

Zadanie 55

Opracowanie modeli kalibracyjnych dla spektrometru NIRS o zakresie widma 400-2500 nm dla oznaczania glukozyolanów, białka, NDF, ADF oraz steroli i badania zmienności tych związków w roślinach oleistych.

Okres realizacji 2014-2020

Krzysztof Michalski	Adiunkt dr	IHAR PIB O/Poznań
Wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Renata Daleka	specjalista	IHAR PIB O/Poznań
Mariola Ebertowska	Specjalista	IHAR PIB O/Poznań
Czesława Fink	St technik	IHAR PIB O/Poznań
Justyna Karauda	St technik	IHAR PIB O/Poznań

dr Krzysztof Michalski - Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy (IHAR-PIB), Radzików, Oddział w Poznaniu Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych ul. Strzeszyńska 36 60-479 Poznań Tel 61 8464207
email: km2@nico.ihar.poznan.pl, zastępca: mgr Renata Daleka

Cele projektu

Projekt podzielono na cztery tematy badawcze

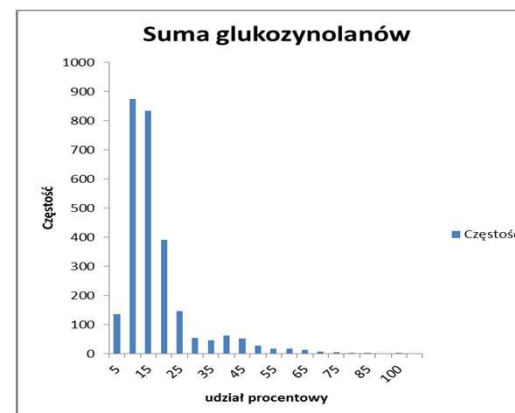
- Temat badawczy 1 **Określenie zmienności składu i zawartości glukozyolanów w próbkach nasion rzepaku.** Celem tematu jest stworzenie bazy danych zawierającej skany w bliskiej podczerwieni oraz zawartość glukozyolanów próbek nasion.
- Temat badawczy 2. **Określenie zmienności zawartości białka, tłuszczu i włókna w próbkach nasion.** Celem tematu jest wyselekcjonowanie próbek nasion rzepaku o zróżnicowanej zawartości białka, włókna i tłuszczu w nasionach, zeskanowanie widm tychże oraz ich analiza referencyjna..
- Temat badawczy 3: **Określenie zmienności w składzie i zawartości podstawowych steroli w oleju.** Celem tematu jest wyselekcjonowanie we współpracy z hodowcami próbek rzepaku o zróżnicowanej zawartości steroli, zapis widm na spektrofotometrze NIRS 6500 oraz ich analiza metodą referencyjną aby stworzyć bazę danych do ewentualnej kalibracji..
- Temat badawczy 4: **Opracowanie kalibracji NIRS i oszacowanie błędu metody.** Celem tematu jest opracowanie kalibracji do oszacowania błędu metody i wykorzystania otrzymanych równań do selekcji próbek.
- Cele zrealizowano w całości

Materiały i metody

- Temat 1 W latach 2014- 2020 r zebrano 1750 próbek nasion rzepaku pochodzących z materiałów własnych IHAR (Poznań) oraz Hodowli Roślin Strzelce które poddano analizie referencyjnej na skład i zawartość glukozyolanów metodą chromatografii gazowej silylowych pochodnych desulfogukozyolanów. Próbki wybrano tak aby w miarę możliwości pokrywały cały dostępny zakres zmienności chemicznej glukozyolanów.
- Temat 2 Pobrano próbki nasion rzepaku z linii i odmian będących w opracowaniu w IHAR O/Poznań i spółkach IHAR w ilości 520 próbek. Zebrane próbki poddano analizie referencyjnej na zawartość białka , włókna ,tłuszczu.
- Temat 3 Pobrano próbki nasion rzepaku z linii i odmian będących w opracowaniu w IHAR O/Poznań i spółkach IHAR oraz z kolekcji odmian rzepaku w ilości 300 próbek. Zebrane próbki poddano analizie referencyjnej steroli w oleju metodą chromatografii gazowej
- Temat 4 Zebrane widma z wynikami referencyjnymi z lat 2014-2020 użyto do wyliczenia kalibracji służących do szybkiego oznaczania badanych składników w nasionach rzepaku.

