

Mısırdaki Protein ve Yağ Oranının FT-NIR (Fourier Dönüşümlü Yakın Kızıl Ötesi Yansıma) Spektroskopisi Yöntemi ile Tespitinde Örnek Tipi ve Kemometrik Metodun Etkisi

Cem Ömer EGESEL^{1*} Fatih KAHRIMAN² İsmail KAVDIR³
Neslihan EKİNCİ⁴ M. Burak BÜYÜKCAN³

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Çanakkale

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Çanakkale

³Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Makinaları ve Teknolojileri Mühendisliği Bölümü, Çanakkale

⁴Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lapseki Meslek Yüksekokulu, Tarımsal Ürünler Muhafaza ve Depolama Teknolojisi Bölümü, Çanakkale

*Sorumlu yazar: cegesel@comu.edu.tr

Geliş tarihi: 09.07.2015, Yayına kabul tarihi: 26.10.2015

Özet: FT-NIR (Fourier Dönüşümlü- Kızıl Ötesi Yansıma) spektroskopisi gıda ve endüstriyel alanda örnek bileşenlerinin tespitinde aktif olarak kullanılan bir enstrümandır. Bu çalışmada farklı genetik özelliklere sahip hibrit ve saf hatlardan oluşan 260 adet mısır örneği materyal olarak kullanılmıştır. Bu örneklerde protein ve yağ oranı kantitatif tayinleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgularla tane ve öğütülmüş halde FT-NIR cihazlarından alınan spektrum verileri kullanılarak kalibrasyon modelleri (n=227) oluşturulmuştur. Model geliştirme amacıyla Çoklu Doğrusal Regresyon (MLR) ve Kısmi En Küçük Kareler Regresyonu (PLSR) yöntemlerinden faydalanılmıştır. Oluşturulan modellerin güvenilirliği dış doğrulama işlemi (n=20) ile test edilmiştir.

Araştırma sonucunda öğütülmüş örneklerle oluşturulan modellerde protein oranı için MLR (RMSEC=0.5482; SEE=0.5494; r=0.882; R²=0.7776) ve PLSR (RMSEC=0.5504; SEE=0.5516; r=0.880; R²=0.7758) yönteminin tahmin gücü bakımından benzerlik gösterdiği, yağ oranı için ise PLSR (RMSEC=0.4429; SEE=0.4439; r=0.719; R²=0.5179) yöntemine göre MLR modelinin tahmin gücünün daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Dış doğrulama sonrasında ise protein oranında modeller arasındaki durum değişmez iken, yağ oranında MLR modelinin daha doğru sonuçlar verdiği ortaya çıkmıştır. Tane örneklerinden alınan spektrumlara dayalı modellerin tahmin gücünün model doğrulama sonucunda kullanıma uygun olmadığı anlaşılmıştır. Sonuç olarak, kullanılan istatistik yöntemin ve ölçüm alınan örnek yapısının tahmin gücüne önemli bir etkisinin olduğu, bu çalışmada kullanılan ölçüm yönteminin öğütülmüş örnekler üzerinde daha başarılı sonuçlar verdiği anlaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Protein oranı, yağ oranı, kalibrasyon, regresyon, *Zea mays*

Effect of Sample Type and Chemometric Method in Determination of Protein and Oil Ratio in Maize using FT-NIR (Fourier Transform-Near Infrared) Spectroscopy

Abstract: FT-NIR (Fourier Transform-Near Infrared) spectroscopy is an actively used instrument in detection of sample ingredients in food and industrial areas. In this study, 260 maize samples including hybrids and inbreds with different genetic characteristics were used as material. On these samples, quantitative protein and oil analyses were carried out. Calibration models (n=227) were developed using these results and spectral data collected with FT-NIR instrument from seed and flour samples. Multiple Linear Regression (MLR) and Partial Least Squares Regression (PLSR) methods were utilized for the purpose of developing models. Reliability of the models was tested with external validation procedure (n=20).

Results showed that MLR (RMSEC=0.5482; SEE=0.5494; $r=0.882$; $R^2=0.7776$) and PLSR (RMSEC=0.5504; SEE=0.5516; $r=0.880$; $R^2=0.7758$) methods were similar in estimation power for protein ratio when the models were developed from flour samples, while for oil ratio PLSR model (RMSEC=0.4429; SEE=0.4439; $r=0.719$; $R^2=0.5179$) gave a higher power with respect to MLR method. After external validation, there was no change in model comparison for protein ratio, whereas ML model emerged to be more reliable for oil ratio analysis. The models based on the spectra taken from intact seed samples were not suitable for use. We concluded that statistical method and sample type had significant effects on estimation power, and the measurement method used here yielded more reliable results on flour samples.

Key words: Protein ratio, oil ratio, calibration, regression, *Zea mays*

Giriş

Alternatif laboratuvar analiz yöntemleri; mevcut kimyasal analiz yöntemlerine alternatif olarak geliştirilmeye çalışılan ve analiz süresi, maliyet, çevreye karşı duyarlılık gibi konular açısından avantaj sağlayan yöntemlerdir. NIR (Yakın Kızıl Ötesi Yansıma) spektroskopisi günümüzde kullanımı hızla yaygınlaşan alternatif yöntemlerden birisidir.

NIR spektroskopisinin gelişiminde 1800'lerde W. Herscell'in araştırmaları, fotografik tablanın NIR yönteminde kullanılmaya başlanması, atomik grupların ve hidrojen bağlar ile NIR spektroskopisinin ilişkisinin tespiti gibi kilometre taşları önem taşır (Davies, 1999). Bu tekniğin uygulamaya aktarılması ise 1960'larda K. Norris tarafından tarımsal ürünlerdeki nem miktarını ölçmek için NIR spektroskopisinin kullanımına dayalı yeni bir metot geliştirmesiyle olmuştur (Pasquini, 2003; Aenugu et al., 2011). NIR analizlerinde kimyasal kullanılmaması, analiz maliyetinin ve süresinin düşük olması, eşzamanlı analiz yapılabilmesi, analiz sonrasında ölçüm yapılan numunelerin diğer analizler için tekrar kullanılabilmesi ve analiz için az miktarda örneğin yeterli olması önemli üstünlüklerdir (Ertugay ve Başlar, 2011). Bu avantajlar, NIR spektroskopisi tekniğinin hem bilimsel (Pasquini, 2003) hem de uygulamalı alanlarda (Osborne, 2000) aktif olarak kullanılma isteğini artırmıştır. 1980'li yıllardan itibaren uluslararası standart kuruluşlarının referans yöntemler arasına NIR analiz tekniklerini eklemesi bu tekniğin kullanımını artırmıştır (Osborne, 2000). Çeşitli alanlarda analiz edilmek istenen bileşenlere yönelik "kalibrasyon" adı verilen NIR tahmin modelleri geliştirilmiştir.

