4-2-02-2-01 „Opracowanie modeli kalibracyjnych dla spektrometru NIRS o zakresie widma 400-2500 nm dla oznaczania glukozynolanów, białka, NDF, ADF oraz steroli i badania zmienności tych związków w roślinach oleistych” (dr K. Michalski).

**Cel zadania:** Utworzenie reprezentatywnej bazy danych widm NIR próbek nasion, które pozwolą na wykonanie wartościowych i precyzyjnych kalibracji dla badanych składników, a więc na kompleksowe oszacowanie przydatności nasion do badań i selekcję materiałów do hodowli. Zadanie realizowano w ramach czterech tematów badawczych.

Temat badawczy 1. Określenie zmienności składu i zawartości glukozynolanów w próbkach nasion rzepaku.

**Celem tematu** 1. było utworzenie bazy danych zawierającej widma próbek rzepaku w bliskiej podczerwieni oraz zawartość glukozynolanów próbek nasion.

**Materiały i metody:** W 2020 roku zebrano 350 próbek nasion rzepaku pochodzących z materiałów własnych IHAR-PIB O/Poznań oraz Hodowli Roślin Strzelce –Grupa IHAR (Małyszyn, Borowo), które poddano analizie referencyjnej na skład i zawartość glukozynolanów metodą chromatografii gazowej silylowych pochodnych desulfogukozynolanów. Próbki wybrano tak aby w miarę możliwości pokrywały cały dostępny zakres zmienności glukozynolanów oznaczanej chemicznie. Widma skanowano w kuwetkach refleksyjnych o pojemności 5 ml za pomocą spektrometru NIRS 6500   
i programu ISISCAN (FOSS) w zakresie widma od 400 do 2500 nm. Do obliczeń użyto programu WINISI (FOSS) .

**Wyniki i dyskusja:** 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.

Analiza w bliskiej podczerwieni jest jedyną metodą instrumentalną nadającą się do zastosowania w analizie glukozynolanów w rzepaku. Metody referencyjne (GC i HPLC) są kosztowne, wymagają laboratorium i kwalifikowanego personelu w przeciwieństwie do nich pomiar w bliskiej podczerwieni jest skrajnie prosty i nie wymaga zaawansowanej wiedzy. Badane są całe nasiona, nieniszcząco.   
W program pomiarowy wbudowane są mechanizmy wykorzystujące dystanse Mahalanobisa porównujące widmo mierzonej próbki z widmami zawartymi w bazie kalibracyjnej i ostrzegające użytkownika, gdy widmo istotnie rożni się od widm kalibracyjnych.

Zebrany zbiór próbek obejmuje zmienność występująca w roku 2020 w obszarze Polski zachodniej (Borowo, Małyszyn, Strzelce, Poznań), co pozwala wprowadzić do kalibracji zmienność geograficzną   
i gwarantuje bardziej równomierne wypełnienie kalibrowanego zakresu. Zbiór kalibracyjny zawierający próbki reprezentatywne dla całej populacji i obejmujący dane z kilku lat pozwala na otrzymanie równań bardziej odpornych na nieprzewidziane zmiany składu mierzonych próbek.

Podsumowanie i wnioski: Zbiór widm zebranych w roku 2020 został dołączony do wcześniejszej (2014-2019) bazy danych celem stworzenia na ich podstawie stabilnej kalibracji estymującej zawartość glukozynolanów w nasionach rzepaku, odpornej na próbki nietypowe.

Poszerzono zakres zmienności glukozynolanów do 90 μM g-1 nasion, co pokrywa praktycznie całą wariancję dla glukozynolanów. Baza próbek obejmuje lata 2014-2020 i pokrywa duży zakres zmienności klimatycznej jaka wystąpiła na obszarze północnej i zachodniej Polski.

Temat badawczy 2. Określenie zmienności zawartości białka, tłuszczu i włókna w próbkach nasion

**Celem tematu** badawczego 2. jest wyselekcjonowanie próbek nasion rzepaku o zróżnicowanej zawartości białka, włókna i tłuszczu w nasionach, zeskanowanie ich widm oraz analiza referencyjna.

