infravörösnél. A szerzők 2009-ben megjelent cikkük (Wu és mtsai, 2009) szintén a tejpորt állítja vizsgálatuk célpontjába. A metodika megegyezik a fent leírtakkal, viszont vas és cinktartalom meghatározására próbáltak becslési összefüggéseket találni különböző regressziós technikákkal. Úgy találták, hogy a középső infravörös régió alkalmasabb vas és cink meghatározásra, mint a NIR tartomány. Következtetésük nem meglepő, hiszen a középső infravörös tartományt ujjlenyomat-tartománynak is nevezik, ahol a széles, átlapoló spektrumok helyett kifejezőbb spektrumokkal találkozunk.

Ebben a fejezetben az utolsóként bemutatott élelmiszertípus a hús és a húskészítmények, mint élelmiszeripari szempontból jelentős mennyiségben vásárolt és fogyasztott termékek. A NIR technika alkalmazása húсок minőségének vizsgálatára Ben-Gera és Norris nevéhez fűződik (Ben-Gera és Norris, 1968). Később Geladi és mtsai húsminták spektrumainak vizsgálatával azok linearitását és szóródási korrekcióját írták le (Geladi és mtsai, 1985). Magyarországi kutatók különböző élelmiszertípusok, köztük friss húсок, osztályozhatóságának lehetőségeiről számoltak be (Kaffka és mtsai, 1986). Kutatásuk során arra a következtetésre jutottak, hogy a NIR technika a nedves kémiai módszerekkel összehasonlítható megbízhatósági eredményeket szolgáltat különböző paraméterek becslésére. Földrajzi elhelyezkedés szempontjából különböző hús és hústermékek azonosítását és osztályozását vizsgálták Arvanitoyannis és mtsai (Arvanitoyannis és Van Houwelingen-

Koukaliaroglou, 2003). Főkomponens analízist és PLS regressziót alkalmaztak a módszer kifejlesztéséhez, melyről megállapítják hogy sikeresen alkalmazható földrajzi eredet azonosítására. Collell és mtsai (Collell és mtsai, 2010) fermentált hústermékek vízáktivitásának, nedvesség- és sótartalmának meghatározására dolgoztak ki közeli infravörös spektroszkópiás módszert. A módszerfejlesztés 207 minta vizsgálatán alapult, kutatásukhoz FT-NIR spektrométert használtak. A becslési összefüggéseket PLS regresszióval állították fel, továbbá megállapították hogy kutatásuk alapul szolgálhat on-line mérési rendszer kiépítésére fermentált hústermékek szárítási folyamatának monitorozására. Szintén fermentált húskészítmények fizikai és kémiai paraméterét becsülték Prochazkova és mtsai (Prochazkova és mtsai, 2010). A becslési összefüggéseket kereszt-validációval állították fel, mindössze 42 minta használatával. Spanyol kutatók ibériai sertések eredetének vizsgálatára fejlesztettek módszert NIR technikával (Zamora-Rojas és mtsai, 2011). Kutatásukhoz 1600-2400 nm-es tartományban működő hordozható spektrométert használtak, majd az eredményeket összevetették egy nagy felbontású 400-2500 nm-es tartományban működő asztali spektrométerrel. Eredményeik alapján azt a következtetést vonták le, hogy már a vágóhídon azonosítható a sertések eredete a kézi készülékkel meggyorsítva ezzel a húsfeldolgozás és jelölés folyamatát.

A NIR eljárások egyik legmarkánsabb alkalmazási területe a PAT (Process Analytical Technology; teljes folyamatfelügyeleti technológia) szellemében kialakított fermentációs és gyógyszeripari folyamatok on-line és in-line szabályozása. A PAT célja az, hogy a gyártási folyamatok során a végtermék minőségére ható, lehetőség szerinti összes (fizikai, kémiai, mikrobiológiai) tényezőt nyomon kövessük „real-time” módon, így lehetővé tegyünk többek közt az energia és munkaerő hatékony felhasználását (pl. a gyártási ciklusidők hosszának növelése révén), a selejtek számának csökkentését és az automatizálás kiterjesztését. A PAT technológia alapjaiban épít a többváltozós adatelemzésre, így az on-line NIR rendszerek alkalmazása és a kinyert információ kemometriai feldolgozása természetes részét képezi az ilyen területeken kialakított gyártástechnológiának. A szakirodalom számtalan paraméter mérésére javasolja a NIR technológiát az alapanyag-tisztaságtól kezdve a víztartalom (szárítás-liofilezés nyomon követése) meghatározásán át a végtermék bevonatvastagságának ellenőrzésére

(<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm088828.htm>).

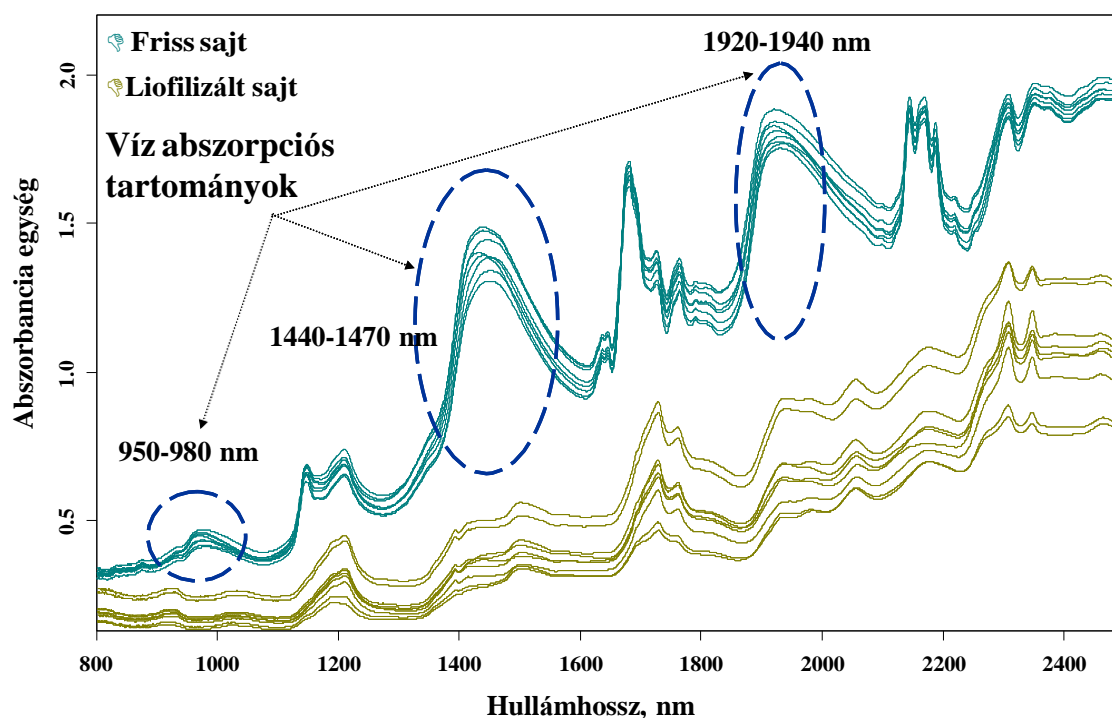
2.7.2. Mintaelőkészítési alapelvek NIR mérésekhez

A következő fejezetben a közeli infravörös technikával történő meghatározásokhoz leggyakrabban használt mintaelőkészítési technikák közül kettőt mutatok be. Mindkét eljárás időigényes folyamat, így alkalmazásuk főként azon kutatóműhelyekben terjedt el, ahol a műszeres meghatározás nincs időhöz kötve, a válaszütem nem korlátozott.

Az első mintaelőkészítési technikát, a szárítószekrényes szárítást az alacsony víztartalmú minták analízise során én is használtam. A durva darálással előkészített mintákból a víz eltávolítása 80°C-os szárítószekrényben történik, mellyel az átfedő vízcsúcsok megjelenése a spektrumban kiküszöbölhető, így az sokkal informatívabb. A szárítást tömegállandóságig végzik, mely természetesen a molekulárisan kötött víz eltávolítására nem ad lehetőséget, így a spektroszkópai vizsgálatra előkészített minta is tartalmaz vizet, viszont az már nem hat zavaróan a spektrum jellegére.

A legtöbb biológiai minta hőérzékeny komponenseket tartalmaz, így a szárítás nem jelent megoldást a vízelőtávolításra. Erre a célra a fagyasztva szárítást vagy más néven liofilezést alkalmazzák. A mintákból a víz gyakorlatilag eltűnik, így számos, addig fedésben lévő spektrumcsúcs jelenik meg. Ezt a különbséget szemlélteti az 13. ábra, melyen saját kutatásomhoz használt friss és liofilezett sajtminék NIR spektrumát ábrázoltam. Az eljárás gyakran három napot is igénybe vesz (az idő függ a minta víztartalmától), így a NIR egyik legfontosabb előnyét, a gyorsaságot veszíti el. A liofilezett minták tárolását illetve további mintaelőkészítési lépések beiktatását megfelelő körültekintéssel kell végezni, hiszen ha a minta levegővel érintkezik, képes annak nedvességtartalmát megkötni és ezzel a spektrumok torzulhatnak.

Ismét fontos hangsúlyozni, hogy a liofilezés alkalmazása rutinanalitikai laboratóriumokban nem terjedt el, viszont a spektrumvizsgálatot a kutatóműhelyekben megkönnyíti.



12. ábra: Liofilezés hatása a kemény sajtok spektrumaira

2.7.3. Vizsgált élelmiszercsoportok

A következő fejezetekben azon élelmiszercsoportokra vonatkozó infravörös spektroszkópiai publikációk irodalmi eredményeit foglaltam össze, amelyek az én vizsgálati területemet is érintették.

2.7.3.1. Sütőipari termékek

A sütőipari termékek fehérje-, zsír- és cukortartalmának meghatározása NIR spektroszkópiával elvégezhető. A meghatározás mind klasszikus mind pedig spektroszkópiai kivitelezését nehezíti a termékek változatossága, mivel hangsúlyt kell helyezni a különböző töltelékek és az alapanyagok különbözőségéből fakadó eltérésekre. Jirsa és mtsai 2007-ben megjelent publikációjukban (Jirsa és mtsai, 2007) kenyerek fizikai és kémiai tulajdonságait vizsgálták közeli infravörös spektroszkópiával. A cikk beszámol 231 különböző lisztfajtából készült köztes termék és késztermék vizsgálatáról is. A becslési összefüggések felállításához a WinISI programot használták mPLS regressziót alkalmazva. A fehérjetartalmat Kjeldahl módszerrel határozták meg, a referencia mérések minimum és maximum értéke 8,6 – 16,1 m/m%. A kereszt-validáció során a fejlesztett becslési összefüggés átlagos hibája 0,13 m/m%-nak adódott $R^2 = 98,6\%$ értékkel. A közlemény nem közöl ábrát egyetlen minta spektrumáról sem illetve a kalibrációkhoz használt hullámhossz-tartományokról sem esik szó. Búzalisztból és rozslisztből készült kenyerek NIR spektroszkópiás vizsgálatáról számol Sørensen

(Sørensen, 2009). A kísérlethez használt kenyérmintákat három éven keresztül gyűjtötte és vizsgálta az adott évben. Mintaelőkészítési technikának a szárítást választotta, majd a mintákat darálása után a spektrumok felvételét forgó petricsészés feltéttel hajtotta végre. A vizsgált minták változatosságát fokozza továbbá, hogy néhány tésztájában, néhány csak a héjon tartalmazott különböző magokat. A kalibrációs összefüggés felállításához 535 mintát használt, míg a külső validációhoz 50 mintás mintasort alkalmazott. A Sørensen által alkalmazott kalibráló/validáló adatsor aránya eltér az irodalomban ajánlott 2:1 felosztástól. Valójában ilyen nagy mintaszám esetén nem is indokolt a validáló adatsor alacsony mintaszáma. A mintaelőkészítési eljárás és a spektrumok rögzítésének módja hasonló a Jirsa és mtsai által alkalmazottal. A spektrális kieső minták kiszűrésére a Mahalanobis-távolságot 3,5-re állította, majd a becslési összefüggéseket PLS regresszióval állította fel. A minták fehérjetartalmának meghatározására a Kjeldahl módszert, a zsírtartalom meghatározására a Schmid-Bondzynski-Ratzlaff meghatározást alkalmazta (engineers.ihs.com/document/abstract/WRSOHBAAAAAAAAA, 2013).

A vizsgálatokhoz nem használta a teljes közeli infravörös tartományt, csak az 1100-2500 nm-ig terjedőt. A becslési összefüggés átlagos hibája fehérjetartalom meghatározására 0,14 m/m%-nak, míg zsírtartalom meghatározására 0,27 m/m%-nak adódott. A kenyérminták fehérjetartalma a klasszikus vizsgálatok alapján 4,5-11,5 m/m%, míg a zsírtartalom esetén 1,0-13,8 m/m%-nak adódott. Minden egyes komponens becslésére használt hullámhossz-tartományok bemutatásra kerülnek, viszont a közleményben a minták spektrumairól nem található ábra. A szerző módszert fejlesztett számos más makrokomponens meghatározására is, mint például sótartalom, hamutartalom, rosttartalom mérésére. Ezek hasznosak lehetnek további kutatásokhoz, például energiatartalom meghatározására irányuló összefüggések felállításához.

2.7.3.2. Szárzástészta

A szárzástészta közeli infravörös spektroszkópiás vizsgálata a mintamátrix egyszerűsége miatt könnyű feladatnak tűnhet. A hagyományosan három fő komponenst (víz, liszt és tojás) tartalmazó minta tojástartalmának meghatározása már az 1980-as években is foglalkoztatta a kutatókat (Kaffka és Kulcsar, 1982). A kereskedelmi árat egyértelműen befolyásolja a tojástartalom, tekintettel arra, hogy a tojás a tésztagyártás legdrágább alapanyaga. A Magyar Élelmiszerkönyv szabályozza ezen alkotó meghatározását, illetve azt is hogy a deklarált tojásszámot valójában hány tojás hozzáadásától lehet feltüntetni. A vonatkozó magyar szabvány (MSZ 20500/4-87) alapján 8 tojásos szárzástészták

klasszikus tojástartalom meghatározása esetén -20% eltérés megengedett, ami azt jelenti, hogy 6 tojás felhasználásával 8 tojásosként kereskedelmi forgalomba kerülhet a termék.

Zardetto és mtsai szárzészészták hőkezelési eljárását vizsgálták (Zardetto, 2005), illetve a különböző hőkezelési eljárások hatását a spektrumra. A kísérletben használt kalibrációs minták száma 67, míg a validációs minták száma 20 volt. Megállapították, hogy a NIR technika alkalmas szárzészészták különböző hőkezelési eljárásainak monitorozására. Zardetto és Dalla Rosa szerzőpáros két különböző tézsta-feldolgozási műveletet vizsgált (Zardetto és Dalla Rosa, 2006). A mintákról rögzített spektrumok alapján FT-NIR technikával elkülöníthető volt a két tézsta-nyújtási eljárás mivel az alkalmazott technológia miatt a minták színe és felszíne is megváltozott. Főzési próbát is végeztek, mely után a két minta közti vízmegkötő képességbeli különbségek nem voltak meghatározhatók NIR technikával. Szintén a fent említett szerzőpáros munkája 2009-ből két nyújtási eljárás (laminálás és nyújtás) hatása a főzött és friss szárzészésztákra. A fizikai tulajdonságokon túl azok néhány kémiai tulajdonságát is megvizsgálták. Arra a következtetésre jutottak, hogy a nyújtott tézsta a főzési eljárás során több vizet abszorbeál mint az oldalra hajtott tézsta (Zardetto és Rosa, 2009).

2.7.3.3. Sajtok

Sajtok fehérje- és zsírtartalma NIR spektroszkópiával meghatározható, melyről már korábbi tanulmányok is beszámoltak. Különböző termékek, úgymint friss-, lágy-, kemény sajtok, juh-, kecske- és tehéntej keverékéből készült (Gonzalez-Martin és mtsai, 2009), valamint tetilla, arzúa, edami, (Rodríguez-Otero és mtsai, 1995) ementáli típusú (Karoui és mtsai, 2006), illetve ömlesztett sajtok (Curda és Kukackova, 2004; Pi és mtsai, 2009), ezen kívül pedig más tejtermékek, úgymint túró (Sultaneh és Rohm, 2007), és fermentált tejek (Rodríguez-Otero és Hermida, 1996; Rodríguez-Otero és mtsai, 1997) vizsgálata során. A vizsgálandó mátrixokat tekintve más és más a minták minta-előkészítési igénye. A fermentált tejminták és egyes lágy sajtok vizsgálata előtt valós mintaelőkészítésre nincs szükség, elegendő csupán a petricsészébe történő kimérésük. Ezek a pépes, sűrű mátrixok zsír-, fehérje- és szárazanyagtartalma mind reflexiós, mind pedig transzflexiós mérési módban is meghatározható. Fermentált tejminták Rodríguez-Otero & Hermida (Rodríguez-Otero és Hermida, 1996) szerzőpáros általi reflexiós vizsgálata során a 141 minta mérése 30 mm vastag küvettákban történt (a minták 6-9°C hőmérsékleten kerültek a küvettába), közvetlenül a hűtőszekrényben való tárolás után. Vizsgálataik alapján a közeli infravörös transzflektancia pontosabb módszernek bizonyult a transzmissziónál (Rodríguez-Otero és Hermida, 1996), mert az összes el nem nyelt fény mennyisége meghatározásra kerül. Ez esetben (Rodríguez-Otero és mtsai, 1997) a 143 minta bemérése volt szükséges egy 0,2 mm vastag transzflektanciás mérőcellába. Arra, hogy a minták

mennyire tekinthetők homogénnek, illetve estek-e át homogenizálási eljáráson, a szerzők egyik esetben sem térnek ki.

Érdemes kiemelni hogy, két NIR spektroszkópiai módszer összehasonlítása esetén részletes leírás lenne szükséges, részletezve a minta-előkészítés folyamatát is, hogy a módszerek valóban összevethetőek legyenek. Az irodalmat böngészve találkozunk olyan publikációval, amelyben a mérési körülmények nem teljesen egyértelműek. Ilyen például D. H. McQueen és munkatársainak közleménye, melyben az optotermális és FTIR-ATR (MIR tartomány) infravörös módszereket hasonlították össze (McQueen és mtsai, 1995). A sajtok fehérje-, zsír- és nedvességtartalmának vizsgálatára 24 sajtmintát vizsgáltak összesen, ezek közül hat friss, kilenc lágy és kilenc kemény sajt volt, melyek zsír-, fehérje- és nedvességtartalma spektroszkópiás meghatározáshoz kellően széles tartományban változott. A mintaelőkészítés folyamatát egyáltalán nem taglalják a szerzők, csakúgy, mint az FTIR-ATR módszer esetén sem.

Nyugat-európában a friss sajtok közé sorolt túró vizsgálatára is találunk példát (Sultaneh és Rohm, 2007), melynek során összesen 242 túró minta fehérje- és szárazanyag-tartalmát határozták meg diffúz reflexiós módban. A túrószemcséket szitával elválasztották a savótól, a lecsapolt túró után állandó $25 \pm 2^\circ\text{C}$ -on forgatható mérőcellába helyezték, melyek spektrumait homogenizálás nélkül és kis teljesítményű kézi mixerrel történő, egy perces homogenizálás után is felvették. Ezt a kétféle módon történő felvételt azért hajtották végre, mert kíváncsiak voltak arra, hogy a felvételek közti különbség okoz-e bármilyen elváltozást a spektrumban. Arra következtettek, hogy a két különböző mintaelőkészítés ellenére a spektrumok csak kis mértékben tértek el egymástól. Klasszikus értelemben vett sajtok esetében már bonyolultabb mátrixszal van dolgunk, így ezek minta-előkészítési eljárása és mérésük megvalósítása többféleképpen történhet. A kutatók többsége elkerüli a hosszas mintaelőkészítést, törekednek a nagy mintakapacitás elérésére. Ezt a hozzáállást tükrözi a modern száloptikás szondával végrehajtott kísérletsorozat is, amelyet González-Martín és munkatársai írtak le juh-, kecske- és tehéntej keverékéből készült sajtok zsír-, nedvesség-, fehérje- és klorid-tartalmának vizsgálata során (Gonzalez-Martin és mtsai, 2009). A 131 sajtminta csomagolásból való kibontása után csak arra ügyeltek, hogy a sajttömbök felülete tökéletesen lefedje a szonda 5×5 cm-es ablakát. Mintánként így három spektrumot vettek fel, amelyből átlagspektrumokat képeztek. A száloptika használata egy szonda segítségével alkalmas gyártásközi ellenőrzésre, többek közt ömlesztett sajtok on-line gyártásközi monitorozására (Curda és Kukackova, 2004). A tanulmány során 50 ömlesztett sajtminta szárazanyag-, zsír- és nitrogén-tartalmának meghatározása zajlott. A szobahőmérsékletű minták nem estek át mintaelőkészítési eljáráson, csupán a sajtszeletek felületének három különböző pontjáról készítettek spektrumokat, majd ezek átlagát vették a további értékeléshez. A NIR

spektroszkópiával történő mérések során észrevehető, hogy zárt körülmények között történő vizsgálat csak kevés esetben történik. Ez azonban megakadályozná a sajtok, illetve egyéb tejtermékekben található nedvesség elpárolgását. Találunk azonban példát polietilén fóliába csomagolt sajtszeletek zsír-, fehérje- és NaCl-tartalmának meghatározására (Pi és mtsai, 2009). A szeleteket 25 µm vastag polietilén fóliába csomagolták, majd az 51 mintát csomagolás után hat órán keresztül, állandó 20°C-os hőmérsékleten tárolták. A spektrumokat három ponton vették fel, melyeket véletlenszerűen választottak ki és minden ponton 32 pásztázást végeztek el. A fólia eltávolítása után is rögzítették a spektrumokat, végül pedig az azonos körülmények között végzett mérések eredményeinek átlagspektrumát képezték. Ettől eltérő példa is akad a szakirodalomban, Rodriguez-Otero és munkatársai a sajtokat 1 cm vastag szeletek formájában vizsgálták (Rodríguez-Otero és mtsai, 1995), melyeket szeletelés után ugyancsak polietilén fóliába csomagoltak. A vizsgálatban 117 tetilla, arzúa és edami típusú sajtminta szerepelt, melyeket a vizsgálatok előtt 8-10°C-on tároltak, majd ezen a hőmérsékleten helyeztek be a mérőcellába. A mintaelőkészítés többi paraméterét viszont nem közölték. Mintánként 25 pásztázást végeztek, melyekből átlagspektrumot képeztek, ezt használták a további lépésekben. Találkozunk olyan közleménnyel is, ahol a sajtszeleteket nem vonták be polietilén fóliával (ömlesztett sajtminták vizsgálata során sem) (Blazquez és mtsai, 2004). Azonban az ömlesztett sajtok víztartalma viszont jelentős és állás következtében veszíthet nedvességtartalmából, így a különböző időben felvett spektrumok különbözhetnek egymástól. Jelen esetben 64 ömlesztett sajtminta nedvesség-, zsír- és szervesen sótartalmát vizsgálták NIR spektroszkópiás módszerrel. A sajtmintákat 4°C-on tárolták 28 napig, majd szobahőmérsékleten történő, kb. 16 órás állás után került sor a vizsgálatra, hogy a minták eltérő hőmérsékletéből adódó hibaforrást kiküszöböljék. Mindegyik vizsgálatra előkészített sajttömbből egy dugófúró segítségével hengereket vájtak ki (mintánként 3 darabot), melyeket további három darab 1 cm vastag szeletekre vágtak. A minták további mérési körülményeiről csak annyit említenek meg a szerzők, hogy a mérés során a sajtszeletek közepét egy mintaadagoló modulra helyezték. Mintánként így kilenc spektrumot kaptak és használták fel a kalibrációban.

Találkozunk reszelt sajtminták NIR spektroszkópiával történő vizsgálatával is. Ebben az esetben 91 darab, 12-16 hétig érlelt emmentáli sajtokat vizsgáltak (Karoui és mtsai, 2006). Forgatható mérőcellával felszerelt készüléket használtak a zsír-, össznitrogén-, vízdoldható nitrogén-, nem fehérje eredetű nitrogén-, NaCl-tartalom és pH vizsgálatára. A 150 gramm reszelt sajtmintáról a spektrumokat Petri-csészékből diffúz reflexiós módban, három különböző pozícióban rögzítették. A mintaelőkészítésre, illetve a mérési körülményekre vonatkozóan további információval nem szolgál a közlemény.

Blazquez és munkatársai (Blazquez és mtsai, 2004) által készített tanulmány alapján öt tartományt figyelhetünk meg a spektrumban, ahol a komponensek közötti különbségek jól észrevehetőek: a domináns nedvesség tartományok 8330, 6896 és 5260 cm^{-1} közelében, a zsír jellegzetes tartománya pedig 5880 és 4350 cm^{-1} között található. R. Karoui és mtsai (Karoui és mtsai, 2006) a spektrumok első deriváltját képezte és használta a kalibrációkban a 10000 és 4000 cm^{-1} közötti tartományban. Az 5890 - 4167 cm^{-1} -es hullámszám tartomány bizonyult a legfontosabbnak zsírtartalom vizsgálata során a korreláló csúcsok nagy száma miatt. D. H. McQueen *et al.* (McQueen és mtsai, 1995) munkájában vizsgált 3760-1520 cm^{-1} -es hullámszám tartomány, amelyben összehasonlításra került az FTIR-ATR módszer az optotermálissal, nem bizonyult megfelelő választásnak. Ez a hullámszám tartomány már közepes infravörös sugárzásnak tekintendő, amely csak rendkívül kis mértékben tud az anyagba behatolni. Penetrációs mélysége kb. 0,2 és 5 μm közé tehető, ami a zsírcseppek átmérőjével azonos nagyságrendű. Mivel a sajtminék inhomogenitása ezen a szinten rendkívül kritikus tényező, ezért relatív nagy szórást tapasztaltak a visszaverődés mértékében. A módszer predikciós paraméterei pedig gyengébbnek bizonyultak az optotermális módszerétől, ahol az 5750, 5170 és 4590 cm^{-1} -es hullámszámokat alkalmazták.

2.7.3.4. Zöldségfélék

Zöldségfélék közeli infravörös spektroszkópiás vizsgálatáról 1968-ban már Ben-Gera és Norris beszámolt (Ben-Gera és Norris, 1968). Szójabab minták nedvességtartalmát határozták meg direkt spektrofotometriás módszerrel. A fehérjetartalom meghatározásra való on-line alkalmazhatóságról ír Stokes ugyancsak szójabab minták esetén (Stokes, 1979). Búzaminták fehérjetartalmának érés közbeni változását vizsgálták Gergely és mtsai (Gergely és Salgó, 2005). Birth hagymaminták vízdoldható szárazanyagtartalmát határozta meg roncsolásmentes eljárással (Birth és mtsai, 1982). Az általam is vizsgált pillangósvirágúak (*Fabaceae*) közeli infravörös spektroszkópiás vizsgálata már az 1980-as években elkezdődött. 1986-ban megjelent publikációban Martens (Martens és Martens, 1986) fagyasztott borsóminék érzékszervi paramétereit, fizikai- és kémiai tulajdonságait vizsgálta. A kémiai tulajdonságok becslésére PLS regresszióval becslési függvényeket állított fel. Flinn és mtsai (Flinn és mtsai, 1998) darált és egész borsó és csicseriborsó mintákat vizsgáltak, azok különböző fizikai és kémiai (fehérje, nedvesség, zsír, hamu és összes élelmi rost) paramétereit. Arra a következtetésre jutottak, hogy a darált minék kémiai tulajdonságaira készített kalibrációk megbízhatósága jobb volt, mint az egész szemekre készítetté. A becslési függvények felállításához 165 borsó- és 151 csicseriborsó mintát használtak. Ugyancsak darált és egész borsóminék nyersfehérje tartalmát vizsgálta Arganosa (Arganosa és mtsai, 2006) Dumas-féle égetéssel technikával, majd közeli infravörös

technikával. Ugyanarra az eredményre jutottak, mint Flinn és mtsai, hogy a becslési összefüggés kisebb hibával terhelt darált minták esetén. Ezt az eredményt Delwiche (Delwiche és mtsai, 2006) is alátámasztotta, bár ő szójabab mintákkal kísérletezett. Hong (Hong és mtsai, 1998) által fejlesztett NIR módszer a tofugyártásban használható megbízhatóan. A szóják tannin tartalmára, lipid-oxidáció fokára és vízabszorpciós arányára készített kalibrációs összefüggéseket, melyek nem csak a felsorolt paraméterek meghatározására alkalmasak, hanem a növénynevelők hasznát is szolgálják. Urban és Hybl (Urban és Hybl, 1999) sima és ráncos felületű zöldborsóliszt fehérje- és keményítő-tartalmát vizsgálta. Fehérjetartalom meghatározására a Kjeldahl módszert alkalmazták, míg a keményítő tartalom meghatározására egy enzimes spektrofotometriás módszert. A mintaszámot illetően fehérjetartalom meghatározásához 26 mintát használtak, míg keményítő tartalom meghatározásához 33 és 27 (sima és ráncos) mintát. A tartományt tekintve 18,3-26,4 m/m%-nak határozták meg a minták fehérjetartalmát. NIR technikával a becslési összefüggés a következő paraméterekkel írható le: $R^2 = 98,4\%$ és a becslés hibája 0,37 m/m%. A keményítőtartalom meghatározására külön-külön becslési függvényeket állítottak fel sima- és ráncos felületű borsómintákra. A klasszikus mérési eredmények sima felületű borsóból 42,5-50,8 m/m% keményítő, míg ráncos felületű borsó esetében 24,8-31,6 m/m%. A becslési hibák 1,1 m/m% és 0,6 m/m% sima- és ráncos felület esetén. Lee és Choung szintén klasszikus Kjeldahl módszert alkalmaztak borsóminták fehérjetartalmának meghatározására (Lee és Choung, 2009). A rendelkezésre álló mintákat véletlenszerűen osztották két részre, így a kalibrációs mintasor 78 mintából, míg a validációs mintasor 34 mintából állt. A becslési függvények felállításához egész és darált borsómintákat használtak. A spektrumok felvétele 400-2500 nm-es tartományban történt, a Mahalanobis-távolságot 3-as értékre állították. Arra a következtetésre jutottak, hogy a teljes látható és NIR régió együttes használata magasabb R^2 és alacsonyabb becslési hibát eredményezett, mint a két tartományban külön-külön felállított becslési függvények. Továbbá ezen szerzőpáros is igazolta azt, hogy darált minták használatával jobb becslési összefüggés hozható létre, mint egész szemek vizsgálata során. Atta és mtsai (Atta és mtsai, 2004) különböző borsó genotípusokat vizsgált. A növényen elhelyezkedő hüvelyek és a hüvelyekben lévő szemek fehérjetartalmát és szárazanyag-tartalmát vizsgálták NIT mérési elrendezéssel. A növények elágazásait egyenként megvizsgálták és szignifikáns különbség mutatkozott mind a növények mind pedig genotípusok között a fehérjetartalomban (a szár aljától a növény teteje felé emelkedett). Szintén szignifikáns különbséget figyeltek meg a szárazanyag-tartalom eltéréseben a növény aljától a teteje felé haladva. Abban, hogy a hüvely hol helyezkedik el a száron és a hüvelyben a szemek hol helyezkednek el egyik vizsgált paraméterben sem mutatkozott jelentős eltérés. Li és mtsai (Li és mtsai, 2004) szójabab minták fehérje- és zsírtartalmát határozták meg egész szemekből. PLS regresszióval kvantitatív becslési

függvényeket állítottak fel, melyhez 264 mintát használtak. A determinációs együttható értéke fehérje esetén 99,3%-nak, míg zsírtartalom esetén 97,5%-nak adódott. Hermida és mtsai (Hermida és mtsai, 2006) babok nedvesség, keményítő, fehérje és zsírtartalmát határozták meg klasszikus AOAC módszerekkel, majd becslési összefüggéseket készítettek NIR technikával. Minta-előkészítési műveletként csak darálást alkalmaztak, szárítást nem. A kalibrációs mintasor 96 mintát tartalmazott, míg az összefüggéseket 25 mintás validáló mintasorral validálták.

