

MOŽNOSTI VYUŽITÍ FT-NIR SPEKTROMETRIE PRO STANOVENÍ OBSAHU BÍLKOVIN V KOZÍM MLEZIVU FT-NIR SPECTROSCOPY POTENTIAL FOR MEASURING OF THE CONTENT OF PROTEINS IN GOAT'S COLOSTRUM

Zuzana Procházková, Michaela Králová, Hana Přidalová, Lenka Vorlová

Abstract: The near infrared spectroscopy with Fourier transformation (FT-NIRs) in combination with different mathematical corrections was used to predict total content of proteins in goat's colostrum. Samples of goat's colostrum (individual and mixed, $n = 90$) were obtained from the Czech farms. The spectra of the samples were measured on the integration sphere in reflectance mode with use of transreflectance cell (0.1 mm) in the spectral range of $10\,000 - 4\,000\text{ cm}^{-1}$ with 100 scans. Calibration models were created using PLS algorithm and their accuracy was checked by validation and cross validation. Good results were obtained without a mathematical correction ($R = 0.96$ and $RMSEP = 0.68$) and with use of the 1st derivation ($R = 0.97$ and $RMSEP = 0.62$). Calibration model with use of spectra pretreated by the 2nd derivation showed an increase in the spectral noise and higher errors. The result of the study showed the potential of FT-NIRs for measuring of the content of proteins in goat's colostrum.

Keywords: spectroscopy, proteins, goat's colostrum

ÚVOD

Spektrometrie v blízké infračervené oblasti (NIRs) představuje moderní rychlou a jednoduchou metodu pro analýzu majoritních složek potravin, která stále častěji nahrazuje klasické laboratorní metody (Cozzolino a Corbella, 2003; Rodriguez-Otero et al., 1997). Stanovení chemického složení biologických materiálů NIRs technikami je založeno na absorpci záření v blízké infračervené oblasti vazbami mezi atomy. Následná analýza takto získaných spekter umožňuje určit vlastnosti charakteristické pro studovanou matici (Tigabu a Odén, 2002).

Mlezivu jako cennému biologickému materiálu je v posledních letech věnována velká pozornost. Předmětem výzkumu je možný potenciál mleziva a z něj připravených preparátů příznivě ovlivňovat imunitní systém. Vysoký obsah bílkovin v mlezivu je považován za nositele této pozitivně imunomodulační funkce. Stanovení obsahu bílkovin s využitím NIRs vyžaduje pouze malé množství vzorku (Gautz et al., 2006) a mlezivem tak není plýtváno pro účely laboratorních analýz.

Cílem této práce bylo zjistit možnosti využití FT-NIR spektrometrie pro stanovení obsahu bílkovin v kozím mlezivu a také posoudit vliv použití různých matematických úprav na možnosti stanovení bílkovin.

MATERIÁL A METODIKA

Materiál: Vzorky kozího mleziva ($n = 90$) byly získány z farem v České republice v průběhu roku 2012. Jednalo se o vzorky odebrané bezprostředně po porodu a následně v jednotlivé dny až do 4. dne po porodu. Mezi vzorky byly zastoupeny vzorky individuální i směsné. Pro vytvoření kalibračního modelu bylo využito 78 vzorků, 12 vzorků bylo použito pro validaci tohoto modelu.

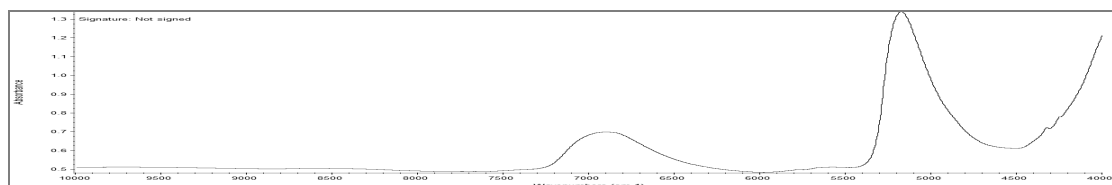
Stanovení bílkovin: Obsah bílkovin v kozím mlezivu byl stanoven infračerveným absorpčním analyzátozem Bentley 2500 (Bentley Instruments, Minnesota, USA) (ČSN 57 0536, 1999).

FT-NIR analýza: Spektra vzorků byla nasnímana FT-NIR spektrometrem NIR Nicolet Antaris (Thermo Electron Corporation, Madison, USA). Za účelem homogenizace byly vzorky před proměřením temperovány na vodní lázni na teplotu 40 °C, důkladně promíchány a následně ochlazeny na teplotu 20 °C. Vzorky byly proměřeny ve spektrálním rozsahu 10 000 - 4 000 cm^{-1} , se spektrálním rozlišením 8, se 100 scany. Spektra byla měřena na integrační sféře v režimu reflektance. Vzorky byly měřeny s použitím Petriho misky a transflektanční kyvety o tloušťce vrstvy 0,1 mm. Každý vzorek byl proměřen třikrát a pro další zpracování bylo použito průměrné spektrum (Jankovská a Šustová, 2003).