**Materiały i metody:** W roku 2020 pozyskano do celów kalibracyjnych 104 próbki rzepaku   
o zróżnicowanych cechach jakościowych zebranych w różnych miejscowościach (Borowo, Małyszyn, Poznań). Wybierając próby do zbioru kierowano się pochodzeniem próbki – starano się wyszukać próbki o maksymalnie zróżnicowanej zawartości białka, tłuszczu i włókna opierając się na pochodzeniu. Próbki zeskanowano na spektrofotometrze NIRS 6500 i poddano analizie referencyjnej (analiza białka metodą Kjeldahla, analiza zawartości włókna metodą van Soesta, analiza zawartości tłuszczu na spektrometrze NMR model MQA 7005 oraz analiza referencyjna na extraktorze Soxletha).

**Wyniki:** Wybrane próbki do zbioru były zróżnicowane pod względem zawartości białka, tłuszczu   
i włókna i obejmowały zmienność występująca w roku 2020 w obszarze Polski zachodniej , co pozwala wprowadzić do kalibracji zmienność geograficzną i gwarantuje równomierne wypełnienie kalibrowanego zakresu, a w efekcie pozwala na otrzymanie równań odpornych na nieprzewidziane zmiany składu mierzonych próbek. Otrzymane wyniki w połączeniu z danymi z lat 2014-2019 pozwalają wyliczyć równania kalibracyjne dla oznaczanych parametrów z dokładnością wystarczającą do celów pomiarowych i selekcji materiału roślinnego.

**Podsumowanie:** 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.

Temat badawczy 3. Określenie zmienności w składzie i zawartości podstawowych steroli w oleju nasion rzepaku.

**Celem tematu** jest wyselekcjonowanie próbek rzepaku o zróżnicowanej zawartości steroli, zapis widm na spektrofotometrze NIRS 6500 oraz ich analiza metodą referencyjną aby stworzyć bazę danych do ewentualnej kalibracji.

**Materiały i metody:** Z różnych źródeł zebrano 60 próbek nasion, zeskanowano na spektrofotometrze NIRS 6500 i poddano analizie referencyjnej (analiza steroli w oleju metodą chromatografii gazowej na chromatografie Agilent 7890). Widma NIRS z wynikami referencyjnymi posłużyły do poszerzenia bazy danych, która pozwoli wykonać wstępną estymacje kalibracji. Wybierając próbki do zbioru kierowano się ich pochodzeniem i zawartością steroli w próbce określonej stosując testową kalibrację wykonaną na podstawie próbek z lat poprzednich. Zebrane próbki charakteryzują się dość dużą zmiennością i po dołączeniu do próbek z okresu 2014-2019 posłużyły do wyliczenia kalibracji nadającej się do zastosowania w selekcji..

**Podsumowanie:** Zebrany zbiór został wykorzystany do rozszerzenia bazy kalibracyjnej i wyliczenia równania zdolnego do estymacji całkowitej zawartości steroli w nasionach rzepaku .

Temat badawczy 4: Opracowanie kalibracji NIRS aby oszacować błąd metody.

Zebrane widma z wynikami referencyjnymi z lat 2014-2020 użyto do wyliczenia kalibracji na oznaczane parametry. Jakość kalibracji ocenia się wykorzystując parametry statystyczne takie jak błąd kalibracji (SEC) liczony dla równania, współczynnik korelacji (Adj RSQ - choć ten zależy w dużym stopniu od zakresu chemicznego oznaczenia) 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 µM g-1 nasion).

Próbki z 2020 roku 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 μM g-1 nasion analiza staje się nieliniowa. Współczynnik korelacji jest stosunkowo niski, co wiąże się z zakresem dostępnej zmienności (większość próbek to próbki o niskiej zawartości glukozynolanów).

Stworzony zbiór kalibracyjny praktycznie pokrywa całą zmienność glukozynolanów w rzepaku i może być podstawą do równania selekcyjnego. Także dokładność równań dla białka, tłuszczu, włókna ADF   
i NDF jest wystarczająca dla ich praktycznego użytkowania.

W przypadku steroli dokładność oznaczenia nadal wymaga ulepszenia poprzez powiększenie bazy danych.

Porównanie błędów dla zbiorów 2014-19 i 2014-20 pokazuje stabilizację dokładności dla glukozynolanów, poprawę dokładności dla steroli oraz NDF i ADF i niewielkie pogorszenie dla tłuszczu. Porównując wyniki kalibracji z poprzednich lat z obecnymi można uznać iż kalibracje się stabilizują   
i stają się odporne na losowe próbki.

Otrzymane równania zostały zastosowane w HR Strzelce (Małyszyn – NIRS 6500, Strzelce – NIRS DS 2500) oraz w IHAR O/Poznań –NIRS 6500, gdzie wykorzystano je do selekcji próbek nasion.