Zadanie 1 Wyselekcjonowane próbki w połączeniu z wcześniej zebranymi materiałami poszerzyły zbiór danych o próbki z różnych lokalizacji i warunków klimatyczno-glebowych, zwiększając reprezentatywność i wariancję zbioru użytego do wyliczenia równań kalibracyjnych i wzmocnienia ich odporności na próbki o nietypowej zawartości oraz pochodzeniu.. Tabela prezentuje zakres zmienności poszczególnych składników w w latach 2014-2020 a wykres rozkład zmienności glukozyolanów

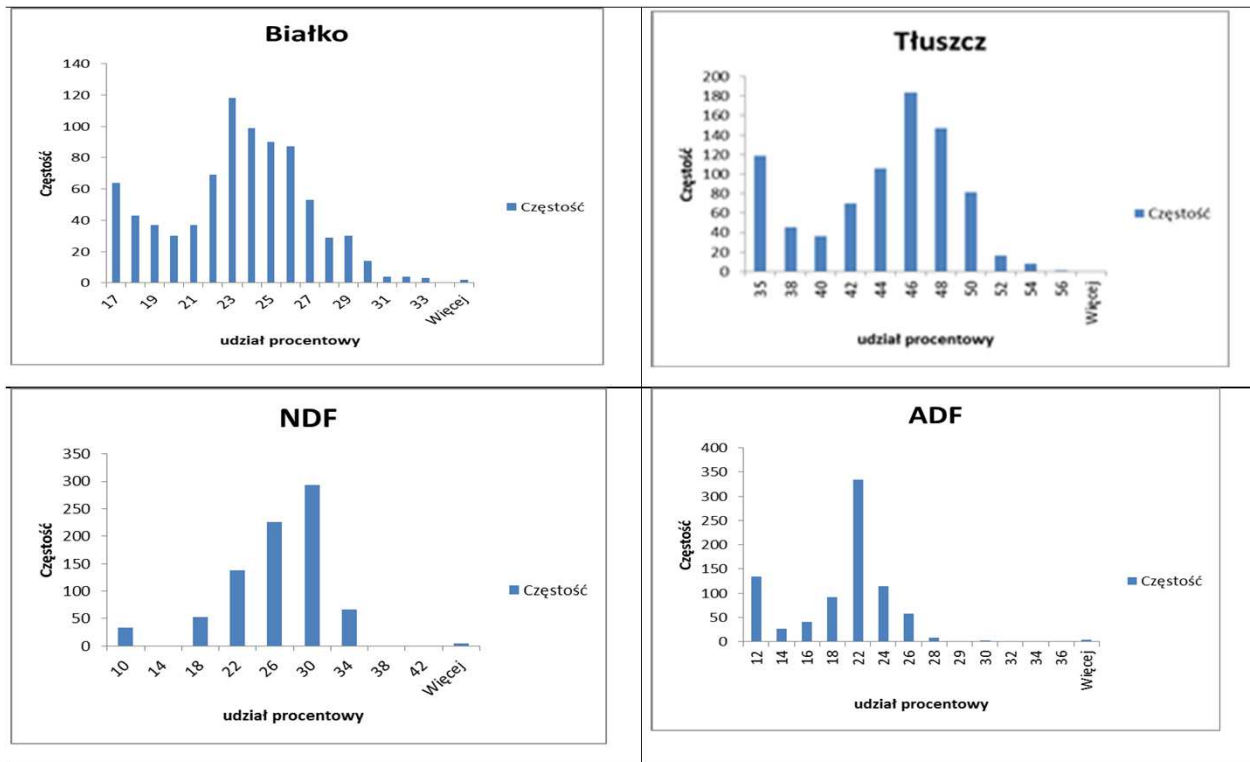
Składnik	Zakres zmienności		Jedn.
	Minimum	Maximum	
Glukonapina	0,1	26,7	μM/g
Glukobrassicapina	0,1	18,4	μM/g
Progoitryna	0,1	70,5	μM/g
Napoleiferyna	0,1	4,8	μM/g
Glukobrassicyna	0,1	2,3	μM/g
4OH-glukobrassicyna	0,1	14,1	uM/g
Suma glukozyolanów	0,5	101,5	μM/g