A kísérleti mintáim között szereplő *Brassicaceae* családba tartozó zöldségfélék közeli infravörös spektroszkópiás vizsgálatára szintén találunk példát az irodalomban. Igaz, ezek a kutatások nem a makrokomponensek meghatározására irányultak, mégis fontos például Velasco és mtsai által publikált, összes glukozinolát tartalom meghatározása *Brassicaceae* fajtákból. A kísérletben 290 mintát használtak, 270-et a kalibráció felállításához, 20 mintát pedig független validálásra. A teljes kereszt-validáció során $R^2=0,99$, míg a független validálás során $R^2=0,95$ értékeket kaptak (Velasco és Becker, 1998).

3. Célkitűzés

A dolgozatban bemutatott kísérletek végrehajtása előtt a következő célokat fogalmaztam meg:

Sütőipari termékek:

- A fehérjetartalom meghatározása referencia módszerrel, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása kereszt-validációval és teszt-validációval
- A zsírtartalom meghatározása referencia módszerrel, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása kereszt-validációval és teszt-validációval
- A cukortartalom meghatározása referencia módszerrel, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása kereszt-validációval és teszt-validációval

Száraztészták:

- A zsírtartalom meghatározása referencia módszerrel, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása kereszt-validációval és teszt-validációval
- Tojástartalmának meghatározása számolással, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása kereszt-validációval és teszt-validációval; a becslési függvények ellenőrzése külső validáló mintákkal

Sajtok:

- A fehérjetartalom meghatározása referencia módszerrel, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása kereszt-validációval és teszt-validációval
- A zsírtartalom meghatározása referencia módszerrel, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása kereszt-validációval és teszt-validációval

Keresztesvirágúak (Brassica félék):

- A fehérjetartalom meghatározása referencia módszerrel, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása kereszt-validációval és teszt-validációval
- A zsírtartalom meghatározása referencia módszerrel, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása kereszt-validációval és teszt-validációval

Pillangósvirágúak (Fabaceae félék):

- A fehérjetartalom meghatározása referncia módszerrel, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása kereszt-validációval és teszt-validációval
- A zsírtartalom meghatározása referencia módszerrel, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása kereszt-validációval és teszt-validációval
- Az energiatartalom meghatározása referencia módszerrel, majd a populáció szétosztása WinISI és OPUS 6.5 programokkal kalibráló és validáló mintákra, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása kereszt-validációval és teszt-validációval

4. Anyag és módszer

Vizsgálataimat a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar Alkalmazott Kémia Tanszékén és a spanyolországi Cordobai Egyetemen végeztem. Néhány, a disszertációban felhasznált referencia adatot külső laboratórium bocsátott rendelkezésemre, ezeket az adott fejezetben részletesen ismertetem. A fejezetben említésre kerülő vegyszerek részletes paramétereit a Melléklet fejezet M2 táblázata tartalmazza.

4.1. Vizsgált minták

4.1.1. Sütőipari termékek

A sütőipari termékekkel végzett kísérleteimet a következő, kereskedelmi forgalomból beszerzett mintákkal végeztem: különböző típusú kenyerek (fehér, barna, kukorica, burgonyás, rozs), kalács, kifli (vizes és tejes), különböző fajta pogácsák (sajtos, sajttal szórt, burgonyás, tepertős) és croissant. A 118 minta klasszikus és műszeres vizsgálatát minden esetben a Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus 2-81 számú irányelv Sütőipari termékek) és az MSZ 20500/2-85 előírásainak megfelelően a termékek bélézetéből végeztük el.

4.1.2. Száraztészta

A száraztésztákkal végzett vizsgálatoknál úgy válogattam össze a mintákat, hogy a Magyarországon elérhető, nem ízesített és nem színezett termékek lehetőleg teljes választéka szerepeljen a minták között. Így tojásmentes, egy-, négy-, hat-, és nyolc tojást tartalmazó száraztészták kerültek a kísérletbe. A kiválasztásnál arra is tekintettel voltunk, hogy a tésztakészítéshez felhasznált liszt minősége szempontjából is lefedjük a jelenleg piacon található termékskálát. Így közönséges búzából (*Triticum aestivum*) és durum búzából (*Triticum durum*) készült termékeket vegyesen válogattunk. Összesen 130 tésztamintát vizsgáltunk, melyből a kalibráció elkészítéséhez 97 mintát, a külső validáláshoz 22 mintát, míg a független becsléshez 11 mintát használtunk fel.

4.1.3. Sajt

A munka során felhasznált valamennyi sajtminta magyar kereskedelmi forgalomban kapható termék volt, beszerzésük hipermarketekben történt. Összesen 29 féle sajtot használtunk fel, melyek mindegyike félkemény-, illetve kemény sajt volt. A sajtok keménysége a CAH által meghatározott csoportosítás, mely alapján megkülönböztetünk kemény, extra kemény, félkemény és lágy sajtokat (MÉ 2-51/6). A Magyarországon kapható sajtok csomagolásán az esetek nagy többségében csupán a zsírtartalmat tüntetik fel. Újabban a szárazanyag tartalomra vonatkoztatva kötelesek kifejezni, hogy a minták nedvességtartalmának változtatásával ne lehessen manipulálni az egész sajtra jellemző zsírtartalmat, ellenkező esetben ugyanis a zsír arányát nagyobb/kisebb víztartalommal jelentősen csökkenteni/növelhetni lehetne (MÉ 2-51/6). A minták kiválasztásánál a csomagoláson feltüntetett információk alapján rendelkezésre álló zsírtartalmat vettük figyelembe.

4.1.4. Keresztesvirágúak (*Brassicales*) rendjébe tartozó zöldségek

Hét különböző *Brassica oleracea* zöldségféléket választottunk ki a kísérlethez, melyek jelentős szerepet játszanak mindennapi táplálkozásunkban. Fajta szerint: fehér káposztát (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *alba*), vöröskáposztát (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *rubra*), kelkáposztát (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* var. *sabauda*), brokkolit (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* var. *italica*), karalábét (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* var. *gongylodes*), karfiolt (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* var. *botrytis*) és kelbimbót (*Brassica oleracea* L. convar. *oleracea* var. *gemmifera*). A zöldségeket (n = 63) friss állapotban szereztük be, kivéve két kelbimbó mintát, melyek gyorsfagyasztott termékek voltak.

4.1.5. Pillangósvirágúak (*Fabaceae*) családjába tartozó hüvelyesfélék

A minták összeválogatásánál tekintettel voltunk arra, hogy minél többféle, a családra jellemző terméket tartalmazzon a mintasor. Fő szempont volt az is, hogy élelmiszeripari szempontból fontos és gyakran használt fajtákat gyűjtsünk össze. Így bab (*Phaseolus vulgaris*, L.), zöldborsó (*Pisum sativum*, L.), sárgaborsó (*Pisum sativum*, L.), lencse (*Lens culinaris*, M.), csicseriborsó (*Cicer arietinum*, L.) és szójabab (*Glycine max*, L.) alkották a kalibrációs mintasort (n = 80). A beszerzésük szárított, csomagolt állapotban történt, kivéve két szójabab mintát, melyek granulátum kiszerelésűek voltak.

4.2. Az alkalmazott minta-előkészítési technikák bemutatása

A minta-előkészítési műveletek természetesen alapvetően a feldolgozni kívánt mintától függnék. A sütőipari termékek, a száraztészták és a pillangósvirágúak vizsgálata során a szárítószekrényben történő szárítás elégségesnek bizonyult, mivel ezen minták nedvességtartalma 20 m/m% alatti. Szárítószekrényben (Memmert, Németország) 80 °C-on szárítottam a mintákat tömegállandóságig. A sütőipari termékek és száraztészták esetén 6 órás, míg a hüvelyes minták esetén 16 órás szárítást alkalmaztam.

A sajt és *Brassicaceae* minták esetében a szárítószekrényes szárítás részben a 20 m/m% feletti víztartalomtól fakadóan, részben a keresztesvirágúak inhomogenitása miatt nem bizonyultak megfelelőnek, ezért szükség volt egy olyan kéméletes minta-előkészítési technika alkalmazására, mely a makrokomponensek stabilitását nem befolyásolja. Ilyen esetekben a fagyasztva szárítás megfelelő eljárás a nedvességtartalom eltávolítására. A mintákat egy Scanvac Coolsafe 55 fagyasztva szárító készülékkel (Scanlaf, Lyngø, Dánia) liofileztem, -110 °C-on, 0,01 mBar nyomáson tömegállandóságig.

A szárított/liofilezett minták további minta-előkészítési műveleteként a minták darálása minden esetben fontos lépés, mivel a NIRS mérések végrehajtásához lehetőleg azonos szemcseméret elérése szükséges. A darált minták szitálásával (lyukméret = 315µm) a megfelelő homogenitás is kialakítható, így az esetlegesen fellépő inhomogenitási problémák is elkerülhetők.

4.3. Referenciamódszerek

4.3.1. Fehérjetartalom meghatározása

A sütőipari termékek fehérjetartalmának akkreditált rendszerű meghatározását a nyíregyházi SGS laboratórium végezte el az ISO/TS 16634-2:2009 számú szabvány alapján, mely a Dumas-féle égetéssel technika alkalmazását írja elő.

A sajtok, keresztesvirágúak és pillangósvirágúak fehérjetartalmának meghatározása a Kjeldahl-féle módszerrel történt (ISO/TS17837:2008; IDF/RM 25:2008). Sajtok, illetve egyéb tejtermékek esetében 6,38, sütőipari termékek, *Brassicaceae*, *Fabaceae* minták esetében 6,25 volt az alkalmazott szorzófaktor (ISO/TS, 2008).

4.3.2. Zsírtartalom meghatározása

A sütőipari termékek, száraztészták, *Brassicaceae* és *Fabaceae* minták esetében az MSZ 20501-1:2007 számú szabványban leírt módszert (Weibull-Stoldt módszer) alkalmaztam.

A sajtminták zsírtartalmának meghatározásához az MSZ 2714/1-1989 számú „Sajt, ömlesztett sajt és túró kémiai és fizikai vizsgálata, A zsírtartalom meghatározása” Magyar Szabványt, illetve az európai EN ISO 1735:2004 magyar változatát, az MSZ EN ISO 1735 számú „Sajtok és ömlesztett sajtok. A zsírtartalom meghatározása. Gravimetriás módszer (referencia-módszer) (ISO 1735:2004)” szabványt használtam. Mindkét szabvány a Schmid-Bondzynski-Ratzlaff-féle eljárást írja elő, mely szerint gravimetriásan határozzuk meg a minta zsírtartalmát. Mintáimból a zsírtartalmat két-két párhuzamos mérés eredményeként állapítottam meg.

4.3.3. Tojástartalom meghatározása

Száraztészták tojástartalmának meghatározására az MSZ 20500/4-87 szabvány kétféle módszert ajánl. A döntő eljárást, amely a minták szterin-tartalmának (koleszterol és fitoszterol) illetve a gyors módszert, amely a minták zsírtartalmának meghatározásán alapul. A szterin-tartalom meghatározásának alapja a Liebermann-Burchard reakció. Ennek lényege, hogy az etil-acetátos extrakciós eljárással kioldjuk a minta szterin-tartalmát, majd az extraktumot tömény kénsavas közegben etil-acetáttal és ecetsav-anhidriddel reagáltatjuk. A reakció eredményeként az oldat kékes-zöld elszíneződést mutat, a szín intenzitása a minta szterin-tartalmának függvénye. A meghatározás számos elvi és technikai problémával küzd. Az extrakcióval leválasztott szterin az idő előrehaladtával átalakul, így az extraktum feldolgozása erősen időfüggő. A Liebermann-Burchard reakció önmagában is időreakció, amelynek nem ismerjük a reakcióidejét, emiatt folyamatos méréssel kell meghatároznunk a minták maximális elnyelését. Ennek megfelelően a reakció nem kontrollálható, nehezen reprodukálható, és nem utolsó sorban vegyszer- és időigényes. A mért szterin-tartalom ismeretében egy tapasztalati táblázat segítségével tudjuk a kérdéses tojástartalmat kiszámítani.

A zsírtartalom meghatározásán alapuló gyors módszer extrakciós hatásfoka a szabványban leírt módszerrel végrehajtva erősen kétséges. A nagyobb hatékonyság érdekében a sütőipari termékek zsírtartalom meghatározására alkalmazott MSZ 20501-1:2007 szabványban rögzített eljárást követtem. Fontos kiemelni, hogy a szabványban feltüntetett számítási módszer figyelmen kívül hagyja a száraztészta-gyártáshoz felhasznált liszt zsírtartalmát, azonban kutatásaink alapján ez a mennyiség nem

elhanyagolható, így az általunk feljesztett egyenlet, melyet az Eredmények részben részletesen bemutatok, ezt is figyelembe veszi. Ezen számítási módszer a tojástartalomra vonatkozó NIRS kalibrációk alapja.

4.3.4. Cukortartalom meghatározása

A cukortartalom meghatározását sütőipari termékek vizsgálata során végeztem el. Az MSZ 20501-1:2007 számú szabvány utasításait követtem.

4.3.5. Összes energia-tartalom meghatározása

Az összes-energiatartalom meghatározását *Fabaceae* mintákból egy IKA Werke Basic C2000 (IKA Werke GmbH, Staufen, Németország) adiabatikus kaloriméterrel végeztem el. A készülék kalibrációját benzooesav sztenderddel hajtottam végre. A por alapú mintákat a meghatározás előtt pasztillázni kellett, melyhez kézi prést használtam. A kb. 0,8 g mintából készült pasztillát a mintatartóba, majd a mintatartót a készülékbe helyeztem. Az égés magas hőmérsékleten oxigéngáz (tisztasági fok 5,0) jelenlétében történik, a mintából csak a hamu marad vissza. Nagyon fontos a megfelelően tömör pasztilla elkészítése, mert ha nem kellő körültekintéssel végezzük a pasztillázást, akkor a nagy nyomással érkező gáz szétfújhatja azt, és a meghatározás sikertelen lesz. A pasztilla elkészítése után a meghatározás minden egyes minta esetében 20 percet vett igénybe. Az égetés során felszabaduló energiát kcal/g egységben kaptam meg.

4.4. Alkalmazott szoftverek és statisztikai módszerek

Méréseim végrehajtása során illetve a mérési eredmények kiértékelésekor az OPUS 6.5 (Bruker Optik GmbH Ettlingen, Németország) és a WinISI II. (InfraSoft International, Port Matilda, PA, USA) műszerspecifikus szoftvereket alkalmaztam. Ezek a szoftverek a különböző spektrum-transzformációs és regressziós modelleket beépítve tartalmazzák, egyszerű alkalmazást téve így lehetővé.

4.4.1. Spektrum-transzformációs műveletek

Valamennyi kalibrációs folyamat során ugyanazt a négy spektrum-transzformációs műveletet használtam. Ezek részletesen: első derivált, második derivált, vektor normalizáció (SNV), többszörös szóródási korrekció (MSC). Emellett ez utóbbi kettőnek első és második deriválttal való kombinációs műveletét is alkalmaztam.

4.4.2. Főkomponens analízis (PCA)

A *Fabaceae* minták vizsgálata során főkomponens analízist alkalmaztunk a WinISI II. szoftverrel történő adat-kiértékelésnél a spektrális kieső minták detektálására. Mivel a spektrumokat Bruker MPA készülékkel rögzítettük, ezért a WinISI II. szoftver által olvasható formátumba kellett konvertálni azokat. Először hullámszám - hullámhossz konverzióra volt szükség, majd az egyes hullámhosszakhoz tartozó abszorbanancia-értékeket minden egyes spektrumról egy .xls fájlba másoltuk. Ez után következett a .txt formátumba való mentés, melyet már a WinISI II. szoftver is tud kezelni. A főkomponens analízist transzformált spektrumokkal hajtottuk végre. A spektrum-transzformációs műveletként vektor normalizációt és 1,4,4,1 deriválást és simítást használtam. A számok jelentése balról jobbra a derivált foka, a rés, a kaputávolság és a második simítás. Az analízis közben a főkomponensek száma meghatározásra kerül, melyek leírják a spektrális változékonyságot. Az OPUS 6.5 szoftverben főkomponens analízis alkalmazása után a felhasználó saját maga döntheti el egy mintáról, hogy azt kiesőnek minősíti vagy sem. A programban rendelkezésre áll a PCA opció, a Mahalanobis távolságot is beállíthatjuk, ezután a szoftver derékszögű koordináta rendszerben ábrázolja a populációt. Itt egyszerre csak két főkomponens grafikus megjelenítésére van lehetőség, míg a WinISI II. az összes főkomponens figyelembe vételével jelöli meg a spektrális kiesőket.

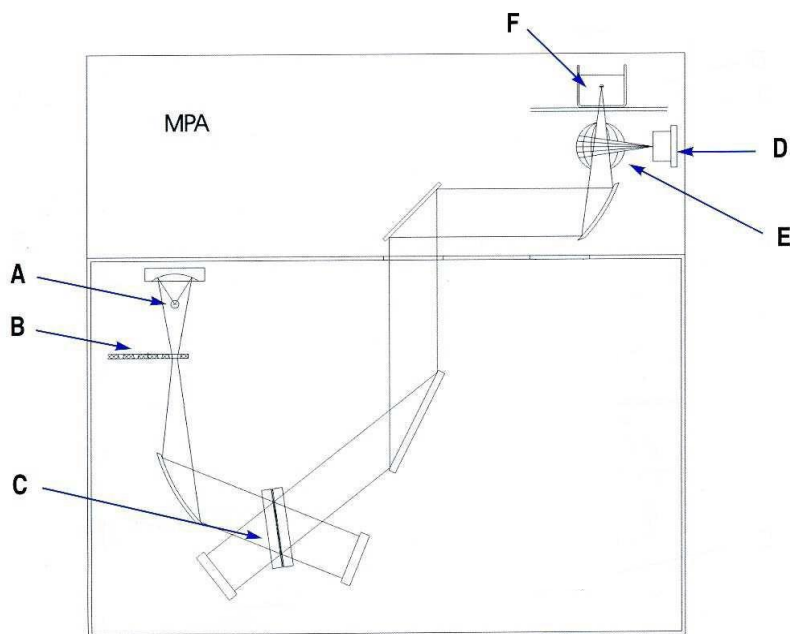
4.4.3. Részleges legkisebb négyzetek módszere (PLS)

Valamennyi kalibráció az OPUS 6.5 szoftver Quant2 kiegészítő moduljával készült, PLS regresszióval.

4.5. FT-NIR/NIT spektrométer

A spektrumokat minden minta esetében egy BRUKER MPA™ típusú FT-NIR/NIT készülékkel (Bruker Optik) rögzítettem. A mérési hullámhossztartomány 800-2500 nm ($12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) volt. A reflexiós mérésekhez legtöbb esetben a készülék 30 mintatartós mintaváltóját használtuk, de a hüvelyes minták vizsgálata során a forgó petricsészés feltétellel rögzítettem a spektrumokat. Mindkét

esetben a spektrum 32 felvétel átlagaként készült (automatikus beállítás a szoftverben), 8 cm^{-1} -es felbontással. A háttér felvétele automatikusan történt, arany bevonatú integráló gömb segítségével. Minden esetben ólom-szulfid (PbS) detektort használtam. A készülék sematikus ábrája a 14. ábrán látható diffúz reflexiós mérési elrendezés.



13. ábra: A Bruker FT-NIR/NIT spektrométer sematikus ábrája diffúz reflexiós mérési elrendezéssel

Az „A” folyamatos infravörös fényforrásból „B” szűrőn keresztül érkezik a sugárzás a „C” lézeres vezérlésű interferométerre. Az interferométer a Bruker cég által fejlesztett Rocksolid típusú interferométer, melyben a Michelson típusú interferométerből ismert síktükröket ún. Cube Corner tükrök váltották fel. A Cube Corner tükrök előnye, hogy biztosítani tudják a sugárnyalábok párhuzamosságát. A mozgó tükör segítségével létrehozott interferáló hullámok intenzitása időben változik („F”). A minta minőségétől és a vizsgált komponens koncentrációjától függően különböző mértékben veri vissza a sugárzást. Az „E” integráló gömb teljes mértékben befogja a mintából reflektált sugárzást és juttatja a „D” ólom-szulfid detektorba. Információvesztés nem léphet fel, mert az integráló gömb belseje arany bevonatú, ezért az infravörös tartományban elnyelése nincs.

5. Eredmények

5.1. Sütőipari termékek

A következőkben ezen termékek fehérje-, zsír- és cukortartalmát határoztam meg klasszikus kémiai módszerekkel, majd becslési függvényeket állítottam fel a fent említett paraméterek becslésére.

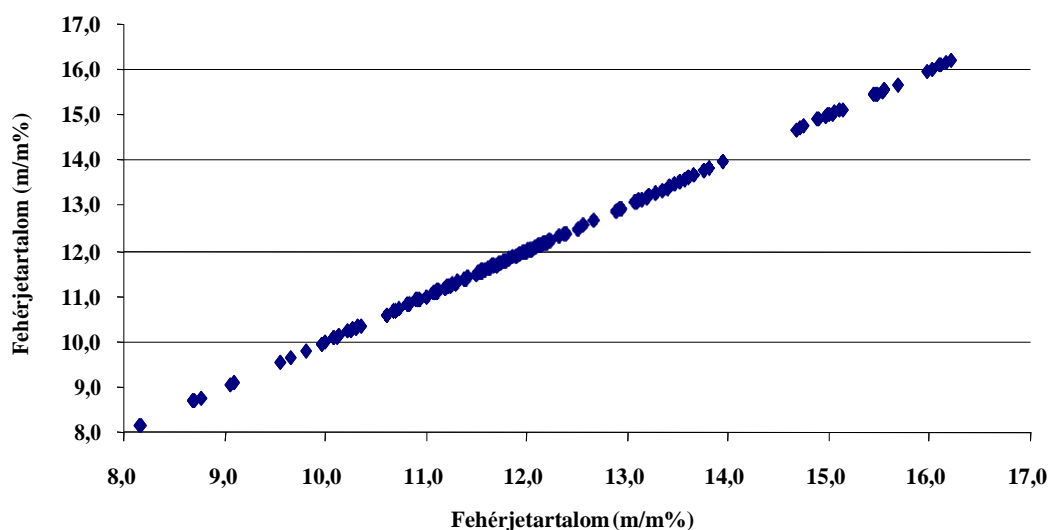
5.1.1. Fehérjetartalom meghatározása

5.1.1.1. Dumas módszer alkalmazása

Az M3. táblázatban összefoglalt adatok az akkreditált laboratórium által elvégzett klasszikus meghatározás eredményeinek összefoglalóját mutatják.

A táblázatban feltüntetett szórás érték a teljes populáció szórását jelenti, ami nem egyezik meg a vizsgált mintánkénti párhuzamos mérések szórásával. A dolgozat minden egyes összefoglaló táblázatában így módon kell értelmezni a szórást.

A korábban már említett, Sørensen által publikált eredményekkel összehasonlítva saját eredményeimet elmondható, hogy a minták szélesebb fehérjetartományt fednek le, ami abból adódhat, hogy a kísérletet nem csak kenyerekből álló mintasorral végeztük el, hanem egyéb sütőipari termékek is szerepeltek a minták között. A kalibrációs folyamatban használt elnyelési tartományok kiválasztása irodalmi adatok alapján és a spektrumok vizsgálatával történt.

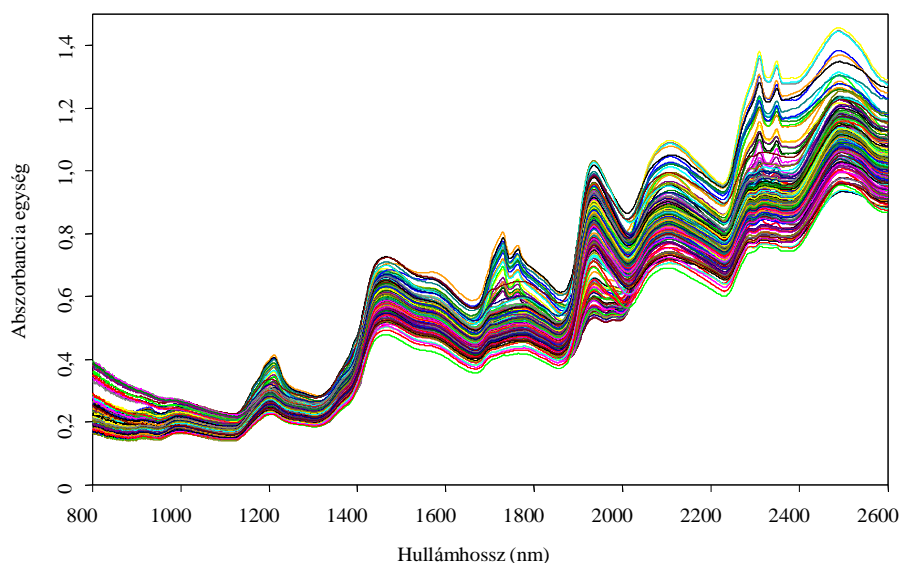


14. ábra: Sütőipari termékek fehérjetartalmának összesítő ábrája

A 14. ábra szemlélteti, hogy a kalibrációhoz alkalmazott minták egyenletesen fedik le a 8,15 - 16,21 m/m%-ig terjedő tartományt.

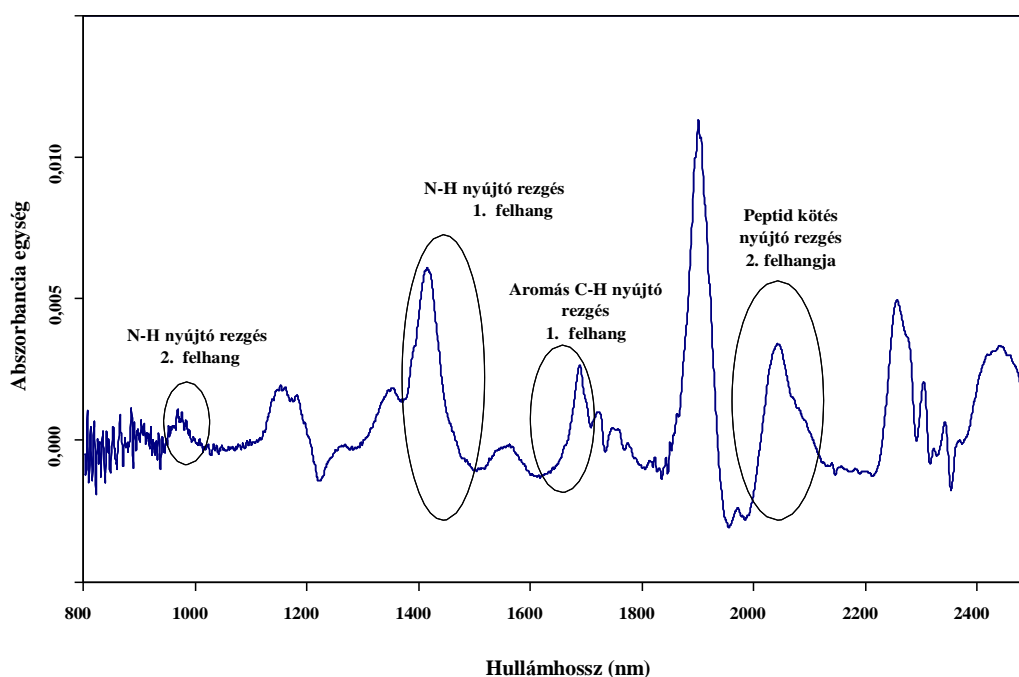
5.1.1.2. FT-NIR módszerfejlesztés

A spektrumokat főkomponens analízisnek (PCA) alávetve, nem találtam spektrális kieső mintát, így a kalibrációhoz mind a 178 mintát felhasználtam (15. ábra).



15. ábra: Sütőipari termékek fehérjetartalmának meghatározására használt minták közeli infravörös spektrumai

A spektrumok első derivált görbéjét (16. ábra) megvizsgálva jelöltem ki a kiértékelési tartományokat: 975 – 1015 nm ($10256 - 9852 \text{ cm}^{-1}$), 1480 – 1550 nm ($6756 - 6451 \text{ cm}^{-1}$), 1620 – 1700 nm ($6172 - 5882 \text{ cm}^{-1}$), 2030 – 2080 nm ($4926 - 4807 \text{ cm}^{-1}$).



16. ábra: Sütőipari termék átlagspektrumának (n=178) első deriváltja a fehérjére jellemző rezgési tartományokkal

Első lépésként teljes kereszt-validációval állítottam fel becslési összefüggéseket, amelyeknek az adatait az 1. táblázatban mutatom be.

1. táblázat: Fehérjetartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	98,46	98,10	99,21	99,22
	RMSEC (m/m%)	0,23	0,25	0,15	0,15
	RPD	8,05	7,25	11,20	11,30
Kereszt-validálás	$R^2(\%)$	97,92	97,00	98,78	98,83
	RMSECV (m/m%)	0,26	0,30	0,18	0,18
	RPD	6,93	5,77	9,07	9,23
	PLS faktor	9	9	10	10
Kémiai kiesők száma		7	1	21	18

A táblázatot két részre oszthatjuk a függvények tulajdonságainak vizsgálata során. Jelentős eltérés figyelhető meg az önállóan alkalmazott első derivált (DER1), második derivált (DER2) valamint a kombinált (DER1+SNV illetve DER1+MSC) spektrum-transzformációs műveletekkel végzett kalibráció eredményeiben. A legkedvezőbb determinációs együttható, RPD és RMSECV érték a DER1+SNV kombinált transzformáció eredményeként kapott becslési függvényt jellemzi. A magas RPD értékek a kalibráció robusztusságára utalnak, mely köszönhető a magas mintaszámnak illetve a minták sokféleségének. Ugyanakkor figyelemre méltó, hogy a kombinált műveletek esetében tapasztaltam a legnagyobb kémiai kieső mintaszámot.

A kombinált műveletek ellen szól az a tény is, hogy mindkét esetben a maximálisan beállított 10 sajátvektort (PLS) alkalmazza. Tekintettel a nagy mintaszámra, a klasszikus adatok kis szórására a maximális sajátvektor alkalmazása a túlillesztés veszélyét rejti magában. Mindent összevetve a legkedvezőbb összefüggésnek az első deriválás (DER1) eredményeként kapott becslési függvényt minősítettem.

Az M1. ábra a referencia adatok és a becsült értékek különbségeit mutatja, melyről leolvashatjuk, hogy a legnagyobb eltérés a kereszt-validáció során $-0,42$ illetve $+0,43$ m/m%-nak adódott. Egyértelműen látszik továbbá, hogy a vizsgálatba bevont minták nem alkotnak csoportokat, a populáció nem mutat mintázatot így normál eloszlásúnak minősítem.

Második lépésként a 178 mintából 66%-ot kalibrálónak választottam, 33%-ot validáló mintaként használtam. A populáció szétosztása az OPUS 6.5 szoftver automata alcsoport választás moduljával történt. Így a lent bemutatott becslési összefüggések 118 minta felhasználásával készültek, melyet aztán 60 mintás validáló mintasorral validáltam. A kalibráló és validáló minták klasszikus adatait az M4. táblázat tartalmazza.

A táblázatban feltüntetett kalibráló minták által lefedett fehérjetartomány szélesebb, mint a validáló minták tartománya. Ez a közeli infravörös spektroszkópiás gyakorlattal megegyezik, (miszerint a kalibrációs minták tartománya szélesebb kell, hogy legyen, mint a validációs mintáké) viszont a kapott értékek magyarázata az, hogy ebben az esetben a populáció osztás automatikus folyamat, melybe a felhasználó nem tud beavatkozni (OPUS 6.5). Az átlagértéket hasonlítva a teljes tartományhoz elmondható, hogy a klasszikus értékek egyenletesen fedik le a tartományt. A 2. táblázatban teszt-validálással készült becslési függvényeket mutatom be.