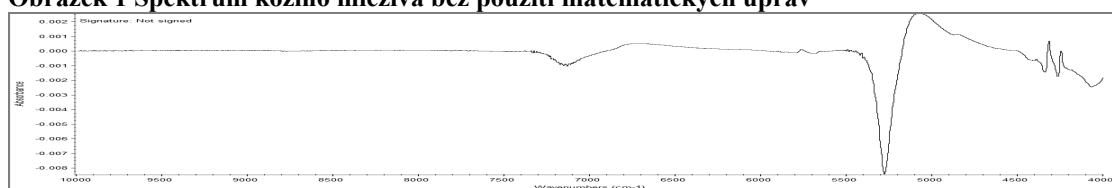
Zpracování výsledků: Naměřená data byla zpracována pomocí programu TQ Analyst verze 6.2.1.509 (ThermoNicolet Corporation, USA). Kalibrační model pro stanovení bílkovin byl vyvíjen s použitím metody částečných nejmenších čtverců (PLS - *Partial Least Squares*). Spolehlivost kalibračního modelu byla ověřena validací na sadě validačních vzorků ($n = 12$) a následně také křížovou validací. Výsledky analýzy byly zpracovány programem Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA).

VÝSLEDKY A DISKUZE

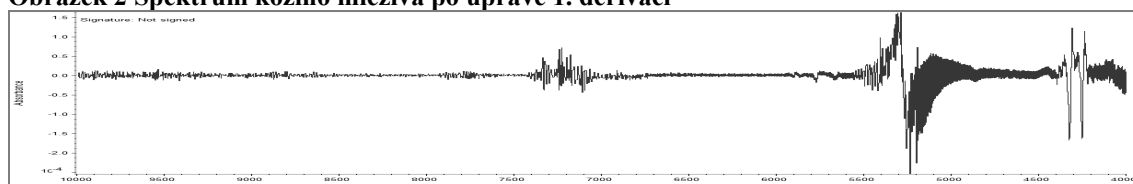
Cílem práce bylo zjistit možnosti FT-NIR spektrometrie a různých matematických úprav pro měření obsahu bílkovin v kozím mlezivu. Kalibrační model byl vytvořen s využitím algoritmu PLS. S využitím diagnostiky *Statistical spectra* byl proveden výběr regionu tak, aby vybrané spektrální oblasti korelovaly co nejvíce se změnami v koncentraci bílkovin. Jako nejvhodnější byl vybrán region v rozsahu 7 104,5 - 4 582,1 cm^{-1} s dvoubodovou základní linií v bodech 6 711,1 a 4 963,9 cm^{-1} . Pomocí diagnostiky *Spectrum outlier* byla odstraněna většina odlehlých standardů ($n = 6$). Zbylé odlehlé standardy ($n = 2$) byly odstraněny v průběhu vytváření kalibračního modelu s použitím diagnostik *Principal Component Scores* a *Leverage*.



Obrázek 1 Spektrum kozího mleziva bez použití matematických úprav



Obrázek 2 Spektrum kozího mleziva po úpravě 1. derivací



Obrázek 3 Spektrum kozího mleziva po úpravě 2. derivací

Kalibrační model pro stanovení obsahu bílkovin v kozím mlezivu byl vytvořen jednak bez použití matematických úprav a dále též po úpravě spekter 1. a 2. derivací. Tyto úpravy spekter se využívají v případech, kdy naměřené spektrum vzorku není dostatečné pro

kalibraci s nízkou chybou a přispívají ke zvýšení spektrální informace (Nicolet CZ, 2007). Vzhledem k dominanci absorpčních pásů pro vodu jsou ve spektrech kozího mleziva hůře pozorovatelné pásy související s obsahem bílkovin. Z obrázků 1 - 3 je patrné, že úprava spekter 1. derivací vedla ke zvýraznění pásů v oblastech spektra typických pro bílkoviny (4 900 - 4 550 cm^{-1}) (Tsenkova et al., 2000). Naproti tomu při použití úpravy 2. derivací došlo ke zvýšení nadbytečného šumu, což se následně projevilo i ve kvalitě kalibračního modelu zvýšením chyby predikce (RMSEP) a cross validace (RMSECV), a také snížením korelačního koeficientu cross validace (R). 2. derivace tedy nepředstavuje pro spektra kozího mleziva vhodnou matematickou úpravu.