Stworzony zbiór kalibracyjny stanowi podstawę do stabilnej, odpornej na próbki nietypowe, kalibracji na zawartość glukozyolanów. Udało się poszerzyć zakres zmienności glukozyolanów do 90 mikromoli/g co pokrywa praktycznie całą wariancję dla glukozyolanów. Baza próbek obejmuje lata 2014-2020 i pokrywa duży zakres zmienności klimatycznej jaka wystąpiła na obszarze północnej i zachodniej Polski.

Zadanie 2 Wybierając próby do zbioru kierowano się pochodzeniem próbek. Próbki w z lat 2014-2020 pozwalają wyliczyć równania kalibracyjne dla oznaczanych parametrów z dokładnością wystarczającą do celów pomiarowych. Zebrane próbki posłużyły do wyliczenia zaawansowanej kalibracji obejmującej analizę zawartości białka, tłuszczu, włókna. Baza próbek umożliwiła stworzenie taniej kompleksowej metody oceny nasion rzepaku obejmującej wszystkie podstawowe składniki występujące w nasionach rzepaku.

Zadanie 2 Wybierając próby do zbioru kierowano się pochodzeniem próbek. Próbki w z lat 2014-2020 pozwalają wyliczyć równania kalibracyjne dla oznaczanych parametrów z dokładnością wystarczającą do celów pomiarowych. Zebrane próbki posłużyły do wyliczenia zaawansowanej kalibracji obejmującej analizę zawartości białka, tłuszczu, włókna. Baza próbek umożliwia stworzenie taniej kompleksowej metody oceny nasion rzepaku obejmującej wszystkie podstawowe składniki występujące w nasionach rzepaku. Wykresy prezentują rozkład zmienności próbek z lat 2014-2020



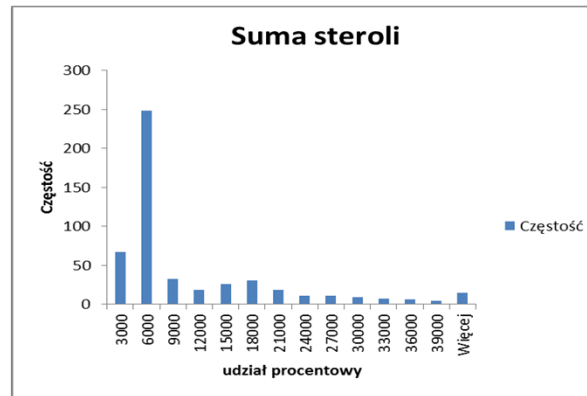
Zebrane próbki mogą posłużyć wraz z zebranymi wcześniej do wyliczenia zaawansowanej kalibracji obejmującej analizę zawartości białka, tłuszczu, włókna.

Baza próbek umożliwia stworzenie taniej kompleksowej metody oceny nasion rzepaku obejmującej wszystkie podstawowe składniki występujące w nasionach rzepaku.

Zadanie 3 W latach 2014-2020 pozyskano do celów kalibracyjnych 300 próbki rzepaku o zróżnicowanych cechach jakościowych zebranych w różnych miejscowościach (Borowo, Małyszyn, Poznań).. Poniższy wykres prezentuje zakres zmienności poszczególnych składników w latach 2014-2020.