2. táblázat: Fehérjetartalom becslésére felállított teszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	98,51	97,87	98,36	98,65
	RMSEC (m/m%)	0,21	0,25	0,21	0,20
	RPD	8,20	6,86	7,80	8,62
Teszt- validálás	$R^2(\%)$	98,19	97,98	98,52	98,75
	RMSEP (m/m%)	0,25	0,27	0,22	0,21
	RPD	7,44	7,05	8,24	9,04
	PLS faktor	9	9	9	9

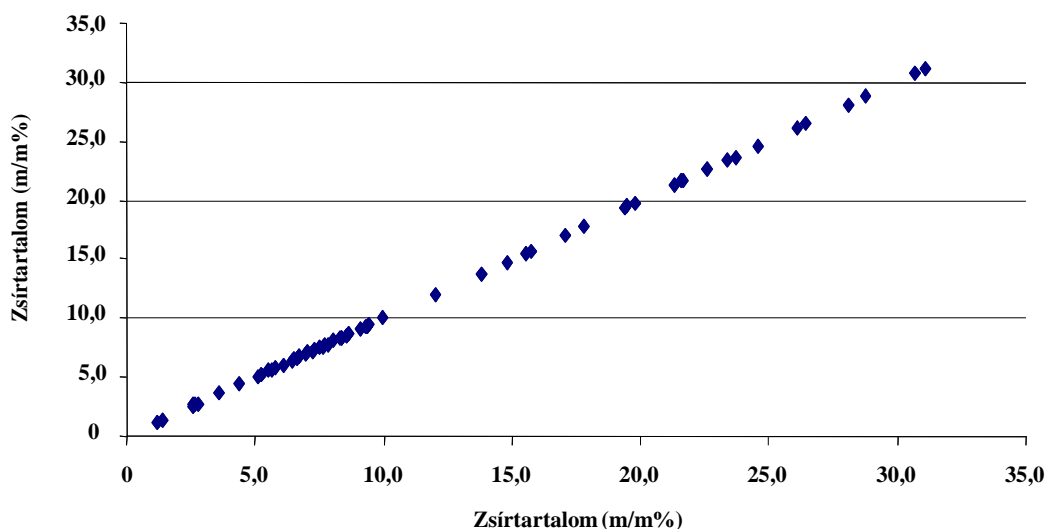
A teljes kereszt-validációs becslési függvényekkel ellentétben nem fedezhető fel különbség az önállóan és kombináltan alkalmazott spektrum-transzformációs műveletek között. A kalibrációs paramétereket figyelembe véve a legjobb eredményt a DER1 + SNV spektrum-transzformációs művelet kombinációjával kaptam. A legrosszabb tulajdonságokkal jellemezhető becslési összefüggéshez a DER2 spektrum-transzformációval kezelt spektrumok használata vezetett. Az RPD értékeket vizsgálva arra következtethetünk, hogy mind a négy összefüggés használható sütőipari termékek fehérjetartalmának meghatározására.

5.1.2. Zsírtaartalom meghatározása

5.1.2.1. Weibull-Stoldt módszer alkalmazása

A klasszikus meghatározással végrehajtott vizsgálat eredményeit a M5. táblázatban foglaltam össze. A módszernek nagy az eredendő szórása, ami befolyásolja a közeli infravörös spektroszkópiás módszerfejlesztést.

A zsírtaartalom meghatározása során mindössze 64 mintával dolgoztunk. Ennek az a magyarázata, hogy a Magyar Élelmiszertkönyv sütőipari termékek csak korlátozott fajtáira írja elő a zsírtaartalom vizsgálatát, és mi csupán ezeket vontuk be vizsgálatainkba.

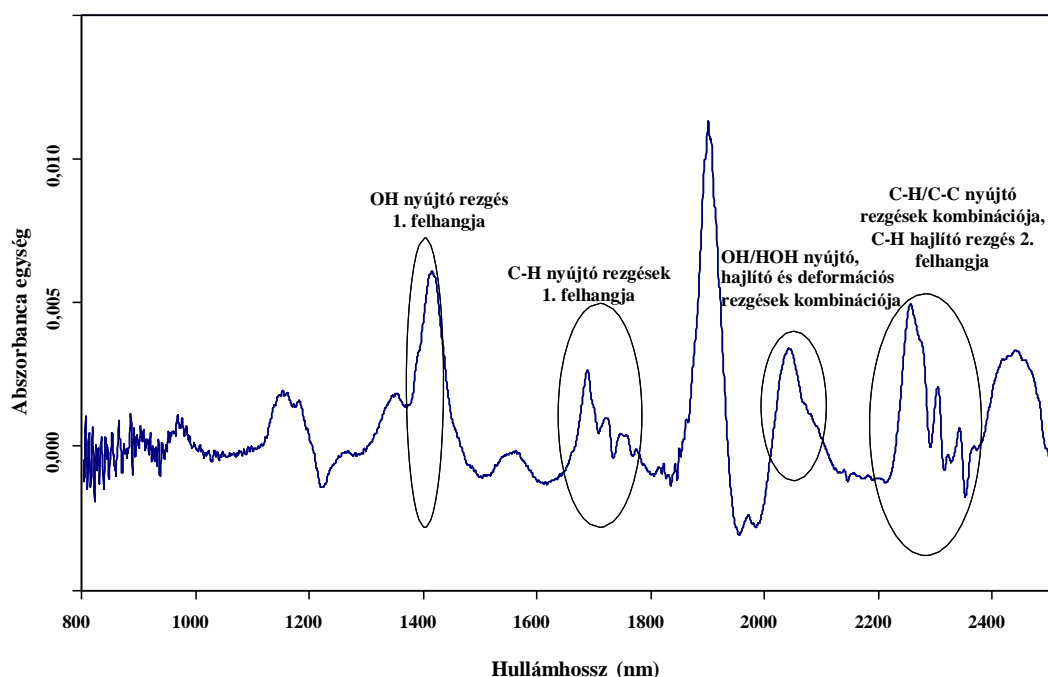


17. ábra: Sütőipari termékek zsirtartalmának összesítő ábrája

A 17. ábrán a 64 minta zsirtartalom eredményeit ábrázoltam, melyek a széles tartományt egyenletesen fedik le, így az eredmények megfelelők a további NIRS vizsgálatokhoz.

5.1.2.2. FT-NIR módszerfejlesztés

A minta-előkészítés után a spektrumokat a darálmányról vettem fel. A spektrumok első deriváltját megvizsgálva (18. ábra) jelöltem ki a kiértékelési tartományokat. A vizsgált hullámhossz (hullámszám) tartományok az 1370 – 1430 nm ($7299 - 6993 \text{ cm}^{-1}$), 1620 – 1780 nm ($6172 - 5618 \text{ cm}^{-1}$), 2030 – 2100 nm ($4926 - 4762 \text{ cm}^{-1}$) és 2190 – 2400 nm ($4566 - 4166 \text{ cm}^{-1}$) voltak.



18. ábra: Sütőipari termékek átlagspektrumának (n=64) első derivált spektruma a zsírtartalommal összefüggő rezgési csúcsokkal

A spektrumok vizsgálata és a megfelelő hullámhossz-tartományok kiválasztása után kereszt-validálással becslési függvényeket állítottam fel PLS regresszióval. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaltam össze.

3. táblázat: Zsírtartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	98,67	98,64	98,97	99,42
	RMSEC (m/m%)	0,90	0,96	0,87	0,66
	RPD	8,67	8,58	9,84	13,10
Kereszt-validálás	$R^2(\%)$	98,27	98,26	98,71	99,25
	RMSECV (m/m%)	1,00	1,04	0,93	0,71
	RPD	7,60	7,58	8,82	11,60
	PLS faktor	3	4	4	5
Kémiai kiesők száma		5	2	4	5

A táblázatban feltüntetett adatok közül egyértelműen kiválasztható a legjobb összefüggés. Az $RMSEC=0,66$, $R^2=99,42$ paraméterekkel rendelkező becslési függvényt DER1 + SNV kombinált spektrum-transzformációs művelettel kezelt spektrumok vizsgálata során nyertem. A három másik összefüggés RMSEC, RMSECV értékei között közel másfélszeres eltérést tapasztaltam a legjobb statisztikai paraméterekkel rendelkező függvényhez képest. Bár kémiai kieső minta szempontjából a DER2 tűnik a legkedvezőbbnek (mindössze 2 kieső minta) valójában a minta jellege nem indokolja a második derivált műveletet. A DER1 alkalmazásakor figyelmet érdemel a sajátvektor (PLS=3) alacsony értéke, ilyen esetben ugyanis az alulbecslés lehetősége is fennáll.

Az M2. ábra a referencia eredmények és a becsült eredmények közötti különbséget mutatja, melyről leolvashatjuk a legnagyobb eltérést, mely $-1,62/+1,3$ m/m%. A populáció nem mutat periodicitást, normál eloszlású.

A teszt-validáláshoz használt kalibráló és validáló minták adatait az M6. táblázatban tüntettem fel. A teszt-validálással végrehajtott optimalizálás során a vizsgált hullámhossz-tartományok azonosak voltak a teljes kereszt-validációs összefüggések felállításakor használtakkal.

4. táblázat: Zsírtartalom becslésére felállított teszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	97,68	97,99	98,10	97,91
	RMSEC (m/m%)	1,23	1,16	1,12	1,18
	RPD	6,56	7,05	7,26	6,91
Teszt- validálás	$R^2(\%)$	97,16	97,92	97,98	98,07
	RMSEP (m/m%)	1,41	1,21	1,19	1,16
	RPD	6,06	7,09	8,17	8,32
	PLS faktor	2	3	3	3

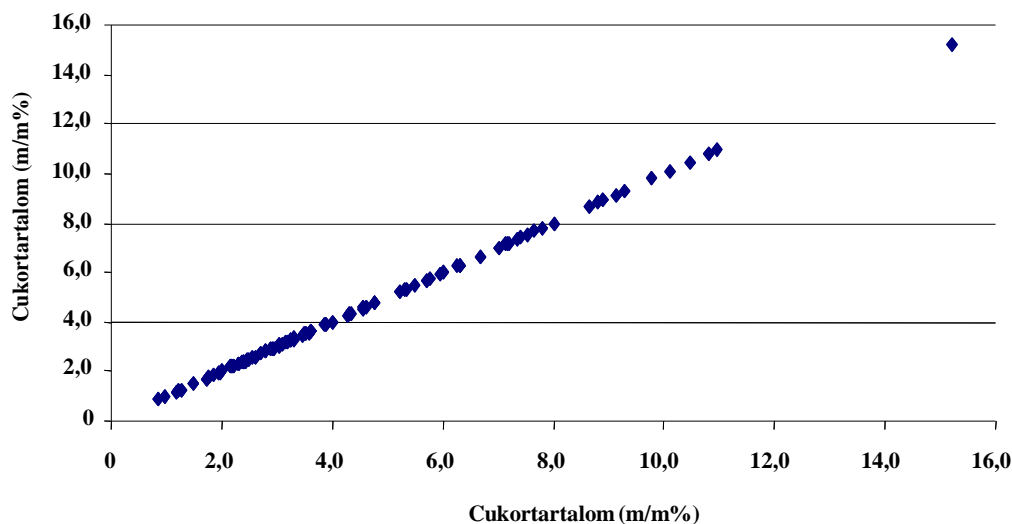
Az RMSEC értékeket tekintve szintén a DER1 + SNV kombinált spektrum-transzformációs művelettel kezelt spektrumokra kaptam a legjobb eredményt. Jelen összefüggéseket összehasonlítva a kereszt-validációval nyert adatokkal elmondható, hogy a populáció ilyen arányú szétosztásával az

összefüggések kevésbé robusztusak. Bár egyes statisztikai paraméterek igen kedvező képet mutatnak, a nagyon alacsony sajátvektor értékek (PLS = 2 illetve 3) felhívják a figyelmet arra, hogy ezek becslési függvények nagy valószínűséggel alulillesztettek. Emiatt a teszt-validálással kapott összefüggéseket csupán nagyobb mintaszám esetében lenne célszerű mennyiségi kiértékelés céljából felhasználni.

5.1.3. Cukortartalom meghatározása

5.1.3.1. Szabványmódszer alkalmazása

A referencia-módszerrel kapott eredmények összefoglalója az M7. táblázatban látható. A minimum érték 1 m/m% alatti, a maximum érték több mint 15 m/m%, ami széles tartománynak tekinthető NIRS meghatározás szempontjából. A táblázatban feltüntettem a szórás értékét is, melyből látható, hogy a módszernek eredendően nagy a szórása.

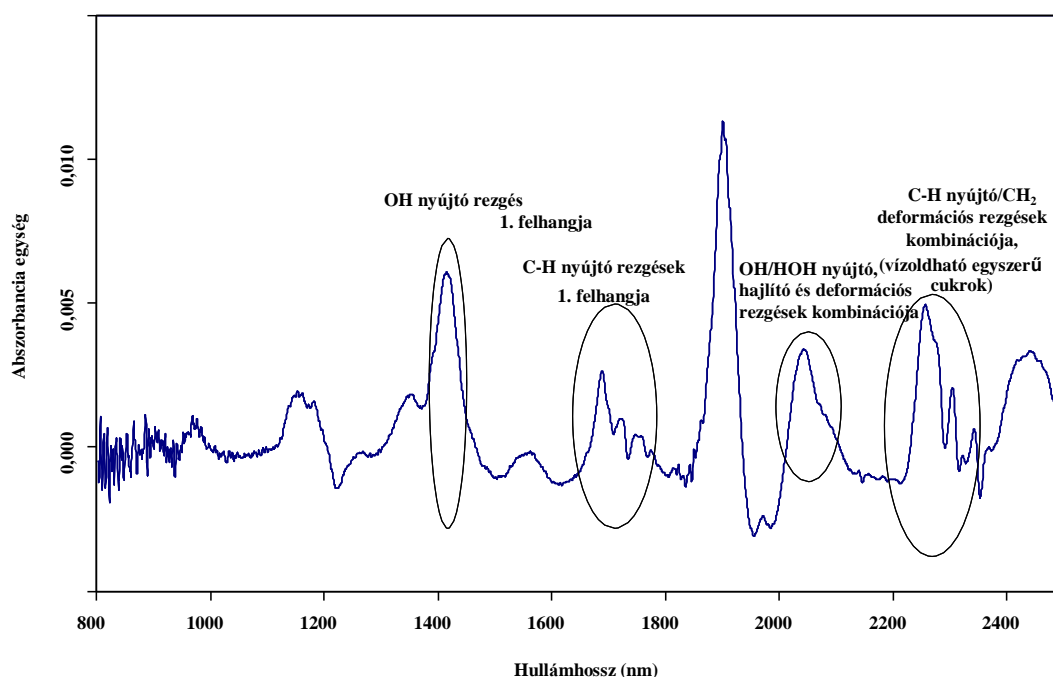


19. ábra: Sütőipari termékek cukortartalmának összesítő ábrája

A minták eloszlását (19. ábra) vizsgálva megállapítható, hogy a nagyon magas (15,2 m/m%) cukortartalommal jellemezhető minta (gofri minta) nem illeszthető a mérési tartományba. A 0,9 - 11,5 m/m% tartományban a vizsgált minták egyenletes lefedettséget mutatnak.

5.1.3.2. FT-NIR módszerfejlesztés

A cukortartalom meghatározása céljából a spektrumok első deriváltját vizsgálva (20. ábra) a következő kiértékelési tartományokat jelöltem ki: 1380 – 1440 nm ($7246 - 6944 \text{ cm}^{-1}$), 1630 – 1780 nm ($6135 - 4608 \text{ cm}^{-1}$), 2000 – 2170 nm ($5000 - 4608 \text{ cm}^{-1}$) és 2230 – 2370 nm ($4484 - 4221 \text{ cm}^{-1}$).



20. ábra: Sütőipari termékek átlagspektrumának (n=99) első deriváltja a cukortartalommal összefüggő rezgési csúcsokkal

A kereszt-validálással végrehajtott optimalás eredményeit a 5. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat: Cukortartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	R^2 (%)	94,70	96,45	97,11	95,08
	RMSEC (m/m%)	0,61	0,51	0,45	0,58
	RPD	4,34	5,30	5,89	4,51
Kereszt-validálás	R^2 (%)	92,31	90,35	95,43	92,85
	RMSECV (m/m%)	0,71	0,79	0,54	0,68
	RPD	3,61	3,22	4,68	3,74
	PLS faktor	7	9	7	6
Kémiai kiesők száma		8	8	12	9

A spektrum-transzformációs műveleteket összevetve megállapítható, hogy a legkedvezőbb statisztikai paramétereket a DER1 + MSC kombinált művelet alkalmazását követően kaptuk. A kémiai kiesők

száma viszonylag nagy, de a kieső minták között találjuk eleve azt a mintát, amelynek cukortartalma a mintasereg cukor-koncentrációjához képest nagyon eltérő volt, és ezért eleve kiesőnek ítéltük, mert a nem egyenletes mintaeloszlás hibás statisztikai következtetésekre vezetett volna. Bár a kalibráció statisztikai paramétereit vizsgálva a DER2 függvénnyel is igen kedvező adatokhoz jutottunk, de a kereszt-validálással történt ellenőrzés már nem erősítette meg a pozitív eredményeket. Ugyanakkor meg kell jegyeznem, mint ahogy a korábbi összefüggések esetében is, a második derivált alkalmazása valójában nem indokolt.

Az M3. ábráról leolvasható, hogy a populáció eloszlása normál eloszlásúnak tekinthető. A legjobbnak ítélt összefüggéssel $-1,35/+1,35$ m/m% maximum eltérés mutatkozott a referencia adat és a becsült érték között.

A populációt a kereszt-validálás után 2:1 arányban kalibráló és validáló mintákra osztottam, melynek klasszikus eredményét az M8. táblázatban foglaltam össze.

A teszt-validálás során kapott becslési összefüggéseket a 6. táblázatban foglaltam össze.

6. táblázat: Cukortartalom becslésére felállított teszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	89,27	87,89	94,88	92,90
	RMSEC (m/m%)	0,99	1,06	0,70	0,70
	RPD	3,05	2,87	4,42	3,75
Teszt-validálás	$R^2(\%)$	88,11	79,70	92,05	92,62
	RMSEP (m/m%)	0,89	1,16	0,74	0,71
	RPD	3,17	2,24	3,73	3,96
	PLS faktor	5	5	7	5

A teszt-validálás során a kombinált spektrum-transzformációt követően kapott becslési függvények statisztikai paramétereit között jelentős különbség nem fedezhető fel. Mind az RMSEC mind pedig az RMSEP értékek gyakorlati használat szempontjából azonosnak tekinthetők. Ebben az esetben a többitől igen eltérő adatokat kaptam DER2 spektrum-transzformációt alkalmazva. Ez a vizsgált

hullámhossz-tartományokban a második derivált által bekövetkező nagymértékű adatredukciónak tulajdonítható.

A kapott eredmények szakirodalommal történő összevetése nem könnyű feladat, mivel makrokomponensek meghatározását hasonló mintákból csak - a korábban már említett - Sørensen tűzte ki célul (Sørensen, 2009). Az általa kapott eredményeket összevetve az én eredményeimmel elmondható, hogy fehérjetartalom meghatározás esetén kisebb RMSECV értékkel (0,14 m/m%) becslő függvényt kapott. Ez köszönhető annak, hogy kísérleteiben csak egyféle sütőipari terméket vizsgált. A termékek zsírtartalmának meghatározására a legkisebb RMSECV értéket DER1 + SNV spektrum-transzformációs művelettel kaptam, mely megegyezik az általa használttal. A kéziratban bemutatott összefüggés átlagos kereszt-validációs hibája 0,27 m/m%, míg az én eredményem zsírtartalom meghatározására 0,93 m/m%. Ez adódhat szintén az általam használt termékek sokféleségéből illetve eltérő zsírtartalmából. A cukortartalom becslésére felállított összefüggés az RMSECV értéket tekintve hasonló az eredményeinket összehasonlítva. A szerző 0,1 m/m%-kal pontosabban becslő kalibrációs összefüggést állított fel.

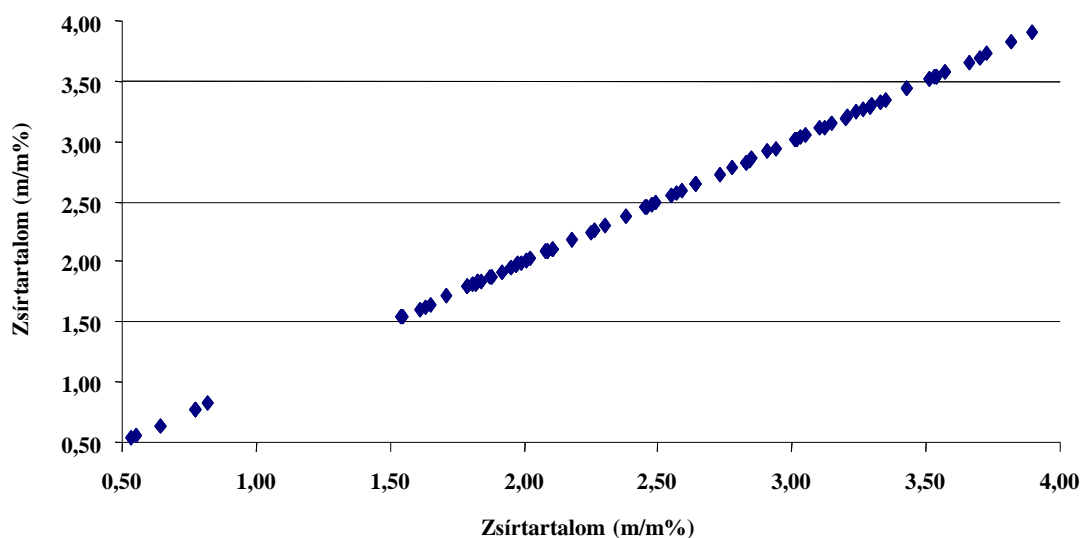
5.2. Száraztészta

5.2.1. Zsírtartalom meghatározása

5.2.1.1. Weibull-Stoldt módszer alkalmazása

A zsírtartalom meghatározása során kapott eredményeket az M9. táblázatban foglaltam össze. A kapott eredmények jóval kisebb tartományt fednek le, mint amit a sütőipari termékek vizsgálata során kaptam. Ez azzal magyarázható, hogy a Magyar Élelmiszerkönyv előírásai alapján a gyártás során a termékbe nem kerülhet hozzáadott zsír. A termékek zsírtartalma csak a gyártáshoz felhasznált liszből és tojásból származhat, azonban ha a gyártók egyéb forrásokból is adagolnak zsírt a termékhez, az nem mutatható ki sem az alkalmazott klasszikus módszerrel, sem a fejlesztett NIR módszerrel.

A minimum érték 1 m/m% alatti, így a NIRS meghatározás pontossága a hasonlóan kis zsírtartalommal rendelkező mintáknál nagy bizonytalansággal hajtható végre.

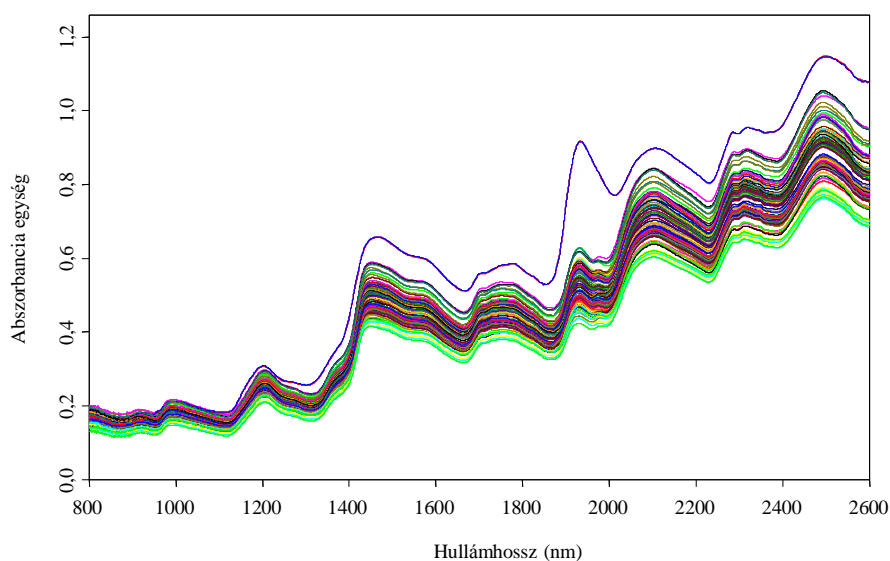


21. ábra: Száraztészta minták zsírtartalmának összesítő ábrája

A 21. ábra kezdeti szakaszában a tojás nélküli száraztészták (origóhoz közelebb) élesen elkülönülnek a tojással készült termékek sorozatához képest. Ez nem akadályozta meg a becslési függvény felállítását, hiszen ahhoz, hogy a függvény alacsony koncentráció-tartományban is megfelelő eredményeket szolgáltatson, mindenképpen szükséges alacsony zsírtartalmú referencia minták beiktatása a kalibrációs mintasorba, továbbá ezen minták reprezentálják a termékbe kizárólag a lisztből kerülő zsírtartalmat.

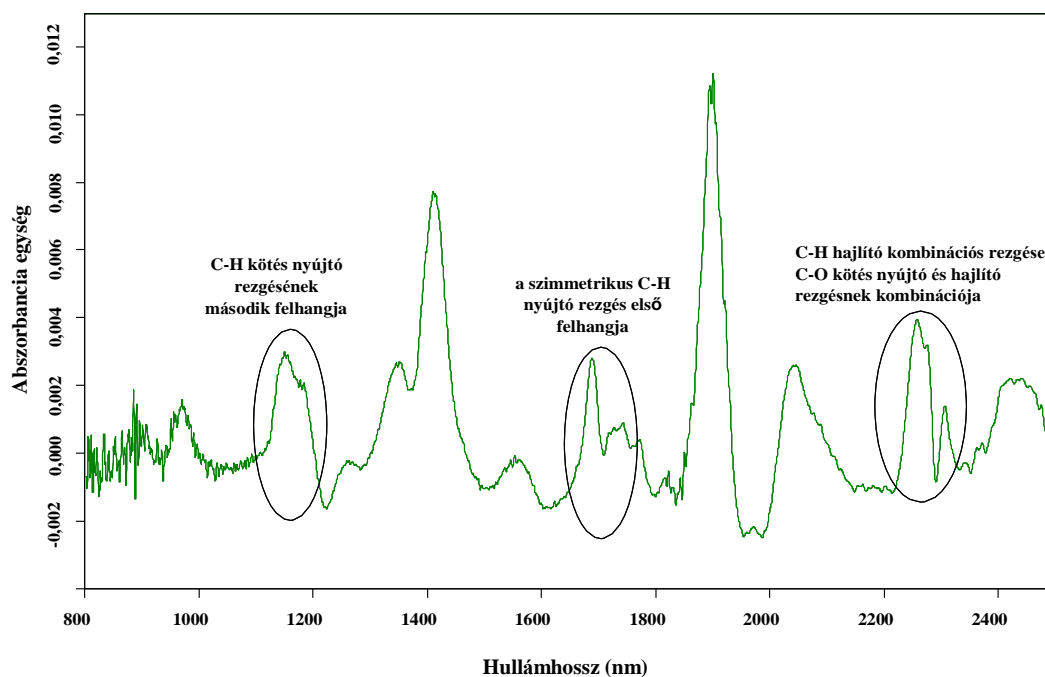
5.2.1.2. FT-NIR módszerfejlesztés

A darált száraztésztákról felvett spektrumok (22. ábra) PCA analízise alapján megállapítottam, hogy a minták között spektrális kiesővel nem kell számolnom.



22. ábra: Szárasztészták zsírtartalmának meghatározására használt minták közeli infravörös spektrumai

A spektrumok első deriváltját megvizsgálva (23. ábra) jelöltem ki a zsírtartalom kalibrációhoz felhasznált kiértékelési hullámhossz-tartományokat.



23. ábra: Szárasztésztá minták átlagspektrumának ($n=90$) első deriváltja a zsírtartalommal összefüggő rezgési csúcsokkal

A derivált spektrumok vizsgálata alapján az 1135 - 1200 nm ($8810 - 8333 \text{ cm}^{-1}$), a 1620 - 1759 nm ($6173 - 5685 \text{ cm}^{-1}$) és a 2247-2330 nm ($4450 - 4292 \text{ cm}^{-1}$) hullámhossz tartományokat vizsgáltam

(Osborne és mtsai, 1999; Workman, 2000). A kereszt-validációval nyert becslési függvényeket az 7. táblázatban foglaltam össze.

7. táblázat: Zsírtartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	97,69	96,56	96,84	97,39
	RMSEC (m/m%)	0,13	0,15	0,15	0,14
	RPD	6,58	5,39	5,63	6,19
Kereszt-validálás	$R^2(\%)$	96,03	94,50	95,83	96,37
	RMSECV (m/m%)	0,16	0,19	0,16	0,15
	RPD	5,02	4,26	4,9	5,25
	PLS faktor	9	6	6	6
Kémiai kiesők száma		2	1	5	5

A 7. táblázatban feltüntetett becslési függvények között nem tapasztalható nagy eltérés. A legnagyobb átlagos becslési hibával terhelt összefüggést a DER2 spektrum-transzformáció használata során kaptam. A DER1 transzformációval nyert összefüggés RMSEC értéke a legkisebb, viszont a kereszt-validálás esetén ez az érték 0,16 m/m%-nak adódott, az RPD érték és a PLS faktorok száma is magas. Ebből arra következtetek, hogy a függvény túlillesztett. A legstabilabb összefüggést a DER1 + SNV kombinált spektrum transzformáció alkalmazásával kaptam száraztészták zsírtartalmának meghatározására.

A zsírtartalom meghatározására legjobbnak ítélt függvénnyel az M4. ábrán bemutatott különbség (-0,30/ +0,37 m/m%) érhető el a valós és a becsült adatok között. Az ábráról úgy tűnhet, hogy a populáció struktúráltságot mutat. Ez következhetne abból, hogy a száraztésztába kerülő zsír csak a tojásból származhat (a tojástartalom meghatározására használt MSZ is ezen alapul), viszont a gyártáshoz felhasznált liszt mennyisége nem elhanyagolható és ez mintánként más és más mennyiség, ebből fakadóan a látszólagos struktúráltság kizárható, a populáció normál eloszlású.

A továbbiakban két részre osztottam a rendelkezésre álló mintákat, az OPUS 6.5 Quant moduljának használatával. A populáció 2/3-át kalibráló, 1/3-át validáló mintának választottam. Az M10.

táblázatban foglaltam össze a kalibrációs és validációs összefüggések felállításához felhasznált minták által lefedett tartományt.

A teszt-validálással végrehajtott becslési függvények paramétereit a 8. táblázatban foglaltam össze.

8. táblázat: Zsírtartalom becslésére felállított teszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	95,36	96,01	97,16	95,98
	RMSEC (m/m%)	0,19	0,18	0,15	0,17
	RPD	4,64	5,01	5,93	4,99
Teszt- validálás	$R^2(\%)$	92,83	93,36	94,58	93,65
	RMSEP (m/m%)	0,20	0,19	0,17	0,18
	RPD	3,74	3,96	4,63	3,97
	PLS faktor	5	3	5	3

A fenti táblázatba foglalt összefüggésekből kiderül, hogy az előző megállapítás a DER1 spektrum-transzformációt követően felállított becslési függvény esetében helytálló. Jelen esetben ez az összefüggés terhelt a legnagyobb hibával. A kombinált műveletek használata vezetett a legjobb összefüggésekhez, a két becslési függvény között a különbségek elhanyagolhatók, így mindkettő alkalmazható zsírtartalom meghatározására száraztésztákból.

5.2.2. Tojástartalom meghatározása

A minták tojástartalmának meghatározását a 4.3.3. fejezetben leírt módon végeztem el. A meghatározás alapja egy általunk fejlesztett egyenlet alkalmazása. A vonatkozó Magyar Szabványban nem fektetnek hangsúlyt a lisztből a késztermékbe kerülő zsírtartalomra, azonban kutatásaink alapján a száraztészta-gyártáshoz felhasznált liszt zsírtartalma – különösen a kis tojástartalmú minták esetében - nem elhanyagolható, így az általunk fejlesztett egyenlet ezt is figyelembe veszi:

$$m_1 * c_1 = x * m_2 * c_2 + (1000 - x * m_2) * d_3 * c_3.$$

Az egyenletben használt jelölések magyarázatát a 9. táblázatban tüntettem fel.