Kalibrasyon oluşturma, spektral veriler ile referans analiz sonucuyla elde edilen verilerin ilişkilendirilerek tahmin modelleri oluşturma işlemlerini kapsamaktadır. Bu ilişki, maddelerin kompozisyonunda var olan spektral yansımalarındaki değişimler ile maddenin yapısındaki fonksiyonel gruplarda bulunan C-H, N-H, O-H ve S-H kimyasal bağlarının elektromanyetik spektruma verdikleri tepkiye bağlıdır (Sandorfy et al., 2007). Kalibrasyon oluşturma çalışmalarının temelinde, uygulanan elektromanyetik spektrum enerjisine karşı maddenin yapısındaki kimyasal bağlarda meydana gelen titreşim durumları ve düzeylerindeki farklılıkların tespiti ve bu farklılıklardan yola çıkarak kemometrik yöntemlere göre tahmin modelinin geliştirilmesi yatmaktadır. Günümüzde NIRs cihazlarında kullanılan kalibrasyonlar MLR (Çoklu Doğrusal Regresyon), PLSR (Kısmi En Küçük Kareler Regresyonu), PCA (Temel Bileşen Analizi) gibi farklı istatistik tekniklerden faydalanılarak geliştirilmektedir (Balabin et al., 2007; Başyigit ve ark., 2008). Bu yöntemlerin hem istatistikî açıdan hem de NIR cihazlarında kullanımı bakımından birbirilerine üstün yönleri vardır. Örneğin MLR'ye dayalı modeller daha kısa sürede oluşturulabilmesine karşın güvenilir tahmin yapabilme potansiyeli PLSR'ye göre düşüktür. MLR modelleri oluşturulurken en etkin dalga boyları kalibrasyon için kullanılmakta, PLSR'de ise taranan tüm spektrumlarda meydana gelen değişimler kalibrasyon modeline dahil edilmektedir. Bu farklar oluşturulan modellerin doğrulama işleminde önemli etki yaparlar (Egesel ve Kahrıman, 2012). Şüphesiz kullanılan kemometrik yaklaşım kadar NIR ölçümünün

yapıldığı örneğin yapısı da (öğütülmüş, tane, ekstrakt vb.) kalibrasyon modelinin tahminleme gücü üzerinde önemli etkilere sahiptir. Bu etkilerin incelenen özelliklere göre detaylı şekilde etkilerinin ortaya konulması uygulamada faydalı bilgiler elde edilmesine imkân sağlayabilir.

Mısırdaki tane kalitesini etkileyen önemli faktörlerin başında protein oranı gelir (Boyer and Hannah, 2001). Bitkisel örneklerde protein oranının belirlenmesine yönelik kullanılan yöntemler arasında en yaygın Kjeldahl metodudur. Ne var ki, bu metotta çevreye zarar veren kimyasallar yüksek oranda kullanılmaktadır. Alternatif olarak Dumas prensibine göre çalışan otomatik cihazlar ile protein miktarı hızlı bir şekilde tespit edilebilse de, yüksek sarf ihtiyacı ve maliyet bu yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır. Mısırdaki diğer önemli kalite bileşeni olan yağ oranının artırılması hem insan hem de hayvan beslenmesinde önemli katkılar sağlayabilmektedir (Lambert, 2001). Bitkisel ve hayvansal ürünlerde yağ oranının tespiti için en yaygın kullanılan yöntem Soxhlet yöntemidir. Bu yöntem ile 6 adet örneğin yağ içeriğinin tespit edilmesi 5-6 saat alabilmektedir. Aynı zamanda yüksek miktarda kimyasal sarfına da ihtiyaç duyan bu yöntem alternatif olarak Soxtech, Ankom Fat Extractor gibi çeşitli metotlar geliştirmiştir. Ne var ki, bu yöntemler de zahmetli ve pahalıdır. Mısır araştırmalarında materyal sayılarının genelde yüksek olması bu analizlerin kullanımını zorlaştırmaktadır. Bu nedenlerle uygulamada pratik ve maliyet açısından avantajlı yeni metotlara ihtiyaç vardır. Yakın Kızıl Ötesi Spektroskopisi (NIRs) söz konusu ihtiyacı karşılamada etkili çözüm yolu olarak karşımıza çıkmaktadır (Keys and Barton, 2007).

Diğer birçok bitkisel üründe olduğu gibi mısırdaki tane kalitesinin NIR ile tespitini konu edinen bilimsel çalışmalar yapılmıştır (Baye et al., 2005; Jiang et al., 2007; Yang et al., 2009). Bunlarda dikkat çeken husus geliştirilen modellerin ya öğütülmüş ya da tane örneklerinde yapılan ölçümlere dayalı olarak ve genelde tek bir matematiksel yöntem (PLSR) kullanılarak geliştirilmiş olmasıdır. Örnek tipi ve kemometrik yöntemin kalibrasyon modelinin tahmin gücüne etkisi yeterince araştırılmamıştır.