Wybierając próby do zbioru kierowano się pochodzeniem próbek i zawartością steroli w próbce – stosując do screeningu testową kalibrację wykonaną na podstawie próbek z lat poprzednich. Zebrany zbiór został wykorzystany rozszerzenia bazy kalibracyjnej i wyliczenia równania zdolnego do estymacji całkowitej zawartości steroli w nasionach rzepaku .

Zebrane próbki charakteryzują się dość dużą zmiennością i posłużyły do wyliczenia kalibracji nadającej się do screeningu steroli



Zadanie 4

Jakość kalibracji ocenia się wykorzystując parametry statystyczne takie jak błąd kalibracji (SEC)liczony dla równiania, współczynnik korelacji (Adj RSQ - choć ten zależy w dużym stopniu od zakresu chemicznego) oraz błąd walidacji skrośnej(SECV) lub błąd walidacji na zbiorze prób nie należących do zbioru kalibracyjnego (SEV).

Otrzymane wyniki kalibracyjne dla glukozynolanów dobrze estymują zawartość głównych glukozynolanów. Błąd pomiaru jest mniejszy od raportowanych w literaturze (ok.4 $\mu\text{M/g}$).

Próbki z lat 2014 -2020 pozwoliły poszerzyć zakres zmienności choć odbyło się to kosztem nieco mniejszej dokładności równania. Jednym z powodów takiej sytuacji jest pogorszenie dokładności analizy referencyjnej- powyżej 40 mikromoli/g nasion staje się nieliniowa. Współczynnik korelacji jest stosunkowo niski co wiąże się z zakresem dostępnej zmienności (większość próbek to próbkio niskiej zawartości glukozynolanów).

Stworzony zbiór kalibracyjny praktycznie pokrywa całą zmienność glukozynolanów w rzepaku i może być podstawą do równania selekcyjnego.

Również dokładność równań dla białka, tłuszczu, włókna ADF i NDF jest wystarczająca dla ich praktycznego użytkowania.

Sterole nadal wymagają ulepszenia poprzez powiększenie bazy danych.

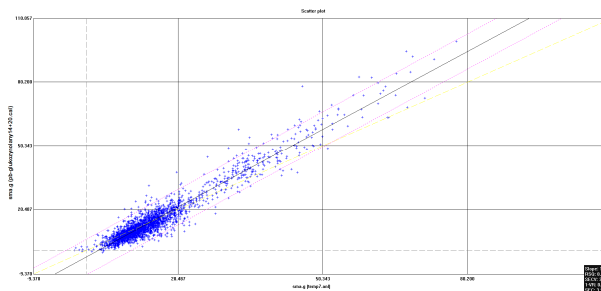
Porównanie błędów dla zbioru 2014-19 , 2014-20 pokazuje stabilizację dokładności dla glukozynolanów, poprawę dokładności dla steroli oraz NDF i ADF i lekkie pogorszenie dla tłuszczu .

Porównując wyniki kalibracji z poprzednich lat z obecnymi można uznać iż kalibracje się stabilizują i stają się odporne na losowe próbki.

Równania kalibracyjne wyliczone na bazie zebranych danych

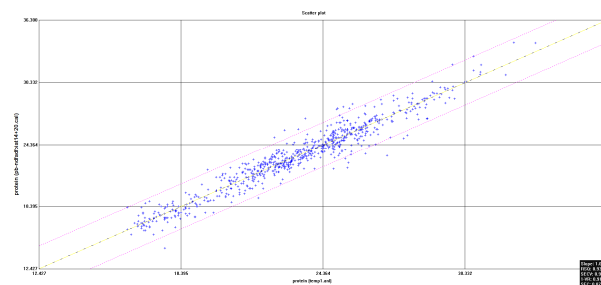
Suma glukozyolanów

Range	0.50 - 99.20	Std Dev.	12.006			
SEC	AdjRSQ	F	REP	SECV	1-VR	
3.924	0.893	83.48	0.000	3.953	0.892	