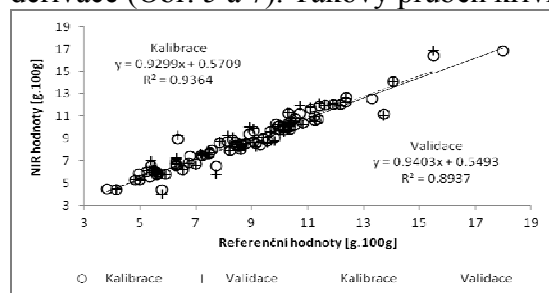
Tabulka 1 uvádí přehled výsledků jednotlivých kalibračních modelů dle použitých úprav spekter. Po úpravě spektra 1. derivací došlo k mírnému zvýšení kalibračního korelačního koeficientu a zároveň ke snížení průměrné chyby kalibrace a ke snížení počtu PLS faktorů. Při úpravě 2. derivací také došlo k mírnému zvýšení R a snížení RMSEC, ale naopak byl zaznamenán nárůst RMSEP a RMSECV. Také porovnáním hodnot korelačních koeficientů získaných z kalibrace a cross validace zjistíme značný rozdíl. Získané výsledky naznačují nižší robustnost kalibračního modelu.

Tabulka 1 Kalibrační a validační výsledky pro obsah bílkovin v kozím mlezivu

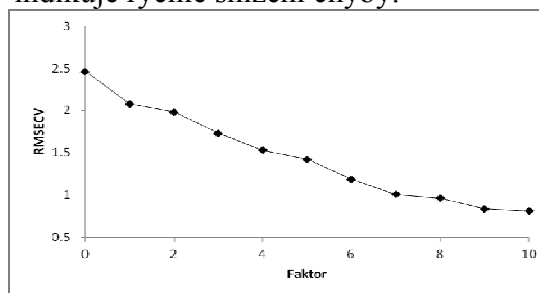
| Použitá matematická úprava | Kalibrace | | | Cross validace | | PLS faktory |
|----------------------------|-----------|-------|-------|----------------|--------|-------------|
| | R | RMSEC | RMSEP | R | RMSECV | |
| bez úpravy | 0,96 | 0,64 | 0,68 | 0,94 | 0,81 | 10 |
| 1. derivace | 0,97 | 0,62 | 0,64 | 0,94 | 0,84 | 7 |
| 2. derivace | 0,97 | 0,60 | 1,80 | 0,84 | 1,33 | 7 |

R - korelační koeficient kalibrace/cross validace, RMSEC/RMSECV - průměrná chyba kalibrace/cross validace v $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$, RMSEP - průměrná chyba predikce v $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$

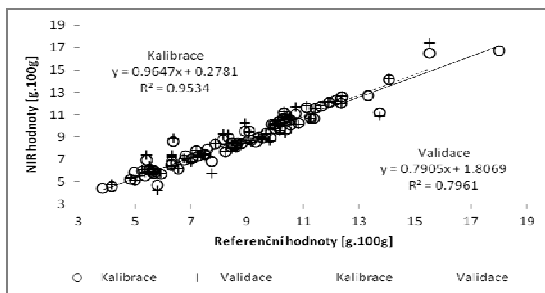
Další vyhodnocení kalibračních modelů bylo provedeno na základě grafů lineární regrese (Obr. 4 a 6). V případě kalibrace bez matematické úpravy a s použitím 1. derivace dochází k plnému překrytí regresních přímek kalibrace a cross validace, což ukazuje na použitelnost těchto kalibračních modelů v praxi. Závislost PRESS (*Predicted Residual Sum of Squares*) zobrazuje, jak se hodnota sumy čtverců predikované zbytkové chyby mění s číslem faktorů použitých ke kalibraci. Porovnáním průběhu křivky PRESS pro kalibrační model bez úpravy a s použitím 1. derivace je zřetelný strmější pokles křivky pro model s použitím derivace (Obr. 5 a 7). Takový průběh křivky indikuje rychlé snížení chyby.