Uluslararası literatürde bu konuda yalnızca bir araştırmaya rastlanmış ve mısırdaki protein, yağ ve nişasta oranını tahminlemede, örnek tipinin ve kullanılan matematiksel modelin önemli bir etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Orman and Schumann, 1991). Ülkemizde ise NIR spektroskopisiyle protein, yağ ve karbonhidrat oranının belirlenmesi amacıyla yürütülen bir araştırmanın (Egesel ve Kahrıman, 2012) dışında herhangi bir bilimsel çalışmaya rastlanmamıştır. FT-NIR spektroskopisi de bir NIR cihazı olmasına rağmen temel parçaları ve ölçüm yöntemindeki farklılık nedeniyle diğer cihazlardan ayrılmaktadır (McClure and Tsuchikawa, 2007). Bu nedenle FT-NIR cihazları ile geliştirilen modellerde ölçüm yapılan örnek tipi ve kemometrik metodun tahmin gücüne etkisinin araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmanın amacı; i) farklı mısır tiplerinden alınan örneklerde protein ve yağ oranlarını tahminleyebilecek kalibrasyon modellerinin geliştirilmesi, ii) örnek tipi ve kullanılan kemometrik yaklaşımın tahmin gücüne etkisinin ortaya konmasıdır.

Materyal ve Yöntem

Deneme Materyali

Bu çalışmada materyal olarak toplam 260 farklı mısır genotipi kullanılmıştır. Bu genotiplere ait örneklerden 194 adedi AGROMAR Tarım A.Ş.'den temin edilmiş, 66 adedi ise Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi'nde yürütülen mısır ıslah çalışmalarından sağlanmıştır. Araştırma materyali olarak kullanılan genotiplerin her birinden koçan taneleme işlemi sonrasında 100-120 g tane örneği alınarak diğer işlemler gerçekleştirilinceye kadar uygun şartlarda (4 °C) muhafaza edilmiştir.

Spektrum Alma

Laboratuvar analizleri yapılmadan önce kalibrasyon setinde yer alan 260 farklı mısır genotipine ait tohum örnekleri ayrı ayrı 100 mL'lik kaplara konulmuştur. Her genotipe ait tane örneklerinden ham spektrumlar, Bruker marka MPA model (Multi-Purpose Analyzer) FT-NIR spektrometre (Bruker

Optik, GmbH, Ettlingen, Almanya) cihazı kullanılarak alınmıştır. Bu ölçümlerde InGaAs ışık dedektörü ve yüksek yoğunluklu tungsten-halojen NIR ışık kaynağı (20 watts) kullanılmıştır. Cihaza ait ölçüm seçeneklerinden olan fiber optik algılayıcı (prob), kap içerisindeki örnek içerisine daldırılmış, 12500-4000 cm^{-1} arasında ham spektrumlar alınarak cihaza bağlı bilgisayar yazılımı (OPUS) kullanılmak üzere kaydedilmiştir. Ham spektrumları alınan örnekler öğütüldükten sonra yine 12794-4000 cm^{-1} arasında 8 cm^{-1} aralıkla ham spektrumları alınıp bilgisayarda farklı bir klasöre kaydedilmiştir (Şekil 2). Kaydedilen ham spektrum her bir örnek için hem referanstan (Spectralon) hem de mısır örneğinden olmak üzere iki ölçümle gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sırasında fiber optik algılayıcı, tane ve öğütülmüş mısır örneklerinin bulunduğu kabın ortasına daldırılmıştır. Fiber optik algılayıcının ucunda, ışık kaynağından gelen ve dedektöre giden fiberler bir karışım halinde bulunmaktadır ve yaklaşık 11,7 mm^2 'lik bir ölçüm alanı oluşturulmaktadır.

Ham spektrumları alınan örnekler daha sonra blenderden geçirilip küçük parçalara ayrılarak laboratuvar değirmeninde (Fritsch pulverisette14, Almanya) 0.5 mm elek ile öğütülmüştür.

Öğütme işleminin ardından spektrum alma işlemi FT-NIR cihazında tane örneklerinden spektrum alma işleminde olduğu gibi gerçekleştirilmiştir. Spektrum alma sonrasında örneklere ait veriler cihazların yazılımı vasıtasıyla kayıt edilmiştir.

Laboratuvar Analizleri

Spektrum alma işleminde kullanılan öğütülmüş örneklerin nem içerikleri 70 °C'de 24 saat süreyle bekletilmek suretiyle tespit edilmiştir. Elde edilen nem değerleri protein ve yağ analizlerinde örneğin tartım ağırlığının kuru madde oranına göre düzeltilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Mısır örneklerinde protein oranı, yaygın olarak kullanılan Kjeldahl (CRA, 1986) yöntemine göre tespit edilmiştir. Bu yöntemle yapılan analizlerde öğütülmüş mısır örneklerinden 1'er g alınarak yakma tüplerinin içerisine konulmuştur. Tüplerin

içerisine yakma tabletiyle (bakır-selenyum karışımı) birlikte 15'er mL sülfirik asit eklenmiş ve örnekler 1 gece boyunca tüplerin içerisinde bekletilmiştir. Sülfirik asit içerisinde bekletilen örnekler daha sonra yakma ünitesinde (Gerhardt Vapodest 40, Almanya) yakma işlemine tabi tutulmuştur. Yakma işlemi, sıcaklığın 50 °C'den başlayıp belli aralıklarla artırılarak 395 °C'ye kadar çıkarılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Yakma işlemi tamamlandıktan sonra (örnekler camgöbeği rengini alınca) alınan örnekler distilasyon ünitesinde distile edilmiştir. Tüp içerisindeki örnekler distilasyon ünitesinin içerisine önceden hazırlanmış 50 mL'lik borik asitle birlikte yerleştirilmiştir. Burada her bir örnek 40 mL sodyum hidroksit (N~0,1) ile nötralize edilerek 4 dakika boyunca titrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Distilasyonun ardından erlenmayer içerisindeki solüsyonun renginin yeşilden kırmızıya döndüğü noktaya kadar standart sülfirik asit (N~0,1) kullanılarak geriye titrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Titrasyonda harcanan asit miktarı mL olarak kaydedilmiştir. Elde edilen titrasyon değeri ve örnek ağırlıkları ile ilgili veriler kullanılarak metotta belirtilen formüle göre toplam azot içeriği belirlenmiştir. Elde edilen azot oranı 6.25 katsayısıyla çarpılarak örneklerin toplam protein oranı tespit edilmiştir.

