



Hochschule Neubrandenburg  
University of Applied Sciences

**Hochschule Neubrandenburg**  
**Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften**  
Studiengang Lebensmitteltechnologie  
Wintersemester 2019/2020

**Bachelorarbeit zum Thema**

# **Optimierung und Kalibrierung von NIR-Messmethoden bei Milchprodukten**

zur

**Erlangung des akademischen Grades  
Bachelor of Science (B. Sc.)**

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis2019-0478-0

Vorgelegt von: Karolin Müller

Betreuer: Prof. Dr. Siegfried Bolenz  
Prof. Dr. Christine Wittmann

Neubrandenburg, 15.01.2020

## **Abstract**

Fourier transform near-infrared spectroscopy is a rapid and accurate method for the detection of fat, dry matter and protein. In this study different types of cream cheese (n = 8), curds (n = 2) and mascarpone (n = 11) are used for the calibration and improvement of existing NIR-methods. After taking the measurement of the wet-chemical reference methods, available calibrations models were completed with these results. The available calibrations models could be improved by the big range of the different samples. The new coefficients of determination of cross validation resulted in  $R^2 = 0,998$  for the content of fat,  $R^2 = 0,992$  for the content of dry matter and  $R^2 = 0,9714$  for the content of protein. Due to the improvement of existing methods, the NIR-library could be expanded. Now, the prediction of compounds is more representative. The results of NIR-spectroscopy are comparable to those of the wet-chemical reference methods.

# Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis verwendeter Formelzeichen, Symbole und Abkürzungen .....	5
1 Einleitung .....	7
2 Stand von Wissenschaft und Technik .....	8
2.1 NIR-Spektroskopie .....	8
2.1.1 Bedeutung der NIR-Spektroskopie .....	8
2.1.2 Physikalische Grundlagen .....	9
2.2 FT-NIR-Spektrometer .....	13
2.2.1 Aufbau und Funktionsweise .....	13
2.2.2 Michelson-Interferometer .....	16
2.2.3 Integrationskugel .....	18
2.3 Käse .....	19
2.3.1 Frischkäse .....	19
2.3.2 Mascarpone .....	20
3 Material und Methoden .....	22
3.1 Versuchsplanung .....	22
3.2 Messung mittels FT-NIR-Spektrometer .....	26
3.2.1 Software OPUS 8 .....	26
3.2.2 OPUS Lab .....	29
3.2.3 Validierung .....	29
3.3 Nasschemische Analysemethoden .....	35
3.3.1 Bestimmung des Fettgehaltes .....	35
3.3.2 Bestimmung des Trockenmassegehaltes .....	36
3.3.3 Bestimmung des Rohproteingehaltes .....	37
4 Ergebnisse .....	39
4.1 Nasschemische Analysemethoden .....	39
4.2 NIR-Spektroskopie .....	40

4.2.1	Praxisanleitungen .....	40
4.2.2	Spektren .....	62
4.2.3	Methodenvalidierung.....	63
4.2.4	Datenanalyse .....	71
4.3	Fehlerhinweise .....	79
5	Diskussion .....	81
5.1	Methodenvalidierung.....	81
5.2	Datenanalyse .....	82
5.3	Nächste Schritte .....	85
6	Zusammenfassung.....	87
7	Literaturverzeichnis .....	89
8	Tabellenverzeichnis .....	92
9	Abbildungsverzeichnis .....	93
10	Anhang .....	95
10.1	Untersuchungsmethoden .....	95
10.2	Rohdaten .....	100

## Verzeichnis verwendeter Formelzeichen, Symbole und Abkürzungen

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Ammoniumsulfat
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl [ $\text{m}^{-1}$ ]
$\text{B}(\text{OH})_3$	Borsäure
$c$	Ausbreitungsgeschwindigkeit [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
$d$	Eichwert
DRFK	Doppelrahmfrischkäse
EW	Eiweiß
FT	Fourier-Transformation
$f$	Frequenz [Hz]
F.i.Tr.	Fett in Trockenmasse [%]
$\text{H}_2\text{O}$	Wasser
HCl	Salzsäure
IR	Infrarot
k. A.	keine Angabe
Korr. Koeff.	Korrelationskoeffizient
M	Anzahl der Standards
MHD	Mindesthaltbarkeitsdatum
N	Stickstoff
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	Natriumsulfat
NaOH	Natronlauge
$\text{NH}_3$	Ammoniak
$\text{NH}_4[\text{B}(\text{OH})_4]$	Ammoniumborat
$\text{NH}_4\text{Cl}$	Ammoniumchlorid
NIR	Nahinfrarot
PLS	<i>Partial Least Square</i>
PRESS	<i>Predictive Error Sum of Square</i> , dt. mittlerer Vorhersagefehler
PSPD	<i>Polystyrene Petri Dish</i> , dt. Polystyrolpetrischale
$R^2$	Bestimmtheitsmaß
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i> , dt. Standardfehler der Kreuzvalidierung
RMSEE	<i>Root Mean Square Error of Estimation</i> , dt. Wurzel des mittleren Fehlerquadrats der Vorhersage

RMSEP	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i> , dt. Wurzel des mittleren Fehlerquadrats der Vorhersage
RPD	<i>Residual Prediction Deviation</i>
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung
SD	<i>Standard Deviation</i> , dt. Standardabweichung der Referenzwerte
$s_i$	durch die PLS-Vektoren $v_r$ rekombiniertes Spektrum
SSE	<i>Sum of Squared Errors</i> , dt. Summe der Fehlerquadrate
$t_{i,r}$	Score-Koeffizienten
TM	Trockenmasse [%]
$v_r$	PLS-Vektoren
$x_i$	gemessenes Kalibrationsspektrum
$y_i$	Konzentrationswert der Probe $i$
$y_m$	mittlerer Konzentrationswert
$\lambda$	Wellenlänge [m]

# 1 Einleitung

Bei der Infrarot-Spektroskopie geht es darum, durch die Absorption der IR-Strahlung die Zusammensetzung von Lebensmitteln herauszufinden. Dazu werden die detektierten Frequenzen bzw. absorbierten Wellenlängen der funktionellen Gruppen, zum Beispiel OH-, CH- und NH-Bindungen, eines Moleküls in einem Spektrum aufgetragen und anschließend mit Hilfe einer Software analysiert. Es handelt sich dabei um ein rein physikalisches Verfahren.

Seit Anfang 2019 verfügt die Hochschule Neubrandenburg über ein FT-NIR-Spektrometer *MPA II* der Firma Bruker Optik, Ettlingen. Es soll unter anderem die milchtechnologischen Praktika unterstützen, damit die dort hergestellten Produkte mit diesem Gerät untersucht werden können. Dafür sind eine solide Datenbasis und Kalibrierungen für die jeweiligen Produkte notwendig. Neben der Milchtechnologie kann das Gerät ebenso in der Fleischtechnologie, aber auch in der Agrarwirtschaft und vielen weiteren Bereichen der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden.

Die NIR-Spektroskopie bietet neben einigen Nachteilen viele Vorteile. Ein großer Vorteil ist das breite Anwendungsgebiet. Die Kalibrierungen sind jedoch aufwendig zu pflegen und können nur so gute Ergebnisse liefern wie die angewendete nasschemische Referenzanalytik. Systematische Fehler der Referenzanalytik werden in die NIR-Methode übertragen.

Im Laufe dieser Arbeit sollen vor allem Mascarpone und Frischkäse untersucht werden. Zu diesen Produkten, die aktuell im Zentrum der Forschung liegen und im Rahmen aktueller Bachelor- und Masterarbeiten hergestellt werden, sollen Kalibrierungen erstellt werden. Gleichzeitig sollen bestehende Kalibrierungen, zum Beispiel die für Speisequark, in ihrer Genauigkeit überprüft und gegebenenfalls mit neuen Werten vervollständigt werden. Dabei wird das Augenmerk primär auf die Bestimmung des Fettgehaltes, des Trockenmassegehaltes und des Rohproteingehaltes gelegt. Außerdem ist das Ziel dieses Projektes, die Software OPUS 8 der Firma Bruker Optik durch Arbeitsanweisungen für nachfolgende Arbeiten mit dem NIR-Spektrometer verständlicher zu gestalten. Mit der Software OPUS 8 können Spektren aufgenommen und analysiert werden.

## **2 Stand von Wissenschaft und Technik**

### **2.1 NIR-Spektroskopie**

#### **2.1.1 Bedeutung der NIR-Spektroskopie**

Bereits 1800 wurde der Grundstein für die heutige NIR-Spektroskopie gelegt. Verantwortlich dafür war Sir William Herschel, der zu diesem Zeitpunkt die Infrarotstrahlung entdeckte, als er Sonnenlicht durch ein Prisma leitete. Hinter das Prisma legte er ein Thermometer. Entgegen seiner Vermutung befand sich die höchste Temperatur nicht bei der gelbgrünen Farbe, sondern jenseits des Rots, im Bereich der unsichtbaren Strahlung. Er nannte diese neu entdeckte Strahlung Infrarot. (Herschel, 1800)

In den folgenden Jahrzehnten wurden weitere Untersuchungen von Physikern vorgenommen, jedoch war die Forschung unter den damaligen Umständen mühsam. Als schließlich Anfang des 20. Jahrhunderts das erste vollautomatische Spektralphotometer von E. Lehrer entwickelt wurde, gewann die Spektroskopie immer mehr an Bedeutung und wurde bis heute stetig weiterentwickelt. (Günzler, 1983)

Heute ist diese Analysemethode aus den Laboren nicht wegzudenken. Da es sich bei der NIR-Spektroskopie um eine zerstörungsfreie Methode handelt, bringt sie viele Vorteile mit sich. Sie kann außerdem als Inline-Messmethode eingesetzt werden. Die NIR-Spektroskopie findet nicht nur in den Laboren der Lebensmitteltechnologie (Bendini, 2007; Melfsen, 2011) statt, sondern unter anderem auch in der Chemie, der Pharmaindustrie (Rager, 2001; Aschenbroich, 2005) und der Agrarwirtschaft. Als Beispiel eines Anwenders in der Lebensmitteltechnologie kann die milchverarbeitende Industrie genannt werden (Sultaneh, 2007). Besonders in der Rohmilchanlieferung ist die NIR-Spektroskopie von Vorteil. In großen Molkereien, in welche eine beträchtliche Menge Rohmilch oder Molke geliefert wird, bleibt bei der Wareneingangskontrolle oft wenig Zeit, um zu konventionellen Methoden zu greifen. Der Probendurchsatz kann durch die Verwendung der NIR-Spektroskopie erhöht werden. Außerdem ist die Bedienung des Gerätes einfach und kann schnell erlernt werden. Aus diesem Grund ist eine NIR-Spektroskopie zur Ermittlung von Fett, Eiweiß, Trockenmasse und Lactose eine zeitsparende und genaue Methode. Zusätzlich können Chemikalien eingespart werden, was nicht nur die Anschaffungs- und Entsorgungskosten reduziert, sondern gleichzeitig die Untersuchungen ungefährlicher macht. Wird der nachfolgende Weg der Milch betrachtet, kann die NIR-Spektroskopie als Inline-

Messmethode, zum Beispiel zur Überprüfung der Trockenmasse bei Frischkäse, Käsebruch oder Joghurt eingesetzt werden.

Neben der Bestimmung des Fett-, Trockenmasse- und Eiweißgehaltes eignet sich die NIR-Spektroskopie zur Aufklärung von Lebensmittelbetrüger, wie zum Beispiel der Detektion von Wasser oder Molke in Rohmilch (Rocha, 2015). Außerdem können auch Bakterien, wie *Escherichia coli* durch die NIR-Spektroskopie qualitativ und quantitativ bestimmt werden. (Cámara-Martos, 2015)

Die Kalibrierung der NIR-Geräte ist jedoch oft aufwendig und nimmt eine gewisse Zeit in Anspruch. Deshalb wird die NIR-Spektroskopie besonders dort eingesetzt, wo es ein hohes Aufkommen von ähnlich zusammengesetzten Proben gibt.

Gleichzeitig sind die Nachteile der NIR-Spektroskopie nicht zu vernachlässigen. Neben dem hohen Aufwand der Kalibrierung ist die Anschaffung eines Gerätes ein erheblicher Kostenfaktor, der gerade bei kleineren Unternehmen oft nicht tragbar ist.

Weiterhin ist zu kritisieren, dass es sich bei der NIR-Spektroskopie um den energiereichsten Teil des Infrarots handelt. Dadurch kommt es leicht zu Überlappungen der einzelnen Banden, was die Auswertung erschwert. (Bruker, 2019)

### **2.1.2 Physikalische Grundlagen**

Das elektromagnetische Spektrum erstreckt sich von der Gammastrahlung bis zu den Radiowellen. Mittig befindet sich der Bereich des Infrarots, welches sich im Wellenspektrum zwischen dem visuellen Licht und dem Mikrowellenbereich befindet. Das Infrarot kann in drei Teilbereiche untergliedert werden, wobei es neben dem nahen Infrarot noch das mittlere und das ferne Infrarot gibt. Abbildung 1 veranschaulicht die Lage des NIR im elektromagnetischen Spektrum. (Günzler, 1983)

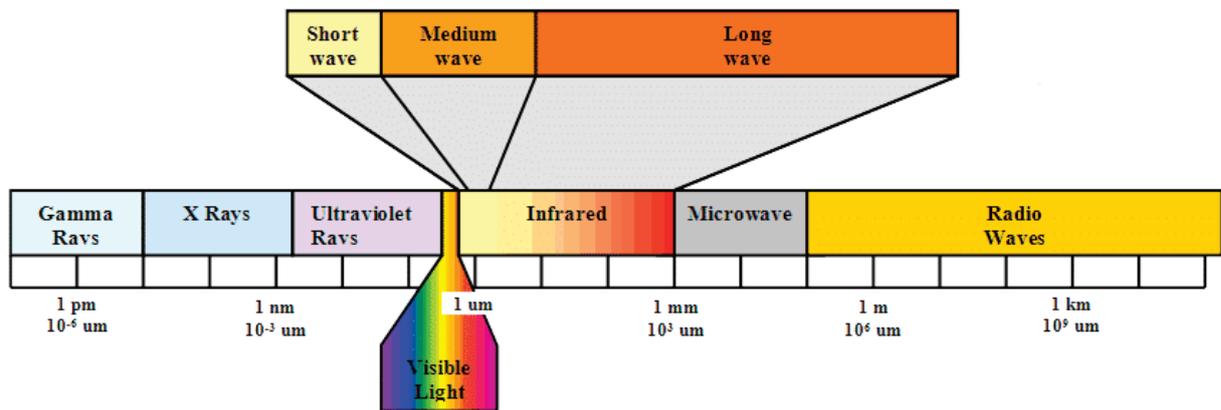


Abbildung 1: Lage des NIR im elektromagnetischen Spektrum

(Quelle: <https://opranic.de/infrartheizung/> (11.11.2019))

Eine wichtige Größe in der IR-Spektroskopie stellt die Wellenlänge ( $\lambda$  angegeben in m) dar. Häufig wird jedoch der reziproke Wert, also die Wellenzahl ( $\tilde{\nu}$  angegeben in m<sup>-1</sup> bzw. cm<sup>-1</sup>) verwendet. Sie ist der Frequenz direkt proportional. Die nachfolgenden Gleichungen (2-1 und 2-2) zeigen den Zusammenhang. (Figura, 2004)

$$c = \lambda * f \quad \text{Gl. 2-1}$$

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad \text{Gl. 2-2}$$

Das NIR hat einen Wellenlängenbereich von 800 bis 2500  $\mu\text{m}$  und eine Wellenzahl von 12500 bis 4000 cm<sup>-1</sup>. Die Wellenzahl des mittleren IR beträgt 2000 bis 400 cm<sup>-1</sup> und die des fernen IR 2000 bis 10 cm<sup>-1</sup>. Bei einer bestimmten Wellenzahl im Bereich des NIR können bestimmte Atomgruppen zum Schwingen gebracht werden, unter der Voraussetzung, dass die Frequenz des eingestrahlichten Lichts der Eigenschwingung des Moleküls entspricht. (Aschenbroich, 2005; Figura, 2004)

Für die NIR-Spektroskopie sind nur solche Moleküle relevant, die IR-aktiv sind. Diese sind Stoffe, die die Molekülschwingungen absorbieren können und deren Atome asymmetrisch angeordnet sind. Ein Beispiel dafür ist das Wassermolekül. Bei ihm treten durch die Schwingungen periodische Änderungen des Dipolmoments auf. Diese Änderungen werden als Normalschwingungen bezeichnet. Sie treten in verschiedenen Formen auf. Sobald sich die Bindungslängen zwischen zwei Atomen eines Moleküls verändern, wird von Streck- oder Valenzschwingung gesprochen. Betrifft die Änderung nur die Veränderung der Bindungswinkel zwischen

zwei Atomen, ist von Biege- oder Deformationsschwingungen die Rede. (Rager, 2001; Figura, 2004)

Die Absorption findet immer bei einer bestimmten Wellenlänge statt. Abweichend von den Normalschwingungen, können die Moleküle Schwingungen mit erhöhter Frequenz ausführen. Diese Schwingungen werden als Oberschwingungen oder Obertöne bezeichnet. Diese Obertöne werden im NIR-Spektrum sichtbar. Die Molekülschwingungen können anhand des Modells des anharmonischen Oszillators beschrieben werden (Williams, 2001). Das bedeutet, dass die potentielle Energie bei den Obertönen bei steigendem Energieniveau abnimmt. Gleichzeitig werden auch die aufgenommenen Frequenzen im NIR-Spektrum deutlich schwächer. Die nachfolgende Abbildung 2 verdeutlicht den anharmonischen Oszillator. (Aschenbroich, 2005)

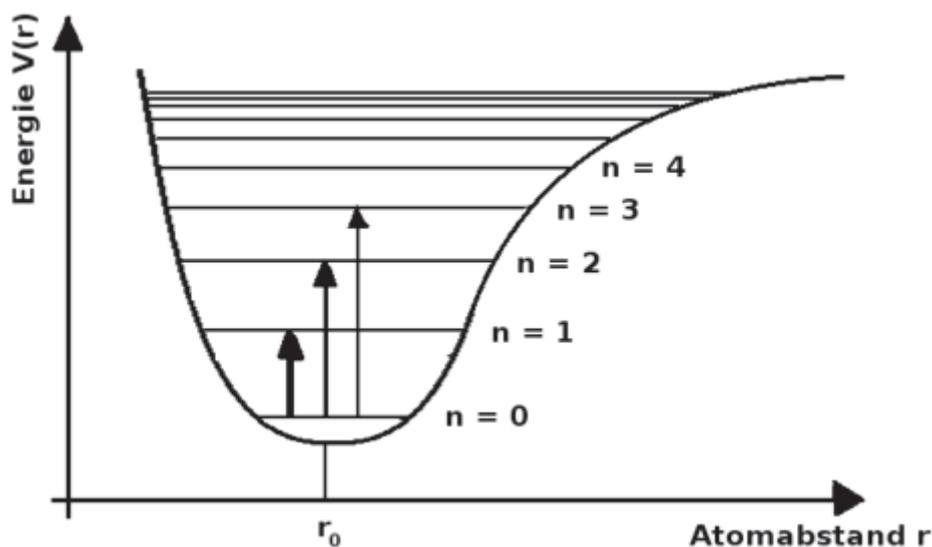


Abbildung 2: Modell des anharmonischen Oszillators

(Quelle: <https://chemieplanet.org/wiki/Infrarotspektroskopie> (28.12.2019))

Moleküle, die IR-inaktiv sind, besitzen eine symmetrische Anordnung ihrer Atome, wie zum Beispiel Sauerstoff, Wasserstoff, Metalle oder Edelgase. Werden sie mit NIR-Licht angestrahlt, findet keine Änderung des Dipolmoments statt. Sie können die NIR-Strahlen dementsprechend nicht absorbieren und werden dadurch auch nicht angeregt. (Figura, 2004)

Ausgehend von dieser Theorie werden nun Moleküle betrachtet, die größer sind als das bisher betrachtete Wassermolekül. Sind die Moleküle größer, verursachen sie nicht nur eine größere Schwingung, wenn sie durch NIR-Strahlen angeregt werden, sie können zusätzlich andere Moleküle in Schwingung versetzen. Das wird als Kombinationsschwingung bezeichnet. Die Folge

dieser Kombinationsschwingung ist, dass viele sich überlappende Peaks detektiert werden, was eine Auswertung des NIR-Spektrums verkompliziert. (Figura, 2004, Bruker 2019)

Mittels der NIR-Spektroskopie ist es möglich, funktionelle Gruppen organischer Verbindungen zu detektieren, wie zum Beispiel die OH-, CH-, und NH-Bindungen. Da es sich beim NIR um den energiereichsten Teil der IR-Strahlung handelt, können diese funktionellen Gruppen in Schwingung versetzt, detektiert und analysiert werden. Zugleich dringt die NIR-Strahlung tiefer in das Probenmaterial ein als beispielsweise die des mittleren Infrarots. So können die Gehalte an Fett, Eiweiß und Trockenmasse qualitativ und quantitativ ermittelt werden. Jede Substanz entspricht einem charakteristischen Spektrum. Die Stärke der Absorption ist abhängig von der Konzentration des Stoffes in der Probe. (Rudzik, 1998) Grundsätzlich wird zwischen der Spektrometrie, also den quantitativen Messungen und der Spektroskopie, der Interpretation von Spektrenzusammenhängen unterschieden. (Matissek, 2018)

Bei der Aufnahme von Spektren kann zwischen unterschiedlichen Modi ausgewählt werden. Werden Flüssigkeiten gemessen, wird die Transmission ermittelt, also der Durchgang von Strahlen durch das Medium (Abbildung 3). Dabei gilt das Lambert-Beersche-Gesetz (Gl. 2-3):

$$E = \varepsilon * d * c \qquad \text{Gl. 2-3}$$

E = Extinktion

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient (Stoffkonstante) bzw. spektraler Absorptionskoeffizient

d = Schichtdicke (mm oder cm)

c = Konzentration der Lösung (mol/L)

Wird die Intensität vor und nach dem Durchgang durch das Medium gemessen, ergibt sich eine Differenz. Diese Extinktion ist abhängig von einer Stoffkonstanten, dem molaren Extinktionskoeffizienten und der Konzentration der Lösung. Die Schichtdicke ist konstant. (Finke, 2003)

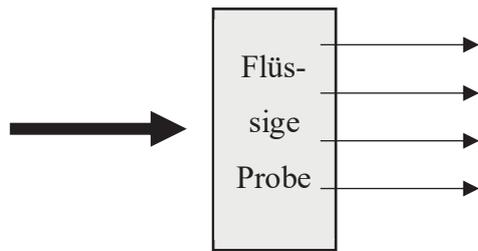


Abbildung 3: Transmission

Bei der Messung von Feststoffen wird die diffuse Reflexion angewendet (Abbildung 4). Die Reflexion ist diffus, da die Probe eine raue Oberfläche besitzt. Werden Feststoffe mit NIR-Strahlung bestrahlt, werfen diese sie zufällig in unterschiedlichen Richtungen zurück. Ein Teil der Strahlung wird von der Probe absorbiert. Der andere Teil, der diffus zurückgestrahlt wird, wird vom Detektor erfasst. (Finke, 2003)

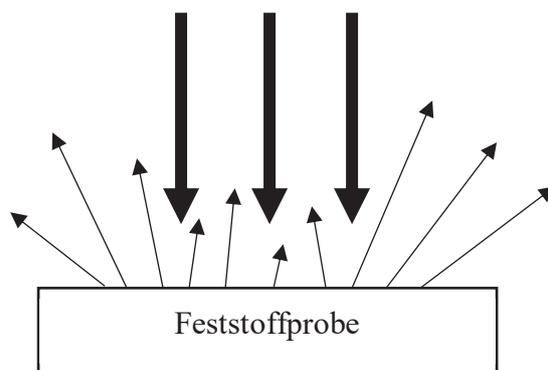


Abbildung 4: Diffuse Reflexion

## 2.2 FT-NIR-Spektrometer

### 2.2.1 Aufbau und Funktionsweise

Das Gerät der Hochschule Neubrandenburg ist seit Anfang 2019 in Betrieb. Dabei handelt es sich um das *MPA II* der Firma Bruker Optik aus Ettlingen. Im Speziellen ist es ein Fourier-Transformations-NIR-Spektrometer mit einem *RockSolid Interferometer*. Das ist ein Michelson-Interferometer (siehe Kapitel 2.2.2 Michelson-Interferometer), welches anstelle der planaren Spiegel so genannte „retroreflektierende Cube-Corner-Spiegel“ besitzt. Deshalb wird bei allen Geräten dieser Art auch kein Spektrum, sondern ein Interferogramm aufgezeichnet. Im Interferogramm sind die Informationen aller Frequenzen des NIR-Spektrums enthalten. Dieses wird mit Hilfe der Fourier-Transformation in ein Einkanalpektrum umgewandelt.

