



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

SZIGEDI TAMÁS

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Készült:
Budapesti Corvinus Egyetem
Alkalmazott Kémia Tanszék

Budapest, 2014.

A doktori iskola

megnevezése:	Élelmiszertudományi Doktori Iskola
tudományága:	Élelmiszertudományok
vezetője:	Dr. Felföldi József egyetemi tanár, PhD Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Témavezetők :	Dr. Fodor Marietta habilitált egyetemi docens Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Alkalmazott Kémia Tanszék Dr. Dernovics Mihály habilitált egyetemi docens Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Alkalmazott Kémia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

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 számottevő 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 kínálnak az ellenőrzést végzők számára. A fent említett csoportba tartozik a közeli infravörös technika (NIR) is, mely roncsolásmentes gyorsvizsgálati módszerként terjed egyre szélesebb körben.

Az alkalmazási területek a meghatározható komponensek és mintamátrixok körét tekintve egyre gyarapodnak, mivel egy mérés költsége jóval kevesebb a hagyományos laboratóriumi meghatározáshoz viszonyítva. Fontos - ha nem 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.

CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozatban bemutatott kísérletek végrehajtása előtt a következő célokat fogalmaztam meg. Élelmiszeripari alapanyagok és termékek makrokomponenseinek meghatározása referencia módszerrel, majd FT-NIR módszerrel becslési függvény felállítása keresztvalidációval és teszt validációval a következő mátrixokon és célkomponenseken:

- Sütőipari termékek: fehérje-, zsír- és cukortartalmának meghatározása
- Szárzészta: zsír- és tojástartalmának meghatározása
- Sajtok: fehérje- és zsírtartalmának meghatározása
- Keresztesvirágúak (*Brassicales* félék): fehérje- és zsírtartalmának meghatározása
- Pillangósvirágúak (*Fabaceae* félék): fehérje- és zsírtartalmának meghatározása
- Pillangósvirágúak (*Fabaceae* félék): energiatartalmának meghatározása majd a populáció szétoztása WinISI és OPUS 6.5 programokkal kalibráló és validáló mintákra.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgált minták között szerepeltek: sütőipari termékek, szárzészta minták, sajtminták, keresztesvirágúak (*Brassicales*) rendjébe tartozó zöldségfélék és a pillangósvirágúak (*Fabaceae*) családjába tartozó hüvelyesfélék.

Az alkalmazott minta-előkészítési technikák közül a fagyasztva szárítást és a szárítószekrényes szárítást alkalmaztam. 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 = 315 μ m) a megfelelő homogenitás is kialakítható, így az esetlegesen fellépő inhomogenitási problémák is elkerülhetők.

A referenciamódszerek közül fehérjetartalom meghatározására Dumas és Kjeldahl módszereket alkalmaztam. Zsírtartalom meghatározására a sütőipari termékek, száraztészták, *Brassicaceae* és *Fabaceae* minták esetében az MSZ 20501-1:2007 számú szabványban leírt módszert alkalmaztam, míg a sajtminták zsírtartalmának meghatározásához az MSZ 2714/1-1989 számú Magyar Szabványt, illetve az európai EN ISO 1735:2004 magyar változatát, az MSZ EN ISO 1735 számú szabványt használtam. 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, mely 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 kinyert szterin az idő előrehaladtával átalakul, így az extraktum feldolgozása erősen időfüggő.

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.

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

Az összes-energiatartalom meghatározását *Fabaceae* mintákból egy IKA Werke Basic C2000 (IKA Werke GmbH, Staufen, Németország) adiabatikus kaloriméterrel hajtottam végre. A por alapú mintákat a meghatározás előtt pasztillázni kellett, melyhez kézi prést

használtam. A megfelelő pasztilla elkészítése után a meghatározás minden egyes minta esetében 20 percet vett igénybe. Az égetés során felszabaduló energiát kcal/g egységben kaptam meg.

A spektrumokat minden minta esetében egy BRUKER MPA™ típusú FT-NIR/NIT készülékkel (Bruker Optik GmbH Ettlingen, Németország) rögzítettem, a mérési hullámhossztartomány pedig 800-2500 nm ($12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) volt. A reflexiós mérésekhez legtöbb esetben a készülék 30 mintatartós mintaváltóját használtam, 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.

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) műszer-specifikus szoftverekkel dolgoztam.