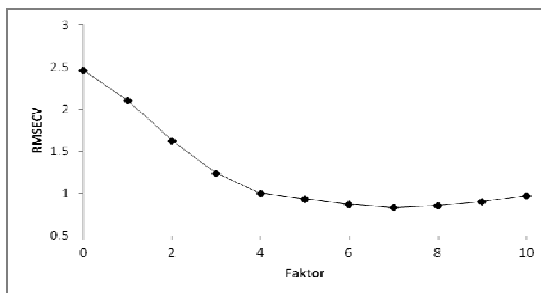
Obrázek 4 Kalibrační a validační výsledky pro stanovení bílkovin v kozím mlezivu, bez matematických úprav



Obrázek 5 Průběh křivky PRESS pro stanovení bílkovin v kozím mlezivu, bez matematických úprav



Obrázek 6 Kalibrační a validační výsledky pro stanovení bílkovin v kozím mlezivu, s použitím 1. derivace



Obrázek 7 Průběh křivky PRESS pro stanovení bílkovin v kozím mlezivu, s použitím 1. derivace

Spolehlivost vytvořených kalibračních modelů byla posouzena na základě výpočtu kalibračního variačního koeficientu (CCV) a predikčního variačního koeficientu (PCV). Za velmi spolehlivou je považována hodnota CCV pod 5 % a hodnota PCV pod 10 % (Albanell et al., 1999). Pro kalibraci bez úpravy spekter bylo CCV = 7,22 % a PCV = 9,21 %, pro kalibraci s 1. derivací spekter bylo CCV = 7,02 % a PCV = 9,51 %. Kalibraci bez matematické úpravy i kalibraci s použitím 1. derivace lze podle těchto kritérií vyhodnotit jako spolehlivé.

ZÁVĚR

Kalibrační modely pro stanovení obsahu bílkovin v kozím mlezivu byly vytvořeny s použitím různého stupně matematických úprav. Dle CCV a PCV byly modely bez derivace a model s první derivací vyhodnoceny jako spolehlivé a použitelné v běžné laboratorní praxi. Model s použitím 2. derivace prokazoval zvýšenou hladinu šumu ve spektrech, a proto tato matematická úprava není pro stanovení bílkovin ze spekter kozího mleziva vhodná. Na základě korelačních koeficientů, jejichž hodnota se přibližuje číslu 1, byla zjištěna vysoká míra závislosti referenčních dat a hodnot predikovaných NIR u obou použitelných modelů. Jako nejvhodnější pro použití v praxi byl vyhodnocen kalibrační model s použitím 1. derivace, kde dochází k rychlému snížení chyby a také míra predikce vykazuje nejnižší odchylku. Blízká infračervená spektrometrie tak představuje rychlou moderní metodu pro stanovení obsahu celkových bílkovin v kozím mlezivu.

LITERATURA

- ALBANELL, E., CACERES, P., CAJA, G., MOLINA, E., GARGOURI, A. 1999. Determination of fat, protein, and total solids in ovine milk by near-infrared spectroscopy. In *Journal of AOAC International*, 1999, vol. 82, 753-758.
- COZZOLINO, D., CORBELLA, E. 2003. Determination of honey quality components by near infrared reflectance spectroscopy. In *Journal of Apicultural Research*, 2003, vol. 42, 16-20.
- ČSN 57 0536. Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátozem. Český normalizační institut, Praha, 1999, 12 s.
- GAUTZ, L. D., KAUFUSI, P., JACKSON, M. C., BITTENBENDER, H. C., TANG, C. 2006. Determination of kavalactones in dried kava (*Piper methysticum*) powder using near-infrared reflectance spectroscopy and partial least-squares regression. In *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2006, vol. 54, 6147-6152.
- JANKOVSKÁ, R., ŠUSTOVÁ, K. 2003. Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. In *Czech Journal of Food Sciences*, 2003, vol. 21, 125-128.
- Nicolet CZ. Spektroskopický software TQ Analyst, stručný návod. Praha, 2007, 97 s.
- RODRIGUEZ-OTERO, J. L., HERMIDA, M., CENTENO, J. 1997. Analysis of dairy products by near-infrared spectroscopy: A review. In *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1997, vol. 45, 2815-2819.

TIGABU, M., ODÉN, P. C. 2002. Multivariate classification of sound and insect-infested seeds of a tropical multipurpose tree, *Cordia Africana*, with near infrared reflectance spectroscopy. In *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2002, vol. 10, 45-51.

TSENKOVA, R., ANATASOVA, S., ITOH, K., OZAKI, Y., TOYODA, K. 2000. Near infrared spectroscopy for biomonitoring: cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 1,400 nanometers. *Journal of Animal Science*, 2000, vol. 78, 2550-2557.

Poděkování: Práce vznikla za podpory projektu MZe NAZV KUS č. QJ1230044 Stanovení parametrů pro legislativní hodnocení kvality a zdravotní nezávadnosti syrového mléka krav, ovcí a koz.

Za poskytnutí vzorků děkujeme Ing. Ladislavu Smejkalovi ze společnosti BETULA PENDULA s.r.o.

Kontaktní adresa: MVDr. Zuzana Procházková, Ph.D., Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Česká republika, tel.: +420 541 562 070, email: prochazkovaz@vfu.cz