Bei dem Detektor handelt es sich um einen Halbleiterdetektor. In ihm ist der Werkstoff Indiumgalliumarsenid (InGaAs) verbaut. Zusätzlich wird der Detektor thermo-elektrisch (TE) gekühlt. Wenn der Detektor NIR-Strahlung detektiert, kann ein Stromfluss gemessen werden. Darauf folgt eine Temperaturdifferenz und somit eine Kühlung des Detektors. Er wird primär für das Detektieren von Infrarotstrahlung verwendet. Der Vorteil liegt im kleineren Dunkelstrom, also der geringen spontanen Bildung freier Ladungsträger durch Wärme. Durch einen kleineren Dunkelstrom kann das Rauschen verringert werden. Weitere Vorteile sind die hohe Empfindlichkeit und die schnelle Reaktionszeit. (Joshi, 2010)

Zur Messung von diffuser Reflektion ist eine Integrationskugel eingebaut. Die Integrationskugel wird auch Ulbricht-Kugel (siehe Kapitel 2.2.3 Integrationskugel) genannt. Sie ist innen mit Gold beschichtet und gewährleistet eine hohe Reproduzierbarkeit bei pastösen Produkten. (Bruker, 2017)

In der nachfolgenden Abbildung 5 (Erklärungen in Tabelle 1) ist der Strahlengang des FT-NIR-Spektrometers bei Messung in diffuser Reflektion dargestellt. Die Probe befindet sich auf einer rotierenden Apparatur mit einem 12 mm großen Messfenster. Zunächst wird das NIR-Licht (1) aus der Lichtquelle über eine Streuscheibe (2), zwei Spiegel und ein Blendenrad zum Interferometer geleitet und trifft auf den Strahlenteiler (3). Dort entsteht mithilfe der Retroreflektoren (4) eine Interferenz. Dann wird das NIR-Licht über mehrere bewegliche und feststehende Spiegel in die Integrationskugel (5) geleitet. Dort trifft das Licht durch den 12 mm großen Messkanal (7) auf die Probe (8) und wird diffus reflektiert. Durch die Integrationskugel kann der Detektor (6) das Signal verstärkt wahrnehmen und auswerten. Anschließend erfolgt mithilfe der Software OPUS und auf Grundlage der Fourier-Transformation die Umwandlung des Interferogramms in ein übliches Einkanalspektrum.

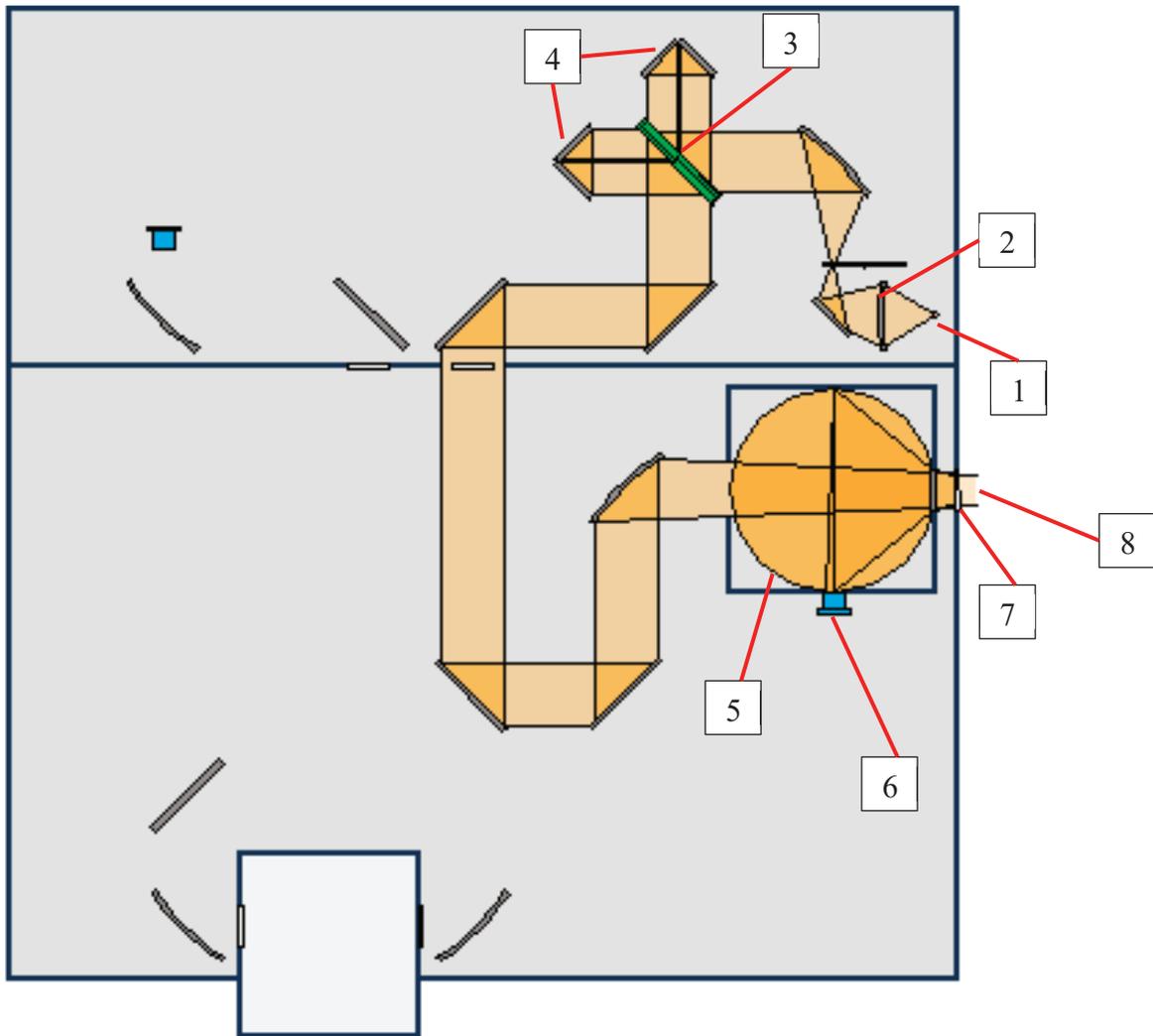


Abbildung 5: Strahlengang (orange eingezeichnet)

(Quelle: geändert nach Software OPUS Version 8, Bruker, 2019)

Tabelle 1: Erläuterungen zum Strahlengang (Abbildung 5)

Nr.	Bezeichnung	Nr.	Bezeichnung
1	NIR-Lichtquelle	5	Integrationskugel
2	Streuscheibe	6	TE-gekühlter InGaAs Detektor
3	Beam Splitter (Quarz)	7	Messkanal (Quarz)
4	Retroreflektoren	8	Probe (diffuse Reflektion)

## 2.2.2 Michelson-Interferometer

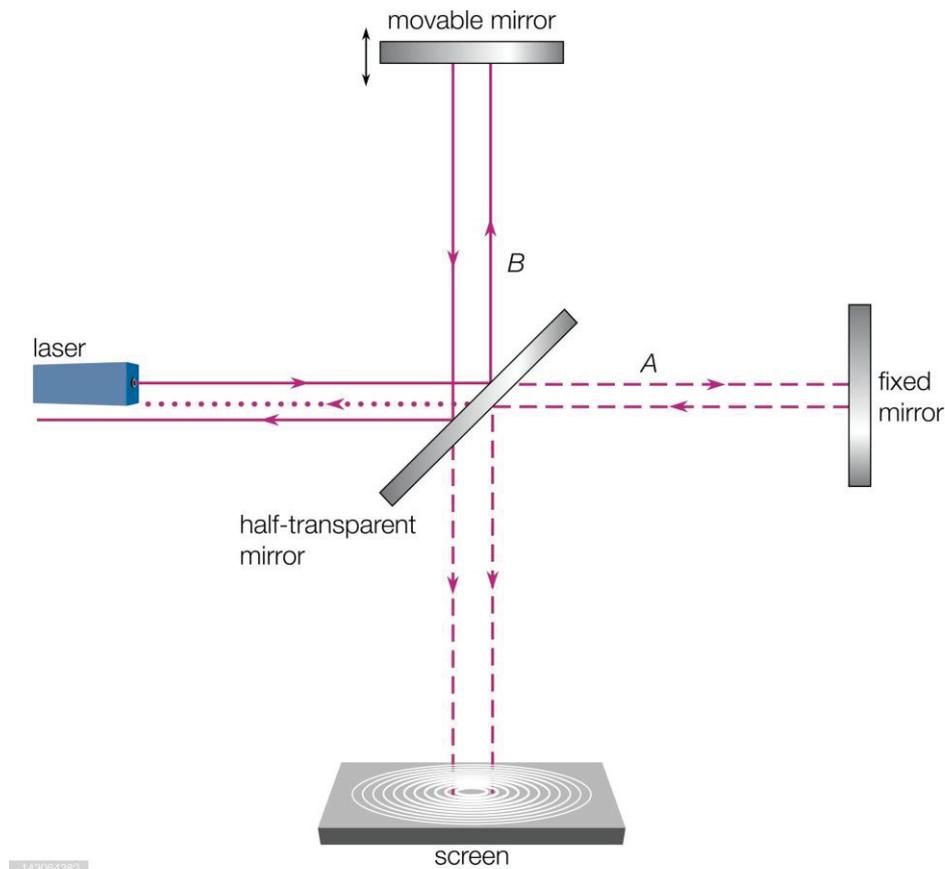


Abbildung 6: Michelson-Interferometer

(Quelle: <https://www.gettyimages.de/detail/nachrichtenfoto/the-michelson-interferometer-measures-the-effect-on-nachrichtenfoto/143064382> (11.11.2019))

In Abbildung 6 ist der schematische Aufbau eines Michelson-Interferometers dargestellt. Wie oben schon erwähnt, befinden sich in für die Versuche verwendeten *MPA II* keine planaren Spiegel, sondern Retroreflektoren. Sie werden unter anderem auch in der Straßensicherheit und im Weltall eingesetzt. Der Vorteil der Retroreflektoren besteht darin, dass sie das Licht in genau die Richtung reflektieren, aus der es kommt. Dabei ist die Reflektion des Lichts unabhängig vom Einfallswinkel. Bei planaren Spiegeln besteht die Gefahr, dass sie sich mit der Zeit leicht verschieben und das reflektierte Licht in eine andere Richtung zurückwerfen. Das sollte in der NIR-Spektroskopie generell vermieden werden. Die Funktionsweise des Michelson-Interferometers ist jedoch unabhängig von den verbauten Spiegeln.

Das Michelson-Interferometer besteht aus zwei vollständig reflektierenden Spiegeln, wobei einer von ihnen fixiert und der andere beweglich ist. Zudem befindet sich in der Mitte ein schräg

angeordneter halbdurchlässiger Spiegel. Das Licht aus der Lichtquelle strahlt mit monochromatischem Licht. In der Abbildung stellt das die gelb gekennzeichnete Linie dar. Gelangt das Licht an den halbdurchlässigen Spiegel, wird die eine Hälfte des Lichts reflektiert (B, durchgezogene Linie), währenddessen die andere Hälfte des Lichtstrahls durch den halbdurchlässigen Spiegel (A, gestrichelte Linie) hindurchtritt. An beiden anderen Spiegeln wird das Licht vollständig reflektiert. Die eine Hälfte der gestrichelten Linie wird am halbdurchlässigen Spiegel ins Nichts (gepunktete Linie) geleitet. Die andere Hälfte trifft wiederum direkt auf den Detektor. Das Gleiche passiert auch mit der durchgezogenen Linie. Ein Teil des reflektierten Lichts tritt durch den halbdurchlässigen Spiegel. Die andere Hälfte wird reflektiert und vom Detektor wahrgenommen bzw. durch den Spiegel weitergeleitet. (Günzler, 1983)

Haben die reflektierenden Spiegel den gleichen Abstand zum halbdurchlässigen Spiegel, würde es zur konstruktiven Interferenz (Abbildung 7a), also zur Überlagerung zweier Wellen, kommen. Die Wellenberge der einen Hälfte der Strahlung treffen auf die Wellenberge der anderen Hälfte der Strahlung. Der Detektor nimmt so ein konstantes Signal wahr. Gleichzeitig kommt es zur Verdopplung der Amplitude. (Günzler, 1983)

Wird nun der Weg zwischen dem halbdurchlässigen Spiegel und dem beweglichen Spiegel um  $\lambda/4$  verändert, schwingen die Wellen gegenphasig. Die Wellen löschen sich durch die Gangverschiebung gegenseitig aus, und somit kann keine Energie detektiert werden. Wird nun der Spiegel stetig in einem cm/s-Bereich verschoben, erhält man ein Interferogramm, dessen Amplitude von der Strahlungsintensität und die Frequenz von der Wellenlänge  $\lambda$  und von der Verschiebungsgeschwindigkeit des beweglichen Spiegels abhängig ist. Wichtig für die Aufnahme eines Interferogramms ist also die destruktive Interferenz (Abbildung 7b). (Günzler, 1983)

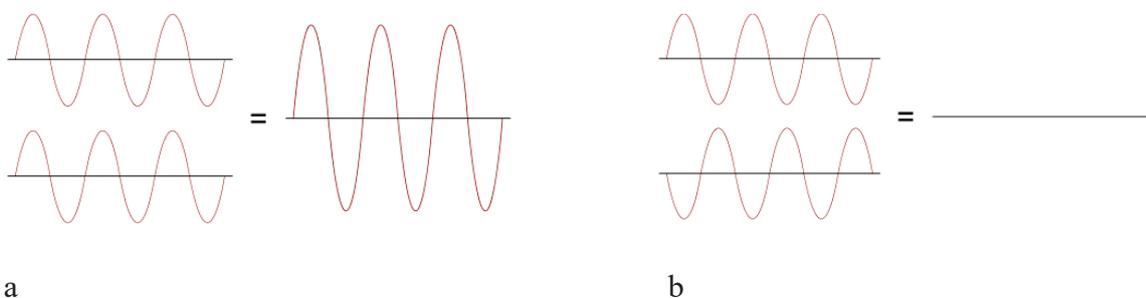


Abbildung 7: Konstruktive (a) und destruktive (b) Interferenz

(Quelle: [https://www.univie.ac.at/mikroskopie/1\\_grundlagen/optik/wellenoptik/5a\\_konstruktiv.htm](https://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/optik/wellenoptik/5a_konstruktiv.htm) (26.11.2019))

Wird nun eine Probe hinter der Lichtquelle platziert und die durchgegangene Strahlung detektiert, geschieht das oben beschriebene in wiederholter Form. Das Interferogramm ist jedoch viel komplizierter. Die Umrechnung erfolgt durch die Fourier-Transformation zu einem herkömmlichen Spektrum. (Günzler, 1983)

### 2.2.3 Integrationskugel

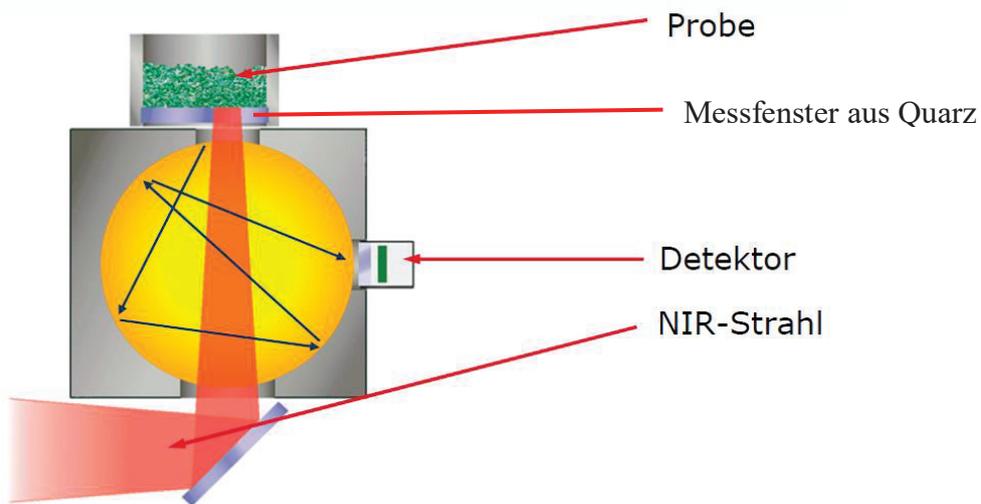


Abbildung 8: Integrationskugel

(Quelle: geändert nach Bruker, 2019)

Im Spektrometer befindet sich eine Integrationskugel (Abbildung 8). Sie ist für die Messungen in diffuser Reflexion konzipiert. Dabei kann ein großes Probenareal mit einem Durchmesser von 12 mm erfasst werden. Es können aber auch gleichzeitig kleinere Proben gemessen werden. Der Durchmesser des kleineren Messkanals beträgt 2,5 mm. Durch die Rotation der Probe können viele Inhaltsstoffe und Bereiche innerhalb der zu untersuchenden Substanz detektiert werden. Dieses ist besonders wichtig, wenn es sich um eine inhomogene Probe handelt. Ohne Rotation würden bei inhomogenen Proben eine hohe Varianz und unterschiedliche und nicht wiederholbare Ergebnisse ermittelt werden. (Bruker, 2019)

## 2.3 Käse

### 2.3.1 Frischkäse

Frischkäse ist eine Käsegruppe, zu der unter anderem die Standardsorten Doppelrahmfrischkäse und der Speisequark gehören. Frischkäse ist im Allgemeinen ein Erzeugnis, das in verschiedenen Fettgehaltsstufen mit pasteurisierter Milch, Sahne oder entrahmter Milch auf verschiedene Weise hergestellt wird. Dabei werden zusätzlich Milchsäurebakterien und/oder Lab verwendet, um den Frischkäse zu säuern und dickzulegen. Eine weitere Gemeinsamkeit aller Standardsorten dieser Käsegruppe ist die Möglichkeit des sofortigen Verzehrs durch den Entfall der Reifung. Außerdem kann durch verschiedene technologische Schritte (zum Beispiel Ultrafiltration oder Pulverzugabe) der Eiweißgehalt erhöht werden. (Spreer, 2010)

**Doppelrahmfrischkäse** gehört laut Käseverordnung zu der Gruppe der Frischkäse. Die Käseverordnung gibt klare Vorgaben für Doppelrahmfrischkäse. Die Trockenmasse des Frischkäses muss min. 44 % betragen, damit ein Frischkäse „Doppelrahmfrischkäse“ genannt werden darf. Daraus ergibt sich ein Fett in Trockenmasse-Gehalt (F.i.Tr.) von 70 %. Sollte dies nicht der Fall sein, darf nicht von einer Standardsorte gesprochen werden. Weiterhin werden Angaben zum Aussehen, zur Struktur, zum Geschmack und Geruch gemacht. Das Aussehen ist weißlich bis rahmgelb. Die Frischkäsemasse darf keine Lochung aufweisen und muss streichfähig sein. Der Geschmack soll, ebenso wie der Geruch, rein milchsäuerlich sein. (Käseverordnung, 2017)

**Speisequark** darf laut Käseverordnung in allen Fettstufen mit entsprechender Einhaltung des Eiweißgehaltes hergestellt werden. Der Anteil an Molkenprotein am Gesamteiweiß darf den Prozentsatz von 18,5 nicht überschreiten. Die Käseverordnung gibt außerdem Kriterien zum Aussehen, zur Textur, zum Geschmack und Geruch an. Dementsprechend soll der Farbton milchigweiß bis rahmgelb sein. Die Textur des Speisequarks ist gleichmäßig und weich. Sollte Sahne zugesetzt worden sein, so ist diese homogen in der Magerquarkmasse zu verteilen. Der Geschmack und Geruch soll „leicht rein milchsauer“ sein. (Käseverordnung, 2017)

Sowohl Doppelrahmfrischkäse als auch Speisequark können durch diverse technologische Verfahren hergestellt werden. Bei Speisequark ist das Thermoquarkverfahren das gebräuchlichste. Einzelheiten zu der Prozessführung und weitere Herstellungsverfahren sind ausführlich in der Literatur beschrieben. (Spreer, 2010; Bake, 2003; Kessler, 1996)

Hauptsächlich werden bei Frischkäseerzeugnissen chemisch-physikalische Qualitätskontrollen durchgeführt. Damit die Ergebnisse dieser Qualitätskontrollen reproduzierbar und mit Resultaten aus anderen Laboren vergleichbar sind, wurden durch verschiedene Instanzen die Untersuchungsmethoden vereinheitlicht. Deshalb wird sich vor allem am LFGB § 64 (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren), am Methodenbuch Band IV der VDLUFA (Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten) und an den DIN-Normen (Deutsches Institut für Normungen) orientiert. (Töpel, 2007)

Wird Frischkäse standardmäßig untersucht, so wird vor allem auf die Trockenmasse (gravimetrische Trocknung bei 102 °C) geachtet. Diese ist besonders wichtig, wenn der Käse in einer bestimmten Fettgehaltsstufe hergestellt werden soll. Außerdem muss der Fettgehalt analysiert werden, um anschließend den F.i.Tr. bestimmen zu können. Der Fettgehalt wird in der Praxis bzw. im laufenden Betrieb meist mittels butyrometrischer Schnellmethoden bestimmt. Die vorgeschriebenen Referenzmethoden sind jedoch gravimetrische Verfahren, wie zum Beispiel das Verfahren nach Schmid-Bondzynski-Ratzlaff. Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Berechnung des Wassergehaltes der fettfreien Käsemasse. (Spreer, 2010)

### **2.3.2 Mascarpone**

Bei Mascarpone handelt es sich um ein Milcherzeugnis mit einem hohen absoluten Fettgehalt von ca. 45 bis 55 %, einem Wassergehalt von ca. 45 bis 55 % und einem Proteingehalt von ca. 7 bis 8 %. Das Produkt hat eine hohe Festigkeit, ist aber dennoch streichfähig. Es hat die Charakteristika eines Frischkäses, was bedeutet, dass es ohne Reifung sofort verzehrt werden kann. Hauptbestandteil ist dabei 30 %-iger Rahm. Der Geschmack ist dementsprechend mild und cremig. Die direkte Zugabe organischer Säuren stellt einen klaren Unterschied zu den restlichen Frischkäseprodukten dar, die mit der Zugabe von Milchsäurebakterien und infolge dessen durch die Caseinfällung gesäuert und dickgelegt werden. Auf diese Weise kann ein End-pH-Wert von ca. 5,8 eingestellt werden. (Kessler, 1996)

Klassisch wird Mascarpone durch Erhitzen der 30 %-igen Sahne auf 80 °C und das Hinzufügen von Zitronensäure oder Weinsteinsäure hergestellt. Nach dem Rühren, wird ein Teil der Molke

abgezogen. Nach ca. 16 bis 24 Stunden hat der Mascarpone die richtige Konsistenz. (Kessler, 1996)

In Versuchen der Hochschule Neubrandenburg wird der pH-Wert der Mascarpone sowohl klassisch durch die Zugabe organischer Säuren als auch durch das nachträgliche Beimpfen mit Milchsäurebakterien auf ca. 5,8 abgesenkt. Außerdem werden auch Produkte hergestellt, bei denen eine Trennung des Bruch-Molke-Gemisches nicht notwendig ist. Dabei wird Milch- bzw. Molkenproteinpulver zur Wasserbindung verwendet. Zur Haltbarmachung wird die Masse erhitzt und anschließend homogenisiert. Dadurch wird das cremige Mundgefühl erzielt. (Döhmann, 2018; Wehlen, 2019 und Fertigstellung 2020; Cao, Fertigstellung 2020)

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchsplanung

Um das FT-NIR-Spektrometer (*MPA II*) korrekt nutzen zu können, müssen Kalibrierungen für die zu untersuchenden Produkte vorhanden sein. Die Kalibrierungen werden zum Analysieren von Spektren benötigt. In ihnen sind die Spektren mit den dazugehörigen Laborwerten hinterlegt. Es sind Kalibrierungen unter anderem für Quark und Käse verfügbar (siehe Seite 29 Tabelle 6). Weiterhin gibt es Kalibrierungen für diverse andere Milchprodukte, wie zum Beispiel Milch, Butter oder Joghurt. Diese Kalibrierungen sind jedoch für den weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht relevant. Aus diesem Grund werden nur die Kalibrierungen für Quark und Käse betrachtet. Grundsätzlich können nicht mit jeder Kalibrierung alle beliebigen Parameter untersucht werden. Mit der Kalibrierung für Käse kann in einem bestimmten Rahmen die Trockenmasse, der Fettgehalt, der pH-Wert und der Salzgehalt untersucht werden. Mit der Quark-Kalibrierung kann hingegen die Trockenmasse, der Fettgehalt und der Eiweißgehalt ermittelt werden. (Bruker, 2017)

Die Versuchsplanung sieht vor, die im Technikum der Hochschule Neubrandenburg sowie industriell hergestellte Frischkäseerzeugnisse (Wehlen, Fertigstellung 2020; Cao, Fertigstellung 2020; Li, Fertigstellung 2020) sowohl nasschemisch als auch mit dem NIR-Spektrometer zu untersuchen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Referenzanalytik genaue und zuverlässige Werte liefert. Diese können, nachdem alle Messungen abgeschlossen sind, in die bestehende Kalibrierungen eingespeist werden. Zusätzlich können neue Kalibrierungen, die auf bestimmte Produktgruppen zugeschnitten werden sollen, erstellt werden.