Mintamátrixtól függetlenül minden esetben a következő spektrum-transzformációs műveleteket alkalmaztam a kalibrációs folyamat során: első derivált, második derivált, vektor normalizáció (SNV), többszörös szóródási korrekció (MSC), és ez utóbbi kettőnek első és második deriválttal való kombinációs művelete.

A *Fabaceae* minták vizsgálata során főkomponens analízist választottam a WinISI II. szoftverrel történő adat-kiértékelésnél a spektrális kieső minták detektálására. Mivel a spektrumokat Bruker MPA készülékkel rögzítettem, ezért a WinISI II. szoftver által olvasható formátumba kellett konvertálni azokat.

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

EREDMÉNYEK

A sütőipari termékek fehérjetartalma 8,2-16,2 m/m%-nak adódott a referencia-módszerrel történő meghatározás során. Az FT-NIR módszerfejlesztés 178 mintán alapul és az átlagos becslési hibája 0,25 m/m%. A zsírtartalmat 64 mintából határoztam meg, a referencia

mérések tartománya 1,2-31,1 m/m%. A becslési függvény 0,71 m/m%-os átlagos becslési hibával jellemezhető. Cukortartalom meghatározása során a 99 mintából azonosítottam egy, a populációhoz képest kiemelkedően magas cukortartalmú mintát, melyet kémiai kieső mintának minősítettem. A klasszikus mérések tartománya 0,9-11,5 m/m%-nak adódott. A cukortartalom meghatározására fejlesztett becslési függvény 0,54 m/m%-os átlagos becslési hibával alkalmazható.

Száraztészták zsírtartalmának meghatározása során a 90 mintás mintasor referenciával módszerrel meghatározott eredményei 0,5-3,9 m/m%-nak adódtak. A becslési függvény átlagos meghatározási hibája 0,15 m/m%.

Száraztészták tojástartalmának meghatározására egy közvetett módszert dolgoztam ki, amely azon elgondoláson alapul, hogy a száraztészta zsírtartalma az alkotók mennyiségi arányának megfelelően azok zsírtartalmából tevődik össze.

Ennek megfelelően a száraztészta tojástartalma a következő egyenlettel számítható:

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

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

A bemutatott egyenlet segítségével számított tojásszám adta a módszer referencia adatait. A 130 mintán alapuló becslési függvénnyel 0,5 db átlagos hibával becsülhető a száraztészta tojástartalma. Megállapítottam, hogy a fejlesztett módszer tojásnélküli illetve kis tojástartalmú minták (n<2 tojás) analízisére, valamint hamisított (tojás helyett zsiradékot tartalmazó) minták azonosítására nem alkalmazható.

Félkemény és kemény sajtok fehérjetartalmának meghatározására az FT-NIR módszer kidolgozásához 87 mintás mintasort használtam. A referenciamódszerrel meghatározott fehérjetartalom tartománya 24,8-65,7 m/m%-nak adódott. A kidolgozott FT-NIR módszer 1,17 m/m%-os átlagos becslési hibával jellemezhető. A zsírtartalom becslésére fejlesztett módszer klasszikus eredményei 19,1-55,6 m/m%-os értékekkel jellemezhetők, a becslési függvény 0,50 m/m% átlagos becslési hibával jellemezhető.

Brassicaceae családba tartozó *Brassica oleracea* félék fehérje- és zsírtartalmának becslésére 63 mintát tartalmazó mintasort használtam. A referencia adatok fehérjetartalom esetén 9,7-33,8 m/m%-nak, míg zsírtartalom esetén 0,7-5,9 m/m%-nak adódtak. A becslési függvények 1,47 m/m%-os (fehérjetartalom) és 0,50 m/m%-os (zsírtartalom) átlagos becslési hibával jellemezhetők. A felállított függvények kedvező statisztikai jellemzői ellenére megállapítható, hogy a megbízható becslés további minták bevonását igényli.

A *Fabaceae* családba tartozó 120 minta vizsgálata során főkomponens analízis alkalmazva megállapítottam, hogy mintasorba bevont granulált szójaminták nem illeszthetők a populációba. Fehérje- és zsírtartalom meghatározására használt minták referencia adatai 19,5-52,6 m/m% (fehérjetartalom), 0,8-16,4 m/m% (zsírtartalom) tartománnyal jellemezhetők. A fehérjetartalom meghatározására felállított becslési függvény 1,44 m/m%-os átlagos becslési hibával jellemezhető. Továbbá megállapítottam, hogy a zsírtartalom meghatározására az általam használt 117 mintát tartalmazó mintasorral közeli-infravörös technikával fejlesztett becslési függvények nem alkalmazhatók megbízhatóan mennyiségi meghatározásra. A *Fabaceae* minták összes energiatartalmának meghatározására kifejlesztett módszer 80 mintás mintasoron alapul, melyek 4,15-5,42 kcal/g energiatartalommal jellemezhetők. A becslési függvények felállításához két, egymástól független kiértékelő-szoftvert használtam, mellyekkel sikeresen végrehajtottam a minták spektrális információon alapuló kalibráló és validáló mintacsoportokra történő elkülönítését és az FT-NIR módszerfejlesztést..