Yağ analizi AOCS (2008) metoduna uygun olarak yapılmıştır. Bu amaçla, öğütülmüş örneklerden 2'şer gram tartılarak filtre kâğıtlarına konulmuştur. Soxhlet örnek ünitelerinin içine 10'ar tane örnek yerleştirilmiştir. Soxhlet cihazında (M-Tops, Korea) ekstraksiyon balonlarının içlerine 185 mL n-hekzan konularak her bir örnek ünitesi için 6 saat süreyle 70 °C'de yağ çıkarma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yağ çıkarma işlemi tamamlandıktan sonra fazladan kalan n-hekzanı uçurmak amacıyla örnekler daha önce 105 °C'ye getirilmiş etüve (Venticell 404, Almanya) konularak 3 saat bekletilmiştir. Etüvden çıkarılan örnekler nem almalarını önlemek amacıyla tartım işlemi yapılana kadar desikatörde bekletilmiştir. Desikatörden alınan örnekler hassas terazide tartılıp değerleri kaydedilmiştir. Yağ içeriğinin tespiti

kullanılan metotta bulunan formüle göre yapılmıştır.

Kalibrasyon modellerinin oluşturulması ve değerlendirilmesi

Çalışmada tahmin modellerinin oluşturulması ve veri düzenleme amacıyla Unscrambler X 10.1 (Camo, Oslo, Norveç) yazılımı kullanılmıştır. Tahmin modellerinin oluşturulması için daha önceden tane, öğütülmüş tane ve yağ örneklerinden alınarak kaydedilen ham spektrum dosyalarında ön veri işleme yapılmıştır. Ön veri işleme safhasında çeşitli türevlendirme ve transformasyon işlemleri uygulanmıştır. Tane, öğütülmüş tane ve yağ örneklerinden NIR ve FT-NIR cihazları ile alınan ham spektrumlar birinci türev+SNV transformasyonuna tabi tutulmuştur. Türev alma işleminde Segment değeri 5, Gap değeri ise 3 alınmıştır. Transformasyonu gerçekleştirilen spektrumlar ve referans analiz sonuçları kullanılarak, en küçük kareler (PLSR) regresyon ve çoklu doğrusal regresyon (MLR) yöntemlerine dayalı kalibrasyonlar oluşturulmuştur. MLR yönteminde örnek sayısının değişken sayısından daha fazla olması gerektiğinden, bu yöntem için transforme edilmiş spektrumlardan hedef özellikle ilişkisi dikkate alınarak 5 dalga boyu seçilmiştir. Dalga boylarının seçilmesi amacıyla SAS istatistik paket programında spektral veri ile hedef değişken arasında doğrusal regresyon modelleri oluşturulmuş ve bağımsız değişkenlerin (dalga boyları) seçiminde en yüksek R² değeri veren (MAXR alt komutu ile) dalga boyları tespit edilmiştir (SAS Inst., 1999). Regresyon modellerinde; örneklere ait referans analizlerin sonuçları bağımlı değişken (X), örneklere ait 1200-2400 nm arasında transforme edilmiş spektrumlar ise bağımsız değişkenler (Y) olarak alınmıştır. Araştırmanın örnek setinde 260 genotipe ait örnek bulunmasına karşın kalibrasyon ve validasyon setlerinde örnekten kaynaklanan sebeplerle (çok uç referans analiz değerleri, tip dışı spektrumlar) 13 örnek setten çıkarılmıştır. Oluşturulan tahmin modellerine ait sette 227, dış doğrulama setinde ise 20 örnek kullanılmıştır. Ayrıca FT-NIR cihazından orijinal spektrumlar dalga sayısı (cm⁻¹)

olarak kaydedildikten sonra sonuç kısmında NIR cihazı ile karşılaştırılabilir olması için dalga boyu (nm) değerine çevrilmiştir.

Oluşturulan kalibrasyon ile ilgili RMSEP, SEE değerleri (CWS Manual 2003) ve RPD değerleri (Bailleres et al., 2002) şu formüllere göre belirlenmiştir:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum (Y_{pred} - Y_{ref})^2}{n}}$$

$$SEE = \sqrt{\frac{n}{n-1} (RMSEP^2 - Bias^2)}$$

$$RPD = \frac{STD_{ref}}{SE_{pred}}$$

Bu eşitliklerde; RMSEP, tahminin kareler ortalamasının karekökünü; Y_{pred}, hesaplanan değeri; Y_{ref}, standart analizler ile elde edilen değeri; n, gözlem sayısını; Bias, tahmin edilen ve standart analizler ile elde edilen değerler arasındaki ortalama farkı; SEE, kalibrasyon setinde tahmin değerlerinin standart hatasını; STD_{ref}, referans analizlere ait standart sapmayı ve SE_{pred}, tahmin değerlerinin standart hatasını göstermektedir.

Bu çalışmada oluşturulan kalibrasyon modellerinin doğrulanması amacıyla iki farklı yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntemde, kalibrasyon setinde çapraz doğrulama yapılarak sette yer alan bütün örnekler modele göre tekrar tahminlenmiştir. İkinci yöntemde ise, tesadüfi olarak seçilen örneklerin (n=20) laboratuvar analizlerinden elde edilen sonuçlar ile bu örneklerden alınan spektrumlar ile oluşturulan NIR kalibrasyonlarından ile elde edilen sonuçlar mukayese edilmiştir. Model doğrulama aşamasında, tahmin değerleri ile referans analiz sonuçları arasındaki SEP (Tahminin Standart Hatası), oransal performans sapması (RPD) ve korelasyon katsayılarından faydalanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Protein ve yağ oranının tahminine yönelik geliştirilen modellerde kullanılan kalibrasyon ve doğrulama setlerinde referans analizlerle ilgili tanımlayıcı istatistikler Çizelge 1'de verilmiştir. Protein

oranı ortalaması %7.94 ve standart sapması 1.17 bulunmuştur. Doğrulama setinde yer alan örneklerin protein içerikleri kalibrasyon setinin sınırları içerisinde yer almıştır (Çizelge 1). Kalibrasyon setinde kullanılan örneklerin (n=227) yağ oranı %2.35 ile

%5.79 arasında değişim göstermiş, ortalama % 3.71 ve standart sapma 0.64 olarak bulunmuştur. Validasyon setinde yer alan örneklerin yağ içerikleri kalibrasyon setinin sınırları içerisinde yer almıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Kalibrasyon ve doğrulama setinde referans analizlere ait tanımlayıcı istatistikler.
Table 1. Descriptive statistics for the reference analyses in calibration and validation sets.