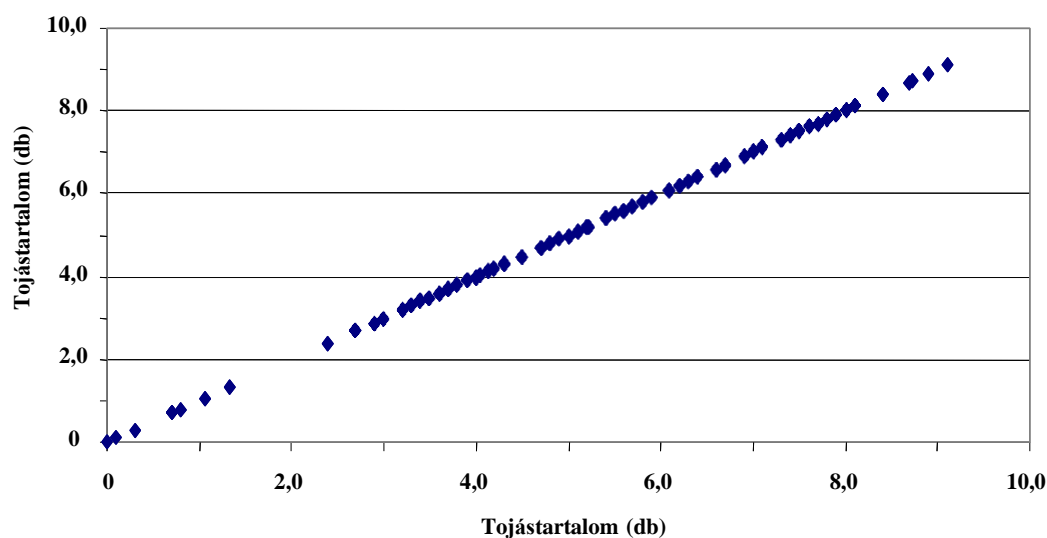
9. táblázat: A fejlesztett egyenletben használt jelölések magyarázó táblázata

Rövidítés	Jelentés	Mért vagy számított érték
m_1	A minta szárazanyag-tartalma g-ban kifejezve	Mért
m_2	Egy átlagos tojás szárazanyag-tartalma (g)	12,77 g (számított)
c_1	A minta zsírtartalma m/m%-ban kifejezve	Mért
c_2	Egy liofilizált átlagos tojás zsírtartalma (m/m%)	38,2 m/m% (mért)
c_3	Tojásnélküli száraztészta zsírtartalma; normál, durum (m/m%)	0,6 , 0,8 m/m% (mért)
d_3	Tojásnélküli száraztészta szárazanyag-tartalma	Mért
x	Tojástartalom (db)	Számított

5.2.2.1. Meghatározás számolással

Ahhoz, hogy az 5.2.2. fejezetben bemutatott egyenletet kifejllesszük, szükségünk volt néhány alapértékre, amely segítségével modellezni tudtunk egy „átlagos” tojást. Ezen alapadatok megállapítása céljából 100 tojást homogenizáltunk, liofileztünk majd porrá daráltunk. Ezt követően megállapítottuk egy átlagos tojás szárazanyag-tartalmát (12,77 g) és zsírtartalmát (38,2 m/m%). Egy átlagos héj nélküli tojás tömegét a vonatkozó szabvány szerint 45 g-nak vettük. A számoláshoz a minták zsírtartalom adatai már rendelkezésre álltak, így a számolás elvégezhető volt. A tojás nélküli száraztészta minták reprezentálták a liszt zsírtartalmát.

Az M11. táblázatban foglalom össze a klasszikus meghatározással nyert eredményeket. Az adatokat a fent bemutatott egyenlettel számoltuk. A minták megoszlása a gyártó által deklarált értékek alapján a következő: 6 minta tojás nélküli, 4 minta egy tojásos, 62 minta 4 tojásos, 11 minta 6 tojásos és 47 minta 8 tojásos.

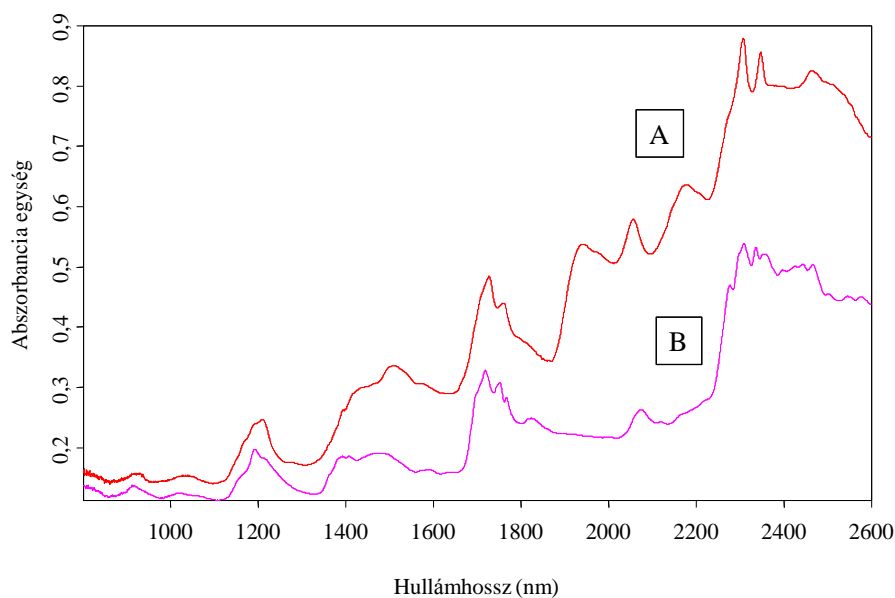


24. ábra: Szárastészta minták tojástartalmának összesítő ábrája

A 24. ábrán láthatjuk a számolással meghatározott kísérleti minták tojástartalmát. A vizsgálni kívánt tartomány tojástartalom szempontjából teljesen lefedi a Magyarországon kereskedelmi forgalomban kapható termékeket.

5.2.2.2. FT-NIR módszerfejlesztés

A liofilizált tojás és koleszterin por FT-NIR spektrumát elemezve választottam ki a megfelelő kiértékelési hullámhossz-tartományokat (25. ábra).



25. ábra: Liofilizált tojáspor (A) és koleszterin (B) NIR spektruma

A 25. ábrának megfelelően az értékelte hullámhossz-tartományok a következők: 1222 - 1280 nm (8183 - 7813 cm^{-1}), 1380 - 1780 nm (7246 - 5618 cm^{-1}) és 1845 - 2500 nm (5420 - 4000 cm^{-1}). A koleszterin használata azzal magyarázható mert a tojás zsírtartalmának kb. 4%-át ez a komponens teszi ki, így a módszerfejlesztéshez azokat a rezgési tartományokat választhattuk ki, ahol feltételezhető a koleszterin elnyelése a közeli infravörös tartományban, így a módszer tojástartalomra még specifikusabb.

A teszt-validáció során kapott becslési függvények paramétereit a 10. táblázatban foglaltam össze.

10. táblázat: Tojástartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	91,45	94,08	94,57	95,41
	RMSEC (db)	0,7	0,5	0,5	0,5
	RPD	3,42	4,11	4,29	4,67
Teszt- validálás	$R^2(\%)$	89,39	87,06	89,69	89,75
	RMSEP (db)	0,5	0,5	0,5	0,5
	RPD	3,07	2,97	4,79	3,66
	PLS faktor	5	3	4	5

A tojástartalom meghatározására fejlesztett becslési összefüggések közül a legjobb statisztikai paraméterekkel rendelkező egyenletet a DER1 + SNV spektrum-transzformációs művelet alkalmazását követően kaptam mind kalibráció, mind pedig kereszt-validáció esetében. Az RMSEC és RMSEP értékek jelen esetben darab tojást jelentenek, így ha minőségellenőrzésre használjuk az összefüggéseket, akkor 0,5 db tojás hibával becsülhető meg a vizsgálandó minta tojástartalma. A szabvány alapján a megengedett eltérés 25% a deklarált és a mért tojástartalom között. Ez azt jelenti, ha egy nyolctojasos téstával számolunk, hogy hat tojás felhasználásával nyolctojasosként hozható forgalomba a termék. Ehhez képest a fejlesztett egyenlet akár négyszer pontosabban képes meghatározni a termékek tojástartalmát.

Az M5. ábráról leolvasható, hogy a legjobbnak ítélt összefüggéssel -1,1 és +1,1 db maximum eltérés mutatkozott a referencia adat és a becsült érték között. Az ábra az eddig bemutatott különbség ábrákhoz képest eltérő, mivel a tojástartalom meghatározására felállított függvényeket nem kereszt-validációval, hanem teszt-validálással hajtottam végre.

A tojástartalom meghatározására teszt-validációval fejlesztett becslési összefüggéseket 11 mintát tartalmazó külső validáló mintasorral ellenőriztem. A külső validáció eredményeit a 11. táblázatban foglaltam össze.

11. táblázat: Tojástartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények külső validálásának összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Külső validálás	SEP	0,58	0,60	0,42	0,49
	RMSEP (db)	0,66	1,08	0,47	0,58
	RPD	5,04	4,81	6,99	5,95

Az RMSEP és RPD értékek alapján elmondható, hogy a teszt-validációval fejlesztett becslési függvények vizsgálata során tévesen válaszottam ki a megfelelőnek vélt összefüggést. A 11. táblázat adataiból egyértelműen következik, hogy a külső minták ellenőrzése során a DER1 + MSC kombinált spektrum-transzformációval felállított becslési összefüggés alkalmazható a legkisebb átlagos hibával száraztészta tojástartalmának meghatározására. Ezt alátámasztja a magas RPD érték is, mely Norris útmutatása alapján (Norris és Williams, 2004), a függvény használatával jó minőségi ellenőrzésre van lehetőség.

A tojástartalom meghatározására kifejlesztett becslési függvény elemzésekor mindenképp le kell szögezni, hogy a módszer nem alkalmas sem tojás nélküli tészták minősítésére, sem esetleges tésztahamisítási folyamatok felderítésére. Előbbi probléma megoldására ELISA technika, míg utóbbi esetben gázkromatográfiás technika vezet megfelelő eredményre.

Kaffka és Kulcsár 1982-ben megjelent cikkükben már beszámolnak száraztésztaikkal folytatott vizsgálatokról (Kaffka és Kulcsár, 1982). A 25 mintás mintasoruk 2-6 tojásos tésztákat tartalmazott, melyek zsír- és tojástartalmának meghatározására állítottak fel becslési összefüggéseket. A meghatározáshoz két karakterisztikus hullámhosszt választottak, ezért magas korrelációt kaptak zsírtartalom meghatározása esetén. Az általam használt mintasor változatosabb tojástartalom szempontjából és a választott hullámhossz-tartományok szélesebbek így a két munka nem összehasonlítható.

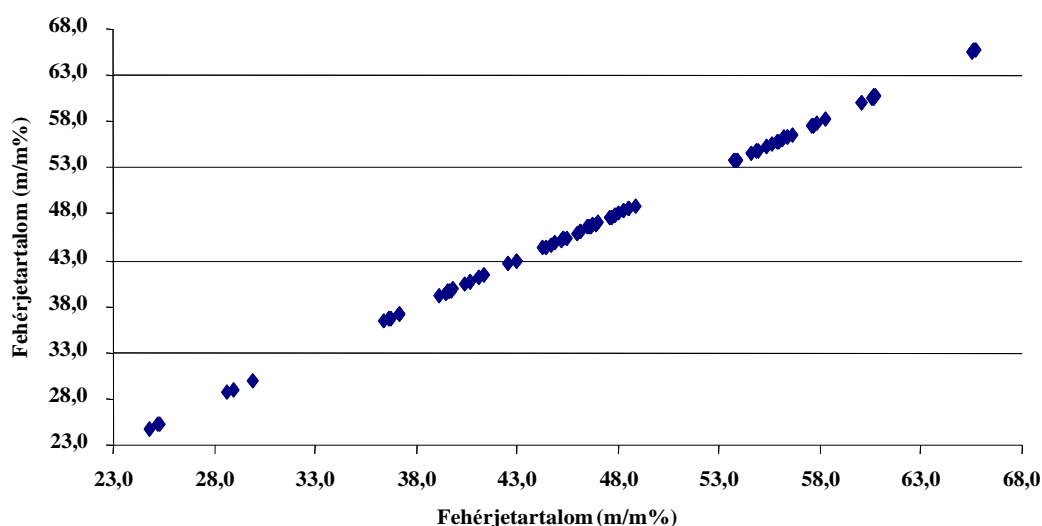
5.3. Sajtminták

5.3.1. Fehérjetartalom meghatározása

5.3.1.1. Kjeldahl módszer alkalmazása

A klasszikus meghatározást az ISO 21543:2006 szabványmódszer illetve a DIN EN ISO 8968:2001 szabványban rögzített módszerek alapján hajtottam végre. Az alkalmazott szorzófaktor a N tartalom meghatározása után 6,38 volt.

A Kjeldahl-módszerrel meghatározott referencia-adatok nagy szórással terheltek, így ezt a spektroszkópiás módszerfejlesztés értékelésénél mindenképpen figyelembe kell venni. A Kjeldahl módszer szórása 0,02%-tól 0,04% a szabvány alapján nitrogéntartalomra vonatkoztatva, így az általam számolt szórás valóban nagy, ami adódhat a minták inhomogenitásából, személyi hibából (M12. táblázat).

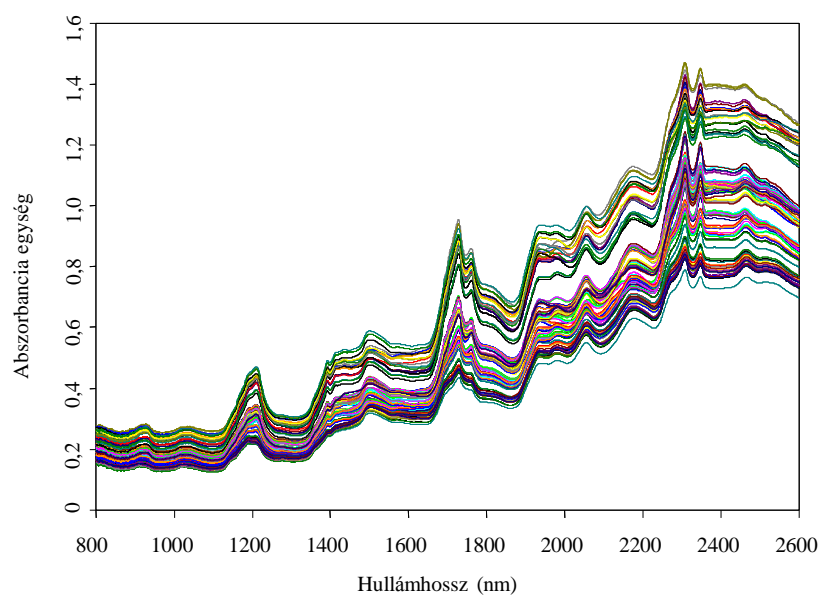


26. ábra: Sajtminták fehérjetartalmának összesítő ábrája

A vizsgálatokra beszerzett kemény és félkemény sajtminták fehérjetartalma (26. ábra), egyenletesen lefedi a vizsgálandó tartományt.

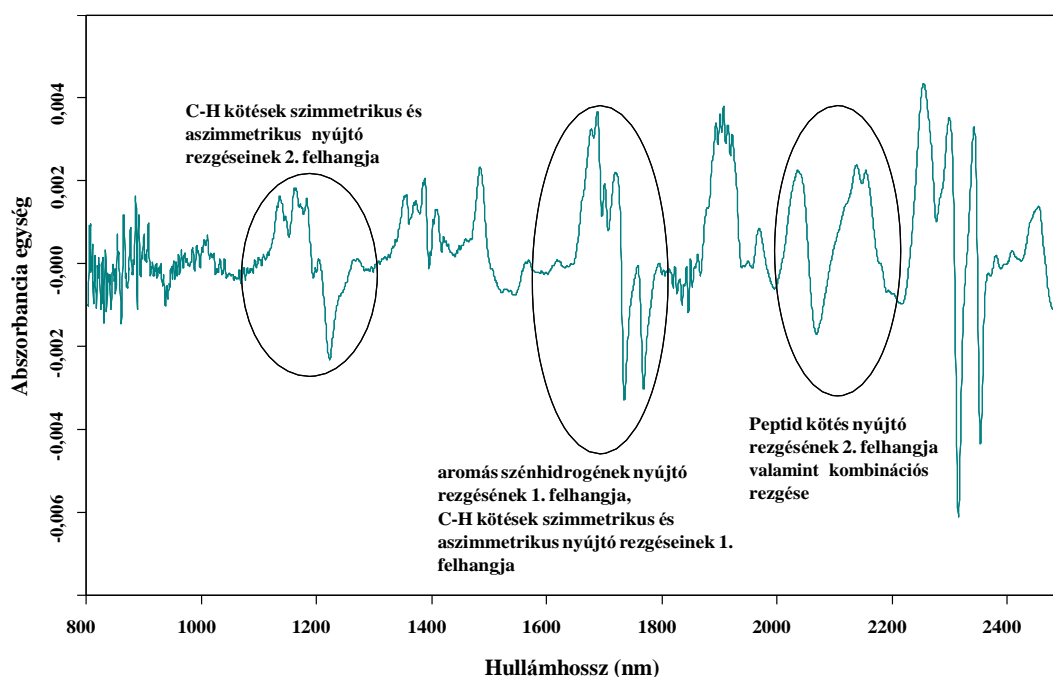
5.3.1.2. FT-NIR módszerfejlesztés

A liofilizált, darált minták diffúz-reflexiós spektrumának rögzítése az eddigiekkel megegyező módon történt (27. ábra). A spektrumokat PCA analízisnek alávetve megállapítottam, hogy a minták között spektrális kieső nem található.



27. ábra: Félkemény és kemény sajtok közeli infravörös spektruma

A kiértékelési tartomány kiválasztása céljából ebben az esetben is a spektrum első deriváltját vizsgáltam meg (28. ábra). Jól látható, hogy a kisebb hullámhossz tartományban (kb. 1100 nm-ig) a derivált spektrum zajos, melynek lehet az az oka, hogy a sajtban található fehérjék enzimes és mikrobiológiai bontáson is átesnek, így a peptidek/fehérjék mérete és szerkezete összetettebb lesz. Emellett elképzelhető az is, hogy a nem megfelelően kialakított szemcseméret befolyásolja a spektrumot, ami viszont fizikai zavaró tényező. További magyarázatként szolgálhat az a tény is, hogy a PbS detektor 1100 nm alatt sokat veszít az érzékenységéből.



28. ábra: Liofilizált sajtminták átlagspektrumának (n=87) első deriváltja a fehérjetartalommal összefüggő rezgési csúcsokkal

A fehérjetartalom becslésére az 1090 - 1334 nm ($9174 - 7496 \text{ cm}^{-1}$), 1639 - 1836 nm ($6101 - 5446 \text{ cm}^{-1}$) és a 2000 - 2200 nm ($5000 - 4545 \text{ cm}^{-1}$) hullámhossz-tartományt választottam ki.

12. táblázat: Fehérjetartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

Becslési függvény tulajdonságok					
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	98,68	98,82	98,23	98,11
	RMSEC (m/m%)	1,06	1,00	1,33	1,33
	RPD	8,70	9,21	7,51	7,28
Kereszt-validálás	$R^2(\%)$	98,20	97,73	97,08	97,08
	RMSECV (m/m%)	1,17	1,33	1,63	1,58
	RPD	7,46	6,63	5,86	5,86
	PLS faktor	6	6	6	6
Kémiai kiesők száma		14	11	5	4

A teljes kereszt-validálással végrehajtott optimálás során a vizsgált minták fehérjetartalmának meghatározására a legjobb becslési függvényt a DER1 spektrum-transzformációt alkalmazva kaptam. Annak ellenére, hogy 14 kémiai kieső mintát azonosítottam, az összefüggés az RPD érték és a PLS faktorok száma alapján robusztusabb, mint amilyen összefüggésre a többi spektrum-transzformációt követően jutottam. Meglepő eredményt hozott a kombinált műveletekkel kezelt spektrumok alkalmazása. Az eddig bemutatott eredményekhez képest a sajtminák fehérjetartalmának meghatározására kevésbé alkalmasak a kombinált spektrumtranszformációs műveletek. A legkisebb átlagos kereszt-validációs hiba 1,17 m/m%, mely a klasszikus adatok minimum értékéhez képest egy nagyságrenddel kisebb, így a függvény megbízhatóan alkalmazható kemény és félkemény sajtminák fehérjetartalmának becslésére.

Az egyes mintákra vetítve a referencia és a becsült adatok közötti maximális eltérés (M6. ábra) - 2,9/+2,9 m/m%. A populáció nem mutat mintázatot, ismétlődést, így normál eloszlásúnak tekintem.

A teszt-validálás elvégzéséhez a mintákat a szakirodalomban (Norris) javasoltaknak megfelelően ebben az esetben is 2:1 arányban osztottam szét kalibráló és validáló mintasorra. Ennek megfelelően a 87 mintából 58 mintát használtam fel a kalibrációhoz és 29 mintát a validációhoz. A populáció szétoztása az OPUS 6.5 szoftver automata alcsoport választás moduljával történt. Az M13. táblázatban összefoglalt statisztikai adatok azt mutatják, hogy a mintacsoportok elválasztása során átlag, koncentráció-tartomány és szórás szempontjából is egyenletes mintaelosztás történt.

13. táblázat: Fehérjetartalom becslésére felállított teszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

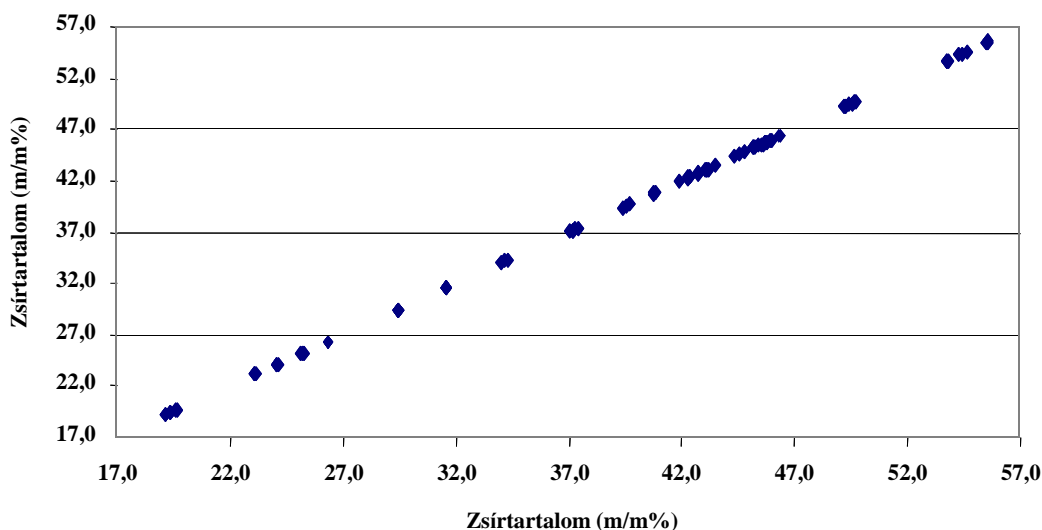
		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	R ² (%)	98,11	97,51	97,44	97,79
	RMSEC (m/m%)	1,19	1,34	1,36	1,38
	RPD	7,27	6,33	6,24	6,73
Teszt-validálás	R ² (%)	97,63	98,26	95,58	97,74
	RMSEP (m/m%)	1,53	1,35	1,75	1,42
	RPD	6,76	7,59	4,85	6,91
	PLS faktor	6	5	2	6

A teszt-validálás során kapott becslési függvények nem térnek el nagy mértékben a teljes kereszt-validációval nyert becslési függvényektől. A legnagyobb különbséget a DER1 + MSC kombinált spektrum-transzformáció alkalmazása során tapasztaltam. Az R^2 érték 95,58% és a teszt-validálás átlagos hibája ebben az esetben a legnagyobb (1,75 m/m%). A sajátvektorok számából (PLS=2) egyértelműen arra következtettem, hogy az így módon transzformált spektrumokra létrehozott becslési függvény alulillesztett. A teszt-validálás során szintén a DER1 spektrum-transzformációval nyert összefüggés jellemezhető a legjobb statisztikai tulajdonságokkal a kalibrálást tekintve. Azonban a DER2 alkalmazásával a validáció során jobb eredményeket kaptam. A PLS faktorok nagyobb száma, az RMSEC és RMSECV értékek különbsége alapján a DER1 + SNV spektrum-transzformációval kezelt spektrumok használata során kapott összefüggést minősítem a legjobbnak.

5.3.2. Zsírtartalom meghatározása

5.3.2.1. Schmid-Bondzynski-Ratzlaff-féle módszer alkalmazása

A sajtminák zsírtartalmának referencia-adatai (a fehérjetartalomhoz hasonlóan) nagy szórással terheltek (M14. táblázat).

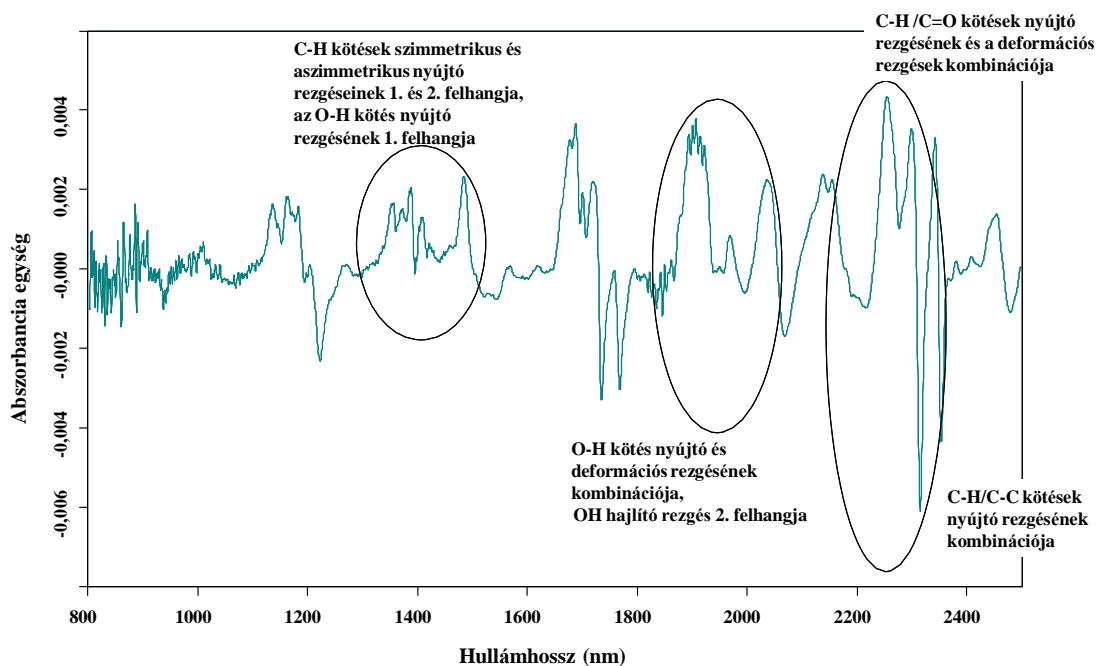


29. ábra: Sajtminák zsírtartalmának összesítő ábrája

A 29. ábrán látható, hogy a minták összeválogatásával sikerült széles zsírtartományt lefedni. Az alacsony zsírtartalmú minták számát tekintve a populáció további minták bevonásával még inkább egyenletessé tehető.

5.3.2.2. FT-NIR módszerfejlesztés

A zsírtartalom meghatározására felállított becslési függvények 87 minta adatain alapulnak. A kiértékelési hullámhossz tartományok kijelölése ebben az esetben is a spektrumok első deriváltjának (30. ábra) vizsgálata alapján történt.



30. ábra: Liofilizált sajtminék (n=87) első deriváltja a zsírtartalommal összefüggő elnyelési maximumokkal

A vizsgált hullámszám (hullámhossz) tartományok az 1333–1520 nm (7502 – 6579 cm⁻¹), 1800 – 2100 nm (5555 – 4762 cm⁻¹) és 2190 – 2370 nm (4566 – 4220 cm⁻¹) voltak.

A kereszt-validációra kapott kalibrációs és validációs adatokat a 14. táblázatban foglaltam össze.

14. táblázat: Zsírtartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	99,86	99,86	99,82	99,87
	RMSEC (m/m%)	0,45	0,41	0,49	0,41
	RPD	26,4	26,6	23,3	27,6
Kereszt-validálás	$R^2(\%)$	99,67	99,65	99,69	99,77
	RMSECV (m/m%)	0,62	0,61	0,59	0,50
	RPD	17,5	17,0	18,0	21,1
	PLS faktor	10	9	9	10
Kémiai kiesők száma		8	11	2	2

A teljes kereszt-validáció során nyert becslési függvények hasonló paraméterekkel rendelkeznek mind a négy spektrum-transzformációt követően. A legjobb paraméterekkel rendelkező összefüggést a DER1 + SNV kombinált spektrum-transzformáció eredményeként kaptam. A DER2 alkalmazása is jó eredményhez vezetett a statisztikai paraméterek alapján, meg kell azonban jegyezni, hogy a becslési függvény ebben az esetben csak 76 minta adatain alapul. A kereszt-validálás során a kombinált műveletekkel, ezek közül is a DER1 + SNV transzformációval jutottam az RMSECV hibaértékek szempontjából a legkedvezőbb ($RMSECV \leq 0,6$ m/m%) eredményhez.

Az egyedi eltéréseket megvizsgálva (M7. ábra) megállapítható, hogy a legnagyobb különbség - 1,1/+1,2 m/m% értékek között mutatkozott.

A következő lépés szintén a 87 minta kalibráló és validáló mintákra történő szétosztása volt, amit az eddigiekkel megegyező módon az OPUS 6.5 szoftver automata alcsoport választás moduljával hajtottam végre (M15. táblázat).

A teszt-validáció során nyert becslési függvényeket a 15. táblázatban foglalom össze.

15. táblázat: Zsírtartalom becslésére felállított teszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	99,35	99,65	99,71	99,78
	RMSEC (m/m%)	0,88	0,62	0,58	0,51
	RPD	12,4	16,8	18,6	21,5
Teszt- validálás	$R^2(\%)$	99,34	99,65	99,71	99,78
	RMSEP (m/m%)	0,92	0,66	0,62	0,55
	RPD	12,7	17,0	18,6	21,3
	PLS faktor	7	8	5	7

A vizsgált spektrum-transzformációs műveleteket összehasonlítva egyértelműen kitűnik a rosszabb statisztikai jellemzőivel a DER1 transzformációt követően nyert összefüggés. Ez jellemezhető a legnagyobb hibával (RMSEC és RMSEP értékek) és a legkisebb R^2 értékkel. A másik három függvény-transzformáció eredményeként kapott becslési függvények statisztikai paraméterei közel azonosak., közülük a DER1 + SNV kombinált műveletet követően kapott összefüggés mutatkozik statisztikai szempontból a legkedvezőbbnek.

