

Primena bliske infracrvene spektroskopije u određivanju sadržaja ulja i proteina u semenu soje

- Originalan naučni rad -

Svetlana BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, Vuk ĐORĐEVIĆ, Mladen TATIĆ,
Miladin KOSTIĆ i Aleksandar ILIĆ
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Izvod: Mogućnost brzog i nedestruktivnog određivanja hemijskog sastava semena soje predstavlja bitan faktor u oplemenjivanju i semenarstvu soje, kao i u prerađivačkoj industriji. Bliski infracrveni (NIR) deo spektra, predstavlja samo mali deo spektra svetlosti i odnosi se na talasne dužine od 700 do 2,500 nm. U ovom delu spektra nalazi se veliki broj apsorpcionih traka i kombinovanih traka, koji potiču od različitih organskih molekula i omogućavaju kvantitativnu i kvalitativnu hemijsku analizu semena soje. Uz primenu multivariacionih statističkih metoda moguća je kvantitativna analiza različitih klasa organskih molekula u semenu soje. Jednačine kalibracionih krivih konstruisane su na osnovu 220 uzoraka semena soje. Utvrđene su bliske vrednosti dobijene merenjem standardnim laboratorijskim tehnikama i NIR tehnikom. Koeficijent determinacije za sadržaj proteina iznosio je 0,97 dok je za sadržaj ulja bio 0,93. NIR spektroskopija je brza, robusna i pouzdana tehnika pomoću koje je moguće kvantitativno određivanje sadržaja proteina i ulja u intaktnom semenu soju.

Ključne reči: NIR, sadržaj proteina, sadržaj ulja, soja.

Uvod

Bliska infracrvena spektroskopija, metoda difuzne refleksije, predstavlja kvalitativnu i kvantitativnu metodu, koja se danas svrstava među najvažnije analitičke metode, *McClure*, 2003. Njene prednosti su joj omogućile da postane jedna od značajnih alatki za rešavanje različitih vrsta analitičkih problema u različitim oblastima, uključujući poljoprivredu, prehrambenu, hemijsku, farmaceutsku, tekstilnu, kao i industriju lekova, *Reeves i McCarty*, 2001, *Moron i Cozzolino*, 2003, *Reich*, 2005. Mnogi istraživači su zaključili da je NIR metoda ekonomična, jednostavna i

brza i jedna od najboljih metoda za analize velikih populacija u ranim generacijama u oplemenjivačkim programima, *Panford*, 1987, *Robbelen*, 1990, *Tajuddin i sar.*, 2002. Mogućnost brzog i nedestruktivnog merenja kvaliteta zrna soje predstavlja jedan od glavnih faktora pri uspešnom oplemenjivanju soje na poboljšan hemijski sastav zrna.

NIR (*near infrared*) spektroskopija je tehnologija koja je uglavnom zasnovana na stvarnom broju molekula svakog pojedinačnog konstituenta. Molekuli osciliraju na frekvencijama koje odgovaraju talasnim dužinama u infracrvenom regionu elektromagnetnog spektra, *Murray i Williams*, 1987. NIR spektar obuhvata deo elektromagnetnog zračenja u rasponu od 750 do 2.500 nm. Za kvantitativnu analizu različitih klasa organskih molekula u semenu soje, najznačajnije su apsorpcione trake kojese odnose na kombinacije fundamentalnih vibracija različitih funkcionalnih grupa organskih molekula (C-H, C-N, O-H, N-H, C=O i C=C). Zbog preklapanja apsorpcionih traka u ovom delu spektra nije moguće primeniti klasičnu kvantitativnu spektralnu analizu, koja uzima u obzir jednu talasnu dužinu, nego je neophodno primeniti multivariacione statističke analize i uzeti u obzir više intervala talasnih dužina, a ponekad i ceo NIR spektar.

Materijal i metode

Za analizu sadržaja vlage, ulja i proteina u semenu soje korišćen je spektrofotometar Perten DA7000 sa InGaAs *diode array* detektorom. Dve stotine dvadeset uzoraka semena soje, mase 250 g, upotrebjeno je za izradu kalibracione krive. U uzorcima semena soje, pre prikupljanja spektara, izdvojene su mehaničke nečistoće (zemlja, biljni ostaci). Za primenu ove metode nije potrebno vršiti dodatnu pripremu uzoraka.