Protein Oranı (%) / Protein Ratio (%)					
	n	Ortalama/Mean	Min.	Maks/Max.	Std.sap./Std.dev.
Kalibrasyon/ Calibration	227	7.94	5.23	11.4	1.17
Dış doğrulama/ External validation	20	7.91	6.40	10.8	1.09
Yağ Oranı (%) / Oil Ratio (%)					
	n	Ortalama/Mean	Min	Maks/Max.	Std.sap./Std.dev.
Kalibrasyon/ Calibration	227	3.71	2.35	5.79	0.64
Dış doğrulama/ External validation	20	3.93	2.92	5.37	0.58

Çalışmamızda, örnek tipinin protein oranını tahminlemeye yönelik oluşturulan modeller üzerine önemli bir etkisi olduğu, tahmin gücünün kullanılan istatistiki modele göre önemli bir değişim göstermediği anlaşılmıştır. Nitekim öğütülmüş örneklerden alınan spektrumlarla oluşturulan modellerde tahmin ve referans analizler arasında hesaplanan korelasyon katsayıları bu sonucu doğrulamaktadır. Hem öğütülmüş hem de öğütülmemiş örnekler için ait spektrumlarla oluşturulan modellere ait değerler örnek tipine göre yüksek derecede benzerlik göstermiştir (Şekil 1).

Protein oranına ilişkin kalibrasyon değerlendirme parametreleri ile ilgili sonuçlar Çizelge 2’de görülmektedir. Kalibrasyon setine ait parametreler dikkate alındığında, öğütülmemiş örneklerden oluşturulan modellerde RMSEC ve SEE değerlerinin öğütülmüş örneklerden daha yüksek olduğu, buna bağlı olarak belirtme katsayılarının (R^2) düştüğü görülmektedir. Öğütülmüş örnekler için ait spektrumlarla oluşturulan modellerde ise hem MLR (RMSEC=0.5482; SEE=0.5494; $r=0.882$; $R^2=0.7776$) hem de PLSR (RMSEC=0.5504; SEE=0.5516; $r=0.880$; $R^2=0.7758$) modeline ait değerler benzerlik göstermiştir (Çizelge 2). Bir önceki safhada öğütülmüş örnekler için ait spektrumlarla

oluşturulan MLR modelleri için doğrulama işleminde olumlu sonuçlar vermesine rağmen, dış doğrulama işleminde PLSR modellerinin MLR modellerine göre %0.9 daha doğru tahmin değeri verdiği görülmüştür. Öğütülmemiş örneklerde PLSR modelleri dış doğrulamada iç doğrulama safhasında olduğu gibi MLR modellerinden daha düşük tahmin gücüne sahip olmuştur. Dış doğrulama sonuçlarında en yüksek RPD değeri (1.98) PLSR yöntemine göre oluşturulan modelden elde edilmiştir. Sonuç olarak her ne kadar MLR modelleri kalibrasyon değerlendirme parametreleri bakımından olumlu sonuçlar verse de, dış doğrulama işlemine göre, protein içeriğini belirlemeye yönelik oluşturulan modellerden PLSR yönteminin daha doğru tahmin değerleri verdiği belirlenmiştir. Protein oranı NIR spektroskopisinde en başarılı şekilde tespit edilen özelliklerden birisidir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar FT-NIR cihazı ile tane halinde olan örneğe prob daldırarak yapılan ölçümlerin doğru sonuçlar vermediğini göstermiştir. Öğütülmüş örneklerde ise her iki matematiksel modelde de başarılı sonuçlar alınmıştır. Orman and Schumann (1991) öğütülmüş ve öğütülmemiş mısır örneklerinde MLR ve PLSR modellerinin tahmin güçlerini karşılaştırmıştır.

Öğütülmüş örneklerde hem PLSR ($r=0.97$; $SEP=\%0.26$) hem de MLR regresyon tahmin modellerinde ($r=0.98$; $SEP=0.28$), öğütülmemiş örnekler ile oluşturdukları modellerden (MLR modeli için $r=0.90$; $SEP=\%0.52$ ve PLSR modeli için $r=0.83$; $SEP=0.54$) daha başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Öğütülmüş örneklerde elde edilen değerler dikkate alındığında bu çalışma sonuçları ile söz konusu araştırma bulguları ile benzerlik içerisindedir. Tallada et al. (2009) öğütülmemiş örneklerden protein oranının tespitine yönelik yürüttükleri çalışmada oluşturdukları PLSR modelinin belirtme katsayısını (R^2) 0.75, tahmine ait standart hatayı $\%0.47$ ve modele ait RPD değerini 2.02 olarak bulmuşlardır. Bu değerler kalibrasyon doğrulama setinin tahmine ait standart hatası (SEP) dışında bizim sonuçlarımızla uyum içerisindedir. Öğütülmüş örnekler kullanılarak NIR cihazında farklı istatistik modellerin kıyaslanması amacıyla yürütülen bir çalışmada MLR yönteminde NIR tahminleri ve referans analizler arasındaki korelasyon katsayısı ($r=0.990$) PLS modelinden ($r=0.987$) daha yüksek bulunmuş ancak doğrulama aşamasında PLS modelinin daha düşük hata ile tahmin verdiği görülmüştür (Egesel ve Kahrıman, 2012). Bu çalışmada şu anki proje bulgularından daha yüksek doğrulukla tahmin değerleri elde edilmesinin başlıca nedenlerinden birisi olarak kalibrasyon setinde protein oranının