McQueen és mtsai klasszikus módon 24 mintát vizsgáltak, melyhez referencia módszerként szintén Kjeldahl és Schmid-Bondzynski-Ratzlaff eljárásokat alkalmaztak (McQueen és mtsai, 1995). A klasszikus meghatározás tartományait összehasonlítva elmondható, hogy az általunk vizsgált minták tartománya jóval szélesebb, mint szerzők által vizsgált mintáké. A zsírtartalom eredményeket összevetve a tartomány hasonló. Ezzel szemben a műszeres meghatározással mind fehérje, mind pedig zsírtartalom esetében kisebb átlagos hibával becsülő függvényeket sikerült felállítanunk. Fehérjetartalom meghatározását 1,17 m/m%-os hibával jellemezhető becslési függvénnyel hajthatjuk végre, míg ez a hiba az ő esetükben 1,9 m/m%. Zsírtartalom meghatározására 0,50 m/m%-os átlagos hibával rendelkező becslési függvényt állítottunk fel, míg a szerzők 1,4 m/m%-os átlagos hibáról számolnak be. Ez köszönhető az alacsony mintaszámnak (24 db) illetve a nagyszámú kieső mintának (8 db). Blazquez és mtsai 64 mintás mintasorral dolgoztak, majd dolgoztak ki NIR módszert zsírtartalom meghatározására (Blazquez és mtsai, 2004). A referencia mérések tartománya 23,7 m/m%-tól 34,2 m/m%-ig terjedt, ami jóval szűkebb az általunk használt minták zsírtartományához

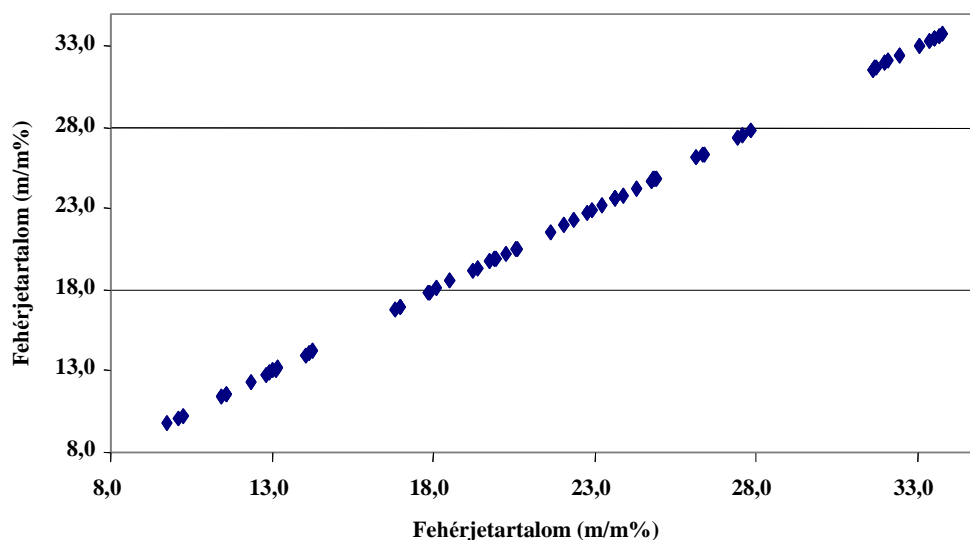
képest. Eredményeik azonban hasonlóan mondhatók, az általuk felállított becslési függvény 0,45 m/m%-os hibával képes a sajtok zsírtartalmának meghatározására, bár szinte a teljes közeli infravörös tartományt (1100 – 2498 nm) használják. A nem jól megválasztott hullámhossz-tartomány vezethet téves eredményhez, hiszen számos más abszorpciós sávot is mérünk, amely nem a vizsgált makrokomponens rezgéséből származik. Cruda és mtsai optikai szállal felszerelt FT-NIR műszerük használatával zsírtartalom meghatározására 0,43 m/m%-os hibával jellemezhető, míg fehérjetartalom meghatározására 0,99 m/m%-os átlagos becslésihibával jellemezhető függvényt állítottak fel (Curda és Kukackova, 2004).

5.4. Keresztesvirágúak – *Brassicaceae* család *Brassica* nemzetsége

5.4.1. Fehérjetartalom meghatározása

5.4.1.1. Kjeldahl módszer alkalmazása

A *Brassica* minták fehérjetartalmának meghatározását a 4.3.1. fejezetben bemutatott Kjeldahl módszerrel végeztem el. A friss zöldségfélék N-tartalma 1-3% körüli értékre tehető, mely alapvetően a fehérjetartalomból adódik (Belitz és Grosch, 2004). Tekintettel a friss termékek kis fehérje- és nagy nedvességtartalmára a minta-előkészítés első lépéseként liofilizáltam a mintákat, mellyel fehérjetartalmuk olyan tartományba került, mely lehetővé tette az FT-NIR technikával történő becslést. Az M16. táblázatban a liofilizált minták fehérjetartalmára vonatkozó adatokat foglaltam össze. A legkisebb fehérjetartalmú minta a fejeskáposzta (9,7 m/m%), míg a legnagyobb a brokkoli minták (33,8 m/m%) közül került ki.

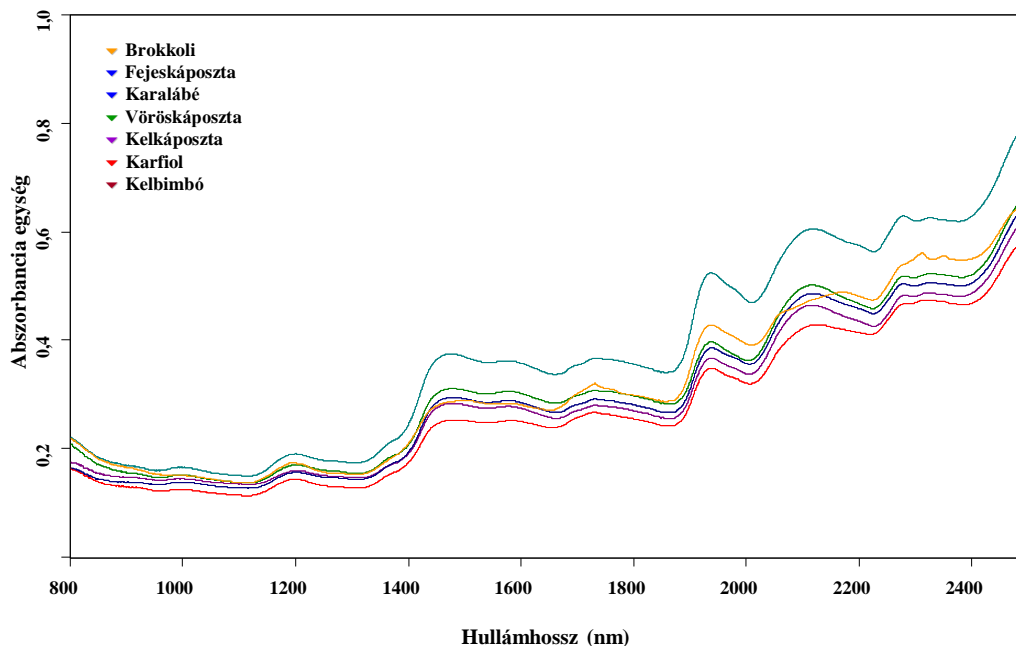


31. ábra: Keresztesvirágúak Kjeldahl módszerrel meghatározott fehérjetartalom eredményeinek tartománya

A vizsgált minták fehérjetartalmuk alapján (31. ábra) látszólag három csoportba sorolhatók: alacsony- (9,7 – 14,2 m/m%), közepes- (16,8 - 28,0 m/m%) és magas (30,0 - 33,8 m/m%) fehérjetartalmú minták. Ez a csoportosítás azonban – ahogy a fehérjetartalom értékeket összevetjük – nem jelent valós osztályozást, a vizsgált koncentráció tartomány egyenletesen lefedettnek minősíthető.

5.4.1.2. FT-NIR módszerfejlesztés

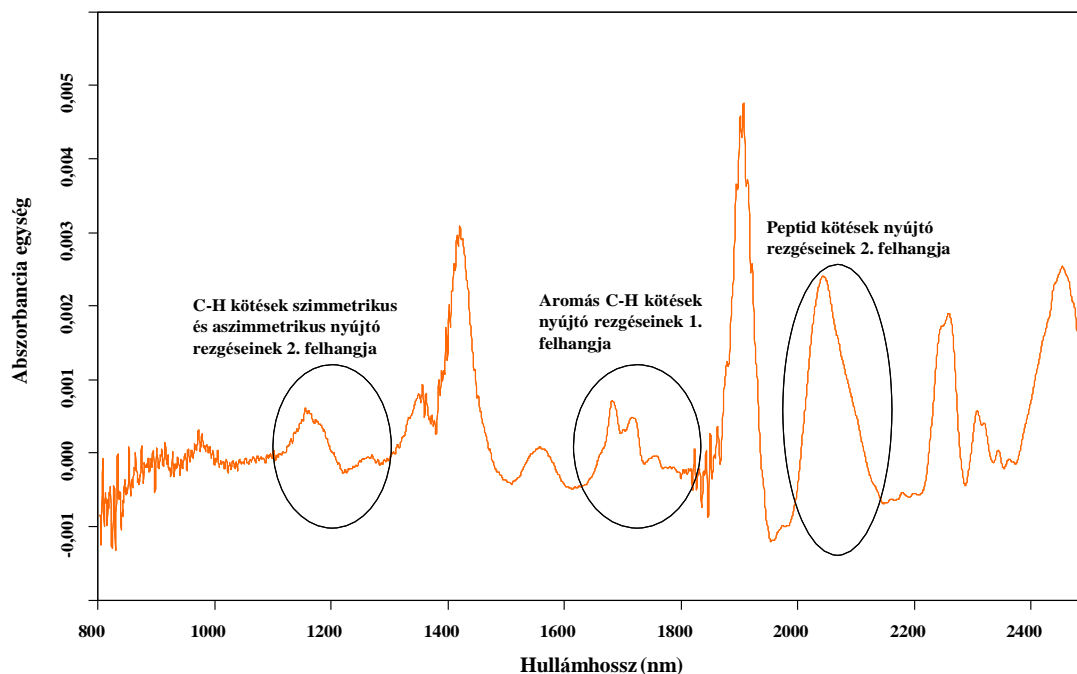
A friss zöldségek nedvességtartalma átlagosan 70-95 m/m%-ra tehető. A víz nagy moláris abszorpciós koefficiense miatt az infravörös tartományban nagy az elnyelése, így fontos részeket fedhet el a spektrumból. Tekintve, hogy a víz jellegzetes infravörös elnyelési maximumai (O-H kötés nyújtó rezgésének 1. felhangja 1440-1470 nm, O-H nyújtó/HOH deformációs valamint O-H hajlító rezgés 2. felhangjának kombinációs sávja) éppen olyan területre esnek, amelyek mind a fehérje-, mind a zsírtartalom szempontjából fontosak, a víz eltávolítása a mintákból spektrális szempontok miatt is lényeges lépés. A 32. ábrán a hét vizsgált mintacsoport NIR átlagspektrumait ábrázoltam.



32. ábra: A hét vizsgált *Brassica* mintacsoport közeli infravörös átlagspektruma

A spektrumok első kiértékelése ebben az esetben is főkomponens analízissel történt, amely eredményeként megállapítottam, hogy a vizsgált minták között spektrális kieső nem található.

A spektrumok első deriváltjainak (33. ábra) kiértékelése alapján a következő vizsgálati tartományokat választottam: 1136 - 1334 nm ($8803 - 7496 \text{ cm}^{-1}$), a 1639 - 1836 nm ($6101 - 5447 \text{ cm}^{-1}$) és a 2010 - 2170 nm ($4975 - 4608 \text{ cm}^{-1}$).



33. ábra: *Brassica* félék átlagspektrumának ($n=63$) első deriváltja a fehérjetartalommal összefüggő rezgési csúcsokkal

A 16. táblázatban foglaltam össze a kereszt-validálással felállított becslési függvények jellemző statisztikai adatait.

16. táblázat: Fehérjetartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	98,00	97,27	99,62	98,62
	RMSEC (m/m%)	1,09	1,24	0,50	0,90
	RPD	7,07	6,05	16,10	8,50
Kereszt-validálás	R^2				
	$R(\%)$	93,83	87,59	99,08	95,69
	RMSECV (m/m%)	1,76	2,50	0,72	1,47
	RPD	4,03	2,84	10,50	4,82
	PLS faktorok száma	9	6	6	8
	Kémiai kiesők száma	1	1	10	1

A 16. táblázat statisztikai adatait kiértékelve megállapítható, hogy a legkedvezőbb statisztikai paraméterekkel a DER1 + MSC kombinált transzformációs művelettel nyert becslési függvény rendelkezik. Mind a kalibráció, mind a validáció (RMSEC és RMSECV) 1 m/m% alatti hibával jellemezhetők, ami igen jó eredménynek látszik. Az adatok minősítésénél azonban figyelembe kell vennünk, hogy a 10 kémiai kieső igen nagy szám, főleg abban az esetben, hogy a teljes mintapopuláció nem volt nagy a 63 db-os mintaszámmal. Ezt még 10 mintával tovább csökkentve a kapott eredmény csak látszólag kedvező. A DER2 alkalmazásával olyan becslési függvényhez jutottam, amely kereszt-validációs R^2 értéke 90% alatti és ez a függvény rendelkezik a legnagyobb átlagos becslési hibával (2,50 m/m%), így kijelenthető hogy a vizsgált populációra a DER2 függvény-transzformáció nem alkalmazható megbízhatóan. Mindent összevetve megállapítható, hogy a fehérjetartalom becslésére a legkedvezőbb becslési függvényt a DER1 + SNV kombinált spektrum-transzformáció eredményezte.

A kereszt-validálás átlagos 1,47 m/m% hibája az M8. ábrán látható adatok alapján -3,0/+3,2 m/m% közötti értékek átlagából számolható.

A teszt-validálás elvégzése előtt a mintákat 2/3-ad 1/3-ad arányban kalibráló és validáló mintákra osztottam az OPUS 6.5 szoftver automata alcsoport választás moduljával. Az így kapott kalibráló és validáló mintacsoport jellemző adatait a M17. táblázatban foglaltam össze.

A teszt-validálással végrehajtott optimalás során a 17. táblázatban feltüntetett becslési összefüggéseket kaptam.

17. táblázat: Fehérjetartalom becslésére felállított teszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	R^2	97,55	95,74	96,57	96,58
	RMSEC (m/m%)	1,23	1,55	1,41	1,41
	RPD	6,39	4,84	5,40	5,41
Teszt-validálás	R^2	94,92	86,55	93,31	95,63
	RMSEP (m/m%)	1,68	2,73	1,92	1,56
	RPD	4,45	2,76	3,87	4,79
	PLS faktorok száma	8	5	6	6

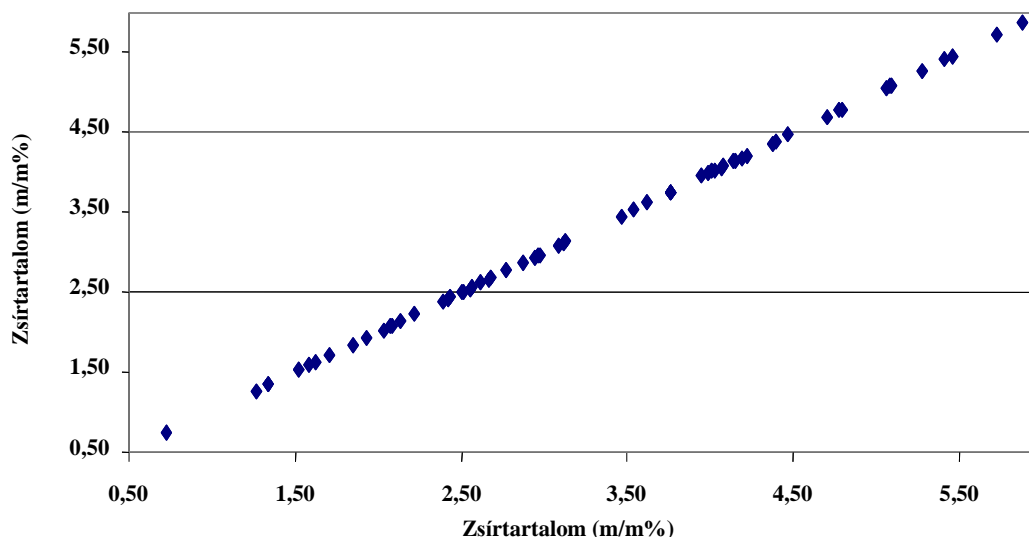
Annak ellenére, hogy a viszonylag kevés mintaszámot a teszt-validáció során a minták osztásával tovább csökkentettem, a várthoz képest jobb eredményeket kaptam. Kémiai kieső mintát nem azonosítottam egyik transzformációt követően sem. A kalibrációs összefüggések R^2 értéke mind a négy spektrum-transzformációs műveletet esetében 95% fölöttinek adódott. A teszt-validálás becslési függvényeinek statisztikai paramétereit összevetve a DER2 spektrum-transzformációs művelet eredményezte a leggyengébb összefüggést. Tekintettel a minta kémiai összetételére, a második derivált alkalmazása valószínűleg nem is indokolt.

A DER1 és ennek kombinációs műveleteit vizsgálva megállapítható, a sajátvektorok száma szempontjából a kombinált műveletek a legkedvezőbbek (PLS=6). A két kombinált spektrum-transzformáció eredményeként kapott becslési függvényeket összevetve, az RPD értékek viszonylag alacsonyak (3,87 illetve 4,79), de ez egyértelműen az alacsony mintaszámmal magyarázható. Végül következtetésként leszögezhetem, hogy a DER1 + SNV kombinált spektrum-transzformációs művelet alkalmazása adta a legkisebb hibával (RMSEP= 1,56 m/m%) jellemezhető összefüggést.

5.4.2. Zsírtartalom meghatározása

5.4.2.1. Módosított Weibull-Stoldt módszer alkalmazása

A zsírtartalom meghatározása a 4.3.2. fejezetben leírt módszerrel történt. A legkisebb zsírtartalmú minta a fehérjetartalomhoz hasonlóan szintén a fejeskáposzta míg a legnagyobb zsírtartalmú a brokkoli minta volt a klasszikus mérések alapján (M18. táblázat).

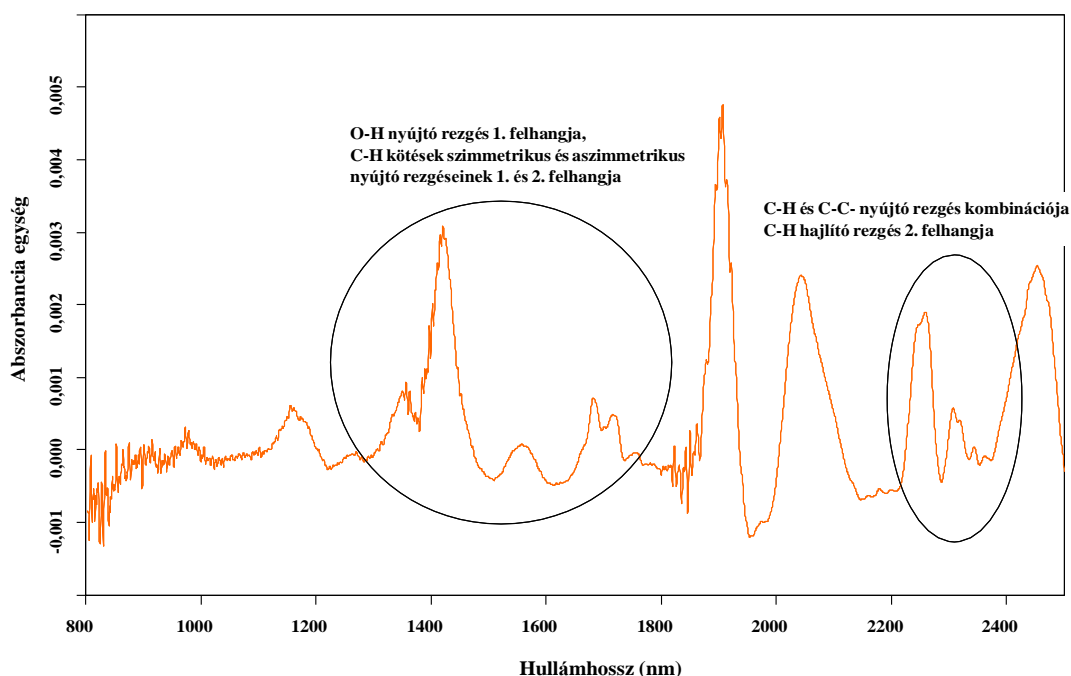


34. ábra: Keresztesvirágúak módosított Weibull-Stoldt módszerrel meghatározott zsírtartalom eredményeinek tartománya

A koncentráció-tartomány (34. ábra) nem olyan széles (0,7 – 5,9 m/m%), mint a fehérjetartalom esetében, de a minták eloszlása egyenletes, teljes lefedettséget mutat a vizsgált tartományban.

5.4.2.2. FT-NIR módszerfejlesztés

A zsírtartalom meghatározására fejlesztett becslési függvényekhez 63 minta klasszikus adatát használtam fel. A kalibrációs összefüggéseket kereszt-validálással és teszt-validálással állítottam fel. A spektrumok első deriváltjának (35. ábra) vizsgálatával a következő kiértékelési hullámhossz-tartományokat jelöltem ki: 1332 – 1780 nm ($7507 - 5618 \text{ cm}^{-1}$) és 2206 – 2402 nm-es ($4533 - 4163 \text{ cm}^{-1}$).



35. ábra: Keresztesvirágúak átlagspektrumának (n=63) első deriváltja a zsírtartalommal kapcsolatos rezgési csúcsokkal

A kereszt-validálással készült becslési függvények paramétereit a 18. táblázatban foglaltam össze.

18. táblázat: Zsírtartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	92,16	87,71	89,60	90,85
	RMSEC (m/m%)	0,39	0,45	0,44	0,41
	RPD	3,57	2,85	3,1	3,31
Kereszt- validálás	R^2 $R(\%)$	83,81	79,68	81,96	84,54
	RMSECV (m/m%)	0,51	0,54	0,53	0,50
	RPD	2,49	2,22	2,35	2,55
	PLS faktorok száma	9	6	7	7
	Kémiai kiesők száma	4	4	2	3

A kalibrációs R^2 és RMSEC értékek alapján a DER1 spektrum-transzformációval végrehajtott optimalás eredménye a legjobb, bár ebben az esetben találtam a legtöbb kémiai kieső mintát. A kombinált műveletek közül a DER1 + SNV művelettel nyert kalibráció R^2 értéke 90% fölötti és RMSEC értéke 0,02-dal marad el a fent említett összefüggésétől. A kereszt-validáció során az R^2 és RMSECV értékeket figyelembe véve jobb eredményt kaptam a kombinált művelettel. A sajátvektorok (PLS faktorok) száma és az RPD értékek alapján is a kombinált művelet a megfelelő mert a túl sok faktor figyelembe vételével a túlillesztés veszélye is fennáll. Ha a referencia adatokkal összehasonlítjuk a NIRS mérések hibáit, egy nagyságrendnyi eltérés tapasztalható, mely ilyen kis koncentráció-tartomány esetén jó eredmény. A 2 m/m%-nál kisebb zsírtartalommal jellemezhető mintákat (M9. ábra) a legjobb statisztikai paraméterekkel rendelkező becslési összefüggéssel is alámértem. Ez azért történt így, mert ez a tartomány (0-2 m/m%) NIR technikával már nehezen becsülhető.

A teszt-validáláshoz a mintákat a már megszokott módon 2:1 arányban osztottam kalibrációs és validációs mintasorra (M19. táblázat)

A teszt-validálás becslési függvényeinek statisztikai jellemzőit a 19. táblázatban foglaltam össze.

19. táblázat: Zsírtartalom becslésére felállított teszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	R^2	85,72	88,25	86,22	84,97
	RMSEC (m/m%)	0,55	0,49	0,53	0,56
	RPD	2,65	2,92	2,69	2,58
Teszt-validálás	R^2	81,31	76,88	82,81	80,70
	RMSEP (m/m%)	0,50	0,56	0,48	0,51
	RPD	2,31	2,12	2,41	2,28
	PLS faktorok száma	8	7	7	7

A kereszt-validációhoz képest rosszabb eredményeket kaptam, ami egyértelműen a mintaszám csökkenésével magyarázható. A legjobb összefüggést a kalibráció során a DER2 spektrum-transzformáció alkalmazását követően kialakított becslési függvénnyel kaptam. A validálás során azonban ez a transzformációs művelet volt a legnagyobb hibával terhelt. A DER1 + MSC transzformációval kialakított becslési függvényt jellemzi a legmagasabb R^2 és legalacsonyabb RMSEP érték. Hasonló paramétereket kaptam a DER1 és a DER1 + SNV kombinált spektrum-transzformáció eredményeként.

Az eredményeink összevetése a szakirodalommal nehezen elvégezhető, mivel *Brassica oleracea* típusú minták makrokomponensek meghatározására irányuló munka nem található. A *Brassicaceae* családba tartozó *Brassica napussal* (repcé) viszont több szakirodalom is foglalkozik. Ezen magok közeli infravörös spektroszkópiás vizsgálata mintaelőkészítés nélkül elvégezhető. Velasco és mtsai repcemagok fehérjetartalmának meghatározására dolgoztak ki becslési függvényt (Velasco és Möllers, 2001). Az általuk kereszt-validálással felállított összefüggés átlagos hibája 0,87 m/m%, míg a mi esetünkben ez a hiba 0,90 m/m%, így annak ellenére, hogy az általunk használt mátrix bonyolultabb, az eredmény azonosnak tekinthető. Font és mtsai szintén *Brassicaceae* családba tartozó zöldségféléket vizsgáltak szemes és darálmány formában (Font és mtsai, 2006). Nyersfehérje-tartalom meghatározására egész szemekből 0,51 m/m%-os, míg darálmányból 0,55 m/m%-os predikciós

hibával terhelt összefüggéseket kaptak. Ezen eredmények az általam felállított függvényekhez képest pontosabb becslést tesznek lehetővé.

5.5. Pillangósvirágúak – *Fabales* rendhez tartozó *Fabaceae* család

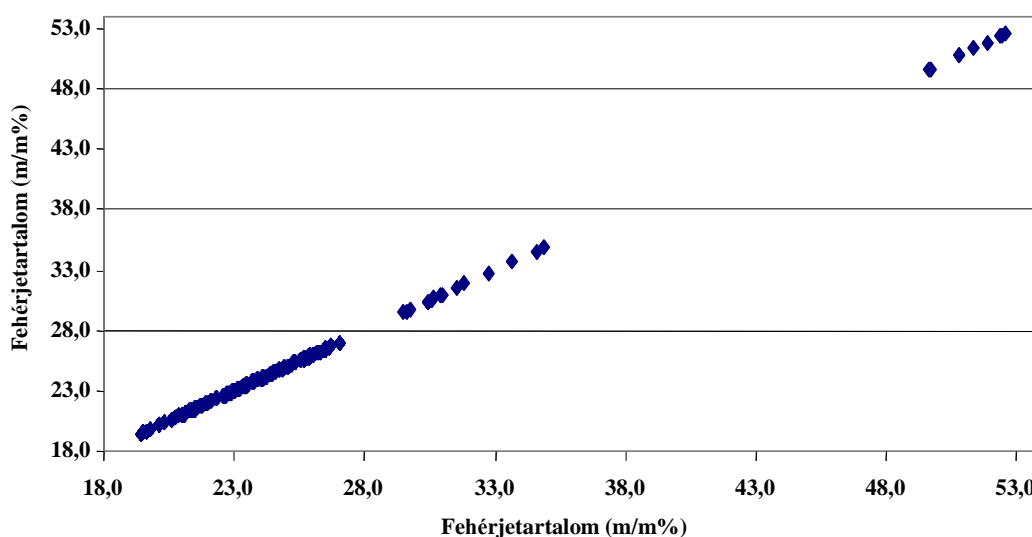
5.5.1. Fehérjetartalom meghatározása

A pillangósvirágúak fehérjetartalmának meghatározását a 4.3.1. fejezetben leírt referencia-módszerrel végeztem el.

5.5.1.1. Kjeldahl módszer alkalmazása

A Kjeldahl módszerrel meghatározott fehérjetartalom fajtánkénti jellemző adatait az M20. táblázatban foglaltam össze.

Míg a borsó, lencse, csicseriborsó minták fehérjetartalma hasonló, viszonylag szűk tartományban mozog, addig a bab és szója minták között jelentős eltérés tapasztalható. A legkisebb fehérjetartalommal az egyik bab minta rendelkezett (19,5 m/m%), míg a vizsgált minták közül a legnagyobb fehérjetartalma az egyik szójamintának volt (52,6 m/m%). A szórásértékek tekintetében szintén a szójamintákat kell kiemelni, mivel ezen minták jellemezhetők a legnagyobb szórással. Ez valószínűleg abból adódik, hogy a szójagranulátumok homogenitása nem volt megfelelő.

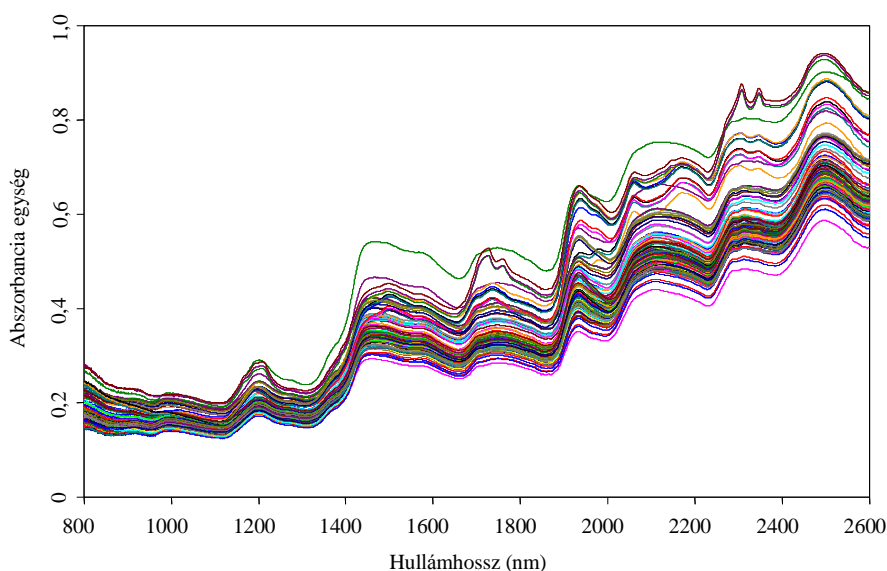


36. ábra: Pillangósvirágúak fehérjetartalmának összesítő ábrája

A vizsgálatba bevont 120 minta fehérjetartalma 19,5 - 52,6 m/m% tartománnyal jellemezhető (36. ábra). A 46. ábra mintaeloszlása egyértelműen figyelmeztet arra, hogy az egyenetlen lefedettség statisztikai problémákat vethet fel. Meg kell jegyeztem, a minták kiválasztásakor a csomagoláson csak a szójaminták esetében volt deklarált fehérjetartalom, a többi minta csomagolásán nem voltak feltüntetve ezen beltartalmi paraméterre vonatkozó értékek.

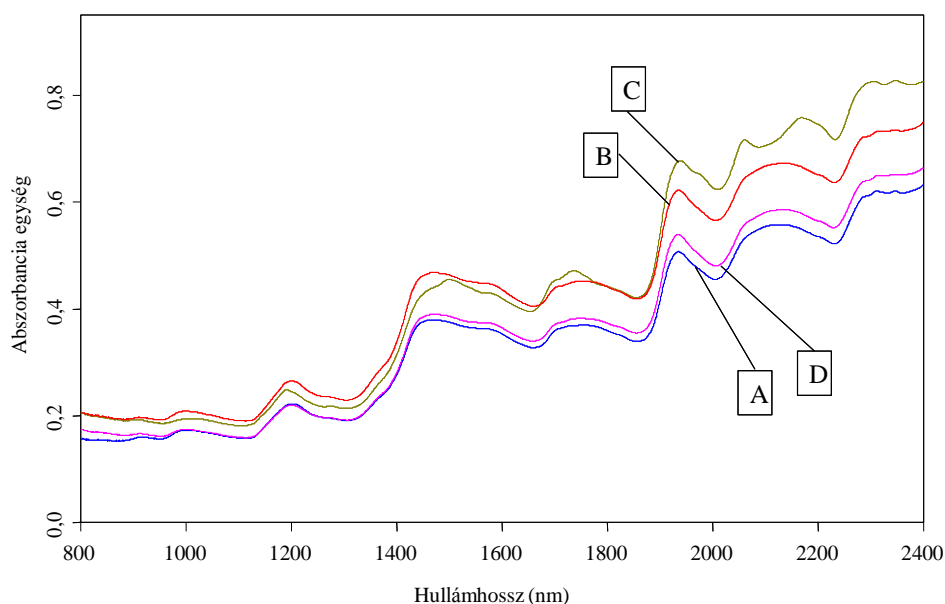
5.5.1.2. FT-NIR módszerfejlesztés

A spektrumok rögzítése az eddigiekkel megegyező módszerrel, a 800-2500 nm-es tartományban történt, diffúz-reflexiós üzemmódban. A 120 hüvelyes minta spektruma a 37. ábrán látható.



37. ábra: *Fabaceae* minták közeli infravörös spektrumai

A NIRS becslési összefüggések felállítása előtt elvégeztem az egyes képviselőkre jellemző átlagspektrumok vizsgálatát (38. ábra). Az ábrán egyértelműen feltűnik, hogy a C-vel jelölt szójabab minták spektrumának lefutásában 2100 nm-en egy váll jelenik meg, mely Workman nyomán a C-H nyújtó rezgés, C=O nyújtó rezgés, C-H deformációs rezgés kombinációjának illetve az O-H nyújtó rezgés, HOH deformációs rezgés kombinációjának illetve az O-H hajlító rezgés 2. felhangjának köszönhető (Workman, 2000).