Hemijske analize sadržaja vlage, proteina i ulja urađene su standardnim laboratorijskim metodama. Sadržaj vlage u znu soje određen je standardnom metodom za soju, *JUS/ISO 1573*, 1995, sadržaj proteina Kjeldahl metodom, *JUS/ISO 1871*, 1992, a sadržaj ulja preko udela heksanskog ekstrakta, *JUS/ISO 695*, 1991.

Refrakcioni spektri ($\log 1/R$) kalibracionih uzoraka semena soje prikupljeni su na talasnim dužinama od 950 do 1.700 nm, u rezoluciji od 5 nm. Originalni spektralni podaci, pre izračunavanja, transformisani su korišćenjem drugog izvoda spektra na osnovu pet tačaka, *Savitsky i Golay*, 1964. Nakon toga obavljene su sledeće korekcije: korekcija za višestruko rasejanje (MSC korekcija) koja smanjuje slučajnu varijaciju spektra i "*mean centred*" korekcija koja povećava male razlike između spektara. Za svaki pojedinačni konstituent korišćene su sledeće talasne dužine: za vlagu od 1.115 do 1.700 nm, za ulja od 1.110 do 1.700 nm i za proteine od 1.110 do 1.300 nm.

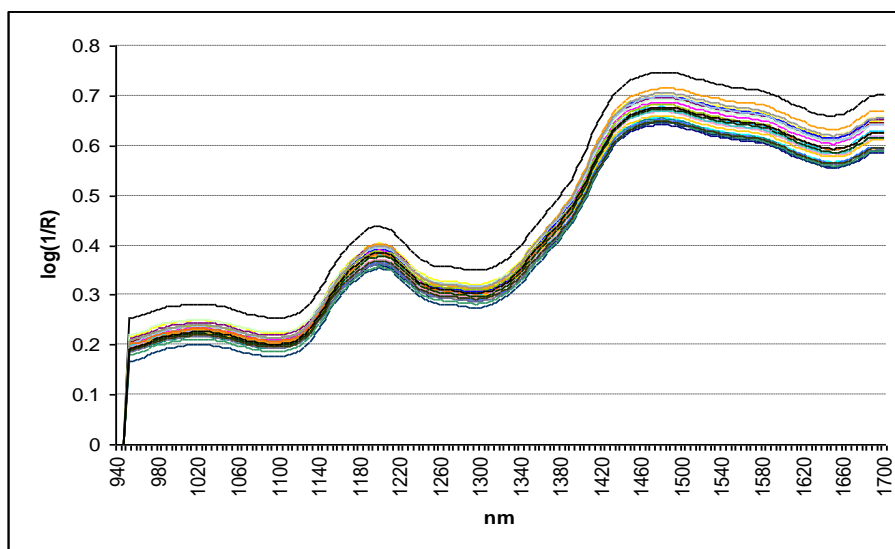
Izrada kalibracione krive obavljena je metodom parcijalnih najmanjih kvadrata, a izračunavanja su obavljena pomoću PLS1 algoritma. Provera jednačine prave izvršena je ukrštenom proverom (cross validation) i na osnovu toga korigovan

je broj faktora. Optimalan broj faktora za svaki konstituent izabran je na osnovu vrednosti predviđena greška sume kvadrata ostatka (PRESS - *Prediction Residual Error Sum of Squares*). Za konstrukciju kalibracione krive i sva ostala izračunavanja korišćen je softverski program Grams/32 PLSIQ.

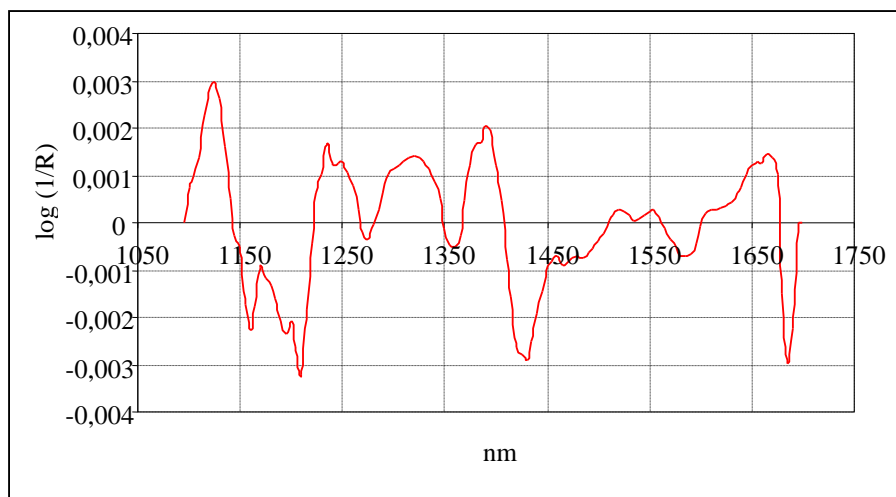
Kontrola ispravnosti kalibracionih kriva izvršena je eksternom validacijom. Validacija je obavljena pomoću 41 uzorka semena soje koji nisu korišćeni pri razvijanju kalibracije. Eksterna validacija za sadržaj vlage nije obavljena. Tri uzorka prilikom validacije krive za sadržaj proteina detektovana su kao pogrešna ocena i isključeni su iz daljeg razmatranja.