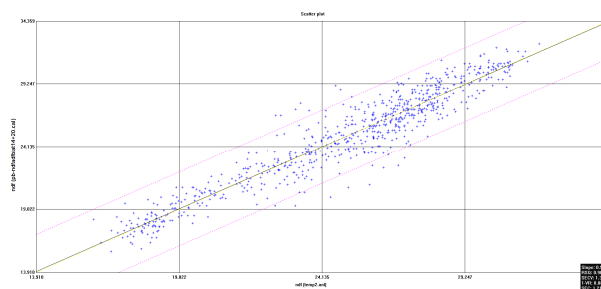
Białko

Range	14.40 - 34.13	Std Dev.	3.294			
SEC	AdjRSQ	F	REP	SECV	1-VR	
0.873	0.930	14.15	0.000	0.937	0.919	



NDF

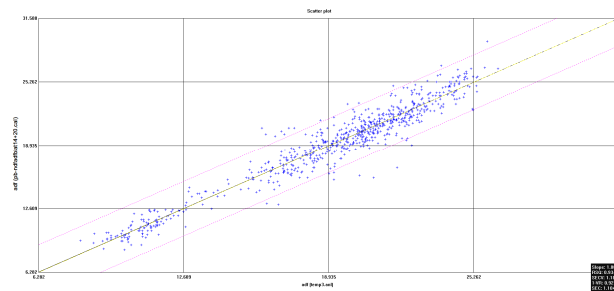
Range	15.60 - 32.50	Std Dev.	3.922			
SEC	AdjRSQ	F	REP	SECV	1-VR	
1.214	0.904	16.17	0.000	1.307	0.889	



Równania kalibracyjne wyliczone na bazie zebranych danych

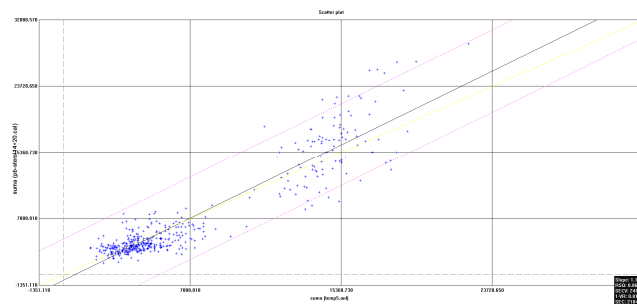
ADF

Range 8.50 - 29.30 Std Dev. 4.262
 SEC AdjRSQ F REP SECV 1-VR
 1.104 0.933 18.62 0.000 1.183 0.923



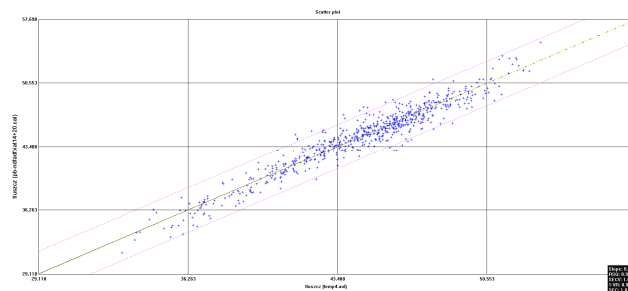
Suma steroli

Range 1412.50 - 29048.60 Std Dev. 5664.919
 SEC AdjRSQ F REP SECV 1-VR
 2184 0.851 18.44 0.000 2411 0.818



Tłuszcz

Range 31.48 - 55.10 Std Dev. 3.809
 SEC AdjRSQ F REP SECV 1-VR
 1.013 0.929 24.35 0.000 1.071 0.921



Wykorzystanie otrzymanych danych

- Zebrane dane (widma i wyniki referencyjne) wykorzystano do otrzymania równań kalibracyjnych, które zostały zainstalowane w programach pomiarowych
- :HR Strzelce - DS2500
- HRr Strzelce O/ Małyszyn= NIRS 6500
- IHAR O/Poznań - NIRS 6500
- Za ich pomocą przebadane zostały duże ilości próbek rzepaku, a wyniki wykorzystane do selekcji materiałów badawczych