Untersucht wird der Gehalt an Fett, Eiweiß und Trockenmasse (Tabelle 2). Dazu wird für die Fettbestimmung das Verfahren nach Van Gulik angewendet (C 15.3.8 „Butyrometrische Bestimmung des Fettgehaltes von Käse – Verfahren nach Van Gulik“ der VDLUFA (Verband deutscher landwirtschaftlicher Forschungs- und Untersuchungsanstalten) (1985)). Für die Ermittlung des Gehaltes an Eiweiß wird klassisch die Methode nach Kjeldahl angewendet. (LFGB § 64: L 01.00-10 (2016-02) Teil 1: Kjeldahl-Verfahren und Berechnung des Rohproteingehaltes (nach DIN EN ISO 8968-1)). Die vorgeschriebene Referenzanalytik für die Ermittlung der Trockenmasse stellt die Seesandmethode dar. Diese Methode nimmt einen beträchtlichen zeitlichen Aufwand in Anspruch (LFGB § 64). Die alternative Analyseverfahren ist die Folienmethode

(VDLUFÄ – Methode C 35.4, 1985). Diese Methode liefert ebenso zuverlässige Werte und hat einen geringeren Zeitaufwand. (Müller, 2019)

Tabelle 2: Anzahl der Versuche, Wiederholungen je Versuch und Angabe des erwarteten Wertebereiches

<b>Analysemethode</b>	<b>Anzahl der Versuche</b>	<b>Anzahl der Wiederholungen je Versuch</b>	<b>Wertebereich [%]</b>
Bestimmung des Trockenmassegehaltes – Folienmethode	21	3	18,0 – 51,0
Bestimmung des Fettgehaltes – Van Gulik	21	2	1,0 – 40,0
Bestimmung des Rohprotein-gehaltes – Kjeldahl	11	2	3,0 – 31,0

Es ist sinnvoll, immer eine Doppel- bzw. Dreifachbestimmung durchzuführen. Wie zu erkennen ist, unterscheiden sich die Produkte in ihren Gehalten an Fett, Trockenmasse und Eiweiß. Eine große Bandbreite an Produkten ist vorteilhaft für eine spätere Entwicklung und Validierung der Kalibrierungen.

In Tabelle 3 sind die theoretisch ermittelten Gehalte an Trockenmasse, Fett und Eiweiß der im Technikum hergestellten Produkte aufgeführt. Vor deren Herstellung muss eine Rezeptur rechnerisch entwickelt werden. Diese kalkulierten Werte sind die theoretisch ermittelten Anteile der einzelnen Inhaltsstoffe. Die zu analysierenden Laborwerte orientieren sich an den errechneten Werten. Sie können mit den theoretischen Werten verglichen, jedoch nicht gleichgesetzt werden.

Tabelle 3: Übersicht über den im Technikum hergestellten Frischkäse und Mascarpone (theoretisch ermittelt)

Produkt	TM [%]	Fett [%]	EW [%]
Friskkäse – V1	49,80	30,00	7,55
Friskkäse – V2	<b>49,56</b>	<b>29,75</b>	<b>7,54</b>
Friskkäse – V3	49,60	29,76	7,35
Friskkäse – V4	49,45	29,90	10,70
Friskkäse – V5	49,45	29,90	10,66
Friskkäse – V6	28,75	1,08	20,70
Friskkäse – V7	39,67	1,54	30,35
Mascarpone – V1	49,46	39,58	3,74
Mascarpone – V2	48,28	36,72	4,03
Mascarpone – V3	49,88	34,73	8,93
Mascarpone – V4	48,90	32,02	8,60
Mascarpone – V5	50,11	30,79	7,32
Mascarpone – V6	49,60	34,57	5,51
Mascarpone – V7	49,71	32,40	6,20
Mascarpone – V8	49,60	34,57	5,51
Mascarpone – V9	49,71	32,40	6,20
Mascarpone – V10	49,60	34,57	5,51

Anhand der fett markierten Werte wird die Beispielrechnung durchgeführt.

Im Folgenden wird das Prinzip des Rechenweges am Beispiel der Probe „Friskkäse – V2“ kurz vorgestellt (Tabelle 4). Bei dieser Probe handelt es sich um einen Friskkäse, der mit Magermilchpulver und Gelatine hergestellt wurde (Li, Fertigstellung 2020). Die verwendeten Zutaten werden tabellarisch gegenüber den Inhaltsstoffen aufgetragen und der jeweilige dazugehörige Anteil in die entsprechenden Zellen eingetragen. Daraus ergeben sich die bereitzustellenden Mengen für die Produktion sowie die theoretisch ermittelte Zusammensetzung des Produktes.

Tabelle 4: Beispielrechnung

Anteil [%]		Fett [%]	Laktose [%]	Casein [%]	Molkenprotein [%]	Salze [%]	Säure [%]	Wasser [%]
<b>74,00</b>	<b>Rahm (40%)</b>	40,00	2,88	1,68	0,36	0,42	0,00	54,66
<b>0,50</b>	<b>Gelatine</b>	0,00	0,00	0,00	84,20	1,70	0,00	14,00
<b>15,45</b>	<b>Magermilchpulver</b>	1,00	51,24	29,89	6,40	7,47	0,00	4,00
<b>9,30</b>	<b>Wasser</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100
<b>0,75</b>	<b>Zitronensäure (5%)</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100	0,00
<b>100</b>	<b>Frischkäse</b>	<b>29,75</b>	10,05	5,86	1,68	1,47	0,75	50,44
					<b>7,54</b>			

Zur Berechnung des Fettgehaltes wird die Summe aus den Fettanteilen aller Zutaten gebildet und durch 100 % geteilt.

$$\text{Fett [\%]} = \frac{40,00 \% * 74,00 \% + 1,00 \% * 15,45 \%}{100 \%} = \mathbf{29,75 \%}$$

Analog zum Fettgehalt wird auch der Gehalt der anderen Inhaltsstoffe berechnet.

Bei der Berechnung des Eiweißgehaltes muss darauf geachtet werden, dass der Anteil des Caseins und der Molkenproteine zusammengefasst wird.

Die Trockenmasse kann zum Schluss berechnet werden, indem die Anteile aller festen Inhaltsstoffe addiert werden oder der Anteil des Wassers von 100 % subtrahiert wird.

$$\text{TM [\%]} = 29,75 \% + 10,05 \% + 7,54 \% + 1,47 \% + 0,75 \% = \mathbf{49,56 \%}$$

Zusätzlich wird industriell hergestellter Mascarpone, Frischkäse und Quark (20 % F.i.Tr. und 40 % F.i.Tr.) untersucht, wobei die genauen Angaben dazu Tabelle 5 zu entnehmen sind. Hier ist anzumerken, dass die Gehalte an Trockenmasse, Fett und Eiweiß aus der Nährwerttabelle der Verpackung entnommen worden sind und nicht in die Kalibrierung mit einfließen. Auch diese Werte dienen lediglich als Anhaltspunkte.

Tabelle 5: Angaben zu industriell hergestelltem Käse

Produkt	Hersteller	MHD	Ge- wicht	Chargen- nummer	TM [%]	Fett [%]	EW [%]
<b>Mascarpone</b>	S.p.A Egidio Galbani, Mailand, Italien	17.12.2019	250 g	13:45 L190296	44,6	38,0	3,5
<b>Frischkäse: Doppel-rahmstufe</b>	Arla Foods, Dänemark	02.03.2020	300 g	L163202:44	33,3	25,0	4,5
<b>Quark 20 % F.i.Tr.</b>	DMK – Deutsches Milchkontor, Zeven, Deutschland	11.12.2019	250 g	k. A.	18,4	4,3	10,3
<b>Quark 40 % F.i.Tr.</b>		05.12.2019	250 g	k. A.	22,6	10,0	8,8

## 3.2 Messung mittels FT-NIR-Spektrometer

### 3.2.1 Software OPUS 8

Zu Beginn der Messung müssen die gewünschten Parameter eingestellt werden. Es muss die Anzahl der aufzunehmenden Scans angegeben werden. Diese beträgt 64, was einer Messdauer von 45 Sekunden entspricht. Diese 64 Scans sind vom Hersteller empfohlen und können beliebig geändert werden. Dabei entspricht eine Spiegelbewegung einem Spektrum. Je mehr Scans aufgenommen werden bzw. je öfter ein Spektrum erstellt wird, desto genauer ist das Endergebnis. Alle aufgenommenen Spektren werden zu einem Gesamtspektrum zusammengefasst. (Bruker, 2019)

Eine wichtige Einstellung ist die Auswahl der gewünschten Experimentierdatei. Dort sind bereits die optimalen Einstellungen des Herstellers hinterlegt, wie zum Beispiel die optimale Auflösung, die Anzahl der Scans oder die Vorverstärkung. Außerdem wird die Art der Messung (Reflektion, Transmission oder Transreflektion) und der Messkanal festgelegt. Das bedeutet,

dass für die Untersuchung von Quark sowie für Mascarpone und Frischkäse die Experimentierdatei für Quark (*MPAII\_Curds\_B.XPM*) hinterlegt sein muss. Das „B“ im Namen der Experimentierdatei gibt den Vorverstärker an. Es können vier verschiedene Vorverstärker eingestellt werden. (Bruker, 2019)

„REF“ = ohne Vorverstärkung

„A“ = 3x „REF“

„B“ = 30x „A“

„C“ = 300x „B“

Die Verwendung des Vorverstärkers ist sinnvoll, wenn die Probe inhomogen ist und Hohlräume aufweist. Durch die Inhomogenität und die Hohlräume geht NIR-Licht verloren. Durch den Vorverstärker kann das Lichtsignal intensiviert werden. Die Wahl des Vorverstärkers hängt unter anderem von der Farbe der Probe ab. Ist die Probe weiß, wie Frischkäse oder Mascarpone, ist beispielsweise der Vorverstärker „A“ oder „B“ ausreichend. Um die verschiedenen Auswirkungen des Vorverstärkers betrachten zu können, kann im Justiermodus das Interferogramm und das Spektrum der Probe betrachtet werden. Die Amplitude des Interferogrammpeaks muss laut Herstellerangaben immer zwischen 1000 und 20000 liegen. Ist dies nicht der Fall, ist der Detektor überladen (Abbildung 9a) oder es kommt zum Rauschen des Spektrums (Abbildung 9b) und somit zu ungenauen Analyseergebnissen. (Bruker, 2019)

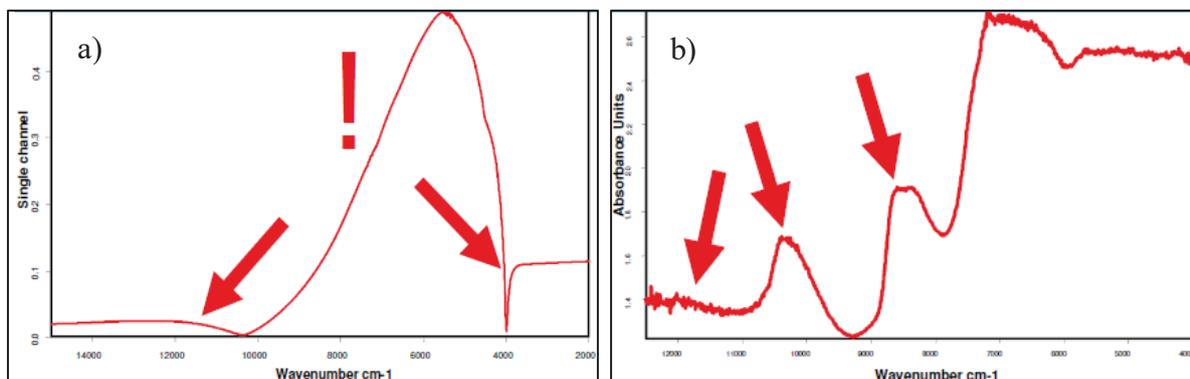


Abbildung 9: Überladender Detektor (a) und „verraushtes“ Spektrum (b)

(Quelle: Bruker, 2019)

Bevor das Interferogramm der Probe gemessen werden kann, wird ein Hintergrundspektrum aufgenommen, um Einflüsse des Spektrometers zu berücksichtigen. Diese Einflüsse können die unterschiedlichen Leistungen der Quelle oder die vom Spiegelmaterial absorbierte Strahlung bei unterschiedlichen Frequenzen sein. Dabei muss die Probe nicht aus dem Strahlengang entfernt werden, es ist also ein Leerkanalspektrum. Diese Messung muss nicht vor jeder

Probenmessung durchgeführt werden. Der Anwender oder das Labor muss jedoch definieren, nach welchem Zeitraum die Messung des Hintergrunds wiederholt werden soll. Das Hintergrundspektrum wird bei der Erstellung des Probenspektrums berücksichtigt und eliminiert. (Günzler, 1983; Bruker, 2017)

Die Messung wird in einer Polystyrolpetrischale durchgeführt. Wichtig ist, dass die Probe mit einer gleichmäßigen Schichtdicke in die Petrischale eingebracht wird, sodass das NIR-Licht nicht durchscheint. Die Auflösung bei der Messung beträgt  $16\text{ cm}^{-1}$ . Das bedeutet, dass in dem Wellenzahlbereich zwischen  $12000$  und  $4000\text{ cm}^{-1}$  alle  $16$  Wellenzahlen eine Messung vorgenommen wird. Die Auflösung von  $16\text{ cm}^{-1}$  wird üblicherweise bei Feststoffen verwendet. Ist die Auflösung nicht richtig gewählt, „rauscht“ das Spektrum. Das bedeutet, dass die Linie des aufgenommenen Spektrums gezackt und nicht glatt ist. (Bruker, 2019)

Es ist wichtig, dass die Probe nicht zu kalt ist, denn die Temperatur hat Einfluss auf das Ergebnis. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn die Temperatur der Probe der Raumtemperatur angeglichen wird. Werden Spektren von Wasser unterschiedlicher Temperaturen aufgezeichnet, sind Abweichungen der Absorption bestimmter Frequenzbereiche erkennbar. Ist die Probenmessung abgeschlossen, erscheint das aufgenommene Spektrum. Dabei wird die Wellenzahl im Bereich von  $12000$  bis  $4000\text{ cm}^{-1}$  gegenüber der Absorption aufgetragen. Für eine bessere Ansicht des Graphen können die x- und y-Achsen skaliert werden. (Bruker, 2019)

Anschließend kann das Spektrum mit den hinterlegten Kalibrierungen, zum Beispiel für Quark (Curds-PSPD) (Tabelle 6) analysiert werden. Dabei können mehrere Spektren geladen werden. Die Software gibt anschließend die Ergebnisse aus. Gleichzeitig wird angezeigt, ob es sich bei einem der Werte um einen Ausreißer handelt und wie groß die Mahalanobis-Distanz ist. Dieser Wert gibt an, wie gut das gemessene Spektrum der Probe zu dem Kalibrationsspektrum passt. Je weiter der gemessene Wert vom Mittelwert der Kalibrierung abweicht, desto größer wird die Mahalanobis-Distanz. Störeinflüsse sind zum Beispiel Probenverunreinigungen oder unterschiedliche Temperaturfelder innerhalb der Probe. Werte, die außerhalb des Kalibrationsbereiches liegen, können nicht zuverlässig vorhergesagt werden (Conzen, 2005)

Tabelle 6: Curds-PSPD

(geändert nach Bruker, 2019)

Parameter	Einheit	min.	max.
Trockenmasse	%	10,6	59,5
Fett	%	0,0	24,2
Eiweiß	%	7,8	18,5

### 3.2.2 OPUS Lab

OPUS Lab ist eine vereinfachte Version des OPUS Programms. Durch die einfache Gestaltung der Bedienoberfläche eignet es sich für den regulären Laborbetrieb. Dort können einfache Messungen vorgenommen werden. Die Ergebnisse werden anschließend sofort angezeigt. Allerdings sind in dieser vereinfachten Version der OPUS Software keine Veränderungen der Kalibrierungen und keine Methodvalidierungen möglich. In das Programm können nur die bestehenden Kalibrierungen hineingeladen werden.

Wie oben schon erwähnt, muss vor jeder Probenmessung bzw. in regelmäßigen Abständen ein Hintergrundspektrum aufgenommen werden. Bei OPUS Lab kann eingestellt werden, wie lange das Hintergrundspektrum gültig ist und warnt, wenn es erneuert werden muss.

### 3.2.3 Validierung

Für die Validierung einer Kalibrierung wird die Statistik zur Hilfe herangezogen. Sobald eine Kalibrierung erstellt ist, ist es notwendig zu überprüfen, wie zuverlässig und robust sie ist. Dabei ist die Validierung eine Qualitätssicherung von Analysemethoden. Dazu werden sowohl bekannte als auch unbekannte Proben mit den bestehenden Kalibrierungen überprüft. Bei der NIR-Spektroskopie wird eine multivariate und faktoranalytische Kalibration angewendet. Multivariate Kalibrationen finden in Ein- oder Mehrkomponentensystemen i.d.R. über den gesamten bzw. einen größeren Wellenlängenbereich statt. Die häufigste verwendete Kalibration ist eine bilineare PLS-Regression (*Partial Least Square*). (Aschenbroich, 2005; Bruker, 2019)

Unter eine PLS-Regression versteht man die Extrahierung einer kleinen Anzahl von Faktoren aus dem Datensatz der Spektren. Bei der Regression werden nur die Daten genauer betrachtet,

die im direkten Zusammenhang mit den Laborwerten stehen. Jede Probe wird als Punkt im multidimensionalen Raum betrachtet. Diesen Proben werden mit dem spektralen Datensatz in Verbindung gebracht. (Rager, 2001)

Der erste Schritt ist die mathematische Darstellung der Datensätze der Spektren (X) und der Referenzanalytik (Y) als Matrizen. Diese werden anschließend in ihre Eigenvektoren, bestehend aus Hauptkomponenten bzw. Faktoren, zerlegt. Die Faktoren enthalten anschließend alle wichtigen Informationen der Spektren in verkürzter Form. (Fink, 2003)

$$\text{Spektraldaten} \quad X = T P + F \quad \text{Gl. 3-1}$$

$$\text{Konzentrationsdaten} \quad Y = U Q + G \quad \text{Gl. 3-2}$$

T, U = Score-Matrizen (Faktorgewicht)

P, Q = Loading-Matrizen (Hauptkomponenten)

F, G = Residualmatrizen

Dabei erfasst beispielsweise der erste Faktor den größten Teil der Varianz, also die Hauptveränderung im Datensatz, der zweite Faktor den größten Teil der verbleibenden Varianz usw. Je höher der Faktor, desto höher das spektrale Rauschen. Wichtig dabei ist, dass die Menge der ausgewählten Faktoren weder zu gering noch zu hoch ist. Werden zu viele Faktoren gewählt, ist das Modell „überbestimmt“, und der störende Anteil des Rauschens ist zu groß. Ist das Gegenteil der Fall, können die Strukturen der Spektren nicht richtig erkannt werden. (Bruker, 2019; Fink, 2003)

Nachfolgend können über weitere mathematische Schritte unbekannte Proben aufgrund ihrer Spektren vorhergesagt werden. Diese Vorhersage kann jedoch nur verbessert werden, wenn weitere Proben in die Kalibrierungen eingetragen werden.

Um nun die Genauigkeit der PLS-Regression bestimmen zu können, werden verschiedene mathematische und statistische Parameter verwendet.

Der **Rang** beschreibt die Anzahl der Faktoren und der Hauptkomponenten in der PLS-Regression, die notwendig sind, um eine Methode bzw. ein Modell zu beschreiben. Zur Bestimmung des Rangs wird der RMSECV (*Root Mean Square Error of Cross Validation*, dt. Standardfehler

der Kreuzvalidierung) herangezogen. Der optimale Rang kann nur dann berechnet werden, wenn genügend Proben und Kalibrationsspektren verfügbar sind. Je niedriger der Rang, desto weniger Faktoren werden für eine chemometrische Methode benötigt, und dementsprechend robuster ist eine Kalibrierung. (Conzen, 2005)

Es wird zwischen interner und externer Validierung unterschieden. Bei der externen Validierung werden neben den Kalibrationsspektren Testsets definiert und diese mit einer Validierung überprüft. Von allen Spektren werden händisch etwa vier Fünftel als Kalibrationsdatensatz und ein Fünftel als Testset definiert (Yang, 2013). Dabei sollte auf eine gleichmäßige Verteilung der Werte zwischen dem Kalibrationsset und dem Testset geachtet werden. Der Vorteil ist, dass diese Methode als sicher und einfach gilt. Nachteilig ist der hohe Zeitaufwand durch das händische Selektieren der Spektren. Zusätzlich ist die externe Validierung nur für eine größere Menge an Proben und Kalibrationsspektren geeignet. (Conzen, 2005)

Eine häufige und auch hier angewendete Form der Validierung ist die Kreuzvalidierung. Dabei werden alle Proben, die zur Kalibrierung genutzt wurden, auch zur Validierung herangezogen. Bei einem Probensatz von  $n$  Proben werden  $n - 1$  Proben zur Kalibration verwendet. Mit den verbliebenen Proben kann die Validierung, also die Überprüfung der Kalibrierung, durchgeführt werden. Anschließend wird diese Probe wieder dem Kalibrationsset hinzugefügt und die nächste Probe für die Validierung verwendet. Auf diese Weise werden alle Proben einmal aus dem Kalibrationsset entfernt und analysiert. Die interne Validierung ist vor allem bei einem kleinen Probensatz vorteilhaft. (Aschenbroich, 2005)

Um die Ergebnisse der Kreuzvalidierung richtig deuten zu können, gibt es verschiedene aufeinander aufbauende mathematische Ausdrücke, die diese beschreiben.

Es kann nie die gesamte Abweichung zwischen den Matrizen der Laborwerte und denen der Spektraldaten durch die Faktorzerlegung erklärt werden. Das **Residuum** (*Res*) ist der Rest, der nicht durch die Faktorzerlegung beschrieben werden kann. Eine wichtige Rolle spielt dieser Parameter bei der Erkennung von Ausreißern. Je größer das Residuum einer Probe, desto wahrscheinlicher ist es, dass es sich bei der Probe um einen Ausreißer handelt. Das spektrale Residuum (**SpecRes**, Gl. 3-3) ist die Summe aller ausgewählten Frequenzpunkte des Differenzspektrums. (Conzen, 2005; Bruker, 2017)

$$\text{SpecRes} = \sqrt{\sum (x_i - s_i)^2} \quad \text{mit} \quad s_i = \sum t_{i,r} v_r \quad \text{Gl. 3-3}$$

- $x_i$  gemessenes Kalibrationsspektrum
- $s_i$  durch die PLS-Vektoren  $v_r$  rekombiniertes Spektrum
- $v_r$  PLS-Vektoren
- $t_{i,r}$  Score-Koeffizienten

Anschließend kann mithilfe des Residuums der **SSE** (*Sum of Squared Errors*, dt. Summe der Fehlerquadrate) berechnet werden (Gl. 3-4). Das ist die Differenz zwischen den wahren und denen durch die Faktorzerlegung rekonstruierten Werte. Der **SSE** ist also die Summe der Residuenquadrate.

$$\text{SSE} = \sum [\text{Res}_i]^2 \quad \text{Gl. 3-4}$$

**R<sup>2</sup>** beschreibt das Bestimmtheitsmaß einer Kalibrierung, also wie viel Prozent der Probandaten durch das Modell erklärt werden können (Gl. 3-5). Ein hohes Bestimmtheitsmaß bedeutet eine gute Korrelation zwischen den Laborwerten und den Daten der aufgenommenen Spektren. Wichtig ist dabei, dass niedrige **R<sup>2</sup>**-Werte zu schlechteren Analyseergebnissen führen, da es viele Ausreißer gibt. Deshalb wird immer ein möglichst hoher Wert angestrebt. (Conzen, 2005)

$$R^2 = \left( 1 - \frac{\text{SSE}}{\sum_{i=1}^M (y_i - y_m)^2} \right) * 100 \quad \text{Gl. 3-5}$$

- $y_i$  Konzentrationswert der Probe  $i$
- $y_m$  mittlerer Konzentrationswert
- $M$  Anzahl der Standards

Eine ebenfalls wichtige Größe ist der **RMSECV**. Dieser Wert gilt als das übliche Bewertungskriterium einer Kreuzvalidierung und beschreibt seinen Standardfehler. Dieser Fehler ergibt sich aus der Differenz der ermittelten Werte aller Spektren und den tatsächlichen gemessene Konzentrationen aus der Referenzanalytik (Gl. 3-6). Er wird als quantitatives Maß der Genauigkeit angesehen und sollte möglichst gering sein. Der Wert wird nur bei einer internen Validierung genutzt, das bedeutet, wenn der Probensatz sowohl zur Kalibrierung als auch zur

Validierung verwendet wird. Oft ist der RMSECV bei der Validierung einer Methode besser als bei der anschließenden Analyse. (Conzen, 2005)

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{1}{M} * \sum_{i=1}^M (y_{\text{Referenz}} - y_{\text{NIR}})^2} = \sqrt{\frac{1}{M} * \text{PRESS}} \quad \text{Gl. 3-6}$$

**PRESS** (*Predictive Error Sum of Square*) ist der mittlere Vorhersagefehler. Er ergibt sich aus der Quadratsumme der Differenz zwischen den vorhergesagten und den gemessenen Werten (Gl. 3-7). Mit Hilfe dieses Wertes kann die optimale Anzahl an PLS-Faktoren ermittelt werden. (Conzen, 2005)

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^M (y_{\text{Referenz}} - y_{\text{NIR}})^2 \quad \text{Gl. 3-7}$$

**RMSEP** (*Root Mean Square Error of Prediction*) ist der Vorhersagefehler aller Proben ( $n$ ). Er wird für alle Proben durch die Wurzel des Quotienten der mittleren Abweichungsquadrate durch die Probenzahl berechnet (Gl. 3-8). Ein Vorteil bei der Verwendung dieses Wertes ist, dass er in derselben Einheit wie die Referenzmethode angegeben wird. Der Unterschied zum RMSECV ist, dass hier alle Proben zur Fehlervorhersage herangezogen werden. Der RMSEP wird vor allem bei der externen Validierung, also einer Testset-Validierung, genutzt. (Bruker, 2019)

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (y_{\text{Referenz}} - y_{\text{NIR}})^2}{n}} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n}} \quad \text{Gl. 3-8}$$

Ob eine Methode zur Bestimmung unbekannter Proben geeignet ist, ist daran zu erkennen, dass beiden Vorhersagefehler – **RMSEP** und **RESECV** – möglichst gering und gleich groß sind.