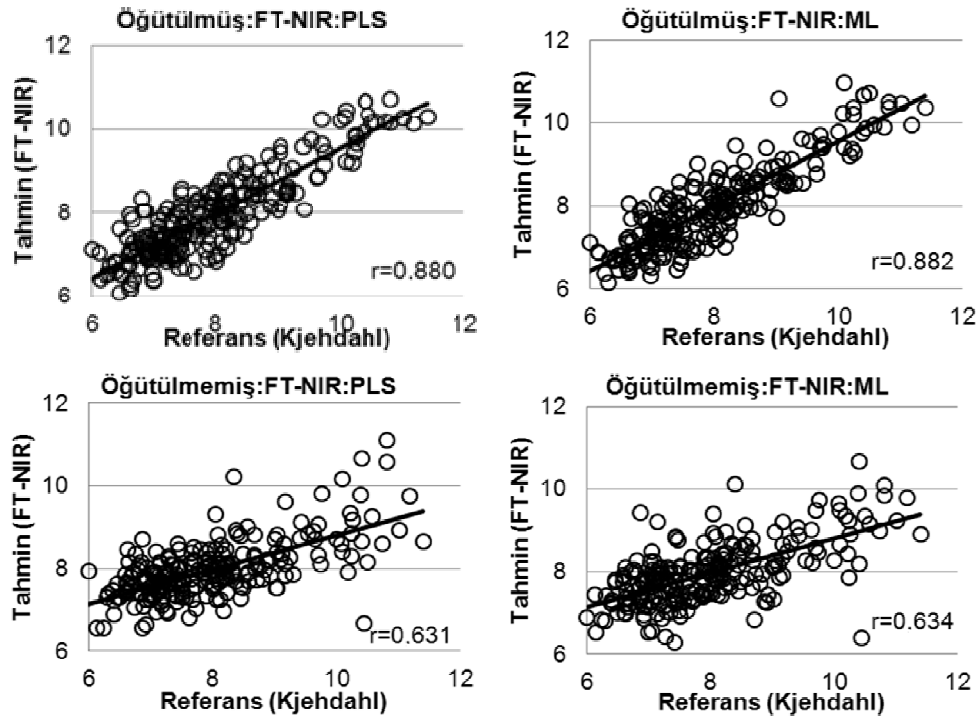
düzenli ve yüksek değişimi ($\%6.57$ ile $\%19.60$ arasında) gösterilebilir. Zira kalibrasyon setinde hedef özellik bakımından örneklerin içeriğindeki değişim ve bu değişimin dağılımı tahmin potansiyelini önemli ölçüde etkileyen unsurlardan birisidir (Agelet et al., 2010).

Çalışmada PLSR yöntemi ile yağ oranının tespitine yönelik oluşturulan kalibrasyon modellerinden elde edilen değerler ve referans analizler arasındaki ilişkiler Şekil 2'de sunulmuştur. Öğütülmemiş örneklerden oluşturulan modelin tahmin gücünün bir hayli zayıf olduğu ($r=0.205$) anlaşılmıştır. Öğütülmüş örneklerle oluşturulan modelde ise yağ oranı tahminleri ile referans analizler arasındaki korelasyon kabul edilebilir sınırdadır (Şekil 2). MLR yöntemine göre oluşturulan modellerin tahmin-referans analiz sonuçları arasındaki korelasyonlar hem öğütülmüş, hem de öğütülmemiş örnekler için PLSR modelinden daha yüksek bulunmuştur (Şekil 2). Kalibrasyon değerlendirme parametrelerine göre yağ oranının PLSR yöntemi kullanıldığında daha başarılı şekilde tespit edilebileceği görülmüştür. RPD değeri öğütülmüş örneklerde öğütülmemiş örneklerden daha yüksek bulursa da bütün modeller için 2'nin altında kalmıştır. Bu durum belirtilen sınırın altında RPD değerine sahip olan tahmin modellerinde tahmin hatasının yüksek olacağına işaret etmektedir (Çizelge 3).

Çizelge 2. Ham protein oranı için kalibrasyon modellerine ait değerlendirme parametreleri.
Table 2. Evaluation parameters of the calibration models generated for crude protein ratio.

Kalibrasyon Seti (n=227)/Calibration Set (n=227)					
Örnek/Sample	Model	RMSEC	SEE	r	R^2
Öğütülmemiş/Seed	MLR	0.8988	0.9007	0.634	0.4022
	PLSR (7) &	0.9013	0.9033	0.631	0.3987
Öğütülmüş/Flour	MLR	0.5482	0.5494	0.882	0.7776
	PLSR (5)	0.5504	0.5516	0.880	0.7758
Dış Doğrulama Seti (n=20)/External Validation Set (n=20)					
		RMSEP	SEP	r	RPD
Öğütülmemiş/Seed	MLR	0.8534	0.8833	0.5228	1.23
	PLSR (7)	0.8900	0.9076	0.5381	1.20
Öğütülmüş/Flour	MLR	0.5542	0.6460	0.8477	1.69
	PLSR (5)	0.5605	0.5514	0.8539	1.98

& PLS modellerinde program tarafından önerilen faktör sayısı./Number of effective factors suggested by the program in the PLS models.



Şekil 1. Farklı örneklerden alınan spektrumlarla protein oranı (%) için oluşturulan modellerin tahmin değerleri ile referans analiz sonuçları.