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 mintamatrixot felölelő élelmiszereminta-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 szénhidrát-tartalom 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 két eltérő kemometriai szoftverben rejlő lehetőségeket a mintapopuláció spektrális információon alapuló kalibráló és validáló mintacsoportokra történő elkülönítésében.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Impakt faktoros folyóiratcikkek:

- **Tamás Szigedi**, Mihály Dernovics, Marietta Fodor
Determination of protein, lipid and sugar contents in bakery products by using Fourier-transform near infrared spectroscopy Acta Alimentaria 2011, 40 (Suppl.), 222-229.
IF₂₀₁₁: 0,444
- Marietta Fodor, Ágnes Woller, Sándor Turza, **Tamás Szigedi**
Development of a rapid, non-destructive method for egg content determination in dry pasta using FT-NIR technique Journal of Food Engineering 2011, 2, 195-199.
IF₂₀₁₁: 2,414
- **Tamás Szigedi**, József Lénárt, Mihály Dernovics, Sándor Turza, Marietta Fodor
Protein content determination in Brassica oleracea species using FT-NIR technique and PLS regression International Journal of Food Science and Technology 2012, 47, 436-440.
IF₂₀₁₁: 1,259
- József Lénárt, **Tamás Szigedi**, Mihály Dernovics, Marietta Fodor
Determination of fat and protein contents in cheeses by FT-NIR spectroscopy Acta Alimentaria 2012, 41, 351–362.
IF₂₀₁₂: 0,475
- **Tamás Szigedi**, Marietta Fodor, Dolores Pérez-Marin, Ana Garrido-Varo
Fourier-transform near infrared spectroscopy to predict the gross energy content of food grade legumes Food Analytical Methods 2013, 6, 1205-1211.
IF₂₀₁₂: 1,969

Az értekezésben szereplő eredményeket az alábbi hazai és nemzetközi

konferenciákon ismertettem:

- **Szigedi Tamás:** Módszerfejlesztés száraztészták zsír- és tojástartalmának meghatározására NIR technikával.
(XXIX. OTDK Konferencia, Élelmiszertudomány szekció, 2009. április 6-8., Gödöllő. Előadás kivonatok, 152. oldal ISBN: 978-963-269-095-7)
- **Szigedi Tamás, Dr. Fodor Marietta:** NIR technika alkalmazása száraztészták zsír és tojástartalmának meghatározására.
(Lippai János – Ormos Imre – Vas Károly tudományos Ülésszak, 2009. október 29-30., Budapest)
- **Tamás Szigedi, Mihály Dernovics, Marietta Fodor:** Method development for the determination of protein content in Brassica Oleracea samples using FT-NIR technique.
7th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD 2010), Leszbosz, Görögország, 2010. szeptember 28. - október 2.
- **Szigedi Tamás, Dr. Turza Sándor, Dr. Dernovics Mihály, Dr. Fodor Marietta:** Gyorsmódszer fejlesztése Brassicaceae családba tartozó zöldségminták fehérjetartalmának becslésére FT-NIR technikával
Hungalimenteria konferencia, 2011. április 19-20., Budapest
- **Fodor M., Szigedi T.:** Az FT-NIR alkalmazása az élelmiszerek minőségbiztosítása terén.
Spektroszkópiai és elválasztástechnikai szeminárium, Budapest, 2011. szeptember. 27-28.
- **T. Szigedi, M. Dernovics, M. Fodor:** Determination of egg content in dry pastas by FT-NIR technique
'Pumpaya' Workshop, Kőszeg, 2011. május 6-7.
- **Szigedi Tamás, Dr. Dernovics Mihály, Dr. Fodor Marietta:** Fabaceae minták összes energia-tartalom meghatározása FT-NIR technikával.
TÁMOP záró konferencia, 2012. január 18-19., Budapest