**RMSEE** (*Root Mean Square Error of Estimation*) ist die Wurzel des mittleren Fehlerquadrates der Vorhersage. Er wird unter Verwendung der Summe berechnet.  $M$  ist dabei die Anzahl der Proben und  $R$  beschreibt den Rang (Gl. 3-9). (Bruker, 2017; Conzen, 2005)

$$\text{RMSEE} = \sqrt{\frac{1}{M - R - 1} * \text{SSE}} \quad \text{Gl. 3-9}$$

Der **RPD** (*Residual Prediction Deviation*) klärt die Frage, wie robust eine Kalibrierung ist. Es wird ein möglichst hoher Wert angestrebt. Der RPD-Wert wird höher, je mehr Werte in die Kalibrierung eingetragen werden (Tabelle 7). Er wird aus dem Quotienten der Standardabweichung der Referenzwerte (*SD*) und RMSECV gebildet (Gl. 3-10). (Conzen, 2005; Bruker, 2019)

$$\text{RPD} = \frac{\text{SD}}{\text{RMSECV}} \quad \text{mit} \quad \text{SD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (y_{\text{Referenz}} - y_{\text{NIR}})^2}{M - 1}} \quad \text{Gl. 3-10}$$

Tabelle 7: Verteilung der RPD-Werte

(Quelle: geändert nach Bruker, 2019)

<b>RPD-Wert</b>	<b>Klassifizierung</b>
<b>&lt; 3</b>	wenig robust, akzeptables Modell
<b>3 bis 6</b>	so gut wie eine Screeningmethode
<b>6 bis 10</b>	Freigabemethode
<b>&gt; 10</b>	so gut wie die Referenzmethode

Der **Bias**-Wert, auch systematischer Fehler genannt, ist die systematische Abweichung der vorhergesagten Werte von den Laborwerten aufgrund einer bestimmten Kalibrierung (Gl. 3-11). Der Bias wird in Abhängigkeit des ausgewählten Rangs angezeigt. Es kann beispielsweise die Abweichung des durchschnittlichen Messwertes vom durchschnittlichen Laborwert sein. (Bruker, 2019)

$$\text{Bias} = \frac{\sum y_{\text{Referenz}} - y_{\text{NIR}}}{M} \quad \text{Gl. 3-11}$$

Es ist möglich mit der Software OPUS 8 Optimierungen der Kalibrierungen durchzuführen. Dabei werden verschiedene Frequenzbereiche und Datenvorbehandlungsmethoden (erste Ableitung und Vektornormierung) in verschiedenen Kombinationen sukzessive durchgerechnet. Die Ergebnisse der Berechnung werden anschließend tabellarischer Form beginnend mit dem niedrigsten **RMSECV** und niedrigsten Rang dargestellt. Manuell muss anschließend

entschieden werden, mit welcher Optimierung eine neue Validierung durchgeführt werden soll. Dieses entscheidet sich primär an einem möglichst niedrigen Standardfehler. Weiterhin ist für diese Entscheidung der **Rang** von zentraler Bedeutung. Dieser Wert sollte möglichst gering sein. Die erste Wahl fällt auf den Parameter, der den geringsten Standardfehler aufweist. Werden allerdings mehrere Optimierungen mit einem ähnlichen Standardfehler angezeigt, wird der Parameter mit dem niedrigsten Rang gewählt. Maximal können 10 Ränge vergeben werden. Je weniger Ränge, also Faktoren notwendig sind, desto besser und robuster ist die Methode. (Brucker, 2017)

### 3.3 Nasschemische Analysemethoden

#### 3.3.1 Bestimmung des Fettgehaltes

Die Bestimmung des Fettgehaltes erfolgt nach dem Verfahren C 15.3.8 „Butyrometrische Bestimmung des Fettgehaltes von Käse – Verfahren nach Van Gulik“ der VDLUFA (1985). Diese Methode befindet sich auch im LFGB § 64 (L 01.00-20). Das Prinzip der Untersuchungsmethode besteht darin, das Fett in der Probe mit der zugesetzten Schwefelsäure vollständig aufzuschließen. Der Amylalkohol verbessert die Phasentrennung. Nach dem Zentrifugieren der Probe wird der Fettgehalt mithilfe der Skala des Butyrometers abgelesen. (VDLUFA, 1985)

#### Chemikalien

Amylalkohol	Dichte bei 20 °C: 0,811 g/ml
Schwefelsäure	Dichte bei 20 °C: 1,522 g/ml ± 0,005 g/ml; 62 %-ig (frei von Bestandteilen)

#### Geräte und Material

Zentrifuge	RZB: 350 ± 50, beheizbar ( <i>Nova Safety</i> , Funke Gerber, Drehzahl: 1350 U/min, Berlin, Deutschland)
Wasserbad für die Butyrometer	Temperatur von 65 °C ( <i>WB436-D</i> , Funke Gerber, Berlin, Deutschland)
Käsebecher	als Einwägevorrichtung, ohne Loch
Analysewaage	Ablesegenauigkeit 1 mg ( <i>BP 210 S</i> , max. 210 g, d = 0,1 mg, Sartorius Göttingen, Deutschland)
Butyrometergestell	

geeichte Butyrometer	Ablesebereich 0 – 40 %; Skalenteilung 0,5 % (Funke Gerber, Berlin, Deutschland)
Gummistopfen	
Gerät zu Probennahme	Löffel
Abmessvorrichtung	für Schwefelsäure
Eppendorf-Pipette	für Amylalkohol
Schüttelhülse	

Die genaue Beschreibung dieser Methode ist im Anhang (Kapitel 10.1) zu finden.

### 3.3.2 Bestimmung des Trockenmassegehaltes

Zur Bestimmung des Trockenmassegehaltes wird die Folienmethode (VDLUFA – Methode C 35.4, 1985) verwendet. Das Prinzip beruht auf der gleichmäßigen Verteilung der Probe zwischen zwei definiert großen Aluminiumfolien. Durch diese Oberflächenvergrößerung kann die Probe schnell und gleichmäßig bei 102 °C im Trockenschrank getrocknet werden. Sie ist die Schnellmethode zur Referenzmethode (Seesandmethode). (VDLUFA, 1985)

#### Geräte und Material

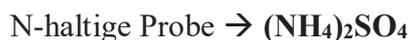
Gerät zur Probennahme	Löffel
Aluminiumfolie	Abmessung 150 * 190 mm, Stärke 0,015 mm
Präzisionswaage	Ablesegenauigkeit 1 mg ( <i>ENTRIS623I-IS</i> , max. 620 g, d = 1 mg, Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Gerät zum Auswalzen der Probe	Reagenzglas
Trockenschrank	Temperatur von 102 ± 2 °C ( <i>Function Line</i> , Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
schwarze Matte aus laminiertem Papier zum Transportieren der Folien	
Pinsel mit weichen Borsten	

Die genaue Beschreibung dieser Methode ist im Anhang (Kapitel 10.1) zu finden.

### 3.3.3 Bestimmung des Rohproteingehaltes

Um den Proteingehalt in einem Lebensmittel zu untersuchen, wird die Methode nach Kjeldahl verwendet (LFBG § 64: L 01.00-10 Teil 1: Kjeldahl-Verfahren und Berechnung des Rohproteingehaltes; DIN EN ISO 8968-1; VDLUFA Methode C 30.2). Dabei wird nicht nur der Stickstoff in Proteinen und freien Aminosäuren erfasst, sondern auch der organisch gebundene Stickstoff von Aromastoffen oder Vitaminen. Der Anteil des organisch gebundenen Stickstoffes in Aromastoffen und Vitaminen ist jedoch so gering, dass dieser vernachlässigt werden kann. Deshalb wird bei der Methode nach Kjeldahl der Gesamtstickstoffgehalt erfasst. Sie ist gleichzeitig die Referenzmethode. Es handelt sich dabei um eine Aufschlussmethode mit anschließender Wasserdampfdestillation und Titration. Die Methode kann in vier einzelne Schritte unterteilt werden. (Matissek, 2018)

1. Saurer Aufschluss



in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Katalysatoren und hoher Temperatur

2. Alkalische Wasserdampfdestillation



3. Auffangen des Ammoniaks



4. Titration



Die Tabellen 3 (Seite 24) und 5 (Seite 26) (Kapitel 3.1 Versuchsplanung) zeigen die zu erwartenden Gehalte an Stickstoff im Versuchsmaterial.

#### Geräte

Aufschlussblock (Kjeldahltherm, Gerhardt, Königswinter, Deutschland)

Wasserdampfdestillierer (FoodALYT D 1000, Bremen, Deutschland)

Analysewaage (Ablesegenauigkeit 1 mg (BP 210 S, max. 210 g, d = 0,1 mg, Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Kjeldahlkolben 500 ml

N-freie Wägeschiffchen

Spatel, Erlenmeyerkolben, Messzylinder, Bechergläser, Bürette, Glasperlen

### Chemikalien

Kjeltabs	quecksilber- und selenfrei
Schwefelsäure	98 %-ig
Entschäumer	Silicon-Antischaumemulsion
Natronlauge	32 %-ig
Borsäure	40 g/l
Mischindikator	für Ammoniaktitrationen, pH 4,4 bis 5,8
Salzsäure	0,1 mol/l
entionisiertes Wasser	

Die genaue Beschreibung dieser Methode ist im Anhang (Kapitel 10.1) zu finden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nasschemische Analysemethoden

Nachfolgend werden die Ergebnisse der nasschemischen Analysemethoden aufgeführt, die für das spätere Erstellen von Kalibrierungen notwendig sind (Tabelle 8). Die Ergebnisse stellen immer das arithmetische Mittel der Mehrfachbestimmung dar. Alle Einzelergebnisse sind im Anhang (Kapitel 10.2 Rohdaten) in Tabelle 12 zu finden.

Tabelle 8: Ergebnisse der nasschemischen Analyse

n = die Anzahl der Wiederholungen

	Probe	TM			Fett		EW	
		[%]	Standardabweichung	n	[%]	n	[%]	n
Technikum	Friskkäse – V1	48,32	1,017	3	31,90	2	k. A.	k. A.
	Friskkäse – V2	48,86	0,115	3	31,10	2	k. A.	k. A.
	Friskkäse – V3	49,24	0,408	3	31,35	2	k. A.	k. A.
	Friskkäse – V4	46,21	0,670	3	30,95	2	k. A.	k. A.
	Friskkäse – V5	45,52	0,996	3	31,35	2	k. A.	k. A.
	Friskkäse – V6	32,28	k. A.	3	1,50	2	23,26	4
	Friskkäse – V7	43,27	k. A.	3	1,50	2	31,94	4
	Mascarpone – V1	51,73	k. A.	2	42,45	2	k. A.	k. A.
	Mascarpone – V2	50,49	k. A.	2	30,00	2	k. A.	k. A.
	Mascarpone – V3	52,67	k. A.	2	39,55	2	k. A.	k. A.
	Mascarpone – V4	53,45	k. A.	2	35,40	2	k. A.	k. A.
	Mascarpone – V5	53,42	k. A.	2	34,00	2	k. A.	k. A.
	Mascarpone – V6	47,90	0,078	3	32,50	2	5,22	2
	Mascarpone – V7	48,84	0,053	3	35,00	2	5,65	2
	Mascarpone – V8	47,30	0,097	3	32,50	2	5,26	2
	Mascarpone – V9	48,72	0,078	3	35,80	2	5,49	2
	Mascarpone – V10	55,44	0,242	4	39,13	4	5,54	4
Industrie	Quark 20 % F.i.Tr.	20,71	0,077	3	4,20	2	10,66	2
	Quark 40 % F.i.Tr.	24,49	0,022	3	10,00	2	9,06	2
	Friskkäse	33,29	0,120	3	24,20	2	4,25	2
	Mascarpone	45,46	0,495	3	37,50	2	k. A.	2

Bei den Proben, bei denen keine Standardabweichung berechnet werden kann, liegen zu wenige Einzelwerte vor.

Bei „Mascarpone“ konnte kein Rohproteingehalt bestimmt werden, da die Probe nicht vollständig aufgeschlossen wurde. Bei den restlichen Proben konnte ebenfalls kein Proteingehalt ermittelt werden.

Die Ergebnisse der Spektroskopie werden nachfolgend in Kapitel 4.2.4 Datenanalyse dargestellt. Zu bemerken ist außerdem, dass es sich bei der Probe „Frischkäse – V6“ und „Frischkäse – V7“ um Versuche mit erhöhtem Proteingehalt handelt. Sie können nicht mit den restlichen Proben verglichen werden. Deshalb bleiben sie in der Methodenentwicklung des Fettgehaltes und der Datenanalyse weitestgehend unberücksichtigt. Allerdings eignen sie sich gut, um die Kalibrierung „Eiweiß“ zu erweitern.

## **4.2 NIR-Spektroskopie**

### **4.2.1 Praxisanleitungen**

Ziel dieser Bachelorarbeit ist nicht nur das Erstellen neuer und das Vervollständigen bestehender Kalibrierungen, sondern auch das Verfassen von Anleitungen zum leichteren Verständnis des Programmes OPUS 8. Mithilfe dieser Anleitungen soll es künftig leichter sein, das Programm zu bedienen, neue Spektren aufzunehmen, Daten zu analysieren und neue Referenzwerte in bestehende Kalibrierungen einzuarbeiten. Auf Grundlage der folgenden Praxisanleitungen wurden die Ergebnisse der NIR-Spektroskopie zusammengetragen. Bei den Anleitungen handelt es sich um eine Abfolge von Arbeitsschritten, die nacheinander durchgeführt werden müssen, um zu einem repräsentativen Ergebnis zu gelangen. Es werden jeweils nur die relevantesten Funktionen des Programmes beschrieben und näher erläutert. Die Zielgruppe sind alle Benutzer, auch aus unterschiedlichen Fachbereichen, die mit diesem Gerät arbeiten.

#### **1. „Anleitung zur Aufnahme von Spektren mit OPUS 8“**

Diese Anleitung beschreibt den ersten Arbeitsschritt, der mit dem Programm durchgeführt wird, wenn eine unbekannte Probe untersucht werden soll. Die Aufnahme eines repräsentativen Spektrums ist wichtig, um später eine genaue Analyse und Vorhersagen zu erhalten.

2. „Anleitung zum Erstellen und Validieren neuer Quant 2 Methoden mit OPUS 8“

Nachdem erste Ergebnisse analysiert wurden, ist die nächste wichtige Aufgabe, die Ergebnisse der unbekanntenen Proben in die Kalibrierungen einzutragen und dadurch die Vorhersagegenauigkeit zu erhöhen. Dabei nutzt das Programm verschiedene Datenvorbehandlungsmethoden und Frequenzbereiche, um die optimalen Ergebnisse zu erzielen.

3. „Anleitung zum Analysieren von aufgenommenen Spektren mit OPUS 8“

Nachdem ein Spektrum aufgenommen wurde, muss es analysiert werden. Diese Anleitung soll den Benutzer dahingehend unterstützen, erste Ergebnisse mit bereits vorhandenen Kalibrierungen zu erhalten. Das erfolgt über die „Dateiliste“. Mit dieser Funktion des Programms können außerdem Zusammenhänge zwischen den Laborwerten und den Vorhersagen des NIR-Gerätes getroffen werden. Diese können sowohl graphisch als auch tabellarisch dargestellt werden. Zusätzlich kann diese Funktion genutzt werden, um mit unabhängigen Proben (Proben, die nicht in die Kalibrierung eingetragen werden) zu überprüfen, wie robust eine Methode ist.

Anmerkungen

In der Software OPUS 8 wird für Kalibrierung der Begriff „Methode“ verwendet.

Der erste Arbeitsschritt besteht aus dem Aufnehmen neuer Spektren (siehe „*Anleitung für die Aufnahme von Spektren mit OPUS 8*“) von für das Gerät unbekanntenen Proben. Anschließend sollte die mit dem FT-NIR-Spektrometer gemessene Probe im Labor nasschemisch untersucht werden. Es ist ratsam, dieselbe Probe zu verwenden, da sich die Zusammensetzung des Probenmaterials geringfügig ändern kann. Zu beachten ist außerdem, dass die gewählten nasschemischen Analysemethoden repräsentativ sind. Dabei muss nicht zwingend die für den zu untersuchenden Inhaltsstoff vorgeschriebene Referenzmethode verwendet werden. Die Methoden sollten gut beherrscht werden, denn die Laborwerte werden grundsätzlich als wahre Werte angenommen.

Beim Messen der Proben muss darauf geachtet werden, dass ein nachvollziehbarer Dateiname gewählt wird. Ein sinnvoller Dateiname ist beispielsweise die Nennung des Produktes und des Datums. Sollte bereits die Referenzanalytik für die jeweilige Komponente (= der zu analysierende Inhaltsstoff) durchgeführt worden sein, kann der jeweilige Wert ebenfalls mit in den Dateinamen eingefügt werden. Es erleichtert anschließend das Erstellen einer neuen Kalibrierung

und sorgt dafür, dass die Spektren den richtigen Laborwerten zugeordnet werden können. Es wird empfohlen, immer mindestens zwei Spektren von einer Probe aufzunehmen. Wird eine neue Probe gemessen, muss lediglich der Probenname und nicht der Dateiname geändert werden.

## 1) Anleitung zur Aufnahme von Spektren mit OPUS 8

Die Messung erfolgt je nach Probe in einer Durchflusszelle mittels Transmission (Milch, Sahne, weitere flüssige Produkte) oder in einer Glas- oder Polystyrolpetrischale mittels diffuser Reflexion (feste und halbfeste Proben, zum Beispiel gesäuerte Milchprodukte (Frischkäse, Mascarpone, Joghurt), Wurstwaren oder Schokolade).

Die folgende Anleitung bezieht sich auf die Messung von Frischkäse in diffuser Reflexion in einer Polystyrolpetrischale (PSPD).

Sollte die Messung dennoch in Glaspetrischalen durchgeführt werden, stehen geeignete Schalen zur Verfügung. Diese dienen der Mehrfachverwendung.

### Vorbereitende Schritte:

- Zunächst muss die Probe mit einer Schichtdicke von ca. 1 cm in eine PSPD gefüllt werden. Die Temperatur der Probe sollte der Raumtemperatur angeglichen sein.<sup>1</sup> Das NIR-Spektrum ist temperaturabhängig. Die besten Ergebnisse werden bei Raumtemperatur erzielt.
- Es ist darauf zu achten, dass möglichst wenig Lufteinschlüsse am Boden zu sehen sind. Diese können mithilfe eines Löffels entfernt werden. Sollten noch Luftblasen zu sehen sein, kann die Messung dennoch durchgeführt werden. Da der Probenträger rotiert, kann ein repräsentatives Ergebnis erzielt werden.
- Die Probenmenge sollte so groß sein, dass kein NIR-Licht durch die Probe scheint.
- Von außen sollte die Petrischale sauber sein, ansonsten führt dies zu falschen Ergebnissen.
- Mithilfe eines Löffels kann abschließend die Oberfläche glattgestrichen werden.
- Die Petrischale wird mit dem Deckel verschlossen und in den rotierenden Probenträger gestellt.

---

<sup>1</sup> siehe Kapitel 3.2.1 Software OPUS 8, Seite 28

Schritt	Arbeitsanweisung
1	<p>Nach dem Anmelden in das Programm OPUS 8 kann mit folgendem Icon  die Aufnahme für ein neues Spektrum gestartet werden.</p>
2	<p>Es öffnet sich folgendes Fenster (Abbildung 1) mit der Registerkarte „<b>Grundeinstellungen</b>“. Hier können verschiedene Grundeinstellungen vorgenommen werden und sowohl die Hintergrundmessung (durchgezogener Kreis) als auch die Messung der unbekannt Probe (gestrichelter Kreis) gestartet werden.</p> <p>Zunächst muss eine Experimentierdatei geladen werden, zum Beispiel „MPAII_Curd_B.XPM“ für die Messung von Frischkäse und Mascarpone. Dort sind bereits verschiedene Grundeinstellungen hinterlegt.<sup>2</sup> Alle Einstellungen können jedoch unter den Registerkarten „<b>Erweitert</b>“ (Abbildung 2) und „<b>Optikparameter</b>“ (Abbildung 3) verändert werden.</p> <div data-bbox="338 853 1378 1671" data-label="Image"> </div> <p style="text-align: center;">Abbildung 1: Messung – Grundeinstellungen</p> <p>Anschließend muss ein Probenname eingetragen werden. Dieser Name sollte sinnvoll gewählt werden, denn es erleichtert die anschließende Erstellung bzw. Vervollständigung neuer Methoden.</p>

<sup>2</sup> siehe Kapitel 3.2.1 Software OPUS 8, Seite 26

Danach kann ein Hintergrundspektrum (Abbildung 1) aufgenommen werden. Dabei wird nur das NIR-Licht gemessen. Es ist sinnvoll, einen Zeitraum festzulegen, nach welchem das Hintergrundspektrum erneuert werden sollte.<sup>3</sup>

3 Die nächste Registerkarte „**Erweitert**“ (Abbildung 2) kann geöffnet werden. Hier können weitere Grundeinstellungen vorgenommen werden, wie zum Beispiel die Änderung der Anzahl der Scans und der Auflösung. Dabei ist eine Auflösung von  $16\text{ cm}^{-1}$  und die Aufnahme von 64 Scans eine übliche Einstellung. Die Auflösung von  $16\text{ cm}^{-1}$  wird normalerweise bei Feststoffen verwendet.

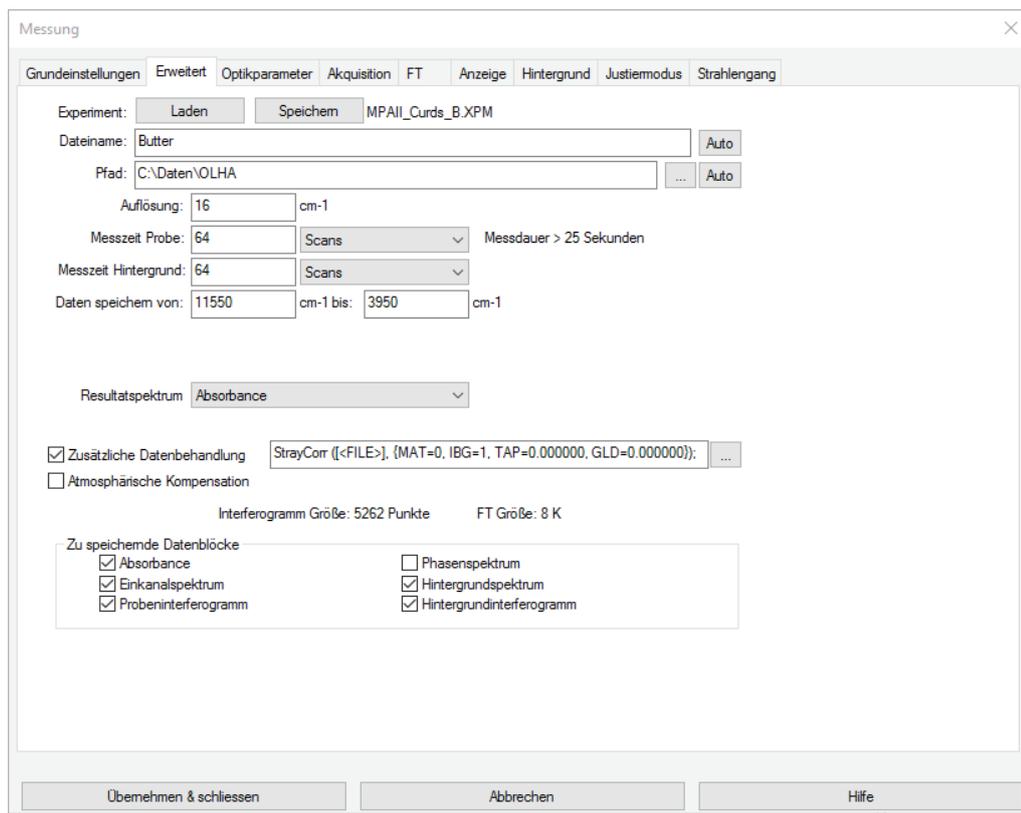


Abbildung 2: Messung – Erweitert

Außerdem kann an dieser Stelle der Speicherpfad für die aufgenommenen Spektren festgelegt werden.

Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, unter „Dateiname“ die Bezeichnung <SNM> einzutragen. Dann wird der Probenname automatisch übernommen. Wird die Probe gewechselt, muss nur der Probenname geändert werden.

<sup>3</sup> siehe Kapitel 3.2.1 Software OPUS 8, Seite 27

Bei „*Resultatspektrum*“ kann zwischen mehreren Alternativen ausgewählt werden. Sinnvoll ist jedoch, sich die Wellenzahl [in  $\text{cm}^{-1}$ ] gegenüber der Absorption im Graphen anzeigen zu lassen.

4 In der Registerkarte „*Optikparameter*“ (Abbildung 3) können weitere Einstellungen vorgenommen werden.

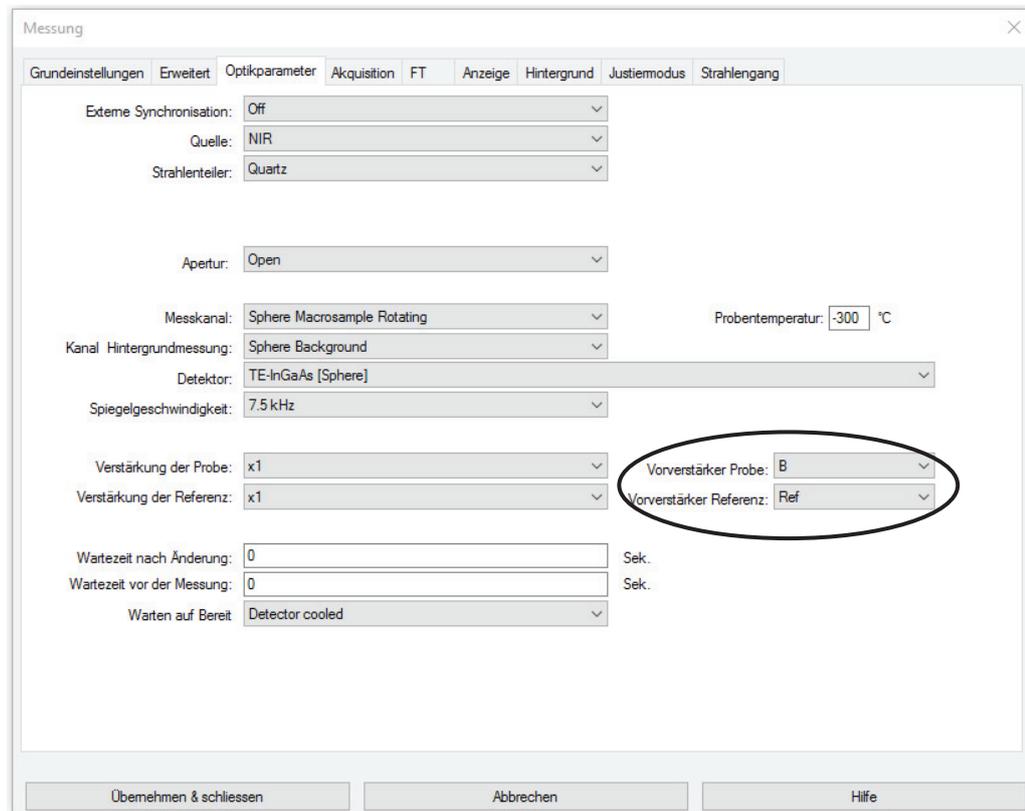


Abbildung 3: Messung – Optikparameter

Wird ein anderer Messkanal gewählt, zum Beispiel die Durchflusszelle, ist eine Beheizung des NIR-Spektrometers möglich. Steht bei der Probentemperatur allerdings „-300 °C“, wird das Gerät aktuell nicht beheizt. (Die Probentemperatur von -300 °C ist seitens des Herstellers festgelegt und kann nicht verändert werden.)

Eine wichtige Einstellung, die in dieser Registerkarte vorgenommen werden kann und die großen Einfluss auf das Probenspektrum hat, ist die Festlegung eines bestimmten Vorverstärkers der Probe (Abbildung 3 schwarz gekennzeichnet). Sind bestimmte Proben besonders inhomogen oder haben besonders viele Hohlräume, können Teile des NIR-Lichtstrahls verloren gehen und somit die Messung verfälschen. Durch die Aktivierung des Vorverstärkers wird das Lichtsignal intensiviert. Welcher Verstärker am besten gewählt werden soll, ist unter anderem

abhängig von der Farbe der Probe. Für Frischkäseprodukte ist der Vorverstärker „B“ empfehlenswert. Es können vier verschiedene Vorverstärker gewählt werden.

„REF“ = ohne Vorverstärkung

„A“ = 3x „REF“

„B“ = 30x „A“

„C“ = 300x „B“

5 Die Auswirkung des gewählten Vorverstärkers kann in der Registerkarte „Justiermodus“ (Abbildung 4) betrachtet werden. Die Amplitude des Interferogrammpicks sollte zwischen 1000 und 20000 liegen. Ist dies nicht der Fall, muss der Vorverstärker geändert werden.

Außerdem wird ein vorläufiges Bild des Probenspektrums angezeigt. Ist das Probenspektrum „gezackt“ oder „zittert“, sollte die Wahl des Vorverstärkers geändert werden. Der Detektor ist dann überladen oder das Spektrum „rauscht“. Ein Negativbeispiel zeigt Abbildung 5.

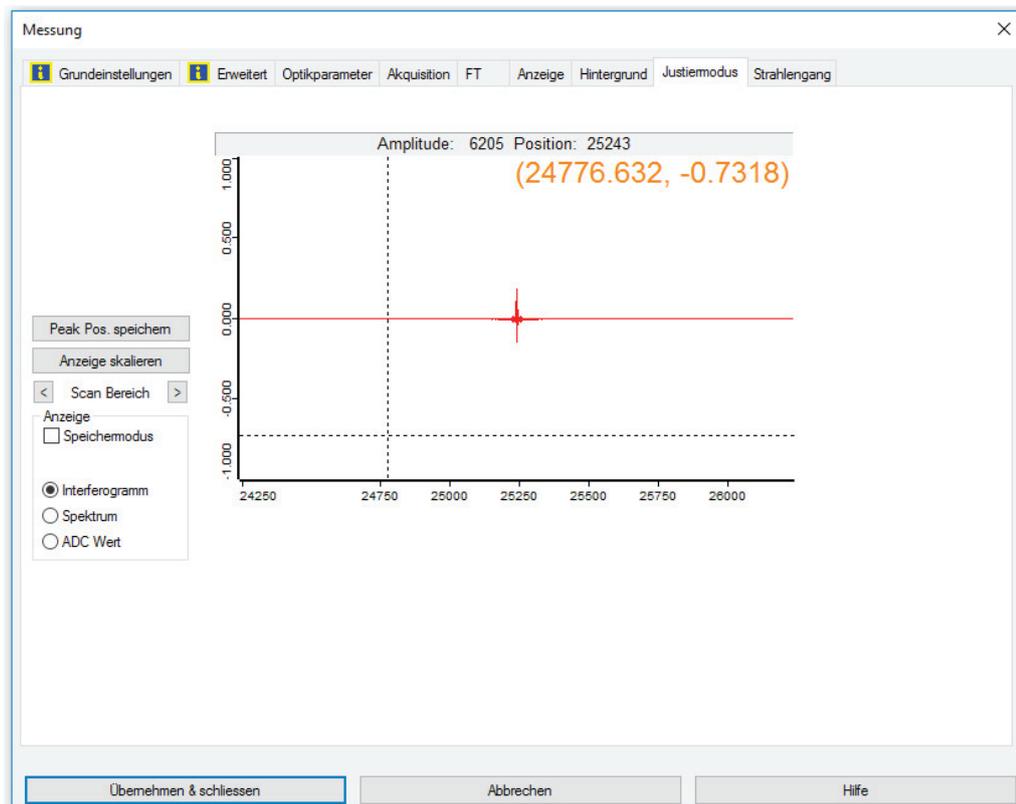


Abbildung 4: Messung – Justierparameter

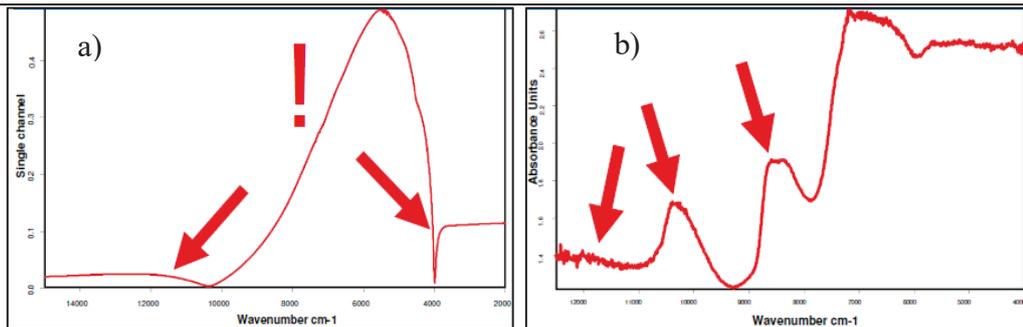


Abbildung 5: Überladender Detektor (a) und „verrausches“ Spektrum (b)  
(Quelle: Bruker, 2019)

6 Nachdem alle Einstellungen vorgenommen wurden, kann die Messung der zuvor in den Probenrotator gestellten Probe in der Registerkarte „**Grundeinstellungen**“ (Abbildung 1) unter „*Probenmessung*“ gestartet werden. In der Statusleiste des Programms kann der Fortschritt der Messung verfolgt werden. Die Spektren werden automatisch in dem zuvor festgelegten Ordner gespeichert und sind zu jedem späteren Zeitpunkt erneut abrufbar.

7 In den restlichen Registerkarten müssen keine weiteren Einstellungen vorgenommen werden.

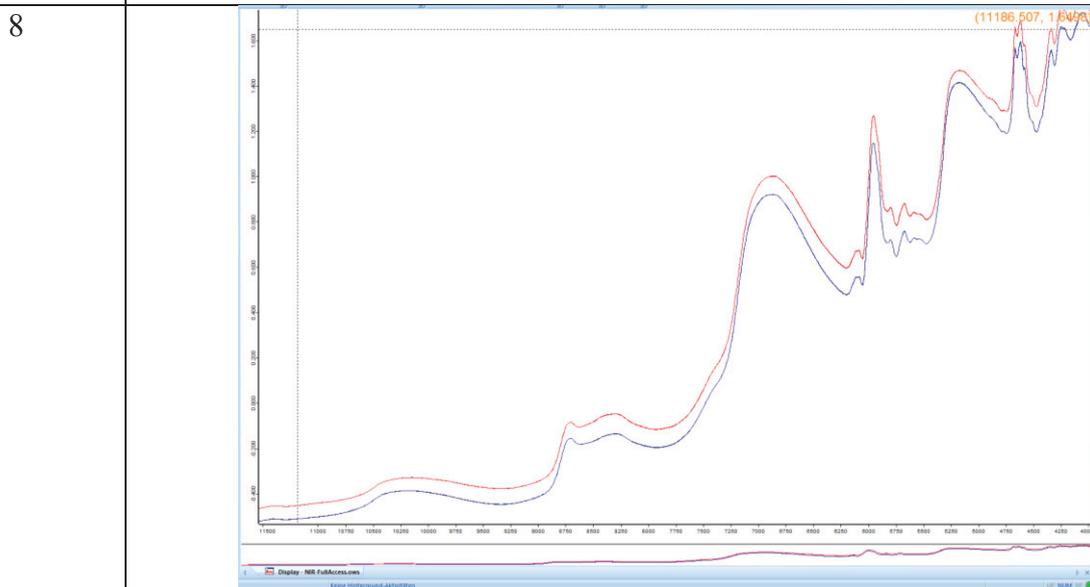


Abbildung 6: Aufgenommenes Spektrum

Ist die Probenmessung abgeschlossen, erscheint im x-y-Diagramm das Spektrum. (Abbildung 6). Sollten Teile des Spektrums abgeschnitten sein, kann die Darstellung durch das Icon „*Skalieren*“  optimiert werden. Auf der x-Achse wird die Wellenzahl [ $\text{cm}^{-1}$ ] und auf der y-Achse die Absorption aufgetragen.

Mit dem Fadenkreuz, das im Diagramm sichtbar ist, können genaue Koordinaten aufgerufen sowie Abschnitte des Spektrums vergrößert werden.

Das in Abbildung 6 dargestellte Spektrum ist ein optimales Spektrum für Frischkäse. Allein aus dem Spektrum können ohne die statistische Analyse jedoch noch keine Daten ausgelesen werden.<sup>4</sup>

Das Programm gibt keine Meldung, ob die Messung „ok“ ist oder wiederholt werden muss. Es ist sinnvoll, immer eine Doppelbestimmung<sup>5</sup> einer Probe durchzuführen, da die Spektren minimal voneinander abweichen können.

---

<sup>4</sup> siehe Kapitel 4.2.2 Spektren

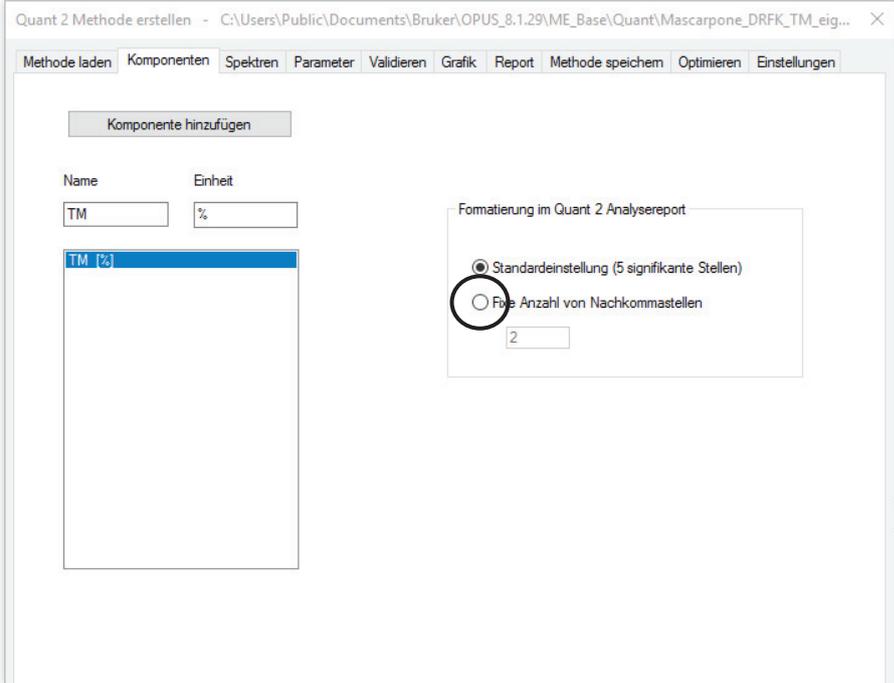
<sup>5</sup> Bruker, 2019

## 2.1) Anleitung zum Erstellen und Validieren neuer Quant 2 Methoden mit OPUS 8

Nachfolgend werden das **Erstellen und Validieren einer neuen Methode** (= Kalibrierung) detailliert erläutert. Dabei wird beispielhaft auf Trockenmasse eingegangen.

Der Begriff „Methode“ bedeutet im Zusammenhang mit der Software OPUS 8 (Firma Bruker Optik aus Ettlingen), dass dort alle gemessenen Spektren mit ihren dazugehörigen Laborwerten hinterlegt sind. Erst durch das Erstellen bzw. Vervollständigen von Methoden können sichere Vorhersagen zu Inhaltsstoffen getroffen werden.

Es wird davon ausgegangen, dass zu diesem Zeitpunkt bereits Messungen unbekannter Proben vorgenommen sowie die Referenzanalytik im Labor durchgeführt wurde.

Schritt	Arbeitsanweisung
1	Nach dem Anmelden in das Programm OPUS, wird das Fenster „Quant 2 Methode erstellen“ über folgendes Icon  geöffnet.
2	Zum Erstellen einer neuen Methode muss unter der ersten Registerkarte „ <b>Methode laden</b> “ keine Einstellung vorgenommen werden.
3	 <p>Abbildung 1: Quant 2 Methode erstellen – Komponenten</p>

	<p>In der zweiten Registerkarte „<b>Komponenten</b>“ muss zunächst „<i>Komponenten hinzufügen</i>“ ausgewählt werden. Dann erscheint die eine Zeile, die im unteren Bild zu sehen ist (Abbildung 1). Dort kann die gewünschte Komponente, in diesem Beispiel die Trockenmasse, und die dazugehörige Einheit, in diesem Beispiel die Einheit %, ausgewählt werden. Außerdem sollte die Anzahl der Nachkommastellen entsprechend der Genauigkeit der Referenzmethode angepasst werden.</p>
4	<p>Im nächsten Schritt wird die Registerkarte „<b>Spektren</b>“ (Abbildung 2) aufgerufen. Wenn eine neue Methode erstellt wird, ist hier noch keine Tabelle zu sehen. Die Spektren, für die neue Methoden verwendet werden sollen, können durch den Button „<i>Spektren hinzufügen</i>“ eingefügt werden. Anschließend erscheinen die ausgewählten Spektren in tabellarischer Form im Fenster (siehe unten). In der Spalte „<i>TM</i>“ müssen nun manuell die Referenzwerte für die Trockenmasse eingetragen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die richtigen Laborwerte zu den dazugehörigen Spektren eingefügt werden.</p> <p>Zusätzlich können ausgewählte Spektren auf „<i>Kalibration</i>“, „<i>Test</i>“ oder „<i>nicht aktiv</i>“ (schwarz gekennzeichnet) gesetzt werden. Das erleichtert die Zuordnung der Spektren zu einem bestimmten Datensatz. Die Spektren, die auf „<i>Kalibration</i>“ gesetzt werden, werden für die Kreuzvalidierung (interne Validierung)<sup>6</sup> verwendet. Wird „<i>Test</i>“ ausgewählt, werden diese Spektren zur Testset-Validierung (externe Validierung)<sup>7</sup> genutzt. Spektren, bei denen kein Referenzwert vorhanden ist, können mit „<i>nicht aktiv</i>“ markiert werden. Dazu wird zunächst auf die Schaltfläche „<i>Datensatz</i>“ geklickt und anschließend das Fenster „<i>Spezialfall</i>“ geöffnet. Dann werden alle Spektren grau hinterlegt und auf „<i>nicht aktiv</i>“ gesetzt, zu denen es keine Referenzwerte gibt. Diese werden anschließend nicht in der Kreuzvalidierung berücksichtigt.</p> <p>Unter dem Button „<i>Datensatz</i>“ können außerdem einzelne ausgewählte Spektren zur besseren Differenzierung farblich markiert werden. Dieses ist sinnvoll, wenn neue Werte zu einer bestehenden Methode hinzugefügt wurden und um zu schauen, ob sie in die Kreuzvalidierung passen. Um die Markierung wirksam zu machen, muss nach der gewünschten Farbauswahl auf den Button „<i>Farbe setzen</i>“ geklickt werden.</p>

<sup>6</sup> siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Seite 31

<sup>7</sup> siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Seite 31

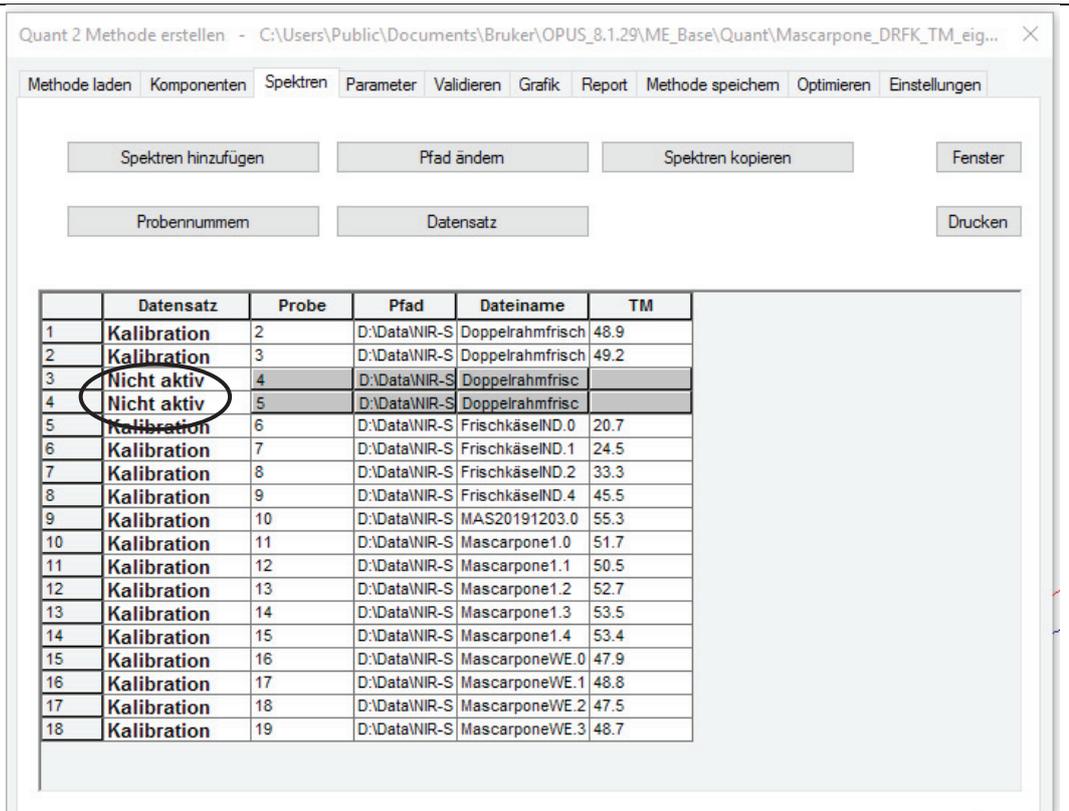


Abbildung 2: Quant 2 Methode erstellen – Spektrien hinzufügen

5

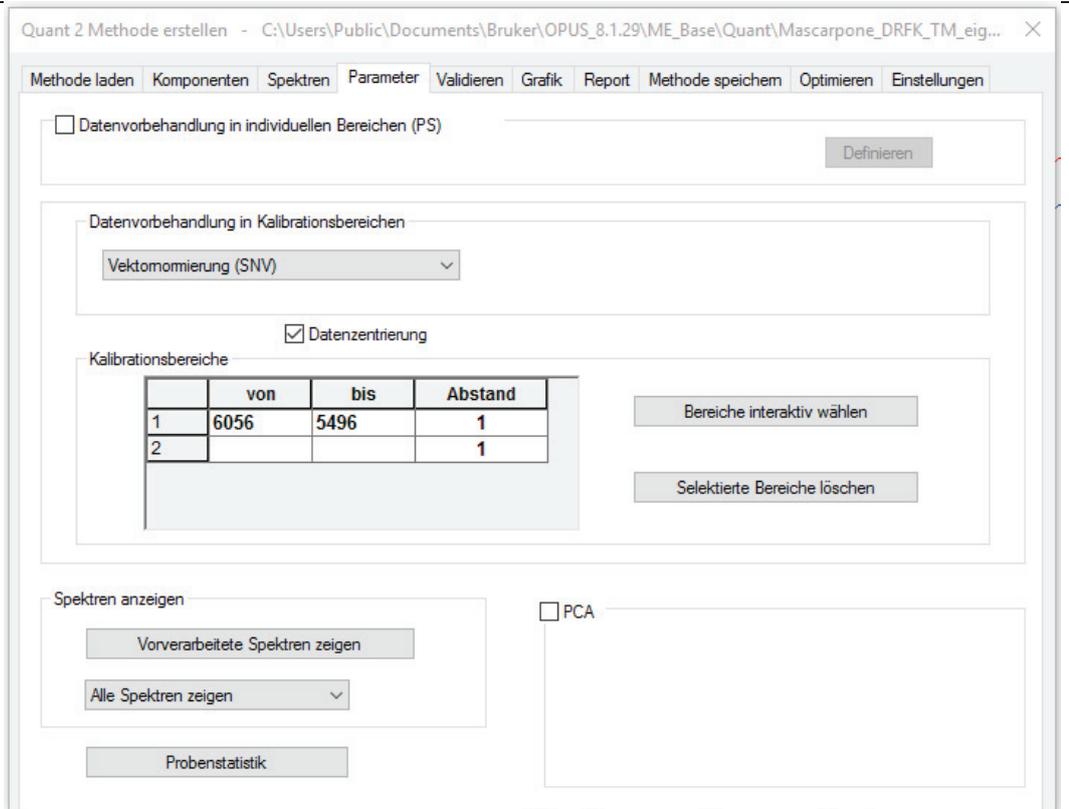


Abbildung 3: Quant 2 Methode erstellen – Parameter

Die nächste Registerkarte, die geöffnet wird, hat die Bezeichnung „**Parameter**“ (Abbildung 3). In dieser Registerkarte können bestimmte Frequenzbereiche eingegrenzt werden, die bei der Datenvorbehandlung berücksichtigt werden sollen. Dabei können ein oder mehrere Bereiche ausgewählt werden. Die Auswahl bestimmter Bereiche kann entweder über die Tabelle oder über die Schaltfläche „*Bereiche interaktiv wählen*“ getroffen werden. Wird auf den Button geklickt erscheinen alle Spektren, die zur Validierung genutzt werden. Diese Einstellung kann jedoch nur vorgenommen werden, wenn es sich um die Erstellung eigener Methoden handelt. Die Methoden bzw. Kalibrierungen des Herstellers sind geschützt, weshalb der Button „*Bereiche interaktiv wählen*“ nicht ausgewählt werden kann.