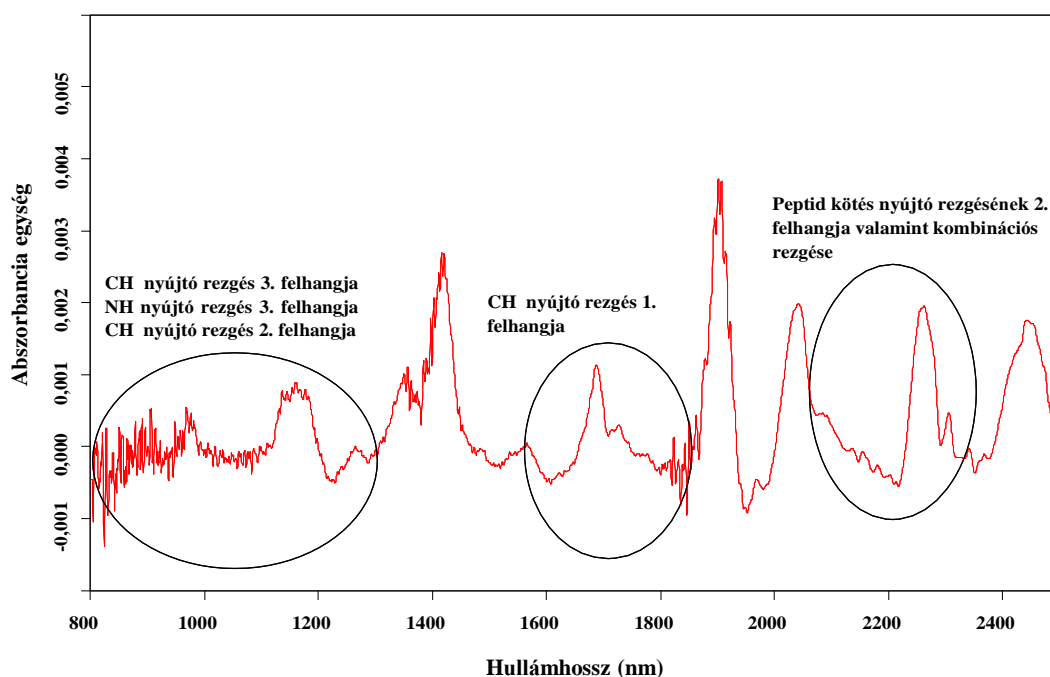


38. ábra: Borsó (A), lencse (B), szója (C) és bab (D) minták közeli infravörös átlagspektrumai

Ez a spektrális eltérés tovább erősítette a klasszikus eredmények vizsgálatánál felmerült gyanút, miszerint a granulált szójamintákat (3 db)– bár növénytani szempontból a *Fabales*ek rendjéhez tartozó *Fabaceae* család tagjai – sem spektrális, sem klasszikus adatok alapján nem tekinthetjük idetartozónak. Elképzelhető, hogy a technológiai lépések (pl. granulálás) során olyan mértékű a makrokomponensek változása, hogy ez okozza a csoporthoz képest a különbséget.

A kiértékelési tartományok kiválasztása az első derivált spektrum csúcsainak elemzésén alapult (39. ábra).

A 39. ábra alapján a következő hullámhossz-tartományokat választottam ki: 801 – 1333 nm ($12484 - 7502 \text{ cm}^{-1}$), 1638 – 1836 nm ($6102 - 5446 \text{ cm}^{-1}$), 2173 – 2354 nm ($4601 - 4248 \text{ cm}^{-1}$).



39. ábra: Hüvelyesek átlagspektrumának (n=120) első deriváltja a fehérjetartalomra jellemző elnyelési maximumokkal

A becslési függvények felállítása már a granulált szójaminták elhagyásával történt. A spektrum-transzformációs műveletek ebben az esetben is a DER1, DER2, DER1 + MSC, DER1 + SNV műveletek voltak. A kereszt-validáció statisztikai adatait a 20. táblázatban mutatom be.

20. táblázat: Fehérjetartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	R^2	99,18	95,75	98,07	98,02
	RMSEC (m/m%)	0,75	1,63	1,11	1,14
	RPD	11,00	4,85	7,19	7,11
Kereszt-validálás	R_{cv}^2	97,45	93,42	96,60	96,55
	RMSECV (m/m%)	1,28	1,99	1,44	1,47
	RPD	6,26	3,90	5,42	5,38
	PLS faktorok száma	7	3	4	4
	Kémiai kiesők száma	11	2	6	8

A táblázatból egyértelműen kiderül, hogy a spektrum-transzformációs műveletek jelentősen befolyásolják a kalibráció paramétereit. Jelen esetben a DER1 és DER2 művelet között több mint kétszeres eltérést tapasztaltam az RMSEC értékekben. Továbbá a kombinált műveletek közti hasonlóság is kiemelhető, hiszen összehasonlítva a táblázat ezen két oszlopát, nem látunk nagy eltérést a kapott adatokban. Minden tekintetben kiemelendő a második derivált spektrum-transzformációval végzett optimalizálás, mivel ez a művelet mondható a legrosszabb választásnak erre a populációra. Hasznos lett volna kipróbálni a második deriváltat kombinálva vagy MSC vagy SNV művelettel, azonban ez a funkció az alkalmazott szoftverben nem elérhető. A négy alkalmazott művelet közül az R^2 , RMSECV és RPD értékek alapján a DER1 spektrum transzformációval nyert becslési függvény rendelkezik a legjobb paraméterekkel. Ugyanakkor nem szabad figyelmen kívül hagynunk, hogy a kémiai kiesők száma eléggé magas (11 minta). A DER1+MSC kombinált spektrum transzformációs műlet eredményeként nyert becslési függvény a felsorolt statisztikai paraméterek (R^2 , RMSECV, RPD) szempontjából valamelyest gyengébb, de mindenképp mellette szól a kevesebb kémiai kieső (6 minta) és a sajátvektor kedvezőbb értéke (PLS=4).

A referencia és a becsült adatok közötti eltérések $-3,2/+3,5$ m/m% értékek között ingadoztak (M10. ábra). Ezeket az értékeket a populáció legkisebb fehérjetartalommal rendelkező mintájával (19,5 m/m%) összehasonlítva elmondható, hogy közel egy nagyságrend eltérés van a referencia adatok minimuma és a becsült érték eltérésének maximuma között, amelyből arra következtethetünk, hogy a becslés alacsony fehérjetartalmú minták esetén is elfogadható pontossággal elvégezhető.

A teszt-validálás elvégzéséhez a minták csoportba rendezését ez alkalommal is az OPUS 6.5 szoftver moduljával végeztem. A populációt kalibráló:validáló mintákra 2:1 arányban osztattam szét, a jellemző adatokat az M21. táblázatban foglaltam össze.

A teszt-validálás elvégzésekor az eddig alkalmazott spektrum-transzformációs műveletekkel dolgoztam. A becslési függvények statisztikai jellemzőit a 21. táblázatban foglaltam össze.

21. táblázat: Fehérjetartalom becslésére felállított teszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	R^2	98,12	94,72	96,04	96,75
	RMSEC (m/m%)	0,96	1,55	1,35	1,23
	RPD	7,29	4,35	5,03	5,55
Teszt-validálás	R^2	95,09	88,38	96,54	95,56
	RMSEP (m/m%)	1,48	2,23	1,76	1,99
	RPD	4,51	2,93	5,41	4,8
	PLS faktorok száma	5	3	4	4

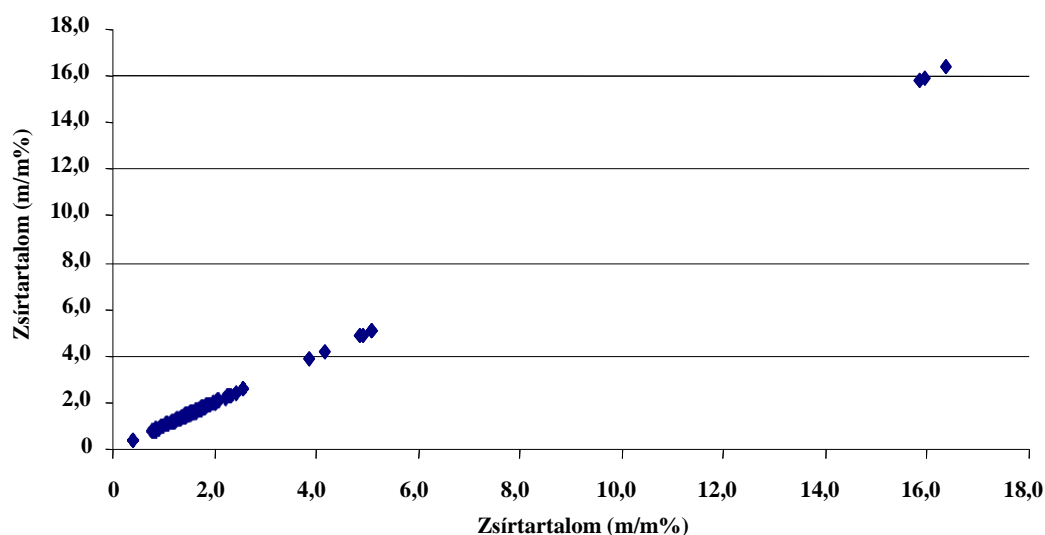
Jelen esetben a DER1 spektrum-transzformációs művelet rendelkezik a legjobb statisztikai paraméterekkel, mind a kalibrációt, mind pedig a teszt-validálást tekintve. Ha a kalibrációs adatokat vesszük figyelembe, akkor a DER1 transzformációs művelet eredményeként kapott becslési függvényt jellemzik a legkisebb RMSEC és a legnagyobb R^2 értékek. A DER2 alkalmazása jelen esetben sem javasolt erre a populációra. A DER1 és a kombinált spektrum-transzformációk eredményeként kapott becslési függvények statisztikai paraméterei között sem tapasztalunk jelentős eltérést. Bár az R^2 és az RPD adatok szempontjából a kombinált műveletek függvényei kedvezőbbek, mérlegelni kell azt a tényt, hogy az RMSEP érték szempontjából a DER1 függvény tekinthető statisztikailag jobbnak. Miután az eltérések a „jobb”/”kevésbé jobb” spektrum-transzformációk között minimálisak, véleményem szerint azt kell kiválasztani, amely a legkisebb átlagos hibával jellemezhető, ennek megfelelően a DER1 műveletet.

5.5.2. Zsírtartalom meghatározása

5.5.2.1. Módosított Weibull-Stoldt módszer alkalmazása

A meghatározást nehezítette, hogy a zöldségfélék zsírtartalma friss állapotban nem esik a NIR-rel detektálható koncentráció-tartományba, ezért a mintákat szárítószekrényben szárítottam.

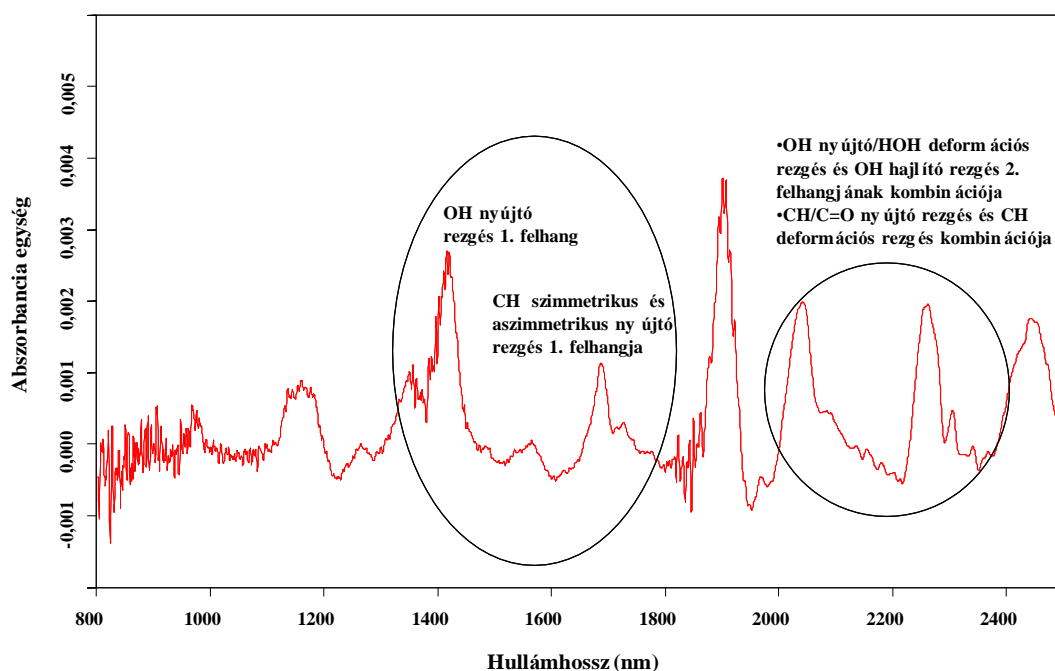
A vizsgált fajták minimum és maximum értékei (M22. táblázat) között néhol jelentős eltérés található. A legnagyobb eltérést a szójaminták esetében figyelhető meg. Ez az eltérés feltételezhetően abból adódhat, hogy a feldolgozott (granulált) mintákhoz a feldolgozás során plusz zsírt adagolt a gyártó, azonban a csomagoláson erre utaló információt nem tüntettek fel. A teljes populációt vizsgálva a legkisebb zsírtartalom 0,8 m/m%-nak, míg a legnagyobb 16,4 m/m%-nak adódott (40. ábra), így a tartomány a referencia-mérés szempontjából szélesnek mondható. A szójaminták zsírtartalom szempontjából is nehézséget okoztak: kiugróan magas zsírtartalom jellemezte őket, s a klasszikus méréseket a nagy zsírtartalom ellenére kiemelkedően magas szórás (6,6%) jellemezte. Ezt a durva hibát többszöri visszaméréssel sem sikerült korrigálni. Ebből arra következtettek, hogy a granulált szójaminták nem tekinthetők homogénnek. Tekintettel a 40. ábrán bemutatott spektrális eltérésekre valamint a klasszikus zsírtartalom értékeknél tapasztalt kiugró adatokra (45. ábra), arra a következtetésre jutottunk, hogy a granulált szójamintákat ebben az esetben sem szabad figyelembe vennünk.



40. ábra: Pillangósvirágúak zsírtartalmának összesítő ábrája

5.5.2.2. FT-NIR módszerfejlesztés

A spektrumok első deriváltjának vizsgálata (41. ábra) alapján a zsírtartalom meghatározására a következő hullámhossz-tartományokat jelöltem ki: 1333 - 1836 nm ($7502 - 5446 \text{ cm}^{-1}$) és 2080 - 2402 nm-es ($4831 - 4163 \text{ cm}^{-1}$).



41. ábra: Hüvelyesek átlagspektrumának ($n=120$) első deriváltja a zsírtartalommal összefüggő elnyelési maximumokkal

A zsírtartalomra vonatkozó becslési függvények felállítása előtt ebben az esetben is kivettem a mintasorból a granulált szójabab mintákat, a fent említett különbség miatt, amely torzítná a becslési függvényt, így a módszer 117 minta spektrális és referencia adatain alapul. A kereszt-validálással nyert becslési függvények statisztikai paramétereit a 22. táblázatban foglaltam össze.

22. táblázat: Zsírtartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Becslési függvény tulajdonságok			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	R^2	85,09	84,07	83,81	84,45
	RMSEC (m/m%)	0,32	0,33	0,34	0,33
	RPD	2,59	2,51	2,49	2,54
Kereszt-validálás	R^2	83,13	81,48	81,76	82,13
	RMSECV (m/m%)	0,34	0,35	0,35	0,35
	RPD	2,43	2,32	2,34	2,37
	PLS faktorok száma	3	3	2	3
Kémiai kiesők száma		0	0	0	0

A statisztikai jellemzők, valamint a 90% alatti R^2 értékek alapvetően arra utalnak, hogy gyakorlatilag egyik spektrum-transzformáció eredményeként sem jutottunk megfelelő minőségű becslési függvényhez. Az RMSECV értékek nagyon magasak a mérési koncentráció-tartományhoz képest, az RPD értékek oly mértékben alacsonyak, hogy ezek az összefüggések mennyiségi kiértékelésre alkalmatlanok. A DER1 függvény-transzformáció eredményeként kapott becslési függvény jellemző eltérés értékeit a referencia adatok függvényében ábrázolva (53. ábra) igen nagy eltéréseket láthatunk.

A mérési tartományt eleve szűk koncentráció-tartomány jellemezte, a tapasztalt eltérések $-0,85/+0,7$ m/m% értékek között mozogtak, amely eltérés értékek összevethetők a mért koncentrációval (M11. ábra). Ez az ábra is bizonyítja, hogy a „legkedvezőbbnek” minősített becslési függvény (DER1) sem alkalmas hüvelyesek zsírtalmának mennyiségi megállapítására. Hiába a látszólag nagy mintaszám, a kis koncentráció értékek, a klasszikus módszer nagy bizonytalanságából eredő magas szórás mind-mind a módszer alkalmatlanságát indokolja.

A legnagyobb különbség a referencia adatok és becsült adatok között $0,8$ m/m%, mely hiba nagyobb, mint a kalibrációban szereplő minimum érték.

A teszt-validálás végrehajtásához a 117 mintából álló populációt 2:1 arányban kalibráló és validáló mintákra osztottam. A kapott kalibráló és validáló minták adatai az M23. táblázatban láthatók.

Mivel a kalibrációs mintaszámot a validáló minták számával csökkentettem, ezért fennáll a veszély a becslési függvények pontosságának és robusztusságának nagyarányú csökkenésére.

A teszt-validációval végrehajtott optimálás becslési függvényeinek tulajdonságait a 23. táblázatban foglaltam össze.

23. táblázat: Zsírtartalom becslésére felállított teszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Kalibrációs sor			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	91,51	90,19	91,40	92,37
	RMSEC (m/m%)	0,26	0,27	0,26	0,25
	RPD	3,43	3,19	3,41	3,62
Teszt- validálás	R^2				
	R (%)	81,19	80,51	79,92	83,95
	RMSEP (m/m%)	0,35	0,35	0,36	0,32
	RPD	2,36	2,32	2,26	2,53
	PLS faktorok száma	8	5	8	9

A becslési függvények statisztikai jellemzőit vizsgálva gyakorlatilag a kereszt-validálás eredményeivel megegyező jelenséggel szembesültem. A kapott becslési függvények R^2 értéke 90% alatti, nagyon alacsony az RPD érték és a mért koncentráció-tartományhoz képest nagy az RMSEP érték. Végző következtetésként meg kell állapítanom, hogy a módszer ilyen mintaszám esetén nem alkalmas *Fabaceae* félék zsírtartalmának mennyiségi meghatározására.

5.5.3. Összes energia-tartalom meghatározása

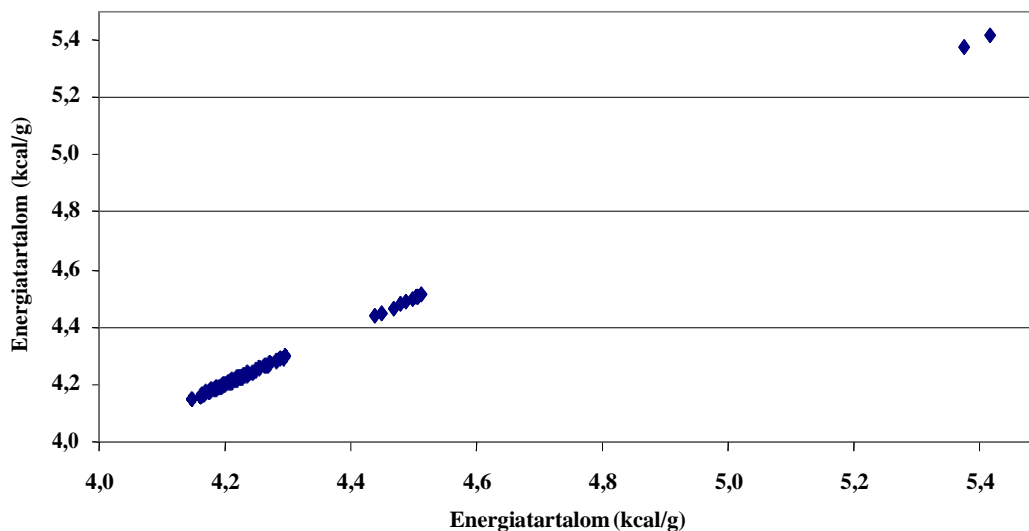
A *Fabaceae* minták összes energia-tartalmának meghatározására irányuló kísérleteket Spanyolországban végeztem el, ahová csak 80 mintát vittem magammal, ebből fakad az eredeti darabszám csökkenése az előző fejezetben bemutatotthoz képest.

5.5.3.1. Adiabtikus kaloriméter alkalmazása

Az M24. táblázat az adiabtikus kaloriméterrel mért adatokat tartalmazza. A szójabab minták energiatartalma a legnagyobb, mely adat a minták magas tápértékét mutatja. A szórásokat tekintve szintén a szójababot/szójagranulátumot kell kiemelni, melynek szórása egy nagyságrenddel nagyobb a többi minta szórásától. Mivel a minták között granulált szója is szerepelt, ezért ez a nagy különbség valószínűleg a feldolgozási technológiai lépések közötti eltérésnek köszönhető. Meg kell jegyeznem azt is, hogy az előzőekben bemutatott klasszikus eljárások szórásához képest az összes energiatartalom meghatározásának szórása jóval kisebb. A minták homogenitása megegyező volt az előzőekkel, ám az

égetéses kalimetriás mérési módszer megfelelőbbnek bizonyult az előző referencia-módszerekhez képest, mivel a rendszer zárt és így kevesebb emberi hibával terhelt, továbbá nem lépett fel mintavesztés a meghatározás során.

A klasszikus mérési módszerrel nyert eredmények alapján egyik mintáról sem mondható el, hogy negatív vagy pozitív irányban olyan eltérést tapasztaltunk volna, mely a spektroszkópiai vizsgálatokból való kizárást indokolná.



42. ábra: Pillangósvirágúak összes energiaartalmának összesítő ábrája

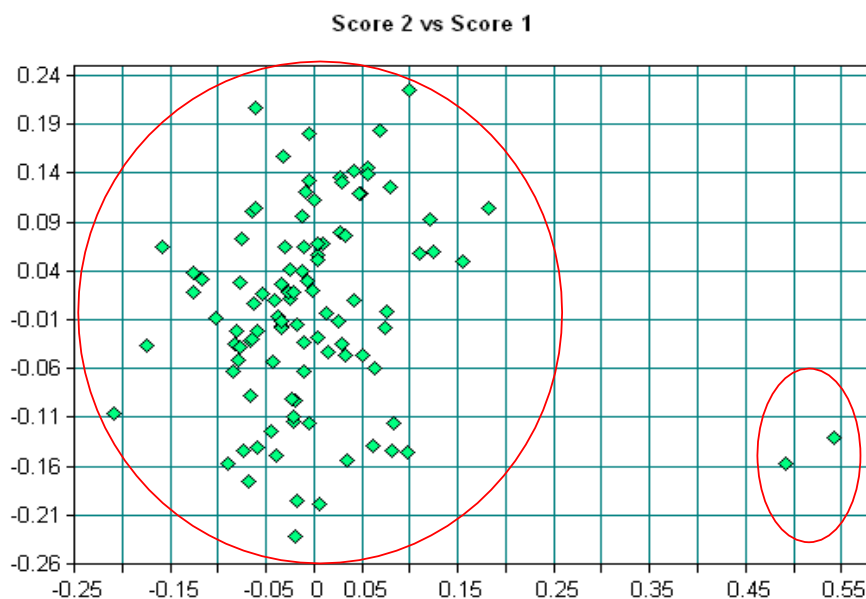
A klasszikus mérési adatok (M24. táblázat) igen szűk - 4,15 – 5,42 kcal/g - mérési tartományban mozognak. A magasabb energiaértékek egyértelműen a szójamintákhoz tartoznak. A 42. ábra bizonyítja, hogy a vizsgált koncentráció tartomány egyenletesen lefedettnek minősíthető.

5.5.3.2. FT-NIR módszerfejlesztés

Az energiaartalom meghatározására rögzített spektrumok felvétele eltér az eddig alkalmazott módszertől. Ezt a vizsgálatot Spanyolországban végeztem, ahol rendelkezésre állt egy Bruker MPA FT-NIR/NIT spektrométer, viszont mintaváltó kerék helyett a készülék forgó petricsészés feltétét használtam. A spektrumok lefutását és felbontását ez az eltérés nem befolyásolja.

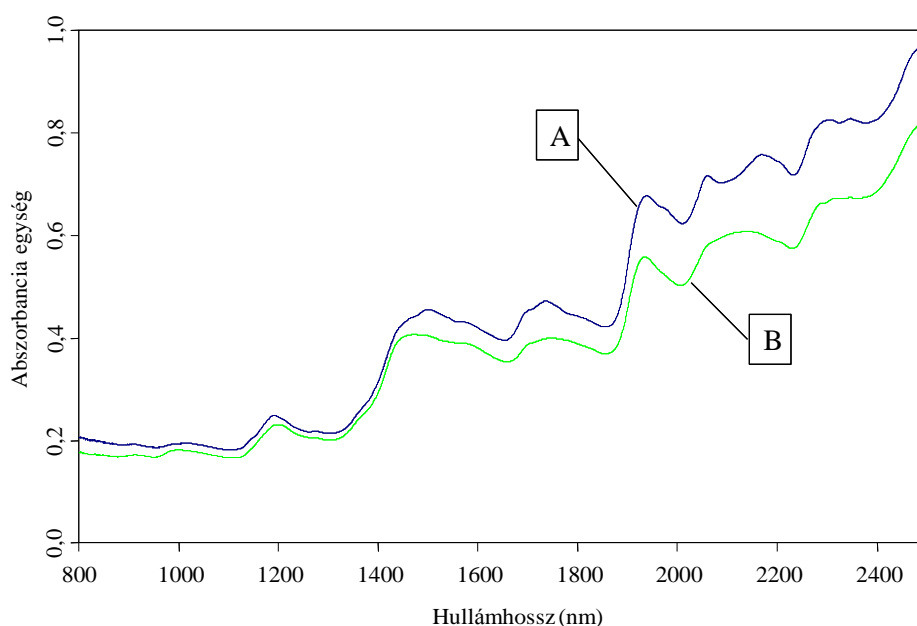
Az adatok kiértékelése szintén eltér az eddigiektől. A WinISI II. szoftver használatával főkomponens analízist végeztem az esetleges spektrális kieső minták megtalálására. Mielőtt végrehajtottam a főkomponens analízist, az összes spektrumot az SNV + Detrending spektrumtranszformációval alakítottam át, majd az első deriváltját (1,10,5,1) határoztam meg mind a 80 spektrumnak. A PCA

analízis után a spektrális populáció középértéke került meghatározásra, majd a Mahalanobis távolságok számítása következett minden egyes spektrum és az átlagspektrum között. Minden olyan minta, amelynek a Mahalanobis-távolság értéke háromnál nagyobb, spektrális kieső mintaként került megjelölésre. A 43. ábra az egymástól jól elkülöníthető két csoportot ábrázolja. Az ábra bal oldalán a felhasznált hüvelyesminták csoportja látható, míg a jobb oldalon a két granulált szójaminta.



43. ábra: Hüvelyes minták PCA analízisének eredménye (Score 2= Főkomponens 2,
Score 1= Főkomponens 1)

Amennyiben összehasonlítjuk a két spektrális kieső mintát (44. ábra) a bent maradó 78 minta átlagspektrumával, látható, hogy a spektrumok lefutásában különbségek mutatkoznak 1200, 1700 és 2300 nm-es hullámhosszaknál. Egy korábbi áttekintő cikkben Garrido-Varo és mtsai megerősítették (Garrido-Varo és mtsai, 2004), hogy a zsírsavaknak van elnyelésük 1734, 1765, 2310 és 2345 nm-en. A zsírtartalom vizsgálatánál már kitértem a kiemelkedően nagy zsírtartalmú granulált szójabab mintákra, melyek a többi mintától eltérőek, mely jelen esetben is igazolható.



44. ábra: A két kieső szójaminta (A) és a többi kísérleti minta (B) átlagspektruma

A spektrális kieső minták detektálása után a populáció szétosztása történt kalibráló és validáló mintákra. Az energiatartalom-kalibrációt az OPUS 6.5 szoftverrel végeztem el, viszont a kalibrációs és validációs minták szétosztását az OPUS-szal és a WinISI II-vel is végrehajtottam. Így két kalibráló (Cal1, Cal2) és két validáló (Val1, Val2) mintasor állt rendelkezésre. Korábban már kiemeltem, hogy az OPUS 6.5 szoftverrel történő populáció-felosztás automatikusan történik a beállított főkomponensek száma alapján. A WinISI II tartalmazza a CENTER algoritmust, mely a Mahalanobis-távolságok alapján sorba rendezi a mintákat, majd a SELECT algoritmussal osztja a populációt kalibráló és validáló mintákra. Annak ellenére, hogy a két különböző programmal készült a populáció szétosztása, a 48. táblázatban feltüntetett értékek hasonlóan adódtak. Mindkét mintasor azonos számú mintát tartalmaz; így a 78 mintából a kalibrációs összefüggések felállításához 52 minta állt rendelkezésre. A kalibráció során az 1110 – 1337 ($9009 - 7479 \text{ cm}^{-1}$) és 1638-2175 nm ($6105 - 4598 \text{ cm}^{-1}$) tartományokat használtam (Kays és Barton, 2002).

A 24. táblázat a kereszt-validálás eredményeit mutatja, mindkét mintasorra.

24. táblázat: Összes-energiatartalom becslésére felállított kereszt-validációs függvények összefoglaló táblázata

		Kalibrációs sor Cal 1.				Kalibrációs sor Cal 2.			
		(OPUS 6.5)				(WinISI II.)			
		DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV	DER1	DER2	DER1 + MSC	DER1 + SNV
Kalibráció	$R^2(\%)$	98,32	95,67	97,63	98,16	96,70	98,26	95,82	96,02
	RMSEC (kcal/g)	0,012	0,020	0,015	0,013	0,016	0,012	0,020	0,018
	RPD	7,7	4,8	6,5	7,4	5,5	7,6	4,9	5,0
Kereszt- validálás	$R^2_{cv}(\%)$	95,44	91,01	94,69	95,68	94,24	93,68	94,03	92,48
	RMSECV (kcal/g)	0,019	0,026	0,020	0,018	0,019	0,022	0,023	0,024
	RPD	4,7	3,3	4,3	4,8	4,2	4,0	4,1	3,7
PLS faktorok száma		7	5	7	6	5	6	5	6

A Cal 1. kalibrációs sorral elvégzett kereszt-validációs eredmények alapján a DER1 illetve a DER1 + MSC és DER1 + SNV spektrum-transzformációs műveletekkel jobb eredményekhez jutottam, mint ugyanazon mintasorra a DER2 műveletet alkalmazva. A Cal 2. mintasorral végzett kalibráció során az R^2 és RMSEC értékek alapján úgy tűnhet, hogy a DER2 a megfelelő spektrum-transzformációs művelet, de ez a feltételezés a kereszt-validációt végrehajtva nem nyert bizonyítást.