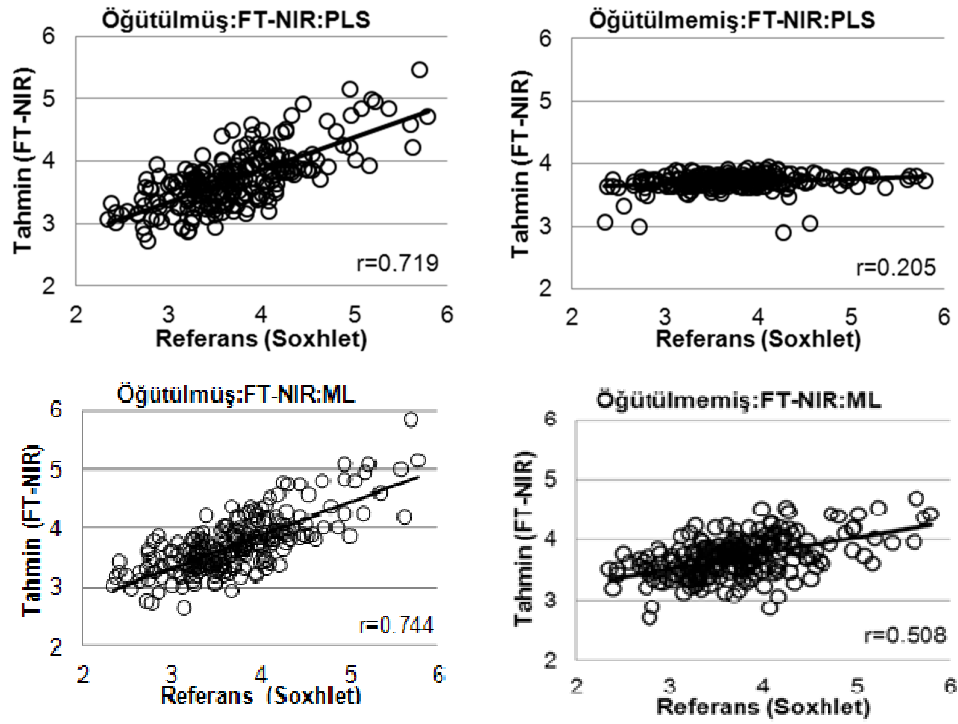
Figure 1. Estimation values and reference analysis results of the models generated for protein ratio (%) using the spectra taken from different samples.

Çizelge 3. Ham yağ oranı için kalibrasyon modellerine ait değerlendirme parametreleri.

Table 3. Evaluation parameters of the calibration models generated for crude oil ratio.

Kalibrasyon Seti (n=227)/Calibration Set (n=227)					
Örnek	Modeli	RMSEC	SEE	r	R ²
Öğütülmemiş/Seed	MLR	0.5494	0.5507	0.508	0.2583
	PLSR (2) &	0.6244	0.6257	0.205	0.0420
Öğütülmüş/Flour	MLR	0.4264	0.4274	0.744	0.5532
	PLSR (4)	0.4429	0.4439	0.719	0.5179
Dış Doğrulama Seti (n=20)/External Validation Set (n=20)					
		RMSEP	SEP	r	RPD
Öğütülmemiş/Seed	MLR	0.7040	0.6322	0.2302	1.01
	PLSR (2)	0.5929	0.5729	0.3406	1.01
Öğütülmüş/Flour	MLR	0.5020	0.5566	0.5244	1.04
	PLSR (4)	0.4618	0.4518	0.6301	1.28

& PLS modellerinde program tarafından önerilen faktör sayısı. /Number of effective factors suggested by the program in the PLS models.



Şekil 2. Farklı örneklerden alınan spektrumlarla yağ oranı (%) için oluşturulan modellerin tahmin değerleri ile referans analiz sonuçları.

Figure 2. Estimation values and reference analysis results of the models generated for oil ratio (%) using the spectra taken from different samples.

Mısırdaki yağ oranının öğütülmemiş tanelerden tespitinin bu çalışmada kullanılan yöntemler ile doğru sonuçlar veremeyeceği anlaşılmıştır. Önceki çalışmalarda da öğütülmemiş örneklerden alınan spektrumlarla oluşturulan modellerin tahmin gücü düşük bulunmuştur (Orman and Schumann, 1991). Yağ oranının NIR cihazı ile tespiti amacıyla yürütülen çalışmada Orman and Schumann (1991) oluşturdukları PLSR modelinin R^2 değerini 0.76, kalibrasyonun standart hatasını ise %0.22 bulmuştur. Tallada et al. (2009) tarafından tane örneklerinden yağ oranının belirlenmesi amacıyla yürütülen farklı bir çalışmada ise PLSR modelinin R^2 değeri 0.28, SEP değeri 0.46 ve RPD değeri 1.22 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile bu çalışmaların sonuçları benzerlik göstermektedir. Bu araştırma bulguları ile yağ oranının öğütülmüş örneklerden NIR cihazı ile belirlenmesi amacıyla yürütülen başka bir çalışmada oluşturulmuş PLSR ($r=0.723$; RMSEP:0.47;

SEE:0.49; RPD:1.40) ve MLR regresyon modellerine ait sonuçlar arasında da benzerlikler mevcuttur (Egesel ve Kahrıman, 2012). Bu çalışmada FT-NIR cihazında yapılan ölçümler, ölçüm probunun toplu bir örneğe daldırılması suretiyle yapılmıştır. Direkt olarak taneyle temas ettirilerek yapılan ölçümlerde yağ oranının yüksek bir başarı ile tespit edilebileceği önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Baye et al., 2006; Jiang et al., 2007). Mısır tanesinde bulunan yağın hemen hepsi embriyodadır. Hem embriyonun küçük olması hem de tane iriliğinin fazla olması nedeniyle öğütülmemiş tanelerden direkt prob teması sağlamaksızın alınan spektrumların yağ içeriğinin tespitinde yetersiz kaldığı düşünülebilir.

Sonuç

Bu çalışmanın sonuçları, örnek tipi ve kullanılan istatistik yöntemin FT-NIR cihazı kullanılarak protein ve yağ oranının

tahminlenmesi amacıyla geliştirilen modellerin tahmin güçleri üzerine önemli etkileri olduğunu göstermiştir. Protein oranının tahmininde, tanenin öğütülmesi ile elde edilen un üzerinden yapılan ölçümlerin tahmin başarısını artırdığı görülmüştür. Buna karşın yağ oranının tespitinde, örnek öğütülse dahi başarı oranının yüksek olmadığı dikkat çekmiştir. Kullanılan istatistik yöntemin tahmin gücüne etkisinin ölçüm yapılan özelliğe göre değişim gösterdiği anlaşılmış, protein oranı için PLSR ve MLR modelleri arasında önemli bir fark tespit edilmez iken yağ oranında PLSR modeli daha avantajlı bulunmuştur.