6 Der nächste Schritt ist das Validieren der eingetragenen Komponenten. In der Registerkarte „**Validieren**“ (Abbildung 4) muss auf „**Validieren**“ (schwarz gekennzeichnet) geklickt werden. Es erscheint ein neues Fenster, in dem die aktuelle Validierung umbenannt werden kann. Anschließend muss die Validierung mit „*ok*“ bestätigt werden.

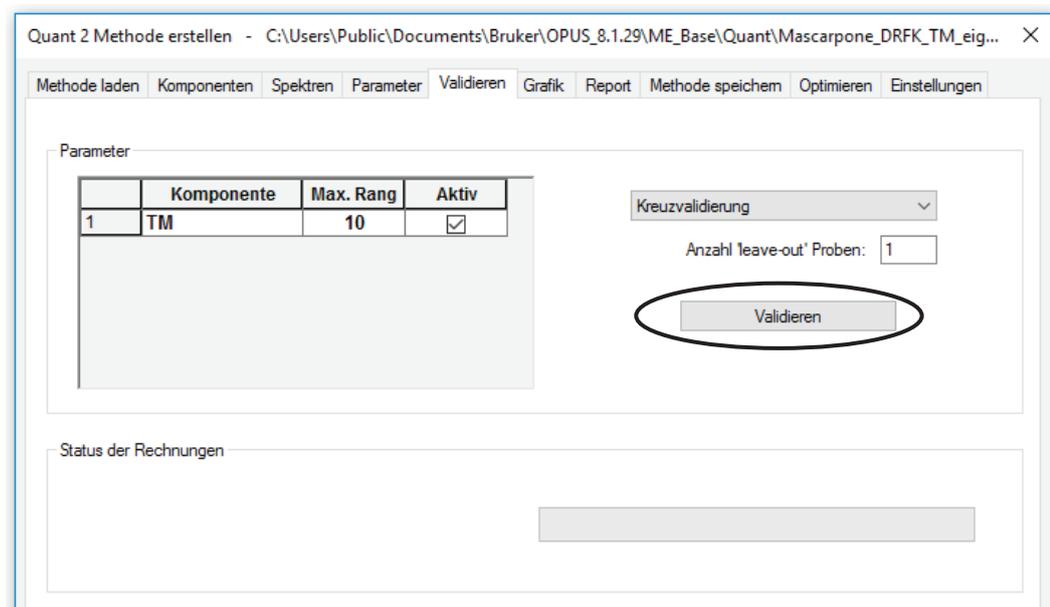


Abbildung 4: Quant 2 Methode erstellen – Validieren

7 Sobald die Validierung bestätigt ist, öffnet sich die Registerkarte „**Grafik**“ (Abbildung 5). Dort wird die Kreuzvalidierung angezeigt. Außerdem wird der  $R^2$ -Wert<sup>8</sup> (Bestimmtheitsmaß), der RMSECV-Wert<sup>9</sup> (*Root Mean Square Error of Cross Validation*, dt. Standardfehler der Kreuzvalidierung)

<sup>8</sup> siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Gleichung 3-5

<sup>9</sup> siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Gleichung 3-6

und der RPD-Wert<sup>10</sup> (*Residual Prediction Deviation*) angezeigt. Der RPD-Wert gibt dabei an, wie gut bzw. robust eine Kalibrierung ist. Je höher der Wert, desto besser und genauer ist die Methode. Aus diesem Grund wird immer ein möglichst hoher Wert angestrebt.

Die Linie in der Grafik der Kreuzvalidierung ist keine Regressionsgerade, sondern eine 45°-Linie. An ihr werden die Referenzwerte positioniert. Im Diagramm wird der Laborwert (x-Achse) gegenüber der Vorhersage des NIR-Gerätes (y-Achse) aufgetragen (Abbildung 5). Die Grafik „Vorhersage vs. Wahr“ ist sehr aussagekräftig. Es kann erkannt werden, wie gut die Werte zueinander passen. Weiterhin können in dieser Registerkarte verschiedene Grafiken aufgerufen werden (gestrichelter Kreis).

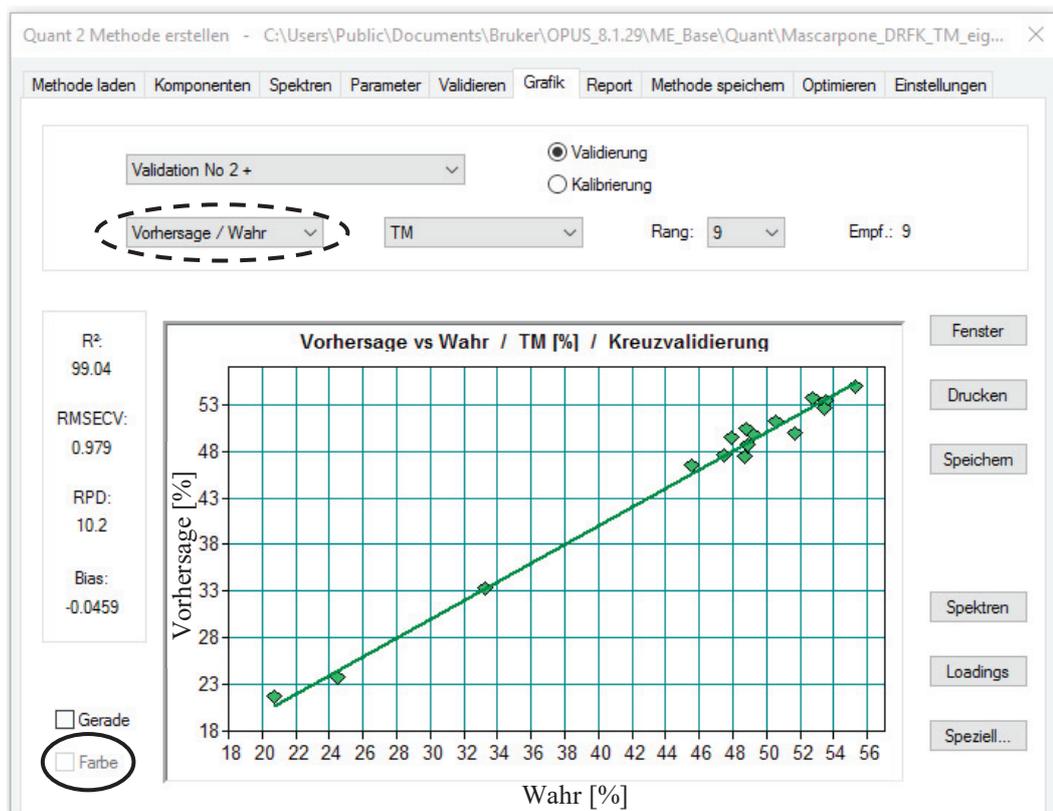


Abbildung 5: Quant 2 Methode erstellen – Grafik

Wurden zuvor in der Registerkarte „*Spektren*“ einige Werte farblich hinterlegt, kann nun ein Haken bei „*Farbe*“ (durchgezogener Kreis in Abbildung 5) gesetzt werden. Die zuvor markierten Spektren werden in der Kreuzvalidierung zur

<sup>10</sup> siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Gleichung 3-10

besseren Differenzierung bunt angezeigt. So kann auf einen Blick erkannt werden, ob die neuen Werte in die Kalibrierung passen oder nicht.

8

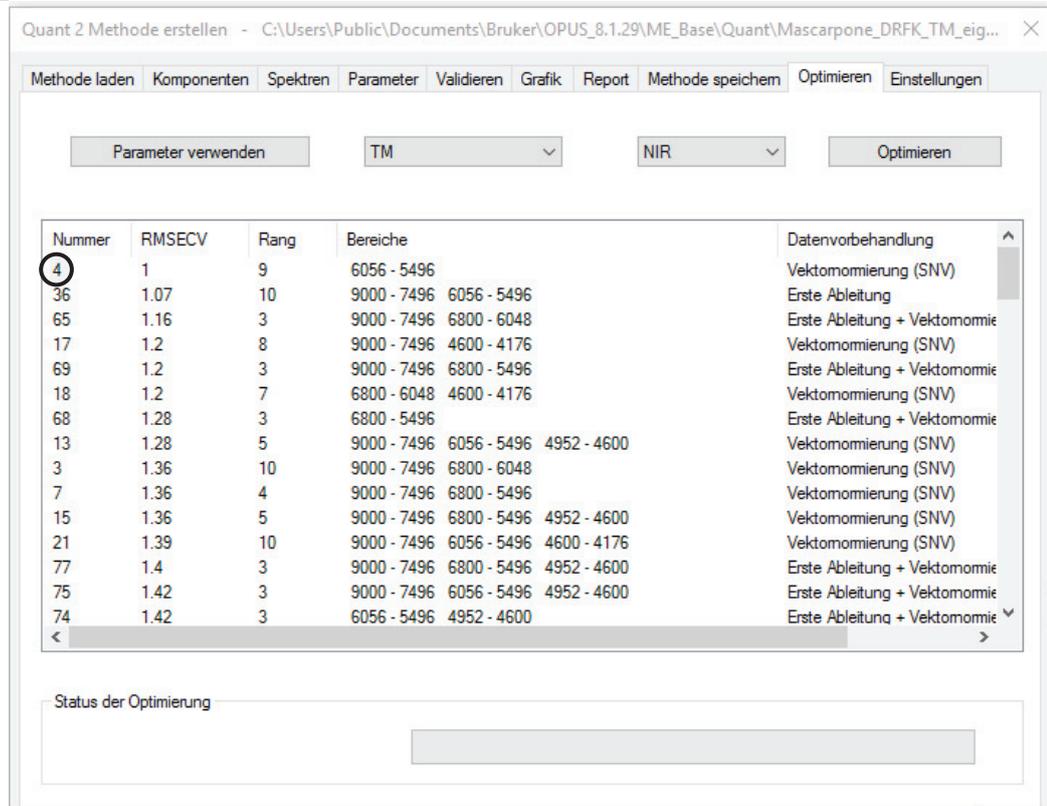


Abbildung 6: Quant 2 Methode erstellen – Optimieren

Die erste Validierung ist nun abgeschlossen. Anschließend folgt die Optimierung. Dazu muss die Registerkarte „*Optimieren*“ (Abbildung 6) geöffnet werden. Beim Erstellen einer neuen Methode ist dieses Fenster noch leer. Es gibt nur die Option „*Optimieren*“. Diese wird ausgewählt. Die zuvor erstellte Validierung wird anschließend automatisch optimiert. Die Optimierungen können je nach Größe des Datensatzes sehr zeitaufwendig sein. Sobald die Berechnung abgeschlossen ist, muss das beste Ergebnis der Optimierung manuell ausgewählt werden (siehe Abbildung 6)<sup>11</sup>. Dabei wird vorrangig auf einen niedrigen Rang<sup>12</sup> (entspricht der Anzahl der Hauptkomponenten einer PLS-Regression) und einen niedrigen RMSECV-Wert geachtet. Standardmäßig ist die Tabelle nach dem niedrigsten RMSECV-Wert sortiert. Die Sortierung kann allerdings manuell verändert werden. Besitzt eines der Optimierungsergebnisse nun einen besonders niedrigen RMSECV-Wert und ebenfalls einen niedrigen Rang, wird die entsprechende

<sup>11</sup> siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Seite 34

<sup>12</sup> siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Seite 30

Nummer angeklickt. In Abbildung 6 entsprechen die Vorgaben der schwarz gekennzeichneten Nummer 4. Nun wird auf „Parameter verwenden“ geklickt. Es erscheint erneut die Registerkarte „Validieren“ (Abbildung 4), in der „Validieren“ angeklickt werden muss. Anschließend öffnet sich die Registerkarte „Grafik“ (Abbildung 5), bei der die neue Validierung im Vergleich zu der vorherigen Validierung ohne Optimierung angezeigt wird.

9

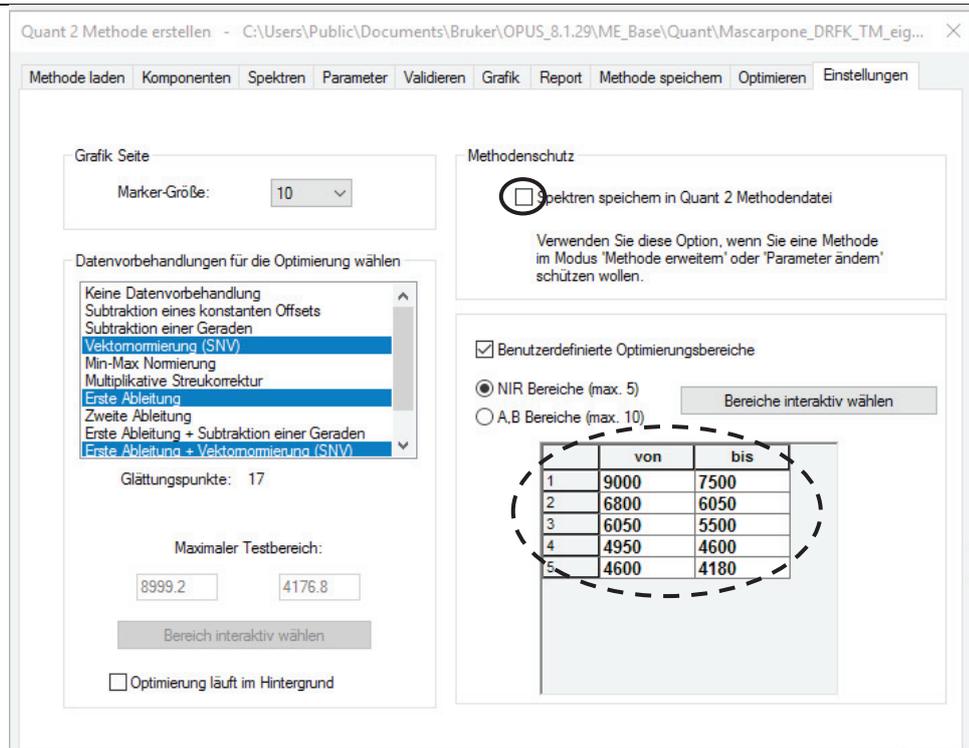


Abbildung 7: Quant 2 Methode erstellen – Einstellungen

In der Registerkarte „Einstellungen“ können benutzerdefinierte Optimierungsbereiche ausgewählt werden. Durch die ausgewählten Frequenzbereiche, die in Abbildung 7 eingetragen wurden, werden die NIR-Banden der Wasserabsorption ausgeschlossen. (Diese Werte sind zusätzlich in der PDF-Datei mit dem Namen „Kopie von 120312 Spectral Ranges AFF“ zu finden.) Die Frequenzbereiche können auch einkalibriert werden. Ist allerdings die Vorhersage der Werte schlecht, können die Frequenzbereiche der Wasserabsorption an dieser Stelle ausgeschlossen werden.<sup>13</sup>

Eine wichtige Einstellung, auf die immer geachtet werden sollte, ist das Setzen des Hakens bei „Methodenschutz“.

<sup>13</sup> Bruker, 2019

10

Als letzter Schritt muss die Methode gespeichert werden. Das geschieht unter der Registerkarte „*Methode speichern*“ (Abbildung 8). Der gewünschte Speicherort und Name kann nun eingetragen werden. Es empfiehlt sich, eindeutige Name zu vergeben.

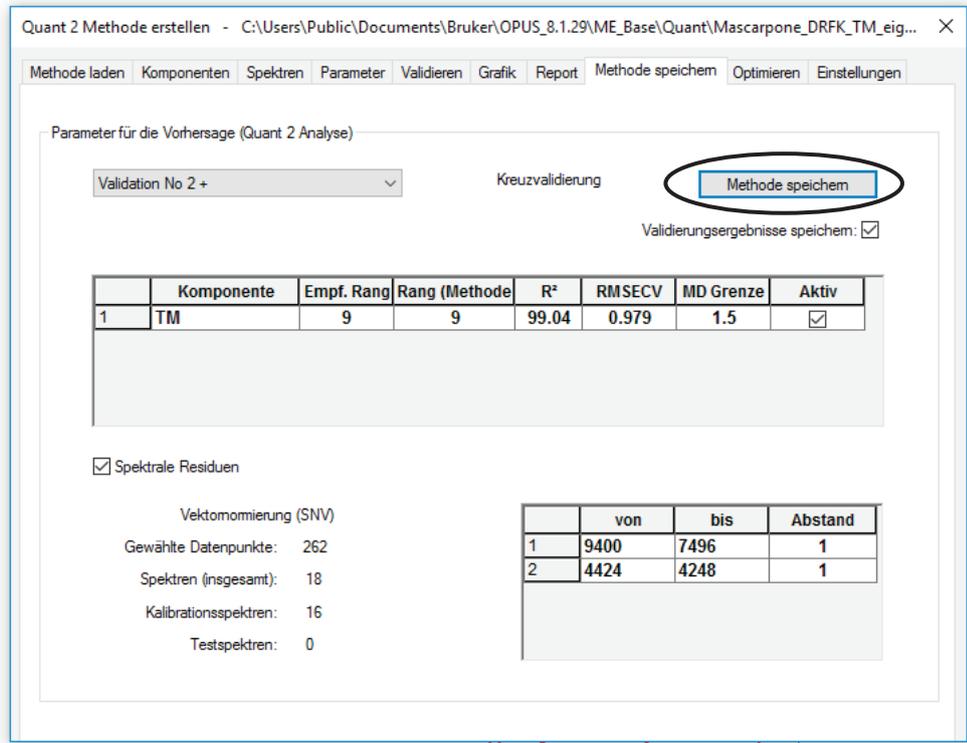


Abbildung 8: Quant 2 Methode erstellen – Methode speichern

## 2.2) Vervollständigen einer bestehenden Quant 2 Methode

Sollten zu einer bestehenden Methode neue Werte eingetragen werden, muss unter der ersten Registerkarte des Fensters „**Quant 2 Methode laden**“ „Methode laden“ (Abbildung 9) gedrückt werden. Es erscheint ein neues Fenster aus dem Explorer, aus dem die zu verändernde Methode geladen werden kann. Die Methodendateien haben die Endung .q2.

Darunter ist ein Überblick über die Methode aufgelistet. Er beinhaltet diverse Informationen, wie zum Beispiel die Anzahl der Spektren, der Kalibrationsproben und der in die Kalibrierung eingetragenen Proben.

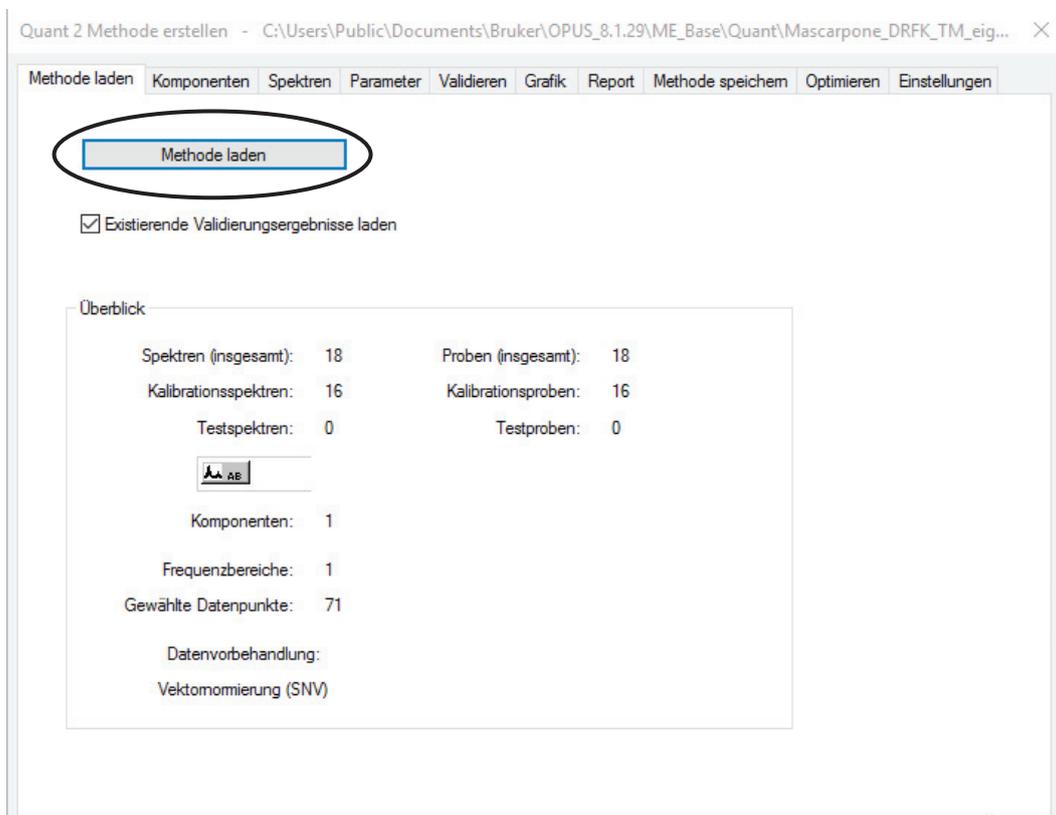


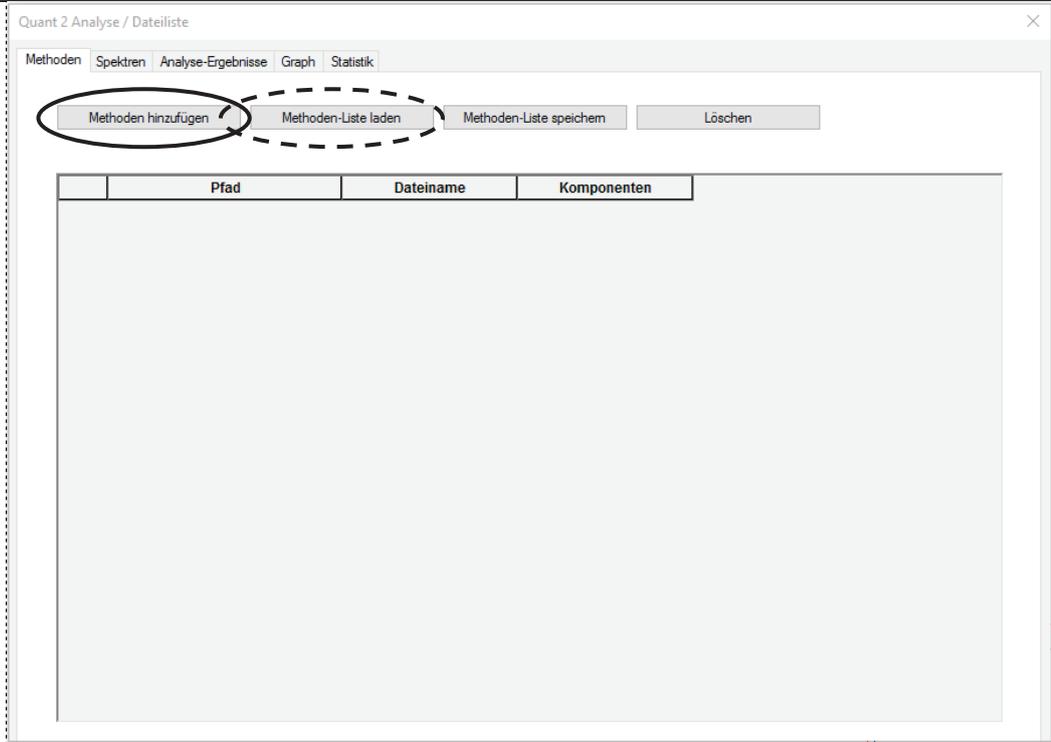
Abbildung 9: Quant 2 Methode erstellen – Methode laden

Anschließend können alle Arbeitsschritte ab Nummer 3 der Anleitung „Methode erstellen“ wiederholt werden.

### 3) Anleitung zum Analysieren von aufgenommenen Spektren mit OPUS 8

Neue Proben können direkt nach der Aufnahme der Spektren analysiert werden. Es ist aber auch möglich, bereits gespeicherte Spektren zu einem späteren Zeitpunkt zu analysieren. Dazu ist es hilfreich, aber nicht unbedingt notwendig, wenn bereits die Ergebnisse der Laborwerte zu den einzelnen zu untersuchenden Inhaltsstoffen vorliegen.

Diese Anleitung beschäftigt sich, im Gegensatz zu der Anleitung des Erstellens einer neuen Methode, mit der Analyse der Spektren. Auch hierzu wird die PLS-Regression verwendet<sup>14</sup>. Allerdings wird hier nicht die Methode validiert, sondern es wird überprüft, wie gut die Vorhersagen der Werte mit einer bestimmten Methode sind.