25. táblázat: Összes-energiatartalom meghatározására fejlesztett becslési függvények validációs összefüggései

	Validációs sor Val 1.	Validációs sor Val 2.
	DER1	DER1
r^2	96,6	93,72
SEP	0,025	0,026
RMSEP	0,025	0,026
RPD	4,2	4,0
RPDc	4,9	2,8

A táblázatból látható, hogy a laboratóriumi összes-energiatartalom értékek nagy korrelációt mutatnak a NIRS által becsült értékekkel. Összességében elmondható, hogy a legjobb eredményt a Val 1. mintasorral nyert adatok szolgáltatják

A szakirodalomban számos tanulmány, kézirat található különböző állati takarmányok tápértékének, energiatartalmának meghatározására (Owens és mtsai, 2009; Alomar és mtsai, 2006; Mentink és mtsai, 2006; Sales, 2009), viszont élelmiszerek vizsgálatáról kevesen számolnak be. Kim és mtsai különböző előre csomagolt élelmiszerek energiatartalmának becslésére állított fel becslési függvényeket (Kim és mtsai, 2007). Az általuk vizsgált minták energiatartalmának tartománya szélesebb (0,4 – 3 kcal/g), mint az általunk használt mintáké. A becslési paraméterek felállításához nem választottak speciális NIR tartományokat, szinte a teljes közeli infravörös tartományt vizsgálták (1100-2498 nm). A kereszt-validáció átlagos hibája esetükben 0,103 kcal/g-nak adódott, ez a mi esetünkben 0,019 kcal/g, ami pontosabb meghatározást tesz lehetővé. A külső validáció átlagos hibája esetükben 0,081 kcal/g, az általunk fejlesztett becslési függvényeké 0,025 kcal/g. A két munka a mintamátrix nagymértékű különbsége miatt nem hasonlítható össze megbízhatóan. Kays és mtsai különböző gabonafélék energiatartalmát határozta meg NIR spektroszkópiával (Kays és mtsai, 2000). A gabonafélék energiatartalmának tartománya (4,05 – 5,48 kcal/g) hasonló az általunk használt minták tartományával. A SECV érték esetükben 0,053 kcal/g-nak adódott, a külső validációs hiba 0,049 kcal/g. Ezen értékekhez képest az általunk felállított becslési függvények kisebb átlagos hibával terheltek. Hasznos lett volna több kutató munkáját feldolgozni, ám úgy tűnik a szakirodalom alapján, hogy e területen a NIR technika alkalmasságának vizsgálatával és használhatóságának igazolásával kevés kutató

foglalkozik. Eredményeink alapján azonban elmondható, hogy a jövőben egyéb élelmiszercsoportok bevonása a vizsgálatokba további eredményes kutatás célja lehet.

6. Új tudományos eredmények

1. Elsőként dolgoztam ki módszert Fourier-transzformációs közeli infravörös (FT-NIR) technika alkalmazásával sütőipari termékek makrokomponenseinek mennyiségi meghatározására. Ennek eredményeként az MSZ EN ISO/IEC 17025:2005 szabványnak megfelelő, akkreditált laboratóriumban használható robusztus becslési függvényt állítottam fel egy igen széles mintamátrixot felölelő élelmiszer-minta-csoport fehérje-, zsír- és cukortartalmának meghatározására.
2. Új módszert dolgoztam ki FT-NIR technika alkalmazásával száraztészták tojástartalmának meghatározására, amely a jelenleg hatályos magyar szabványnál (MSZ 20500-4:1987) egyszerűbb, robusztusabb és pontosabb becslést tesz lehetővé.
- 3., Elsőként dolgoztam ki és alkalmaztam FT-NIR módszert zöldségfélék makrokomponenseinek vizsgálatára. Robusztus becslési függvényt állítottam fel a *Brassicaceae* családba tartozó *Brassica oleracea* félék fehérje- és zsírtartalmának meghatározására, valamint a *Fabaceae* családba tartozó minták vizsgálata során sikeresen alkalmaztam az FT-NIR módszert a minták fehérjetartalmának becslésére.
- 4., Elsőként dolgoztam ki és alkalmaztam FT-NIR módszert a *Fabaceae* családba tartozó minták összes energia-tartalmának meghatározására. Összehasonlítva az FT-NIR módszert a klasszikus zsír-, fehérje- és szénhidráttartalom meghatározással elmondható, hogy az FT-NIR módszer gyorsabb, egyszerűbb, környezetbarátabb és gazdaságosabb a klasszikus eljárásoknál.
- 5., A Fourier-transzformációs Bruker készülék OPUS 6.5 ill. a diszperziós FOSS NIRSystems készülék WinISI II. szoftverének együttes alkalmazásával elsőként kombináltam a két eltérő szoftverben rejlő lehetőségeket a mintapopuláció spektrális információn alapuló kalibráló és validáló mintacsoportokra történő elkülönítésében.

7. Összefoglalás

A doktori munkám során becslési függvényeket állítottam fel különböző élelmiszertípusok makrokomponenseinek meghatározására közeli infravörös spektroszkópia használatával.

A vizsgált minták összeválogatásánál törekedtem arra, hogy kereskedelmi forgalomban elérhető termékek alkossák a kalibrációs mintasort, jól reprezentálva ezzel az egyes terméktípusok sokféleségét. Minden élelmiszercsoport vizsgálata során elkerülhetetlen volt valamilyen mintaelőkészítés alkalmazása, melyek közül a szárítószekrényes szárítást és a fagyasztva szárítást alkalmaztam. A további lépéseket sztenderdizáltam annak érdekében, hogy a spektrumokat azonos körülmények között rögzíthessem. Így a szárított mintákat kávédarálóval közel azonos szemcseméretűre daráltam, majd egy meghatározott lyukméretű szitával szitáltam. Ezzel a módszerrel nagy mértékben csökkenthető a különböző szemcseméretből fakadó fényszórás miatt kialakuló különbségek megjelenése a spektrumban.

A klasszikus meghatározások minden esetben saját mérési eredményekből származtak, kivéve a sütőipari termékek fehérjetartalom értékei, amelyeket egy nyíregyházi akkreditált laboratórium határozott meg. A szabvány szerint végrehajtott módszerek fehérjetartalom meghatározására a Kjeldahl-féle roncsolásos és a Dumas-féle égetéses technikákat választottam. A cukortartalom meghatározására szintén szabványos módszert alkalmaztam. A zsírtartalom meghatározására irányuló vizsgálatok egységesek voltak: abból kifolyólag használtam fel a vonatkozó módszerek helyett a lisztek zsírtartalmának meghatározására előírt szabványos módszert, hogy az elérhető extrakció hatásfoka ez utóbbinak jóval nagyobbnak bizonyult. A száraztésztákkal folytatott kísérletek zsírtartalom meghatározására vonatkozó részét a fent leírtakkal megegyező módon hajtottam végre, viszont a tojástartalom meghatározása már az általunk fejlesztett egyenlettel történő számoláson alapult. Ennek fontos előnye a CAH-ban rögzítettekhez képest, hogy figyelembe veszi a tésztagyártáshoz felhasznált liszt nem elhanyagolható mennyiségű zsírtartalmát is.

Az energiatartalom meghatározását égetéses technikával, adiabatikus kaloriméterrel hajtottam végre. A referencia módszer alkalmazása előtt egy újabb mintaelőkészítési lépést, a pasztillázást kellett beépíteni a folyamatba. Fontosnak bizonyult a megfelelő tömörségű pasztilla készítése, mivel a beáramló gáz nyomása miatt a nem megfelelően tömörített pasztillát szétbonthatja, így idő- és

anyagveszteség léphet fel. A berendezés kalibrálása után a meghatározás automatikus, így a kijelzőről közvetlenül leolvasható a minta energiatartalma a kívánt mértékegységben.

A spektrumfelvételeket egy Bruker MPA FT-NIR/NIT készülékkel illetve az ahhoz tartozó mintaváltó kerékkel, üveg mintatartó használatával hajtottam végre. Ettől eltérő feltétet használtam a spanyolországi kísérlethez, ugyanis ott forgó petricsészés módszert alkalmaztam. A felvételeket 12500 – 4000 cm^{-1} -es hullámszám-tartományban (800 – 2500 nm) rögzítettem minden esetben diffúz reflexiós mérési elrendezéssel. Egy mintáról három felvételt készítettem, majd ezeket átlagoltam és az átlagspektrumokkal dolgoztam tovább a különböző szemcseméretből adódó hibák minimálisra csökkentésének érdekében.

Minden becslési függvény felállításakor négy spektrum-transzformációs művelettel feldolgozott (első deriváltak, második deriváltak ill. az első és második deriváltak kombinálva MSC és SNV műveletekkel) spektrumokat vizsgáltam. A függvény-transzformációk kiválasztása szakirodalmi adatok és személyes konzultációk alapján történt. Munkám során szembesülnöm kellett egy szoftverspecifikus korláttal is, mivel az OPUS 6.5-ös szoftvercsomagban nem érhető el olyan spektrum-transzformáció, mely a második derivált és valamilyen szóródási korrekció kombinációjának használatát tenné lehetővé.

Az energiatartalom meghatározására irányuló becslési összefüggés kalibráló és validáló mintaseregét az eddig rendelkezésre álló szoftver mellett egy másik, a WinISI II. programcsomaggal is végrehajtottam. A két összefüggés között tapasztalt eltérés nem szignifikáns, melyet úgy értékelek, hogy a spektrális adatok alapján történő populáció osztás módszertanában a két program között nincs eltérés.

Valamennyi becslési összefüggést PLS regressziós technikával állítottam fel, majd az összefüggéseket kereszt- és teszt ellenőrzéssel validáltam. Azért használtam ezt a metodikát, mert némely mintacsoportból nem állt rendelkezésre megfelelő mennyiségű minta a külső becslés végrehajtásához.

A sütőipari termékek makrokomponenseinek (fehérje-, zsír-, cukortartalom) meghatározására felállított becslési függvényeket az országban egyedülálló módon akkreditált mérési módszerként alkalmazzák a Budapesti Corvinus Egyetem Analitikai Laboratóriumában. A száraztésza minták tojástartalmának meghatározására fejlesztett számolós módszer alapján felállított becslési összefüggés pontosabb eredményeket szolgáltat, mint a vonatkozó Magyar Szabvány, mivel az egyenlet a száraztésza gyártásához felhasznált liszt zsírtartalmának mennyiségét is figyelembe veszi. A félkemény és kemény

sajtok fehérje- és zsírtartalmának meghatározását NIR technikával a fagyasztva szárítási eljárás nagyban pontosítja. Annak ellenére, hogy a technika egyik legfontosabb előnyét, a gyorsaságot veszítjük el a mintaelőkészítéssel, a felállított becslési függvények megbízhatósága és adaptálása ipari környezetbe, megvalósítható. A keresztesvirágúakkal végzett vizsgálatok eredményeit a Tanszék szeretné felhasználni további vizsgálatokhoz, melyek különböző zöldségfélék energiatartalmának meghatározását célozzák. A fehérje- és zsírtartalom meghatározására fejlesztett becslési összefüggések kiegészítése, további minták bevonása a kalibrációs minták közé, mindenképp szükséges. A meghatározott hullámhossz-tartományok és a megfelelő spektrum-transzformációs műveletek jó kiindulási alapot szolgáltatnak a Tanszék jövőbeni kutatásaihoz. A pillangósvirágúak fehérje- és zsírtartalma mellett a cordobai egyetemen végzett munkám alapján sikerült azok energiatartalmának meghatározására is alkalmas becslési függvényt felállítani.

A dolgozatban bemutatott eredmények hozzájárulnak a Budapesti Corvinus Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszékén folyó közeli infravörös spektroszkópiás kutatásokhoz és a további vizsgálatok alapját képezhetik.

Summary

During my PhD work calibration equations were worked out using a variety of food types to determine macrocomponents by near infrared spectroscopy. Samples analyzed were a selection of commercially available products well representing the types of products available in the market. Sample preparation was necessary to use during the examination of each food group. For removing the water content a drying chamber and a freez-dryer were extensively applied. After sample preparation further steps were standardized to guarantee same conditions during recording the spectra. Thus, the dried samples were ground and sieved to reach a similar particle size distribution. Due to these foregoing steps the light scattering differences in the spectra resulting from inhomogeneous samples were greatly reduced.

The classical analytical methods were always conducted in house except from the protein content analysis of bakery products which were carried out by an external certified laboratory in Nyíregyháza (Hungary). According to the related standards, the Kjeldahl and Dumas methods were chosen for the determination of protein content. To determine the carbohydrate content a standard reference method was also applied. The methods used to determine the fat content in the different samples were uniform. I decided to use the reference method for flour as higher extraction efficiency could be achieved by this than that of the relevant one. Experiments for the determination of fat content in pasta products were carried out in the same manner as described above, but the determination of egg content based on a calculation with an equation developed by us. The most important advantage of this method compared to the related CAH method, that takes also into account the amount of fat coming from the flour used for pasta production. An adiabatic bomb calorimeter was used to determine the gross energy content of the food products. A new sample preparation step, namely pelleting was necessary to introduce into the flow before applying the reference method. The compactness of the pellet proved to be critical as the pressure of the incoming gas could degrade the pellet resulting in time- and material loss. After calibration the instrument, it works automatically and the result is presented on the screen.

Spectra were recorded with a Bruker MPA FT-NIR/NIT instrument, coupled with a rotating sample wheel using glass sample holders when the studies were carried out at the Analytical Chemistry Department in CUB, while a rotating Petri dish system was used for the experiment when the analyses were accomplished at the University of Córdoba. Spectra were recorded in the $12500\text{ cm}^{-1} - 4000\text{ cm}^{-1}$ (800-2500nm) wavelength range in diffuse reflectance mode. Three recordings were made from each

sample, then the average spectra was composed to minimize the errors coming from the different particle sizes.

All calibration equations were set up using four different spectral pre-treatments (first derivative, second derivative, first derivative plus multiplicative scatter correction, first derivative plus standard normal variate). The selection of spectral pre-processing based on the literature and personal consultations. During the work I had to face with a specific limitation of the software, namely that the second derivative combined with other scatter corrections is not an available option in the OPUS 6.5 software package. The calibration and validation data sets gained from the determination of gross energy content were also analyzed by another software package called WinISI II. The results show that there was no deviation between the methodology of the population splitting based on the spectral data. This made me think that the difference was not significant between the two methods applied in this experiment.

PLS regression was used to set up the calibration models and after all full cross- and test validation were applied to validate the models. I used this methodology because in some cases there weren't sufficient amount of sample to carry out external validation.

The calibration equations for macrocomponents analyses (protein, fat and carbohydrate content) in bakery products are uniquely used as certified methods in the Accredited Analytical Laboratory of the Corvinus University of Budapest.

Calculation model developed for the determination of egg content in pasta products provides more accurate results than the related Hungarian Standard, because the equation takes into consideration the fat content of the flour used for pasta production.

The freeze-drying step in the sample preparation makes the NIR determination of fat and protein content in semi-hard and hard cheese products more accurate. By using this additional step, the advantageous fast nature of this method is lost but the reliability of the estimating functions/calibration equations developed makes the whole method applicable in industrial environment.

The Department wishes to use the results of the studies with Brassica species for additional experiments aiming at the determination of energy content in different vegetables. However, the completion of the developed models for the determination of protein and fat content with more samples is necessary. The well defined wavelength ranges and the corresponding spectral pre-processing techniques provide a good starting point for future research at the Department.

Besides the protein and fat content determination another model was also set up for the determination of gross energy content of edible legumes at the University of Córdoba.

Results presented in the thesis have contributed to the research got through with near infrared spectroscopy at the Corvinus University of Budapest, Department of Applied Chemistry and could provide the basis for further studies.

Mellékletek

M1 Irodalomjegyzék

- Alomar, D., Hodgkinson, S., AbarzÅsa, D., Fuchslocher, R., Alvarado, C., Rosales, E. 2006. Nutritional evaluation of commercial dry dog foods by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 90(5-6):223-229. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0396.2005.00585.x>
- Arganosa, G. C., Warkentin, T. D., Racz, V. J., Blade, S., Phillips, C., Hsu, H. 2006. Prediction of crude protein content in field peas using near infrared reflectance spectroscopy. *Canadian Journal of Plant Science*. 86(1):157-159. <http://dx.doi.org/10.4141/p04-195>
- Arvanitoyannis, I. S., Van Houwelingen-Koukialiaroglou, M. 2003. Implementation of chemometrics for quality control and authentication of meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43(2):173-218. <http://dx.doi.org/10.1080/10408690390826482>
- Atta, S., Maltese, S., Cousin, R. 2004. Protein content and dry weight of seeds from various pea genotypes. *Agronomie*. 24(5):257-266. <http://dx.doi.org/10.1051/agro:2004025>
- BarabÁssy, S., Kaffka, K. 1993. Porított tejtermék keverékek roncsolásmentes vizsgálati lehetőségei NIR technikával. *Élelmiszerfizikai Közlemények*. (57):41-52.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., Lister, S. J. 1989. Standard Normal Variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*. 43(5):772-777. <http://dx.doi.org/10.1366/0003702894202201>
- Bear, R. J., Frank, J. F., Loewenstein, M. 1983. Compositional analysis of nonfat dry milk by using near infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. (66):858-863.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. "Food Chemistry 3rd edition." 774. Berlin: Springer, 2004. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-07279-0>
- Ben-Gera, I., Norris, K. H. 1968. Determination of moisture content in soybeans by direct spectrophotometry. *Israel Journal of Agricultural Research*. (18):125-132.
- Ben-Gera, I., Norris, K. H. 1978. Influence of fat concentration on the absorption spectrum of milk in the near infrared region. *Israel Journal of Agricultural Research*. (18):117-124.
- Birth, G. S., Turley, W. C., Kays, S. 1982. Nondestructive determination of soluble solids in onions. *American Society of Agricultural Engineers*.
- Blazquez, C., Downey, G., O'Donnell, C., O'Callaghan, D., Howard, V. 2004. Prediction of moisture, fat and inorganic salts in processed cheese by near infrared reflectance spectroscopy and multivariate data analysis. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 12(3):149-157. <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.420>
- Botonjic-Sehic, E., Brown, C. W., Lamontagne, M., Tsaparikos Forsenic, M. 2009. Application of Near-Infrared Spectroscopy: Aging of Bloodstains. *Spectroscopy Solution for Materials Analysis*.
- Brandt, A., Norris, K. H., Chin, G. 1953. A spectrophotometric method for detecting blood in white-shell eggs. *Poultry Science*. (32):357-363. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.0320357>
- Burns, D. A., Ciurczak, E. W. "Handbook of near-infrared analysis 3rd edition ", 836: CRC Press, 2008.
- Collell, C., Gou, P., Picouet, P., Arnau, J., Comaposada, J. 2010. Feasibility of near-infrared spectroscopy to predict a(w) and moisture and NaCl contents of fermented pork sausages. *Meat Science*. 85(2):325-330. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.01.022>
- Curda, L., Kukackova, O. 2004. NIR spectroscopy: A useful tool for rapid monitoring of processed cheeses manufacture. *Journal of Food Engineering*. 61(4):557-560. [http://dx.doi.org/10.1016/s0260-8774\(03\)00215-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0260-8774(03)00215-2)
- Dalle Zotte, A., Berzaghi, P., Jansson, L. M., Andrighetto, I. 2006. The use of near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) in the prediction of chemical composition of freeze-dried egg yolk and discrimination between different n-3 PUFA feeding sources. *Animal Feed Science and Technology*. (128):108-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.09.009>
- Dalmadi, I., Seregély, Z., Kaffka, K., Farkas, J. 2007. Néhány többváltozós kemometriai módszer alkalmazása műszeres analitikai vizsgálatok értékelésére. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*. 2007/4(53):222-238.
- Davies, A. M. C. 2005. An introduction to near infrared spectroscopy. *NIR news*. (16):9-11.
- Delwiche, S. R., Pordesimo, L. O., Scaboo, A. M., Pantalone, V. R. 2006. Measurement of inorganic phosphorus in soybeans with near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(19):6951-6956. engineers.ihs.com/document/abstract/WSOHBAAAAAAAAAAAAA. hozzáférési dátum: 2013. <http://dx.doi.org/10.1021/jf060919n>
- Erős, K. K. "Az infravörös spektroszkópia analitikai alkalmazásai." Budapest: Műegyetemi Kiadó, 1993.
- Flinn, P. C., Black, R. G., Iyer, L., Brouwer, J. B., Meares, C. 1998. Estimating the food processing characteristics of pulses by near infrared spectroscopy, using ground or whole samples. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 6(1-4):213-220. <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.139>

- Font, R., Río-Celestino, M. d., Haro-Bailón, A. 2006. The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Industrial crops and products*. (24):307-313. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.012>
- Garrido-Varo, A., García Olmo, J., Perez-Marin, D. "Application in the analysis of fat and oils." In *NIRSpectroscopy in Agriculture*, edited by Roberts C., Workman J. and Reeves J. B., 2004.
- Geladi, P., Macdougall, D., Martens, H. 1985. Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Applied Spectroscopy*. 39(3):491-500. <http://dx.doi.org/10.1366/0003702854248656>
- Gergely, S., Salgó, A. 2005. Changes in protein content during wheat maturation - What is measured by near infrared spectroscopy? *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 15(1):49-58. <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.687>
- Givens, D. I., De Boever, J. L., Deaville, E. R. 1997. The principles, practices and some future applications of near infrared spectroscopy for predicting the nutritive value of foods for animals and humans. *Nutrition Research Reviews*. (10):83-114. <http://dx.doi.org/10.1079/nrr19970006>
- Gonzalez-Martin, I., Hernandez-Hierro, J. M., Vivar-Quintana, A., Revilla, I., Gonzalez-Perez, C. 2009. The application of near infrared spectroscopy technology and a remote reflectance fibre-optic probe for the determination of peptides in cheeses (cow's, ewe's and goat's) with different ripening times. *Food Chemistry*. 114(4):1564-1569. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.050>
- Hermida, M., Rodriguez, N., Rodriguez-Otero, J. L. 2006. Determination of moisture, starch, protein, and fat in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by near infrared spectroscopy. *Journal of AOAC International*. 89(4):1039-1041.
- Holly, S., Sohár, P. "Infravörös spektroszkópia." Budapest: Műszaki Könyvkiadó, 1968.
- Hong, T. L., Tsou, S. C. S., Tsai, S. J. 1998. Evaluation of soya bean quality for tofu processing by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 6(1-4):A325-A328. <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.216>
- Hou, Z. C., Yang, N., Li, J. Y., Xu, G. Y. 2009. Egg quality prediction by using Fourier transform near infrared reflectance spectroscopy (FT-NIR). *Spectroscopy and Spectral Analysis*. 29(8):2063-2066. <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/UV-Vis/spectrum.htm>. hozzáférési dátum: 2011. <http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm088828.htm>. hozzáférési dátum: 2009.
- ISO 2006. ISO 21543:2006 (IDF 201:2006) Milk products -- Guidelines for the application of near infrared spectrometry.
- ISO 2010. Animal feeding stuffs, cereals and milled cereal products -- Guidelines for the application of near infrared spectrometry. (12099:2010):
- ISO/TS 2008. Processed cheese products - Determination of nitrogen content and crude protein calculation - Kjeldahl method. (17837:2008):
- Jirsa, O., Hruskova, M., Svec, I. 2007. Bread features evaluation by NIR analysis. *Czech Journal of Food Sciences*. 25(5):243-248.
- Kaffka, K. 2008. How the NIR technology came to and spread in Europe for quality assessment and control in the food industry. *Acta Alimentaria*. 37(2):141-145. <http://dx.doi.org/10.1556/aalim.37.2008.2.1>
- Kaffka, K. J., Horvath, L., Gonczy, J. L., Czabaffy, A., Nadai, B. T. 1986. Qualifying foods by near infrared reflectance spectroscopy. *Periodica Polytechnica, Chemical Engineering*. 30(3-4):153-157.
- Kaffka, K. J., Kulcsar, F. 1982. Attempts to determine egg content in pastry products using the NIR technique. *Acta Alimentaria*. 11(1):47-64.
- Kamruzzmana, M., El Masrya, G., Suna, D. W., Allen, P. 2013. Fast detection and visualization of minced lamb meat adulteration using NIR hyperspectral imaging and multivariate image analysis. *Talanta*. (103):130-136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.020>
- Karoui, R., Mouazen, A. M., Dufour, É., Pillonel, L., Schaller, E., De Baerdemaeker, J., Bosset, J.-O. 2006. Chemical characterisation of European Emmental cheeses by near infrared spectroscopy using chemometric tools. *International Dairy Journal*. 16(10):1211-1217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.002>
- Kays, S. E., Barton, F. E. 2002. Rapid prediction of gross energy, and utilizable energy in cereal food products using near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(5):1284-1289. <http://dx.doi.org/10.1021/jf011385n>
- Kays, S. E., Barton II, F. E., Windham, W. R. 2000. Predicting protein content by near infrared reflectance spectroscopy in diverse cereal food products. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 8(1):35-43. <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.262>
- Kim, Y., Singh, M., Kays, S. E. 2007. Near-infrared spectroscopic analysis of macronutrients and energy in homogenized meals. *Food Chemistry*. 105(3):1248-1255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.011>
- Lee, J. H., Choung, M. G. 2009. Determination of protein content in pea by near infrared spectroscopy. *Food Science and Biotechnology*. 18(1):60-65.
- Li, N., Min, S. G., Qin, F. L., Zhang, M. X., Ye, S. F. 2004. Nondestructive analysis of protein and fat in whole-kernel soybean by NIR. *Spectroscopy and Spectral Analysis*. 24(1):45-49.
- Longerich, H., Ramaley, L. 1974. Digital interface for a Cary 14 spectrophotometer. *Analytical Chemistry*. (46):2067-2071. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60349a019>
- Malinowski, F., Howery, D. "Factor analysis in chemistry." New York: Wiley, 1980.
- Maraboli, A., Cattaneo, T. M. P., Giangiacomo, R. 2002. Detection of vegetable proteins from soy, pea and wheat isolates

- in milk powder by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 10(1):63-69. <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.322>
- Maree, J. E., Viljoen, M. A. 2011. Fourier-transform near- and mid-infrared spectroscopy can distinguish between commercially important *Pelargonium sidoides* and its close taxonomic ally *P. reniforme*. *Vibrational Spectroscopy*. (55):146-152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.10.005>
- Mark, H., Campbell, B. "An introduction to Near Infrared Spectroscopy and Associated Chemometrics." 2008.
- Martens, H., Jensen, S. A., Geladi, P. 1983. Multivariate linearity transformation for near-infrared reflectance spectrometry. *Nordic Symposium of Applied Statistics*. 205-234.
- Martens, H., Naes, T. "Multivariate calibration by data compression." In *Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, 59-100. St. Paul, USA: AACC, 2004.
- Martens, M., Martens, H. 1986. Near-infrared reflectance determination of sensory quality of peas. *Applied Spectroscopy*. 40(3):303-310. <http://dx.doi.org/10.1366/0003702864509114>
- Mayo, D. W., Miller, F. A., Hannah, R. W. "Course notes on the interpretation of infrared and Raman spectra." 567: John Wiley and Sons, 2003.
- McQueen, D. H., Wilson, R., Kinnunen, A., Jensen, E. P. 1995. Comparison of two infrared spectroscopic methods for cheese analysis. *Talanta*. 42(12):2007-2015. [http://dx.doi.org/10.1016/0039-9140\(95\)01685-6](http://dx.doi.org/10.1016/0039-9140(95)01685-6)
- Mentink, R. L., Hoffman, P. C., Bauman, L. M. 2006. Utility of near-infrared reflectance spectroscopy to predict nutrient composition and in vitro digestibility of total mixed rations. *Journal of Dairy Science*. 89(6):2320-2326.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, T. 2004. A user-friendly guide to multivariate calibration and classification. NIR Publications. 354.
- Naes, T., Kvaal, K., Isaksson, T., Miller, C. 1993. Artificial neural networks in multivariate calibrations. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. (1):1-11. <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.1>
- Norris, K., Williams, P. C. "Near-infrared technology in the agricultural and food industries." USA: AACC, Inc, St. Paul, Minnesota., 2004.
- Norris, K. H., Hart, J. R. 1965. Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds. *International Symposium on Humidity and Moisture*. 19-25.
- OPUS 2007. User manual. OPUS 6.5. This manual is the original documentation for the OPUS spectroscopic software.
- Osborne, B. G., Fearn, T. "Introduction." In *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*, 1-19. Harlow: Longman Scientific & Technical, 1986.
- Osborne, B. G., Kotwal, Z., Wesley, I. J., Saunders, L., Dardenne, P., Shenk, J. S. 1999. Optical matching of near infrared reflectance monochromator instruments for the analysis of ground and whole wheat. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 7(3):167-178. <http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.247>
- Owens, B., McCann, M. E. E., McCracken, K. J., Park, R. S. 2009. Prediction of wheat chemical and physical characteristics and nutritive value by near-infrared reflectance spectroscopy. *British Poultry Science*. 50(1):103-122. <http://dx.doi.org/10.1080/00071660802635347>
- Pi, F., Shinzawa, H., Ozaki, Y., Han, D. 2009. Non-destructive determination of components in processed cheese slice wrapped with a polyethylene film using near-infrared spectroscopy and chemometrics. *International Dairy Journal*. 19(10):624-629. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.05.002>
- Pokol, G. "Analitikai Kémia." Typotex Kiadó, 2011.
- Prochazkova, Z., Drackova, M., Salakova, A., Gallas, L., Pospiech, M., Vorlova, L., Tremlova, B., Buchtova, H. 2010. Application of FT NIR spectroscopy in the determination of basic physical and chemical properties of sausages. *Acta Veterinaria Brno*. (79):101-106. <http://dx.doi.org/10.2754/avb201079s9s101>
- R. Antony Shaw, Mantsch, H. H. "Near-IR Spectrometers." In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second edition)*, 1738-1747: Academic Press, 1999.
- Rodríguez-Otero, J. L., Centeno, J. A., Hermida, M. 1997. Application of near infrared transreflectance spectroscopy to the analysis of fermented milks. *Milchwissenschaft*. 52(4):196-200.
- Rodríguez-Otero, J. L., Hermida, M. 1996. Analysis of Fermented Milk Products by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of AOAC International*. 79(3):817-821.
- Rodríguez-Otero, J. L., Hermida, M., Cepeda, A. 1995. Determination of fat, protein, and total solids in cheese by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of AOAC International*. 78(3):802-806.
- Sales, J. 2009. Prediction of digestible energy content across feed ingredients and fish species by linear regression. *Fish Physiology and Biochemistry*. 35(4):551-565. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-008-9286-2>
- Scott Ramos, L. 1986. Chemometrics. *Analytical Chemistry*. 58(5):294R-315R.
- Seregély, Z., Farkas, J., Tuboly, E., Dalmadi, I. 2006. Investigating the properties of egg white pasteurized by ultra-high hydrostatic pressure and gamma irradiation by evaluating their NIR spectra and chemosensor array sensor signal responses using different methods of qualitative analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. (82):115-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.04.012>
- Sinelli, N., Limbo, S., Torri, L., Di Egidio, V., Casiraghi, E. 2010. Evaluation of freshness decay of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaged at different temperatures using NIR and MIR spectroscopy. *Meat*