FT-NIR cihazında model veya metot geliştirirken toplu örneğe ölçüm probunun daldırılarak kullanılmamasında yarar vardır. Bu aşamada probun taneye direkt temas ettirilerek ölçüm alınmasının daha başarılı sonuçlar verdiği önceki çalışma sonuçlarından anlaşılmaktadır. Ölçüm yöntemi ile ilgili olarak alternatif yolların geliştirilmesi de olanaklar dâhilindedir. Yağ oranı, bu çalışmada denenen örnek tipi ve istatistik yöntemler ile yüksek güvenilirlikle tahminlenememiştir. İlerde yapılacak çalışmalarda yağ oranının tahminine yönelik daha güvenilir model-metot geliştirme çabalarına ihtiyaç olduğu aşikârdır. Bu çalışmada kullanılan ölçüm yönteminin ileriki çalışmalarda kullanılması durumunda; verilere farklı istatistikî ön uygulamalar yapılması veya tahmin modellerinde yüksek sapmaya neden olan örneklerin elenmesi ile oluşturulan modellerin mevcut tahmin gücünde iyileştirmeler sağlanabilir.

Teşekkür

Bu çalışmaya 1120429 no'lu Hızlı Destek Projesi ile maddi katkı sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynaklar

Aenugu, H.P.R., Kumar, D.S., Parthiban, S.N., Ghosh, S.S., Banji, D. 2011. Near Infra Red Spectroscopy- An Overview. International Journal of ChemTech Research, 3(2):825-836.

- Agelet, L.E., Charles R. and Hurburgh C., R., Jr., 2010. A Tutorial on Near Infrared Spectroscopy and Its Calibration. Department of Agriculture and Biosystems Engineering, Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- AOCS, 2008. Rapid Determination of Oil/Fat Utilizing High Temperature Solvent Extraction, ANKOM Technology Method 2, 01-30-09, AOCS Official Procedure Am 5-04, (2008).
- Bailleres, H., Davrieux, F. and Ham-Pichavant, F., 2002. Near infrared analysis as a tool for rapid screening of some major wood characteristics in an eucalyptus breeding program. Annals of Forest Science, 59: 479–490.
- Balabin, R.M., Safieva R.Z. and Lomakina E.I. 2007. Comparison linear and nonlinear calibration models based on near infrared (NIR) calibration data for gasoline properties prediction. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 88: 183– 188.
- Baye, T.M., Pearson, T.C. and Mark Settles, A. 2006. Development of a calibration to predict maize seed composition using single kernel near infrared spectroscopy. Journal of Cereal Science, 43: 236–243.
- Boyer, C.D. And Hannah L. C. 2001. Kernel mutants of corn. In: *Specialty corns* (ed: A.R. Hallauer), CRC Pres, Boca Raton (2001). pp. 1-31.
- CRA, 1986. Protein. In Standard Analytical Methods of the Member Companies; Corn Refiners Association: Washington, DC, Method A-20.
- CWS Manual 2003. Sensologic Calibration Workshop Version 2.02, Sensologic GmbH, Germany.
- Davies, A.M.C. 1999. NIR Instruments companies: The Story So Far. NIR news, 10(6):14-15.
- Egesel, C.Ö. ve Kahrıman, F., 2012. Determination of Quality Parameters in Maize by NIR Reflectance Spectroscopy. Journal of Agricultural Sciences, 18:143-156.

- Ertugay, M.F. ve Başlar, M., 2011. Gıdaların kalite özelliklerinin belirlenmesinde yakın kızıl ötesi (NIR) spektroskopisi. *Gıda*, 36(1):49-54.
- Jiang, H. Y., Zhu, Y. J., Wei, L. M., Dai, J. R., Song, T. M., Yan, Y. L., and Chen, S. J. 2007. Analysis of protein, starch and oil content of single intact kernels by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) in maize (*Zea mays* L.). *Plant Breeding*, 126:492—497.
- Keys, S. E., and Barton F.E. 2007. Cereal Foods, In *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*, (Ed: Ozaki, Y., McClure, W. F., Christy, A. A.), John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ pp 297-310.
- Lambert, R.J. 2001. High-oil corn hybrids. p. 123–145. In A.R. Hallauer (ed.) *Specialty corns*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- McClure, W.F., and Tsuchikawa, S. 2007. Instruments in Ozaki, Y., McClure, W.F. and Christy, A.A. (Eds), *Near-infrared spectroscopy in food science and technology*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 75-107.
- Osborne, B.G. 2000. Near-infrared spectroscopy in food analysis, In: *Encyclopedia in analytical Chemistry* (Ed: R. A. Meyers), John Wiley Sons.
- Orman, B.A. and Schumann R. A. Jr. 1991. Comparison of Near-Infrared Spectroscopy Calibration Methods for the Prediction of Protein, Oil, and Starch in Maize Grain. *J Agric Food Chem*, 39:883-886.
- Pasquini, C. 2003. Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications. *J Braz Chem Soc*, 14(2):198-219.
- Sandorfy, C., Buchet R., Lachenal G. 2007. Principles of molecular vibrations for near- infrared spectroscopy, In *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*; Ozaki, Y., McClure, W. F., Christy, A. A., Eds.; John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ, pp 11-46.
- SAS Institute, 1999. *SAS V8 User Manual*, Cary, NC.
- Tallada, J.G., Palecios-Rojas N., and Armstrong P.R. 2009. Prediction of maize seed attributes using a rapid single kernel near infrared instrument. *Journal of Cereal Science*, 50:381-387.
- Yang, X.H., Guo, Y.Q., Fu, Y., Hu J.Y., Chai Y. C., Zhang Y.R., and Li J. S. 2009. Measuring fatty acid concentration in maize grain by near-infrared reflectance spectroscopy. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 29(1):106-109.