Schritt	Arbeitsanweisung
1	<p>Nachdem die Spektren aufgenommen (und eventuell bestehende Methoden vervollständigt bzw. neue Methoden erstellt) wurden, können nun sowohl bekannte als auch unbekannte Proben analysiert werden. Dazu wird mit folgendem Icon  das Fenster „<i>Quant 2 Analyse / Dateiliste</i>“ geöffnet.</p>
2	 <p style="text-align: center;">Abbildung 1: Quant 2 Analyse / Dateiliste – Methoden</p>

<sup>14</sup> siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Seite 29

Das Fenster „**Quant 2 Analyse / Dateiliste**“ öffnet sich mit der Registerkarte „**Methoden**“ (Abbildung 1). Dort können nun „**Methoden hinzugefügt**“ (durchgezogener Kreis) werden. Dabei ist es möglich, mehrere Methoden (zum Beispiel „**Curds\_DM**“, „**Curds\_Fat**“ und „**Curds\_Protein**“ sowie die neu erstellten Methoden<sup>15</sup>) hinzuzufügen. Außerdem können in diesem Fenster „**Methodenlisten**“ (gestrichelter Kreis) erstellt werden. Das erleichtert den späteren Zugriff und erspart das mühsame Auswählen einzelner Methoden. Die einzelnen Methoden erscheinen dann in tabellarischer Form im Fenster.

3 Die nächste Registerkarte „**Spektren**“ (Abbildung 2) kann geöffnet werden.

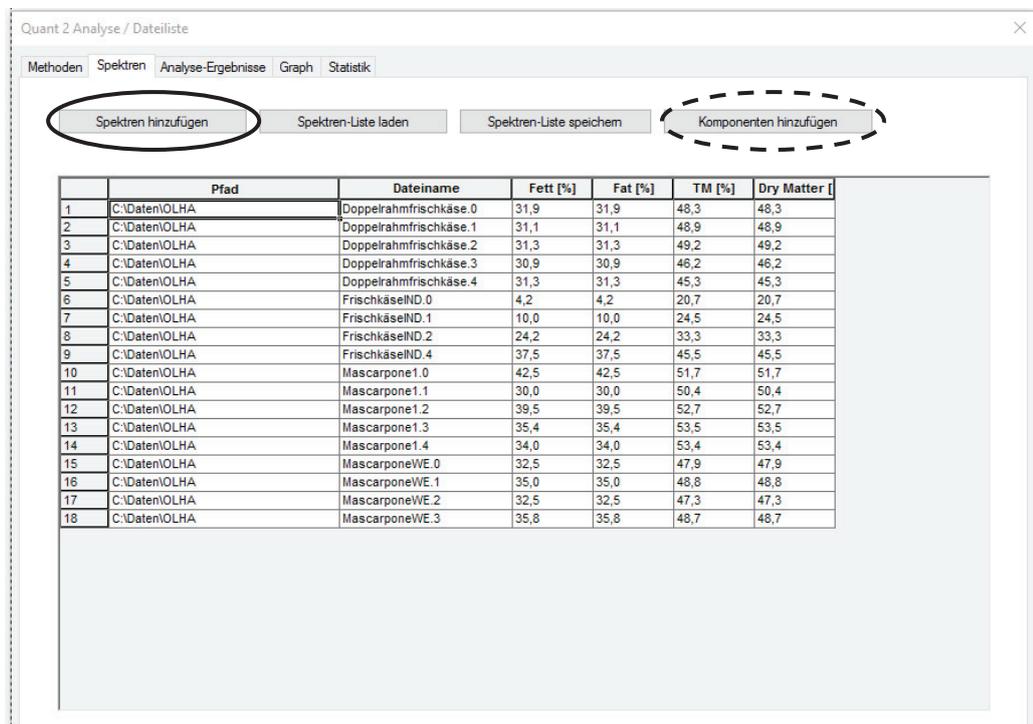


Abbildung 2: Quant 2 Analyse / Dateiliste – Spektren

Hier wird durch den Button „**Spektren hinzufügen**“ (durchgezogener Kreis) das gewünschte zu analysierende Spektrum geladen. Sollte eine unbekannte Probe analysiert werden, so muss zunächst die Probe mittels NIR-Spektroskopie vermessen werden. Es ist jedoch auch möglich, ein älteres NIR-Spektrum zu laden und zu analysieren. Eine Mehrfachauswahl an Spektren ist möglich.

Durch den Button „**Komponente hinzufügen**“ (= *zu analysierender Inhaltsstoff in der Probe*) werden neue Spalten hinzugefügt, in die manuell die zu den jeweiligen

<sup>15</sup> siehe Kapitel 4.2.3 Methodenvalidierung

Spektren gehörenden Laborwerte eingetragen werden können (gestrichelter Kreis), sofern die Referenzanalytik schon durchgeführt wurde.

4 In der nächsten Registerkarte „**Analyse-Ergebnisse**“ (Abbildung 3) werden die geladenen Daten analysiert, ausgewertet und in einer Tabelle aufgelistet. Die eingetragenen Werte der Komponente entspricht dem *wahren* Wert und das ermittelte Ergebnis der NIR-Spektroskopie der *Vorhersage*. Es werden zusätzlich der Datei- und Probenname und die verwendete Methode sowie die Mahalanobis-Distanz und Ausreißer (in Abbildung 3 markiert) angegeben<sup>16</sup>.

	Dateiname	Pr	Methode	Kompo	Wahr	Vorhersa	Einheit	Auße	Mah. Dist.	Grenze	Ausreißer
16	MascarponeWE.1	Ma	Mascarpone_DRFK_Fett_eig	Fett	35	35.69	%	0.3	0.97		
17	MascarponeWE.2	Ma	Mascarpone_DRFK_Fett_eig	Fett	32.5	32.80	%	0.26	0.97		
18	MascarponeWE.3	Ma	Mascarpone_DRFK_Fett_eig	Fett	35.8	35.12	%	0.21	0.97		
19	Doppelrahmfrischkäse.0	Do	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	31.9	37.30	%	0.12	0.19		0
20	Doppelrahmfrischkäse.1	Do	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	31.1	31.60	%	0.12	0.19		0
21	Doppelrahmfrischkäse.2	Do	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	31.3	33.46	%	0.16	0.19		0
22	Doppelrahmfrischkäse.3	Do	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	30.9	31.53	%	0.18	0.19		0
23	Doppelrahmfrischkäse.4	Do	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	31.3	33.32	%	0.11	0.19		0
24	FriskäselND.0	Fri	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	4.2	4.56	%	0.21	0.19	*	1
25	FriskäselND.1	Fri	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	10	9.67	%	0.18	0.19		0
26	FriskäselND.2	Fri	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	24.2	22.68	%	0.17	0.19		0
27	FriskäselND.4	Fri	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	37.5	35.34	%	0.44	0.19	*	0
28	Mascarpone1.0	Ma	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	42.5	41.20	%	0.2	0.19	*	0
29	Mascarpone1.1	Ma	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	30	30.43	%	0.11	0.19		0
30	Mascarpone1.2	Ma	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	39.5	39.59	%	0.11	0.19		0
31	Mascarpone1.3	Ma	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	35.4	35.27	%	0.097	0.19		0
32	Mascarpone1.4	Ma	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	34	34.93	%	0.11	0.19		0
33	MascarponeWE.0	Ma	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	32.5	32.50	%	0.18	0.19		0
34	MascarponeWE.1	Ma	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	35	35.73	%	0.12	0.19		0
35	MascarponeWE.2	Ma	Mascarpone_DRFK_Fett_ko	Fat	32.5	32.62	%	0.18	0.19		0

Abbildung 3: Quant 2 Analyse / Dateiliste – Analyse-Ergebnisse

Dabei zeigen die schwarz gekennzeichneten Zahlen die Proben an, die laut der Software innerhalb der vorgegebenen Grenzen liegen und zu den Spektren passen. Die rot markierten Werte liegen außerhalb der aufgestellten Toleranzen und passen nicht zu den aufgenommenen Spektren.<sup>17</sup>

5 Für eine bessere Übersicht kann in der Registerkarte „**Graph**“ (Abbildung 4) die Kreuzvalidierung betrachtet werden. Diese Funktion ist nur aktiv, wenn die Laborwerte manuell in der Registerkarte „**Spektren**“ (Abbildung 2) hinzugefügt wurden. Die grüne Linie (Pfeil) bezeichnet dabei die optimale 45°-Linie. Je näher sich die

<sup>16</sup> siehe Kapitel 3.2.1 Software OPUS 8, Seite 28

<sup>17</sup> siehe Kapitel 3.2.1 Software OPUS 8, Seite 28

blaue Linie (gestrichelter Pfeil), die anzeigt, wie die Laborwerte in der Kreuzvalidierung liegen, der grünen Linie annähert, desto besser ist die Methode. Zusätzlich wird der  $R^2$ -Wert<sup>18</sup>, der Rang<sup>19</sup>, der RPD-Wert<sup>20</sup> und der RMSEP-Wert<sup>21</sup> (*Root Mean Square Error of Prediction*) angezeigt.

Die aufgenommenen Graphen können separat als PDF-Datei gespeichert werden.

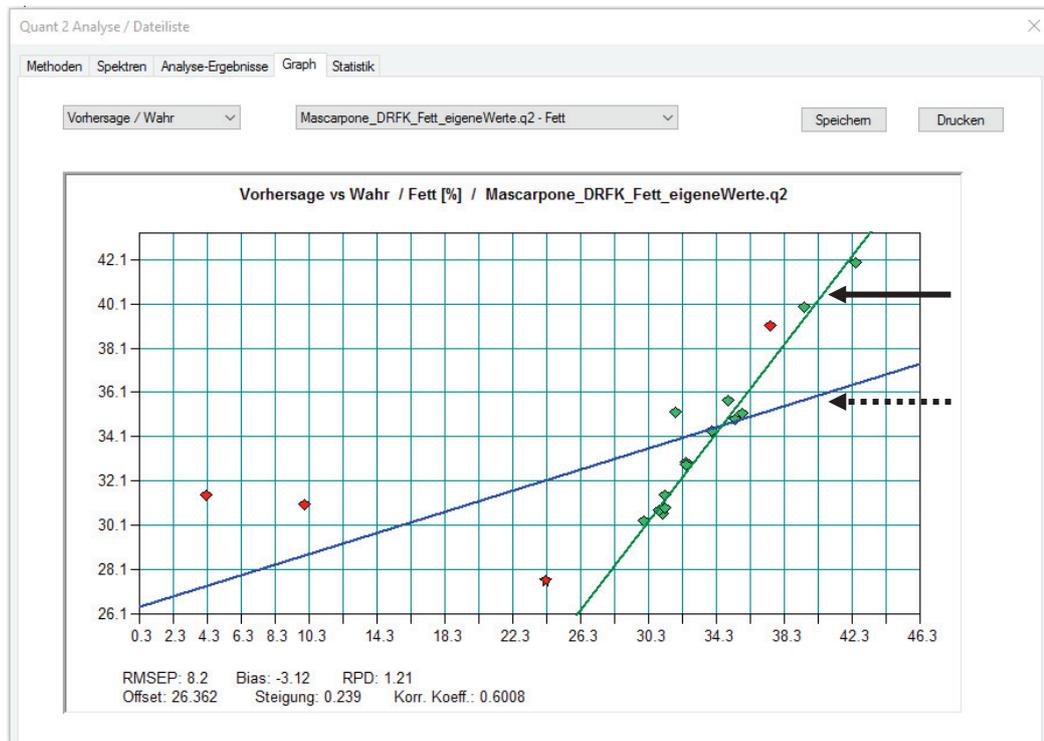


Abbildung 4: Quant 2 Analyse / Dateiliste – Graph

<sup>18</sup> siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Gleichung 3-5

<sup>19</sup> siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Seite 30

<sup>20</sup> siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Gleichung 3-10

<sup>21</sup> siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Gleichung 3-8

## 4.2.2 Spektren

Abbildung 10 zeigt beispielhaft ein aufgezeichnetes Spektrum des FT-NIR-Spektrometers. Bei der Probe handelt es sich um Doppelrahmfrischkäse. Es steht stellvertretend für alle anderen Proben. Da die Zusammensetzung aller Proben ähnlich ist, können die aufgenommenen Spektren miteinander verglichen werden. Es unterscheidet sich lediglich die Höhe der Absorption, jedoch nicht die Lage der Peaks. Die Wellenzahl ist gegenüber der Absorption aufgetragen. Der spitze Peak zwischen  $6000$  und  $5900\text{ cm}^{-1}$  bzw. zwischen  $4600$  und  $4500\text{ cm}^{-1}$  (Nr. 2 und 6 in Abbildung 10) stellt die Kohlenstoffverbindung der Polystyrolpetrischale dar. Dieser Peak erscheint auf allen Analyseberichten und wird in der mathematischen Auswertung berücksichtigt. Bei den weiteren Peaks handelt es sich um funktionelle CH-, OH- und NH-Gruppen (siehe Tabelle 9 nachfolgende Seite). Da aus einem NIR-Spektrum viele Informationen gezogen werden können und diese Informationen sehr ähnlich sind, überlagern sich manche Banden. In diesem Fall überlagert sich der Peak von Wasser und Protein (Nr. 1 und 4). Da bekannt ist, an welchen Stellen im Spektrum sich die Wasserbande befindet, kann diese bei der anschließenden Auswertung berücksichtigt werden. Die Peaks der CH-, OH- und NH-Bindungen werden mit abnehmender Intensität mehrmals angezeigt. Das bedeutet, dass neben der Grundschwingung auch die 1. und 2. Obertöne angezeigt werden (siehe Kapitel 2.1.2 Physikalische Grundlagen).

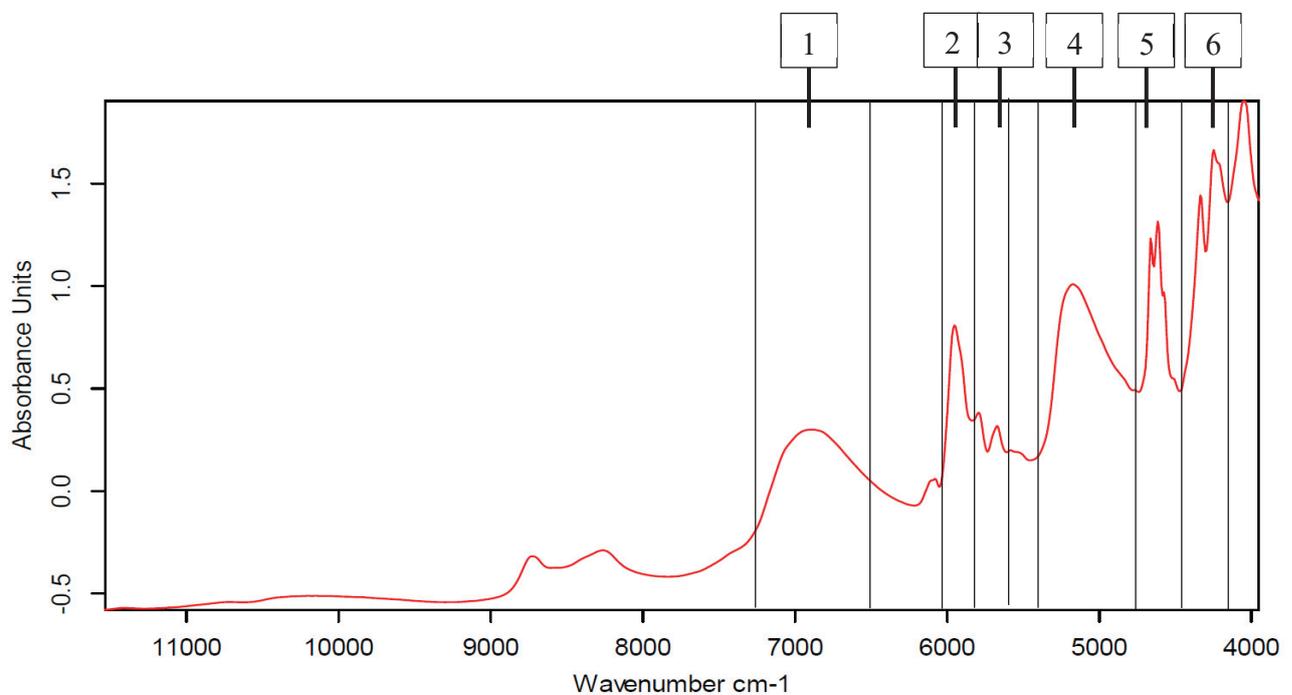


Abbildung 10: Auszug aus einem Analysebericht: Beispiel eines aufgezeichneten Spektrums  
Erläuterungen in Tabelle 9 auf der nachfolgenden Seite

Tabelle 9: Erläuterungen zum Analysereport (Abbildung 10)

Nr.	Inhaltsstoff	Wellenzahl [ $\text{cm}^{-1}$ ]
1	Wasser und Proteine	ca. 7340 bis 6250
2	Polystyrol	ca. 6000 bis 5900
3	Fette	ca. 5900 bis 5600
4	Wasser und Proteine	ca. 5450 bis 4750
6	Polystyrol	ca. 4600 bis 4500
7	Fette	ca. 4500 bis 4250

Die optimale Messung von Proben erfolgt eigentlich in Petrischalen mit einem Quarzboden, bei denen der Peak der Polystyrolschale nicht angezeigt wird. Dieser Unterschied ist auf den aufgezeichneten Spektren deutlich zu sehen. Allerdings ist laut Hersteller mit den Glaspetrischalen nur die Ermittlung der Trockenmasse möglich und wird so für die Versuche nicht verwendet. Die Polystyrolschalen sind im Vergleich zu den Glaspetrischalen vielfältiger einsetzbar.

### 4.2.3 Methodvalidierung

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.1 Nasschemische Analysemethoden wurden gemäß der „Anleitung für das Erstellen einer neuen Quant 2 Methode mit OPUS 8“ zum einen in die bestehenden Curds-Kalibrierungen („Curds\_DM“, „Curds\_Fat“ und „Curds\_Protein“) des Herstellers eingepflegt und zum anderen in einer vollständig neuen Kalibrierung zusammengefasst. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abbildungen 11 bis 17 dargestellt. Die Quant-Methode „Cheese-PSPD“ liefert keine relevanten Ergebnisse. Sie wird nicht weiter betrachtet.

Tabelle 10: Legende zu den Abbildungen 11 bis 17

Abkürzung	Erklärung	Querverweis (Kapitel)
Rang	Anzahl der PLS-Faktoren	3.2.3 Validierung, Seite 30
$R^2$	Bestimmtheitsmaß	3.2.3 Validierung, Gl. 3-5
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Crossvalidation</i>	3.2.3 Validierung, Gl. 3-6
Bias	systematischer Fehler	3.2.3 Validierung, Gl. 3-11
RPD	<i>Residual Prediction Deviation</i>	3.2.3 Validierung, Gl. 3-10

Es handelt sich dabei um eine interne Validierung. Die Ergebnisse der nasschemischen Untersuchung werden sowohl zur Kalibrierung als auch zur Validierung verwendet. Die Vorhersage, also die Werte, die durch die NIR-Spektroskopie ermittelt wurden, werden gegenüber den Laborwerten, die grundsätzlich als wahr angesehen werden, aufgetragen. In allen nachfolgenden Diagrammen der Kreuzvalidierung entspricht die x-Achse dem wahren Laborwert und die y-Achse der Vorhersage der NIR-Spektroskopie.

Zunächst wird die Optimierung der **Trockenmasse** betrachtet. Die Abbildung 11 zeigt die Kreuzvalidierung der eigenen Laborwerte, die in einer neuen Kalibrierung zusammengefasst wurden. Wie zu erkennen ist, liegen die Werte nah an der 45°-Linie. Die Anzahl der eingetragenen Proben beträgt 16. Die Bandbreite der Trockenmasse reicht von 20 bis 55 %. Die Probenanzahl ist für eine aussagekräftige Methode zu gering (empfohlen werden min. 20 Proben, Bruker, 2019). Es wird aber eine gute Grundlage für den Aufbau einer NIR-Bibliothek gelegt. Der R<sup>2</sup>-Wert ist sehr hoch. Das bedeutet, dass bereits viele Messwerte durch das Modell beschrieben werden können. Allerdings ist der Rang mit 9 von 10 möglichen Rängen sehr hoch, was die Methode wiederum weniger robust werden lässt. Es gilt, je weniger Ränge, desto robuster die Methode (Kapitel 3.2.3 Validierung).

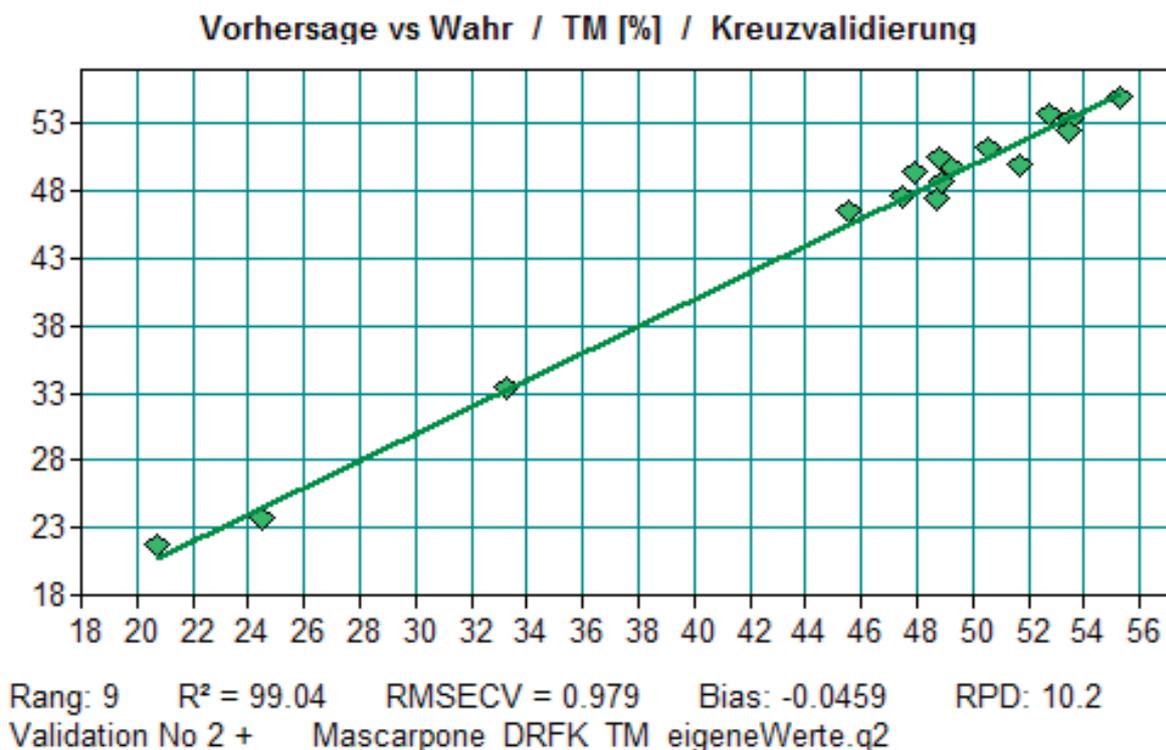


Abbildung 11: Kreuzvalidierung der Methode „Mascarpone“ mit ausschließlich neuen Werten: Trockenmasse (n = 16)

Wird hingegen Abbildung 12 betrachtet, in der die Laborwerte der NIR-Methode „Curds\_DM“ des Herstellers hinzugefügt wurden, ist eine Veränderung zu erkennen. Zuvor reichte die Bandbreite an Proben nur von ca. 10 % bis 30 % TM. Durch die Vervollständigung der neuen Werte (in Abbildung 12 durch einen schwarzen Kreis markiert) können nun Proben bis ca. 60 % Trockenmasse vorhergesagt werden. Um allerdings zuverlässige Werte in diesem Bereich zu generieren, müssen weitere Messungen vorgenommen werden.