- Science. 86(3):748-752. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.016>
- Sirisomboon, P., Tanaka, M., Kojima, T., Williams, P. 2012. Nondestructive estimation of maturity and textural properties on tomato 'Momotaro' by near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*. (112):218-226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.04.007>
- Sørensen, L. K. 2009. Application of reflectance near infrared spectroscopy for bread analyses. *Food Chemistry*. 113(4):1318-1322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.065>
- Stark, E., Luchter, K. 2005. NIR instrumentation technology. *NIR news*. (16):13-16.
- Stokes, L. 1979. Economical and practical evaluation of an online NIR instrument for controlling protein in soybean-meal. *Cereal Foods World*. 24(9):460-460.
- Sultaneh, A., Rohm, H. 2007. Using near infrared spectroscopy for the determination of total solids and protein content in cheese curd. *International Journal of Dairy Technology*. 60(4):241-244. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.2007.00347.x>
- Togersena, G., Arnesenb, J. F., Nilsena, B. N., Hildrum, K. I. 2003. On-line prediction of chemical composition of semi-frozen ground beef by non-invasive NIR spectroscopy. *Meat Science*. (63):515-523. [http://dx.doi.org/10.1016/s0309-1740\(02\)00113-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0309-1740(02)00113-4)
- Topolaglu, N., Günes, H. 2010. Effects of Some Factors on Milk Yield and Components of Holstein-Friesian Cattle in England. *Journal of Faculty Veterinary Medicine*. 36(1):65-74.
- Tripathi, S., Mishra, H. N. 2009. A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder. *Food Control*. 20(9):840-846. [http://dx.doi.org/10.1016/s0309-1740\(02\)00113-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0309-1740(02)00113-4)
- Urban, J., Hybl, M. 1999. The use of NIR method for evaluation of the pea (*Pisum sativum* L.) quality. *Rostlinna Vyroba*. 45(1):41-43.
- Utasi, K. 1995. Növényfiziológiai folyamatok nyomkövetése NIR módszerrel. *Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék*. 14.
- Velasco, L., Becker, H. C. 1998. Analysis of total glucosinolates content and individual glucosinolates in *Brassica* spp. by near-infrared spectroscopy. *Plant Breeding*. (117):97-102. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0523.1998.tb01459.x>
- Velasco, L., Möllers, C. 2001. Nondestructive assessment of protein content in single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.) by near-infrared spectroscopy. *Euphytica*. (123):89-93.
- Viljoen, M., Hoffman, L. C., Brand, T. S. 2005. Prediction of the chemical composition of freeze dried ostrich meat with near infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science*. (69):225-261. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.008>
- Wehling, R. L., Pierce, M. M. 1988. Determination of moisture in Cheddar cheese by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 71(3):571-574.
- Williams, P. C. "Variables affecting near-infrared reflectance spectroscopic analysis." In *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, 143-167. St. Paul, USA, 1987.
- Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P. 1987. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2(1-3):37-52. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-7439\(87\)80084-9](http://dx.doi.org/10.1016/0169-7439(87)80084-9)
- Workman, J. "Handbook of Organic Compounds: NIR, IR, Raman and UV-Vis Spectra Featuring Polimers and Surfactants." In *Methods and interpretations*, 1493: Academic Press, 2000.
- Wu, D., Feng, S., He, Y. 2007. Infrared spectroscopy technique for the nondestructive measurement of fat content in milk powder. *Journal of Dairy Science*. 90(8):3613-3619.
- Wu, D., He, Y., Feng, S., Sun, D.-W. 2008. Study on infrared spectroscopy technique for fast measurement of protein content in milk powder based on LS-SVM. *Journal of Food Engineering*. 84(1):124-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.04.031>
- Wu, D., He, Y., Shi, J. H., Feng, S. J. 2009. Exploring near and midinfrared spectroscopy to predict trace iron and zinc contents in powdered milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(5):1697-1704. <http://dx.doi.org/10.1021/jf8030343>
- Wu, W., Massart, D. L., de Jong, S. 1997. Kernel-PCA algorithms for wide data Part II: Fast cross-validation and application in classification of NIR data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. (37):271-280. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-7439\(97\)00027-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-7439(97)00027-0)
- Wu, Y., Y., Z., Li, Q., Iqbal, J., Zhang, L., Zhang, W., Y., D. 2011. Study on difference between epidermis, phloem and xylem of *Radix Ginseng* with near-infrared and infrared spectroscopy coupled with principal component analysis. *Vibrational Spectroscopy*. (55):201-206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.11.004>
www.astro.umontreal.ca/~paulchar/grps/histoire/newsite/sp/great_moments_e.html. hozzáférési dátum: 2008.
www.optique-ingenieur.org/en/courses/opi_ang_m02_c05/co/contenu_23.html. hozzáférési dátum: 2009.
- Zamora-Rojas, E., Pérez-Marín, D., De Pedro-Sanz, E., Guerrero-Ginel, J. E., Garrido-Varo, A. 2011. In-situ Iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer. *Meat Science*. 90(3):636-642. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.10.006>
- Zardetto, S. 2005. Potential applications of near infrared spectroscopy for evaluating thermal treatments of fresh egg pasta. *Food Control*. 16(3):249-256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.03.002>
- Zardetto, S., Dalla Rosa, M. 2006. Study of the effect of lamination process on pasta by physical chemical determination

and near infrared spectroscopy analysis. Journal of Food Engineering. 74(3):402-409.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.029>

Zardetto, S., Rosa, M. D. 2009. Effect of extrusion process on properties of cooked, fresh egg pasta. Journal of Food Engineering. 92(1):70-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.027>

M1. táblázat : Makromolekulák jellegzetes NIR elnyelési tartományai (Workman alapján)(Workman, 2000)

Vizsgált molekula	Hullámhossz nm	Hullámszám cm^{-1}
<i>Nedvességtartalom</i>		
O-H nyújtó/HOH deformációs rezgés kombinációja, O-H hajlító rezgés 2. felhangja	1920-1940	5210-5155
O-H nyújtó rezgés 1. felhangja	1440-1470	6945-6805
O-H nyújtó rezgés 2. felhangja	950-980	10530-10205
<i>Zsírok, olajok</i>		
C-H nyújtó rezgés/C-C nyújtó rezgés	2280	4300
C-H hajlító rezgés 2. felhangja	2310	4330
C-H nyújtó rezgés/C=O nyújtó rezgés/ C-H deformációs rezgés kombinációja	2140	4673
O-H nyújtó rezgés/HOH deformációs rezgés kombinációja, O-H hajlító rezgés 2. felhangja	2070	4831
O-H nyújtó rezgés 1. felhangja	1415	7067
C-H hajlító rezgés kombinációja	1010-1025	9900-9756
Metilén C-H nyújtó rezgés 3. felhangja	911-935	10976-10695
Metil C-H nyújtó rezgés 3. felhangja	896-915	11161-10930
<i>Keményítő és cukrok</i>		
C-H /C-C és C-O-C nyújtó rezgések	2500	4000
C-H nyújtó rezgés/CH ₂ deformációs rezgés kombinációja	2280-2330	4386-4292
O-H/C-C nyújtó rezgések kombinációja	2270-2280	4405-4380
O-H nyújtó rezgés/HOH deformációs rezgés kombinációja	2100	4762
O-H nyújtó rezgés 1. felhangja	1450	6897
O-H nyújtó rezgés 2. felhangja	1010-1030	9900-9709
C-H nyújtó rezgés 3. felhangja	850-900	11765-11110
<i>Fehérjék</i>		

N-H hajlító rezgés 2. felharmónikus kombinációja a C-H/C=O nyújtó rezgés kombinációjával, a C=O nyújtó rezgés/N-H síkban hajlító rezgés/C-N nyújtó rezgés kombinációjával	2148-2200	4650-4545
Primer amin C=O karbonil nyújtó rezgésének 2. felhangja (amid kötés)	2030-2080	4930-4810
Aromás C-H nyújtó rezgés 1. felhangja	1620-1700	6173-5880
N-H nyújtó rezgés 1. felhangja	1480-1550	6760-6450
N-H nyújtó rezgés 2. felhangja	975-1015	10260-9850

M2. táblázat: A referencia-módszerek végrehajtása során felhasznált vegyszerek összesítő táblázata

vegyszer megnevezése	gyártó/ forgalmazó
Sósav, 37 m/m%	Merck, Darmstadt, Németország
Etanol, abszolút	Reanal, Budapest
Petroléter 40-65 °C	Lachner, Brno, Csehország
Dietil-éter	Reanal, Budapest
Kénsav, 96 m/m%	VWR Spektrum-3D, Debrecen
NaOH, szemcsés	VWR Spektrum-3D, Debrecen
Bórsav	VWR Spektrum-3D, Debrecen
IKA C723 Benzoésav sztenderd	IKA Werke GmbH, Staufen, Németország
Oxigén (tisztaság 5.0)	Linde, Spanyolország

M3. táblázat: Sütőipari termékek Dumas módszerrel meghatározott fehérjetartalom eredményeinek összefoglaló táblázata

	N (db)	Minimum (m/m%)	Maximum (m/m%)	Átlag (m/m%)	Szórás
Kísérleti minták fehérjetartalma	178	8,2	16,2	12,2	1,8

M4. táblázat: Fehérjetartalom becslésére használt kalibrációs és validációs minták referencia módszerrel meghatározott eredményeinek összefoglalása

	Kalibráció (N=118)	Validáció (N=60)
Csoportok átlaga (m/m%)	12,1	12,4
Csoportok tartománya (m/m%)	8,2-16,2	8,7-16,2
Csoportok szórása	1,6	2,0

M5. táblázat: Sütőipari termékek klasszikus módszerrel meghatározott zsírtartalom eredményeinek összefoglaló táblázata

	N (db)	Minimum (m/m%)	Maximum (m/m%)	Átlag (m/m%)	Szórás
Kísérleti minták zsírtartalma	64	1,2	31,1	11,9	8,2

M6. táblázat: Zsírtartalom becslésére használt kalibrációs és validációs minták referencia módszerrel meghatározott eredményeinek összefoglalása

	Kalibráció (N=42)	Validáció (N=22)
Csoportok átlaga (m/m%)	11,0	13,7
Csoportok tartománya (m/m%)	1,2 - 31,1	2,6 – 28,8
Csoportok szórása	7,9	8,6

M7. táblázat: Sütőipari termékek cukortartalmának meghatározására használt minták klasszikus eredményeinek összefoglaló táblázata

	N (db)	Minimum (m/m%)	Maximum (m/m%)	Átlag (m/m%)	Szórás
Kísérleti minták cukortartalma	99	0,9	15,2	4,5	2,8

M8. táblázat: Cukortartalom becslésére alkalmazott kalibrációs és validációs minták referencia módszerrel meghatározott eredményeinek összefoglalása

	Kalibráció (N=66)	Validáció (N=33)
Csoportok átlaga (m/m%)	4,8	4,0
Csoportok tartománya (m/m%)	0,9-11,5	1,2-10,8
Csoportok szórása	2,9	2,6

M9. táblázat: Száraztészták zsírtartalmának meghatározására használt minták klasszikus eredményeinek összefoglaló táblázata

	N (db)	Minimum (m/m%)	Maximum (m/m%)	Átlag (m/m%)	Szórás
Kalibrációs minták zsírtartalma	90	0,5	3,9	2,5	0,8

M10. táblázat: Zsírtartalom becslésére használt kalibrációs és validációs minták referencia módszerrel meghatározott eredményeinek összefoglalása

	Kalibráció (N=60)	Validáció (N=30)
Csoportok átlaga (m/m%)	2,5	2,4
Csoportok tartománya (m/m%)	0,5-3,9	0,8-3,5
Csoportok szórása	0,8	0,7

M11. táblázat: Szárastészták tojástalmának meghatározására használt minták számolt tojástartalmának összesítő táblázata

	Teljes mintaszám N=130	Kalibráció N = 90	Validáció N = 29	Külső becslés N = 11
Átlag (db tojás)	5,1	5,2	4,6	4,9
Tartomány (db tojás)	0,1-9,6	0,1-9,1	1,1-8,7	1,0-9,6

M12. táblázat: Sajtminták klasszikus módszerrel meghatározott fehérjetartalmának összesítő táblázata

	N (db)	Minimum (m/m%)	Maximum (m/m%)	Átlag (m/m%)	Szórás
Kalibrációs minták fehérjetartalma	87	24,8	65,7	47,2	9,5

M13. táblázat: Fehérjetartalom becslésére használt kalibrációs és validációs minták referencia módszerrel meghatározott eredményeinek összefoglalása

	Kalibráció (N=58)	Validáció (N=29)
Csoportok átlaga (m/m%)	48,4	44,9
Csoportok tartománya (m/m%)	24,8-65,7	25,3-60,6
Csoportok szórása	9,3	9,6

M14. táblázat: Sajtminták klasszikus módszerrel meghatározott zsírtartalmának összesítő táblázata

	N (db)	Minimum (m/m%)	Maximum (m/m%)	Átlag (m/m%)	Szórás
Kalibrációs minták zsírtartalma	87	19,1	55,6	38,7	10,6

M15. táblázat: Zsírtartalom becslésére használt kalibrációs és validációs minták referencia módszerrel meghatározott eredményeinek összefoglalása

	Kalibráció (N=58)	Validáció (N=29)
Csoportok átlaga (m/m%)	39,3	37,3
Csoportok tartománya (m/m%)	19,1-55,6	19,3-55,5
Csoportok szórása	10,1	11,5

M16. táblázat: *Brassica* minták Kjeldahl módszerrel meghatározott fehérjetartalom eredményeinek összesítő táblázata

	N (db)	Minimum (m/m%)	Maximum (m/m%)	Átlag (m/m%)	Szórás
brokkoli	9	31,6	33,8	32,5	0,9
fejeskáposzta	9	9,7	18,1	13,7	3,5
karalábé	9	18,5	22,3	20,5	1,3
karfiol	9	23,9	33,7	28,4	4,0
kelbimbó	9	23,6	26,4	24,9	1,2
kelkáposzta	9	16,8	23,2	20,0	2,6
vöröskáposzta	9	11,4	14,2	12,8	1,1
	63	9,7	33,8	21,8	7,2

M17. táblázat: Fehérjetartalom becslésére használt kalibrációs és validációs minták referencia módszerrel meghatározott eredményeinek összefoglalása

	Kalibráció (N=58)	Validáció (N=29)
Csoportok átlaga (m/m%)	21,7	22,1
Csoportok tartománya (m/m%)	9,7-33,8	10,1-33,5
Csoportok szórása	7,0	7,6

M18. táblázat: *Brassica* minták referencia módszerrel meghatározott zsírtartalom eredményeinek összesítő táblázata

	N (db)	Minimum (m/m%)	Maximum (m/m%)	Átlag (m/m%)	szórás
brokkoli	9	4,7	5,9	5,3	0,4
fejeskáposzta	9	0,7	4,8	3,3	1,4
karalábé	9	1,5	3,1	2,4	0,5
karfiol	9	2,6	5,1	3,5	0,8
kelbimbó	9	2,6	4,1	3,5	0,6
kelkáposzta	9	1,3	2,8	2,0	0,5
vöröskáposzta	9	1,9	4,0	2,9	0,7
	63	0,7	5,9	3,3	1,2

M19. táblázat: Zsírtartalom becslésére használt kalibrációs és validációs minták referencia módszerrel meghatározott eredményeinek összefoglalása

	Kalibráció (N=58)	Validáció (N=29)
Csoportok átlaga (m/m%)	3,2	3,5
Csoportok tartománya (m/m%)	0,7-5,7	1,3-5,9
Csoportok szórása	1,3	1,2

M20. táblázat: Pillangósvirágúak Kjeldahl módszerrel meghatározott fehérjetartalom eredményeinek összesítő táblázata

	N (db)	Minimum (m/m%)	Maximum (m/m%)	Átlag (m/m%)	Szórás
borsó	24	21,3	26,7	23,4	1,8
bab	60	19,5	31,5	23,9	3,0
lencse	18	22,3	32,8	26,9	3,2
csicseriborsó	6	23,7	24,7	24,4	0,4
szója	12	33,7	52,6	47,0	7,7
	120	19,5	52,6	26,6	7,8

M21. táblázat: Fehérjetartalom becslésére használt kalibrációs és validációs minták referencia módszerrel meghatározott eredményeinek összefoglalása

	Kalibráció (N=78)	Validáció (N=39)
Csoportok átlaga (m/m%)	25,8	28,2
Csoportok tartománya (m/m%)	19,5–52,4	19,5–52,6
Csoportok szórása	6,6	9,6

M22. táblázat: Hüvelyes minták zsírtartalmának meghatározására használt minták klasszikus eredményei

	N (db)	Minimum (m/m%)	Maximum (m/m%)	Átlag (m/m%)	Szórás
borsó	24	0,8	2,0	1,2	0,3
bab	60	1,0	2,6	1,7	0,4
lencse	18	0,8	2,0	1,5	0,4
csicseriborsó	6	3,9	5,1	4,7	0,5
szója	12	0,9	16,4	5,1	6,6
	120	0,8	16,4	2,1	2,4

M23. táblázat: Zsírtartalom becslésére használt kalibrációs és validációs minták referencia módszerrel meghatározott eredményeinek összefoglalása

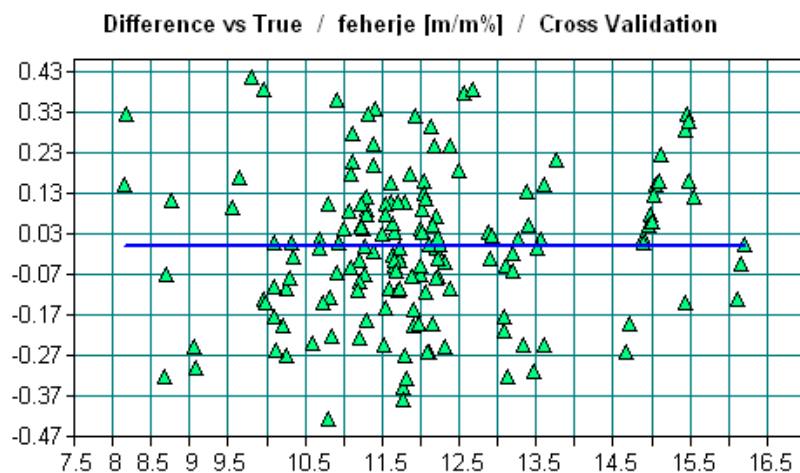
	Kalibráció (N=78)	Validáció (N=39)
Csoportok átlaga (m/m%)	1,7	1,7
Csoportok tartománya (m/m%)	0,8-5,1	0,8-4,9
Csoportok szórása	0,8	0,8

M24. táblázat: Kísérleti minták referencia módszerrel meghatározott összes-energiatartalmának összesítő táblázata

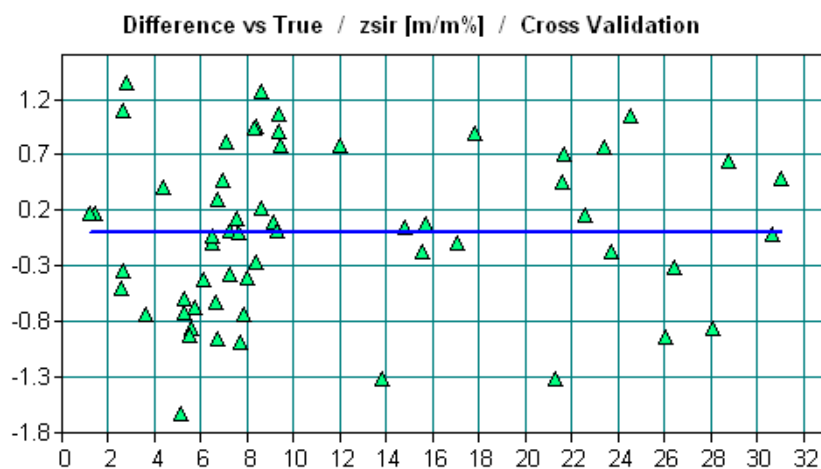
	N (db)	Minimum (kcal/g)	Maximum (kcal/g)	Átlag (kcal/g)	Szórás
borsó	16	4,19	4,25	4,20	0,02
bab	40	4,15	4,29	4,21	0,03
lencse	12	4,16	4,29	4,24	0,04
csicseriborsó	4	4,44	4,50	4,47	0,03
szója	8	4,47	5,42	4,72	0,42
	80	4,15	5,42	4,28	0,20

M25. táblázat: Hüvelyesek összes-energiatartalmának meghatározására felállított becslési függvények kalibrációs és validációs mintáinak klasszikus adatai

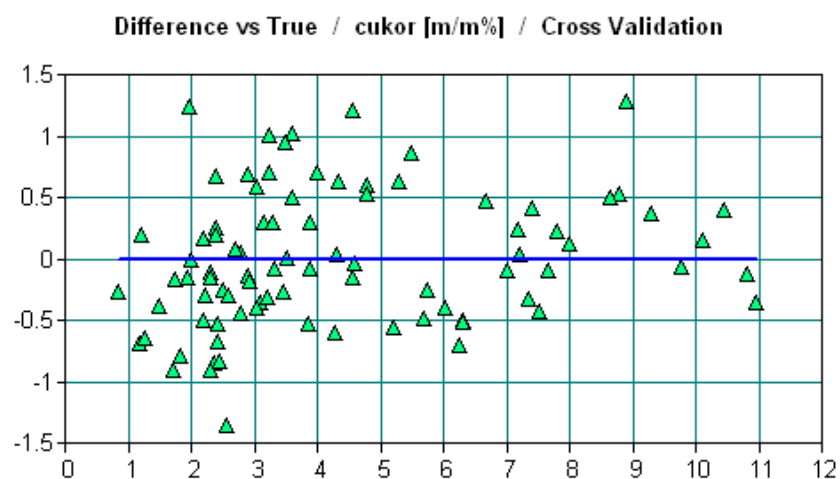
	Teljes populáció N = 78	Cal 1	Val 1	Cal 2	Val 2
Átlag (kcal/g)	4,25	4,24	4,27	4,24	4,27
Tartomány (kcal/g)	4,15-4,51	4,15-4,51	4,17-4,51	4,15-4,51	4,16-4,51
Szórás	0,10	0,10	0,11	0,09	0,11



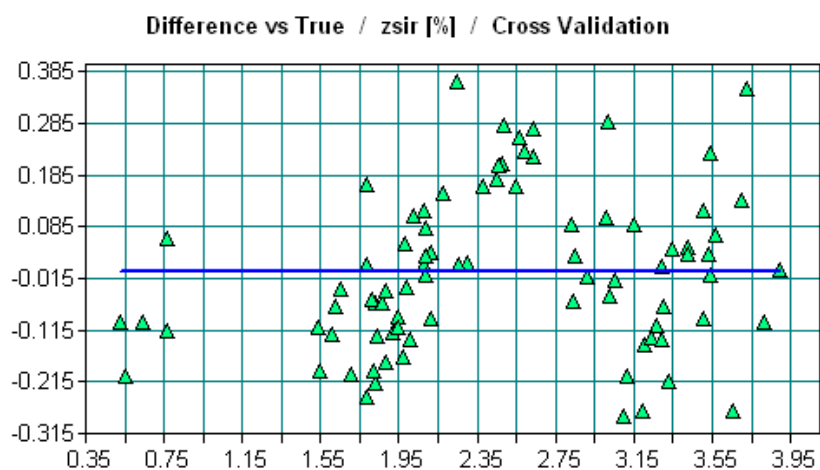
M1. ábra: Sütőipari termékek fehérjetartalmának meghatározására felállított becslési függvény (DER1) referencia adatai és becslült értékeinek különbsége (Difference= eltérés, true= referencia adat, cross validation= kereszt-validálás)



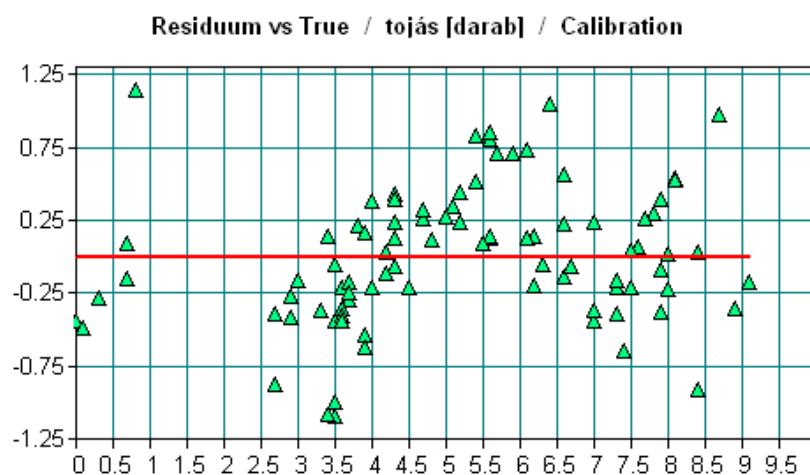
M2. ábra: Sütőipari termékek zsírtartalmának meghatározására felállított becslési függvény (DER1+SNV) referencia adatai és becslült értékeinek különbsége



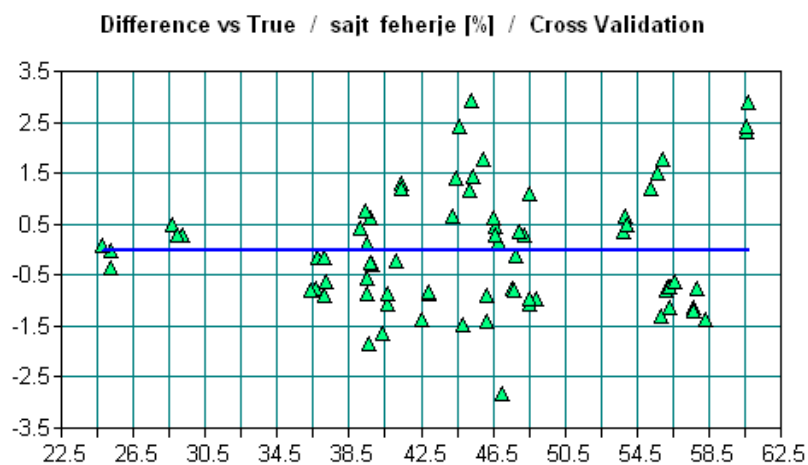
M3. ábra: Sütőipari termékek cukortartalmának meghatározására felállított becslési függvény (DER1+SNV) referencia adatai és becslült értékeinek különbsége



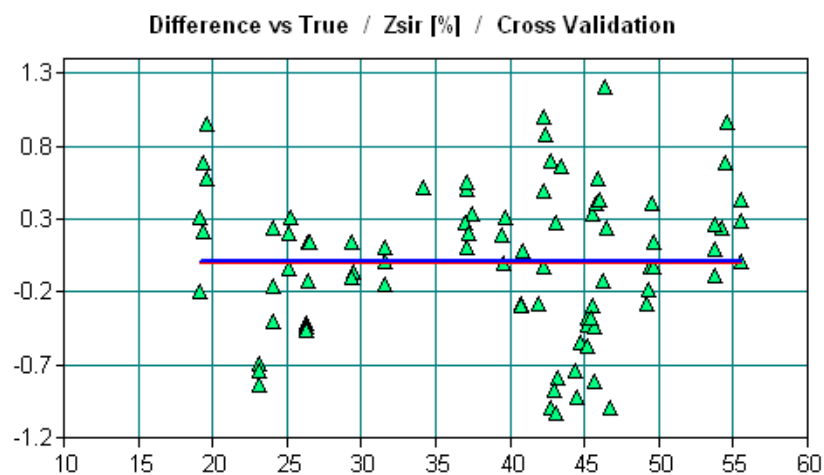
M4. ábra: Szárastészta minták zsírtartalmának meghatározására felállított becslési függvény (DER1+SNV) referencia adatai és becslült értékeinek különbsége



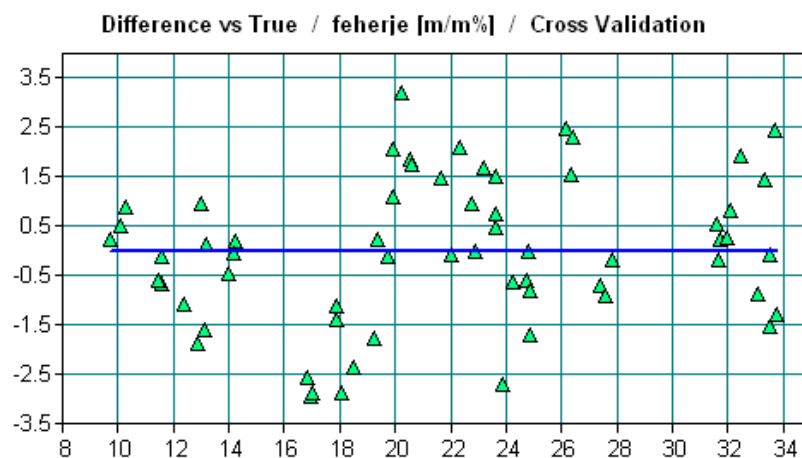
M5. ábra: Szárastészta minták tojástartalmának meghatározására felállított becslési függvény (DER1+SNV) referencia adatai és becslült értékeinek különbsége



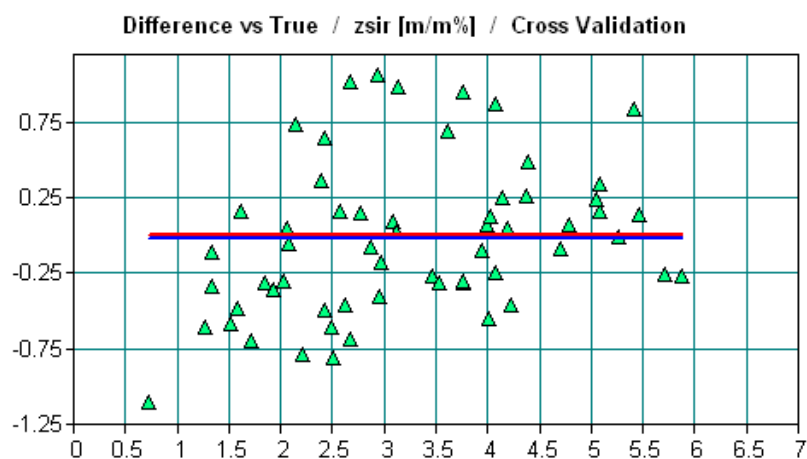
M6. ábra: Sajtminták fehérjetartalmának meghatározására felállított becslési függvény (DER1) referencia adatai és becslült értékeinek különbsége



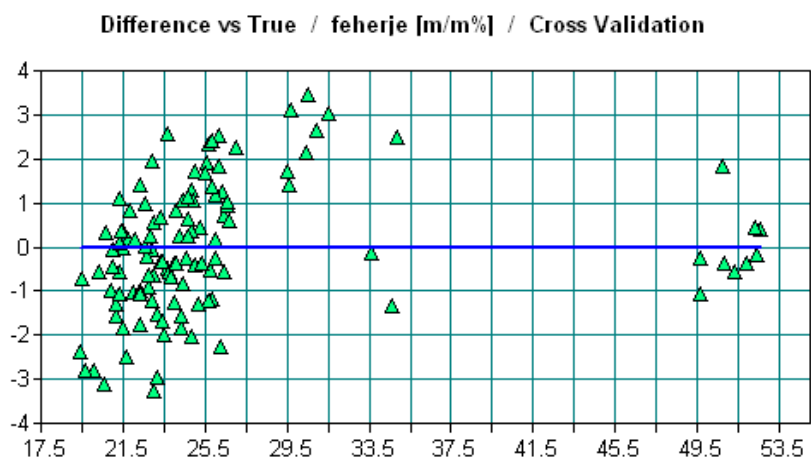
M7. ábra: Sajtminták zsírtartalmának meghatározására felállított becslési függvény (DER1+SNV) referencia adatai és becslült értékeinek különbsége



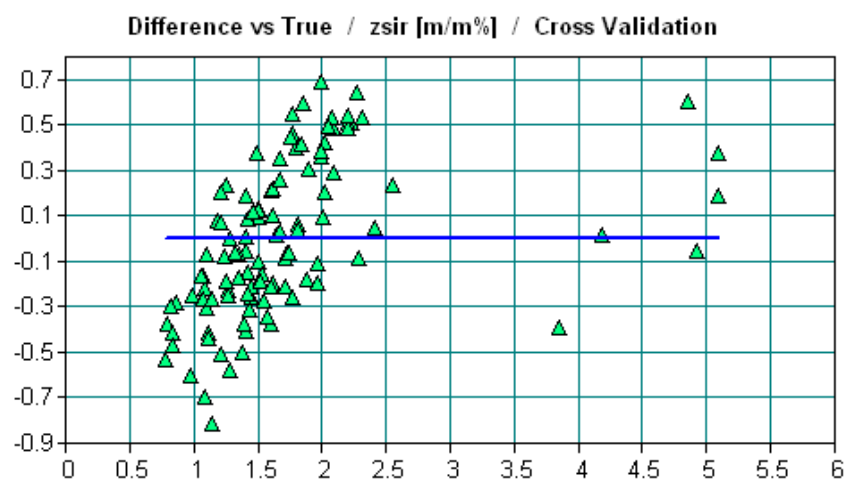
M8. ábra: *Brassicaceae* minták fehérjetartalmának meghatározására felállított becslési függvény (DER1 + SNV) referencia adatai és becslült értékeinek különbsége



M9. ábra: *Brassicaceae* minták zsírtartalmának meghatározására felállított becslési függvény (DER1 + SNV) referencia adatai és becsült értékeinek különbsége



M10. ábra: *Fabaceae* minták fehérjetartalmának meghatározására felállított becslési függvény (DER1+MSC) referencia adatai és becsült értékeinek különbsége



M11. ábra: *Fabaceae* minták zsírtartalmának meghatározására felállított becslési függvény (DER1) referencia adatai és becslült értékeinek különbsége

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Fodor Marietta és Dr. Dernovics Mihály habilitált egyetemi docenseknek, hogy a PhD éveim alatt segítettek és irányították munkámat.

Külön köszönet illeti Dr. Fodor Péter professzor urat, a Doktori Iskola vezetőjét, hogy számomra a kutatás feltételeit biztosította és támogatásával irányt mutatott a doktori munka útvesztőjében.

Köszönöm Prof. Ana Garrido-Varonak, Dolores Pérez-Marinnak és Eduardo Zamora-Rojasnak a Spanyolországban nyújtott szakmai segítségüket.

Köszönettel tartozom Lénárt József PhD hallgatónak a sajtómintákkal folytatott kísérletben nyújtott támogatásáért.

Külön köszönet az Alkalmazott Kémia Tanszék minden dolgozójának és PhD hallgatójának, akik a tanszéken töltött mindennapjaimat színesítették.

Végül köszönetet szeretnék mondani Családomnak és Barátaimnak, végtelen türelmükért és támogatásukért.