Rezultati i diskusija

Na netransformisanom NIR spektru (Grafikon 1) jasno se uočavaju dva maksimuma, jedan na talasnoj dužini od 1.200 nm, a drugi na 1.465 nm. Ovi maksimumi odgovaraju C-H, odnosno O-H vezama u molekulima proteina, ulja i ugljenih hidrata u semenu soje. Takođe, na oko 1.700 nm moguće je uočiti deo maksimuma koji je karakterističan za spektar ulja. Proteini soje, zbog heterogenog hemijskog sastava, imaju veoma kompleksan spektar te ih nije moguće vizuelno odrediti. Dobijeni izgled spektra podudara se sa spektrom koji su predstavili *Delwiche i sar.*, 2006. Ovakav spektar nije pogodan za kvantitativnu analizu, tako da je neophodno obaviti transformaciju spektra (Grafon 2). Nakon transformacije, na spektru je moguće uočiti više maksimuma koji su upotrebljeni za razvijanje kalibracije.

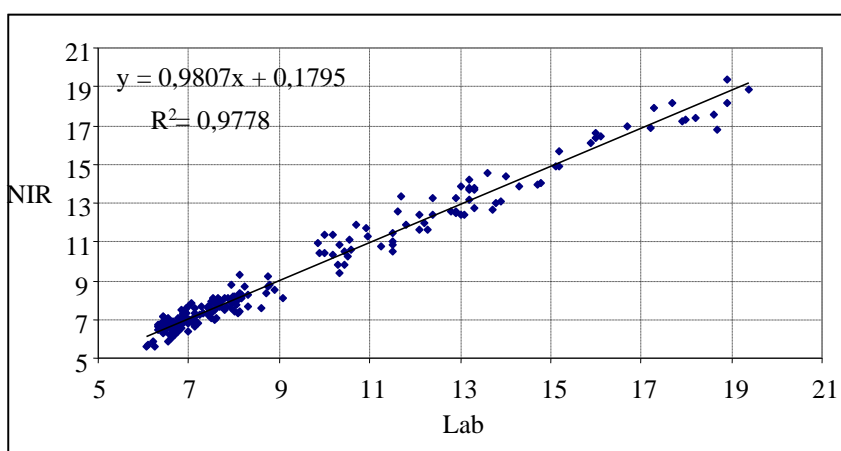


Grafikon 1. Netransformisani NIR spektar 30 uzoraka semena soje
Raw NIR spectra of 30 soybean seed samples

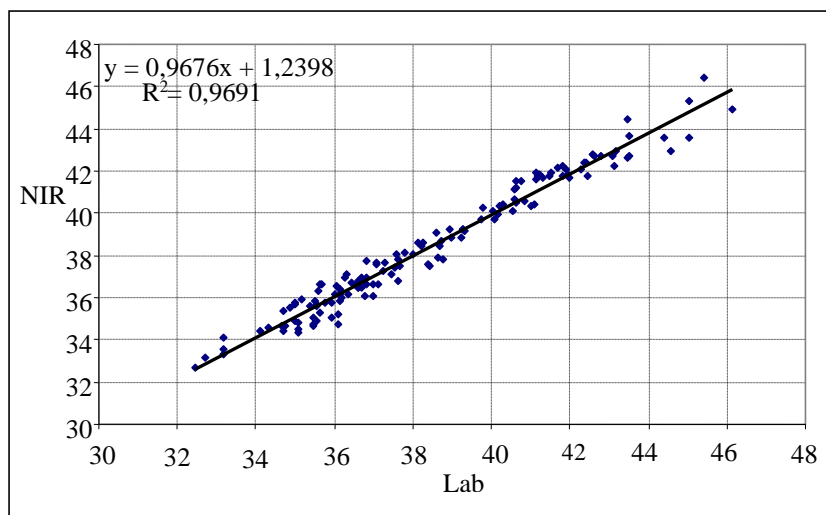


Grafikon 2. Prosečan NIR spektar 220 uzorka semena soja nakon transformacija
Average NIR spectrum of 220 soybean seed samples after transformation

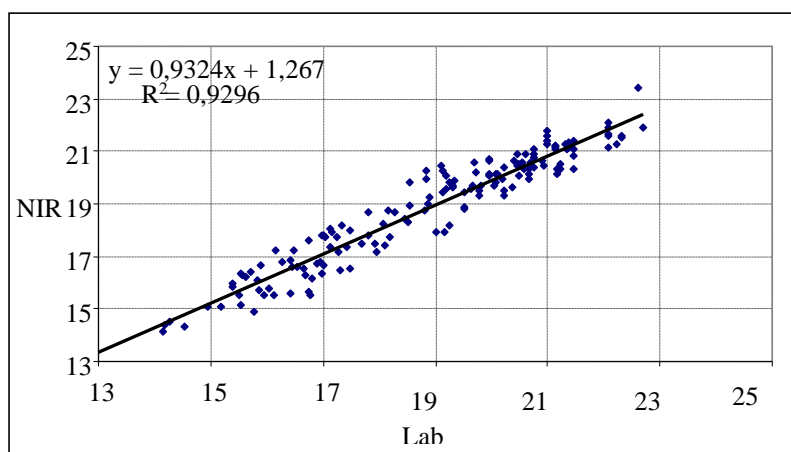
Utvrđena je bliska veza između laboratorijskih i NIR vrednosti za sva tri ispitivana konstituenta semena soje. Visoke vrednosti koeficijenta determinacije, posebno za sadržaj vlage i proteina u znu soje, ukazuju na visoku međuzavisnost merenja standardnim laboratorijskim tehnikama i NIR tehnikom (Grafikoni 3-5), što u svojim istraživanjima ističu brojni autori, **Hruschka**, 1987, **Hymowitz i sar.**, 1974, **Dorsheimer i Isaac**, 1982. Takođe su utvrđene i relativno niske vrednosti standardne greške kalibracije.



Grafikon 3. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja vlage u uzorcima semena soja
Calibration curve for moisture content in soybean seed samples



Grafikon 4. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja proteina u uzorcima semena soje
Calibration curve for protein content in soybean seed samples



Grafikon 5. Kalibraciona kriva za određivanje sadržaja ulja u uzorcima semena soje
Calibration curve for oil content in soybean seed samples

Opseg kalibracije pokriva širok dijapazon očekivanih vrednosti merenja. U svetskoj kolekciji germplazme soje sadržaj proteina u zrnju kreće se od 30 do 53 %, dok je sadržaj ulja između 10 i 25%, *Dong i sar.*, 2004. S obzirom da su uzorci sa ekstremno niskim, odnosno ekstremno visokim sadržajem proteina i ulja veoma retki, kalibraciona kriva pokriva veliku većinu očekivanih vrednosti merenja (Tabela 1).

Na osnovu ukrštene provere, korigovan je broj faktora koji je upotrebljen za konstrukciju kalibracione krive. Ovo je bitan momenat pri razvoju kalibracije.

Tabela 1. Sadržaj vlage, proteina i ulja (%) u uzorcima semena soje upotrebljenih za konstrukciju kalibracione krive
 Moisture, Protein and Oil Content (%) in Soybean Seed Samples Used for the Calibration Development

Konstituent Constituent	Prosek Average	SD	Min	Max
Vlaga - Moisture	9,23	3,33	6,06	19,36
Proteini - Proteins	38,39	3,09	32,45	46,14
Ulja - Oils	18,80	2,25	12,82	22,71

Premali broj faktora obično daje lošu kalibracionu krivu, odnosno model sadrži nedovoljno podataka da bi pouzdano mogao da predvidi količinu konstituenta u nepoznatom uzorku. U slučaju prevelikog broja faktora, u model se uključuju prekomerni podaci koji čine buku i smanjuju pouzdanost kalibracije. Vrednosti za 1-VR (udeo objašnjene varijanse) dobijene nakon ukrštene provere su gotovo identične sa R^2 za sva tri konstituenta, što govori o pouzdanosti modela. Nasuprot tome, standardna greška ukrštene provere (SECV) ima nešto veće vrednosti od standardne greške kalibracije (SEC). Ovakve razlike u standardnim greškama su uobičajene u NIR spektroskopiji (Tabela 2)

Na vrednosti standardnih grešaka i preciznost merenja utiče i konzistencija uzorka. Mlevenjem uzorka povećava se broj mesta interakcije svetlosti i organskih molekula, te se postižu bolji rezultati kalibracije, *Osborne* i *Stevenson*, 1987, *Hollung i sar.*, 2005. Prilikom razvijanja kalibracije opisane u ovom radu, jedan od ciljeva bio je i da se sačuva seme, odnosno da se uzorak nakon merenja može koristiti u druge svrhe. Za oplemenjivače, koji često raspolažu malim količinama semena, ovo je veoma važno, u odnosu na preciznost merenja.

Ispravnost primenjenog modela potvrdila je eksterna validacija (Tabela 3). Opseg vrednosti u setu uzoraka za eksternu validaciju pokrivaio je veliki deo kalibracione krive. Najveći broj uzoraka nalazio se u središnjem delu krive, nešto manji broj sa ekstremno visokim sadržajem ulja i proteina nalazio se u gornjem opsegu krive, dok je deo krive sa ekstremno niskim vrednostima ostao nepokriven. Dobijene vrednosti standardne greške eksterne validacije (SEP) poklapale su se sa vrednostima SECV. Nešto manja vrednost SEP bila je uočena za sadržaj ulja u ispitivanim uzorcima semena soje. Utvrđene visoke vrednosti koeficijenta determinacije, potvrđuju linearnost modela.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se NIR tehnika može koristiti kao analitička metoda za rutinsko ispitivanje sadržaja vlage, proteina i ulja u semenu soje, sa zadovoljavajućom preciznošću.

Tabela 3. Eksterna validacija - External validation

Konstituent Constituent	N	Min	Max	SD	SEP	R ²
Proteini - Proteins	38	36,52	46,33	2,03	0,55	0,92
Ulja - Oils	41	15,29	22,56	1,44	0,41	0,92

SEP - standardna greška eksterne validacije - standard error in external validation

S obzirom da su dobijene visoke vrednosti koeficijenta determinacije, za ispitivane konstituente u semenu soje, kao i niske vrednosti standardne greške kalibracije, postoji visoka međuzavisnost merenja standardnim laboratorijskim tehnikama i NIR tehnikom.

Povećanje tačnosti kalibracionih podataka predstavlja rezultat graničnih poboljšanja stvarne tačnosti, ukoliko je standardna greška referentnih podataka na početku bila manja od dobijene stvarne tačnosti odgovarajuće NIR kalibracije.

Literatura

- Delwiche, S., L. Pordesimo, A. Scaboo and V. Pantalone** (2006): Measurement of inorganic phosphorus in soybeans with near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **54** (19): 6951-6956.
- Dong, Y., L. Zhao, B. Liu, Z. Wang, Z. Jin and H. Sun** (2004): The genetic diversity of cultivated soybean grown in China. *Theor. Appl. Genet.* **108**: 931-936.
- Dorsheimer, W. and R. Isaac** (1982): Application of NIR analysis. *Am. Lab.* **14**: 58-63.
- Hollung, K., M. Øverland, M. Hrustic, P. Sekulic, J. Miladinovic, H. Martens, B. Narum, S. Sahlstrøm, M. Sørensen, T. Storebakken and A. Skrede** (2005): Evaluation of nonstarch polysaccharides and oligosaccharide content of different soybean varieties (*Glycine max*) by near-infrared spectroscopy and proteomics. *J. Agric. Food Chem.* **53** (23): 9112-9121.
- Hruschka, W.** (1987): Data Analysis: Wavelength Selection Methods. In: *Near-Infrared Technology in Agriculture and Food Industries*, Williams, P. and Norris, K. (Ed), ed. by the American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 35-56.
- Hymowitz, T., W. Dudley, F.I. Collins and M. Brown** (1974): Estimation of protein and oil concentration in corn, soybean and oat seed by near-infrared light reflectance. *Crop Sci.* **14**: 713-715.
- JUS/ISO** (1995): Određivanje vlage, 1573:1995.
- JUS/ISO** (1992): Poljoprivredno-prehrambeni proizvodi - opšta uputstva za određivanje azota metodom po Kjeldalu, 1871:1992.
- JUS/ISO 695:1991** (1991): Određivanje ulja: Određivanje heksanskog ekstrakta (ili petrolearskog ekstrakta) nazvanog "količina ulja".

- McClure, W.F.** (2003): 204 years of near infrared technology: 1800-2003. *J. Near Infrared Spectrosc.* **11** (6): 487-518.
- Moron, A. and D. Cozzolino** (2003): Exploring the use of near infrared reflectance spectroscopy to study physical properties and microelements in soils. *J. Near Infrared Spectrosc.* **11** (2): 145-154.
- Murray, I. and P. Williams** (1987): Chemical Principles of Near-Infrared Technology. In: *Near-Infrared Technology in Agriculture and Food Industries*, Williams, P. and Norris, K. (Ed), ed. by the American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 17-34.
- Osborne, B. and S. Stevenson** (1987): Near-infrared research in Europe. In: *Near-Infrared Technology in Agriculture and Food Industries*, Williams, P. and Norris, K. (Ed), ed. by the American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 185-200.
- Pazdernik, D., A. Killam and J. Orf** (1997): Analysis of amino and fatty acid composition in soybean seed, using near infrared reflectance spectroscopy. *Agron. J.* **89**: 679-685.
- Panford, J.** (1987): Application of Near-Infrared reflectance spectroscopy in North America. In: *Near-Infrared Technology in Agriculture and Food Industries*, Williams, P. and Norris, K. (Ed), ed. by the American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 201-212.
- Reeves, J.B. and G.W. McCarty** (2001): Quantitative analysis of agricultural soil using near infrared reflectance spectroscopy and fibre-optic probe. *J. Near Infrared Spectrosc.* **9** (1): 25-34.
- Reich, G.** (2005): Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57** (8) 1109-1143.
- Röbbelen, G.** (1990): Mutation breeding for quality improvement: A case study for oilseed crops. *Mutation Breeding Review*, n. 6, FAO/ IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Vienna, pp. 1-44.
- Savitsky, A. and M.J.E. Golay** (1964): Smoothing and differentiation of data by simplified least-squares procedures. *Anal. Chem* **36** (8): 1627-1639
- Tajuddin, T., S.Watanabe, R. Masuda, K. Harada and K. Kawano** (2002): Application of near infrared transmittance spectroscopy to the estimation of protein and lipid contents in single seeds of soybean recombinant inbred lines for quantitative trait loci analysis. *J. Near Infrared Spectrosc.* **10**: 315-325.

Primljeno: 11.01.2008.

Odobreno: 24.03.2008.

* *
*

The Application of the Near Infrared Spectroscopy in the Determination of the Protein and Oil Content in Soybean Seeds

- Original scientific paper -

Svetlana BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, Vuk ĐORĐEVIĆ, Mladen TATIĆ,
Miladin KOSTIĆ and Aleksandar ILIĆ
Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

Summary

The possibility of a fast and non-destructive estimation of the chemical composition of the soybean seed is one of the most important factors in soybean breeding, soybean seed production, as well as, soybean processing. The near infrared (NIR) spectrum is a small part of the light spectrum and pertains wave lengths between 700 and 2500 nm. These parts of the spectrum contain a large number of absorptions bands, overtones and combined bands, which originate from different organic molecules and provide quantitative and qualitative chemical analyses of the soybean seed. The application of multivariate statistical methods provide quantitative chemical analyses of different classes of organic molecules in the soybean seed. Calibration equations were developed from 220 soybean seed samples. Close relationships between standard analytical methods and NIR values were estimated. The coefficients of determination for the protein and oil contents were 0.97 and 0.93, respectively. The NIR spectroscopy is a rapid, robust and reliable method for quantitative analyses of the protein and oil content in the intact soybean seed.

Received: 11/01/2008

Accepted: 24/03/2008

Adresa autora:

Svetlana BALEŠEVIĆ-TUBIĆ
Institut za ratarstvo i povrtarstvo
Maksima Gorkog 30
21000 Novi Sad
Srbija
E-mail: svetlanabt@ifvcns.ns.ac.yu