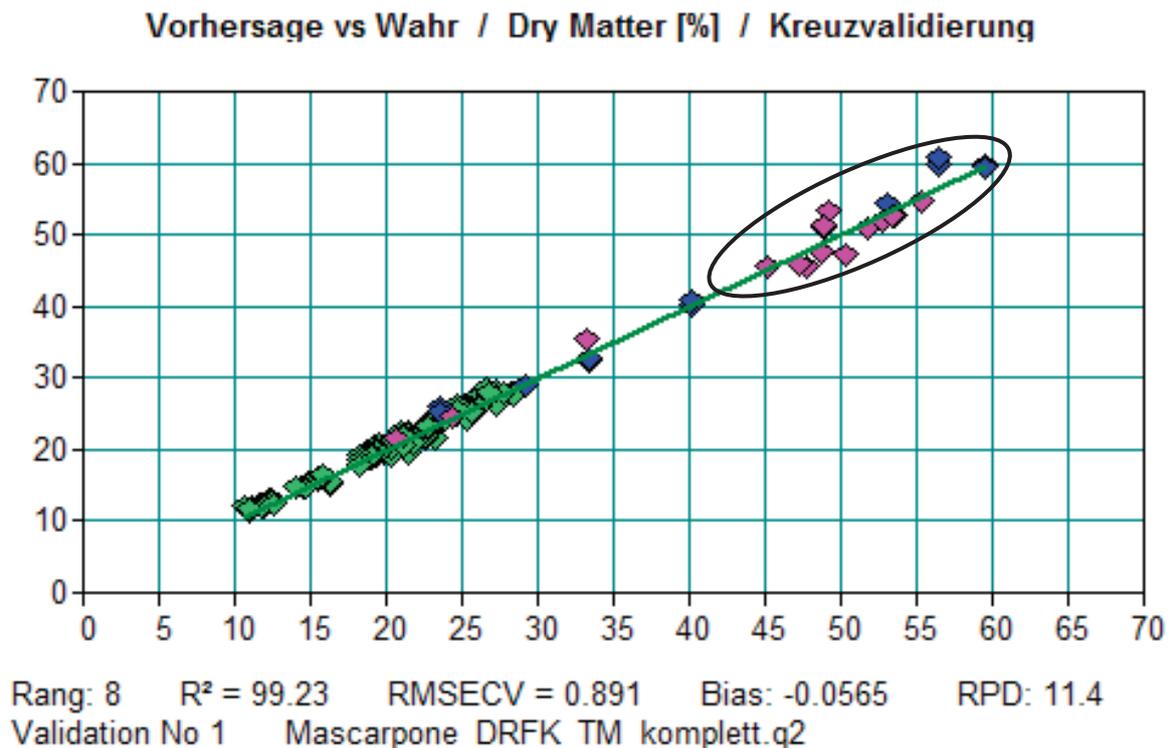


Abbildung 12: Kreuzvalidierung der vervollständigten Methode „Curds\_DM“ des Herstellers: Trockenmasse (n = 115)

Ähnliches kann auch bei der Ergänzung der Methode der **Fettgehaltsvorhersage** beobachtet werden. Die neue Kalibrierung wurde auf Grundlage von 24 untersuchten Proben erstellt. In Abbildung 13 sind die statistischen Ergebnisse der Kreuzvalidierung aufgeführt.

Die schwarz eingekreisten Werte in Abbildung 14 kennzeichnen die neu eingetragenen Laborwerte, mit denen die Kalibrierung „Curds\_Fat“ des Herstellers auf insgesamt 143 Kalibrationswerte vervollständigt wurde. Durch das Eintragen dieser Werte kann die Bandbreite der Vorhersage des Fettgehaltes deutlich erweitert werden. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  zeigt, dass die Korrelation zwischen Laborwerten und Modell sehr hoch ist. Ebenso hat die Methode einen geringen Fehler und einen sehr hohen RPD-Wert. Mit diesem RPD-Wert wäre die Methode so

genau wie die dazugehörige Referenzmethode. Allerdings ist der Rang, also die Anzahl der PLS-Faktoren, sehr hoch, was wiederum für eine weniger robuste Methode spricht.

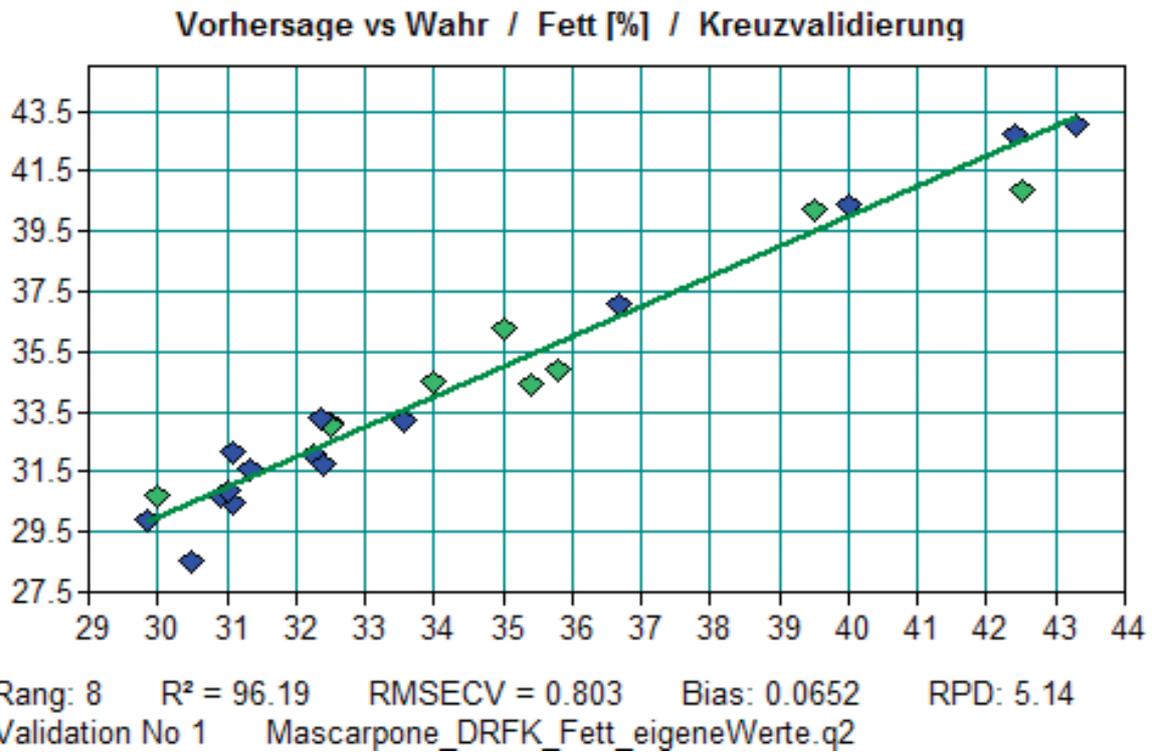
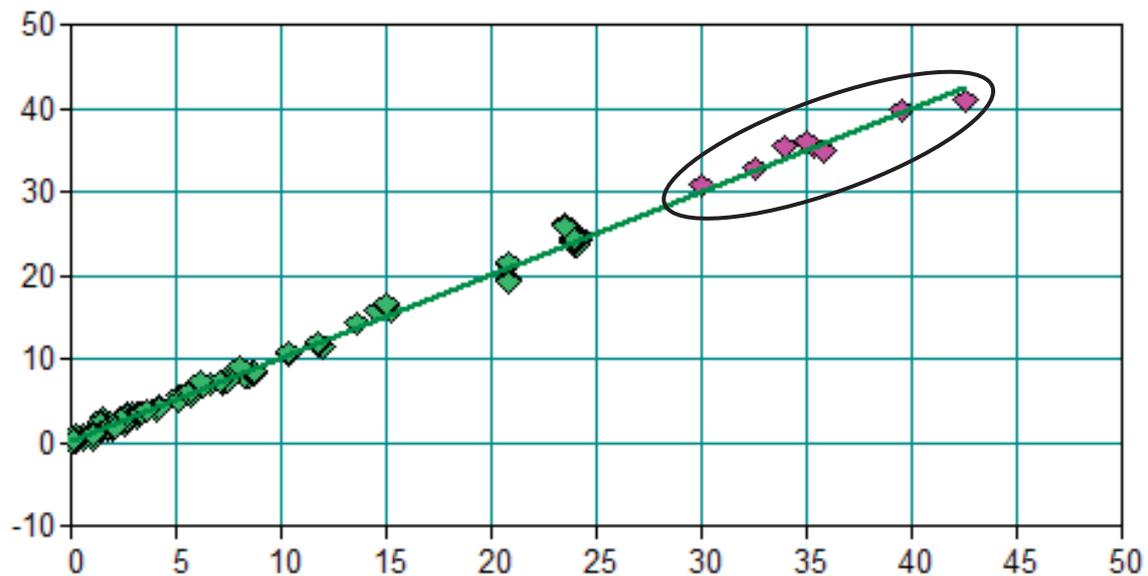


Abbildung 13: Kreuzvalidierung der Methode „Mascarpone“ mit ausschließlich neuen Werten: Fettgehalt (n = 24)

### Vorhersage vs Wahr / Fat [%] / Kreuzvalidierung



Rang: 10     $R^2 = 99.8$     RMSECV = 0.455    Bias: -0.00749    RPD: 22.2  
Validation No 1    Mascarpone\_DRFK\_Fett\_komplett.q2

Abbildung 14: Kreuzvalidierung der vervollständigten Methode „Curds\_Fat“ des Herstellers: Fettgehalt (n = 143)

Es wurden zu wenige nasschemische Untersuchungen zur Bestimmung des **Rohproteingehaltes** durchgeführt, um mit den Ergebnissen eine eigene Methode zu entwickeln (n<sub>untersuchte Proben</sub> = 10, empfohlen n > 20). Aus diesem Grund wird die bereits vorhandene Methode „Curds\_Protein“ des Herstellers mit den Laborwerten auf insgesamt 38 bzw. 40 Kalibrationswerte ergänzt. Die Ergebnisse der Kreuzvalidierung vor und nach den Optimierungen sind in den Abbildungen 15, 16 und 17 dargestellt. Dabei bezieht sich Abbildung 15 auf die Ergebnisse vor der ersten Optimierung. Die Anzahl der Proben vor und nach der Optimierung unterscheidet sich, da zwei neue Proben versuchsweise in die Kalibrierung eingetragen wurden.

Wie in Abbildung 15 zu erkennen ist, reicht die Bandbreite der eingetragenen Laborwerte bis zu einem Rohprotein von ca. 18 %. Die markierten Werte in Abbildung 15 kennzeichnen die Proben „Mascarpone – V6“, „Mascarpone – V7“, „Mascarpone – V8“, „Mascarpone – V9“, „Mascarpone – V10“, „Quark 20 % F.i.Tr.“, „Quark 40 % F.i.Tr.“ und „Frischkäse“. Anhand der statistischen Werte (niedriger  $R^2$ , hoher Rang und niedriger RPD) der Kreuzvalidierung ist zu erkennen, dass die Kalibrierung verbessert werden kann. Nach der Optimierung dieser NIR-Methode kann zwar eine Verbesserung der Werte beobachtet werden (Abbildung 16), es müssen aber alle maximalen 10 Ränge vergeben werden.

Aus diesem Grund werden zwei weitere Proben („Frischkäse – V6“ und „Frischkäse – V7“) in die Kalibrierung eingetragen und erneut eine Optimierung durchgeführt (markierte Werte in Abbildung 17). Diese Proben decken einen höheren Bereich des Rohproteingehaltes ab (siehe Kapitel 4.1 Nasschemische Analysemethoden: Tabelle 8). In Abbildung 17 werden die statistischen Ergebnisse der Kreuzvalidierung dargestellt. Der Rang konnte um einen PLS-Faktor minimiert sowie der  $R^2$ - und der RMSECV-Wert maximiert werden. Zusätzlich dazu können in Zukunft mit dieser Methode Proben höheren Eiweißgehaltes (bis max. 33 %) vorhergesagt werden.

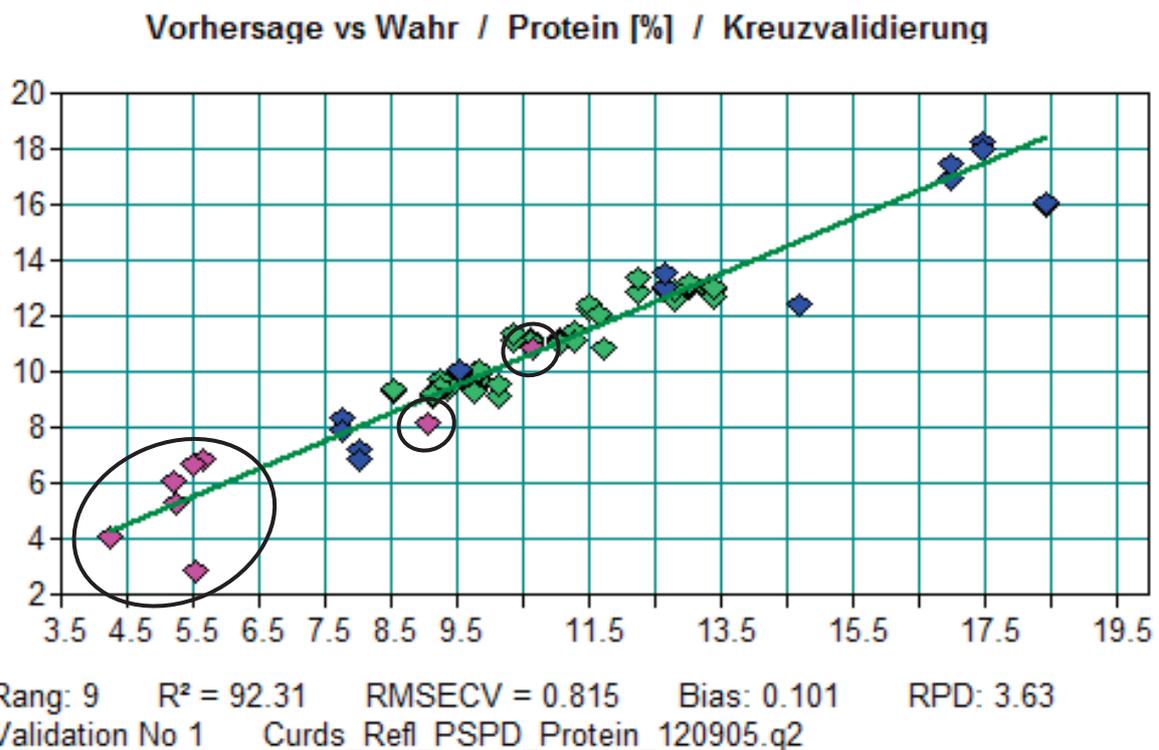
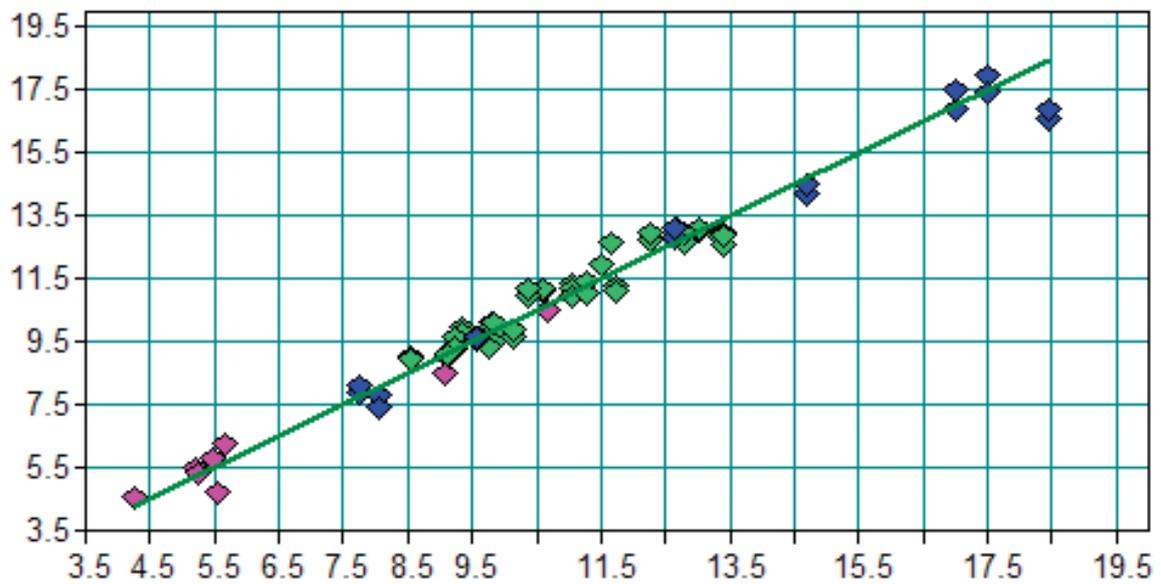


Abbildung 15: Kreuzvalidierung der vervollständigten Methode „Curds\_Protein“ des Herstellers: Eiweiß (n = 38)

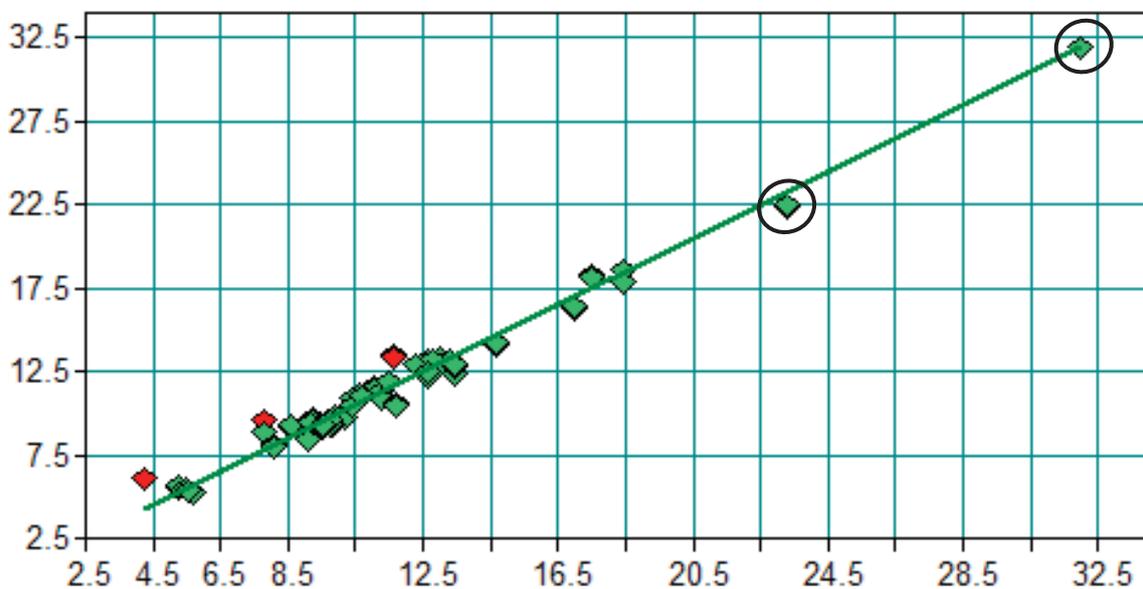
Vorhersage vs Wahr / Protein [%] / Kreuzvalidierung



Rang: 10  $R^2 = 97.14$  RMSECV = 0.497 Bias: 0.0233 RPD: 5.92  
Validation No 2 Curds\_Refl\_PSPD\_Protein\_120905.q2

Abbildung 16: Kreuzvalidierung der vervollständigten Methode „Curds\_Protein“ des Herstellers: Eiweiß nach Optimierung (n = 38)

Vorhersage vs Wahr / Protein [%] / Kreuzvalidierung



Rang: 9  $R^2 = 98.24$  RMSECV = 0.623 Bias: 0.0318 RPD: 7.56  
Validation No 2 Mascarpone\_DRFK\_Eiweiß\_komplett.q2

Abbildung 17: Kreuzvalidierung der vervollständigten Methode „Curds\_Protein“ des Herstellers: Eiweiß nach Optimierung (n = 40)

Die Software OPUS 8 ermöglicht es, zusätzlich zu der Gegenüberstellung der Vorhersage zum wahren Wert, durch weitere Grafiken (zum Beispiel Differenz vs. Wahr, Residuum vs. Wahr,  $R^2$  vs. Rang und weitere) zu veranschaulichen, wie robust eine Methode ist.

Beispielhaft wird anhand der **Trockenmasse** eine dieser Grafiken gezeigt (Abbildung 18). Sie stellt den Standardfehler der Kreuzvalidierung in Abhängigkeit des Ranges dar. Dabei entspricht die x-Achse dem Rang und die y-Achse dem RMSECV. Kennzeichnend für diese Darstellung ist die abfallende Kurve. Der markierte Wert gibt die Lage des optimalen Ranges an. Dieser befindet sich bei der Gegenüberstellung RMSECV und Rang immer am Minimum der Kurve.

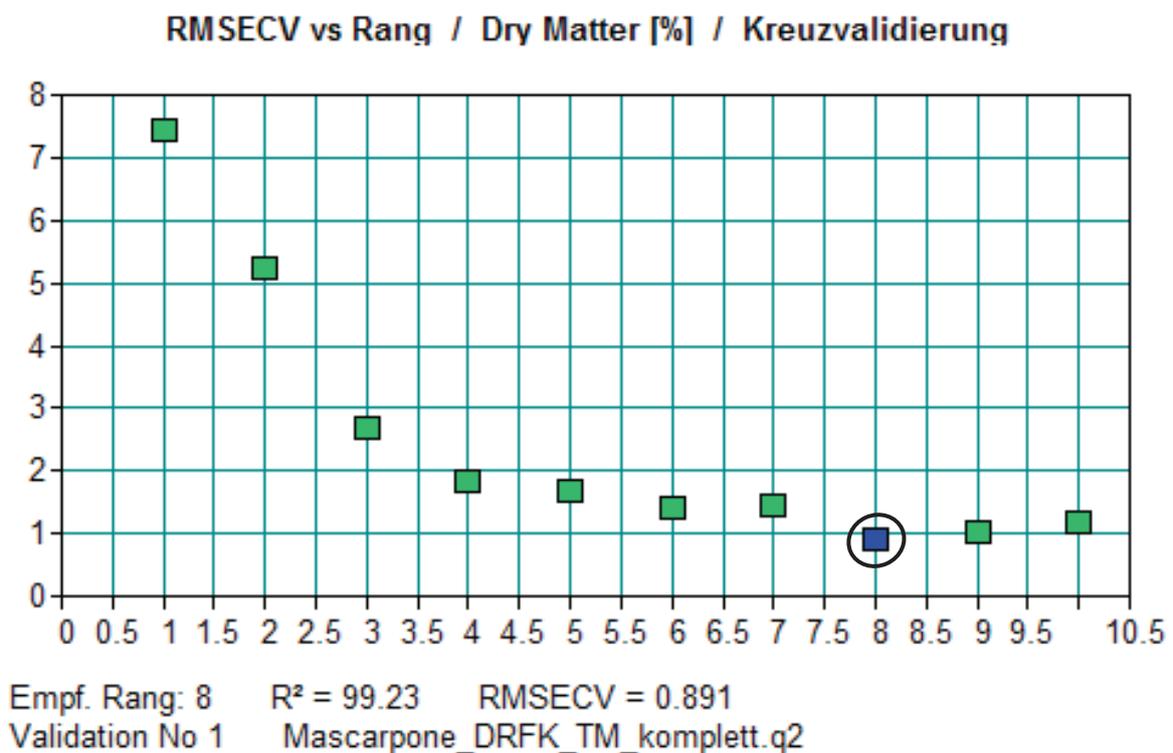


Abbildung 18: RMSECV vs. Rang – Trockenmasse

#### 4.2.4 Datenanalyse

Nach der Methodvalidierung können die aufgenommenen Spektren mit den eigenen und den vervollständigten Methoden analysiert werden. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Abbildungen (22, 23, 27, 28 und 30) aufgeführt. Die genauen Zahlenwerte können den Tabellen 13 bis 15 im Anhang (Kapitel 10.2) entnommen werden. Der Laborwert entspricht der x-Achse und die Vorhersage des NIR-Spektrometers der y-Achse. Die grüne Linie kennzeichnet die 45°-Linie. Mit der blauen Linie wird versucht, eine Gerade durch die Messwerte zu ziehen.

Bei der Analyse dieser Werte greift nicht mehr der RMSECV, sondern der RMSEP (*Root Mean Square Error of Prediction*) (Kapitel 3.2.3 Validierung, Gleichung 3-8), der Standardfehler der externen Validierung. Beide Werte sind miteinander vergleichbar.

Die markierten Werte in den Abbildungen 22, 23, 27, 28 und 30 werden von der Software als Ausreißer gekennzeichnet. Ein Grund dafür ist, dass die Grenze der Mahalanobis-Distanz zu eng gesetzt ist, bzw. der errechnete Wert der vom Hersteller vorgegebenen Mahalanobis-Distanz entspricht. Eine weitere Ursache kann zum Beispiel die gestörte Messung oder ungenaue Referenz sein.

Zusätzlich zeigen die Diagramme (Abbildungen 19 bis 21, 24 bis 26 und 29) die Gegenüberstellung der Laborwerte und den Vorhersagen der drei verschiedenen Kalibrierungen. Zur besseren Übersicht wurden die Proben in drei Gruppen (Technikum – Frischkäse, Technikum – Mascarpone und industrielle Proben) eingeteilt.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der Analyse der **Trockenmasse** dargestellt (Anhang 10.2 Tabelle 13, Abbildungen 19 bis 23). Eine Verbesserung der alten Kalibrierung zu beiden vervollständigten, neuen Methoden ist deutlich zu erkennen. Nahezu alle Werte können korrekt vorhergesagt werden. Werden zusätzlich die Abbildungen 22 und 23 betrachtet, kann anhand des RPD-Wertes erkannt werden, dass die Methode, die neu aufgebaut wurde, bessere Ergebnisse liefert (siehe Kapitel 3.2.3 Validierung, Tabelle 7). Dies ist ebenfalls an den Gegenüberstellungen von den Laborwerten zu den NIR-Vorhersagen zu erkennen (Abbildungen 19 bis 21).

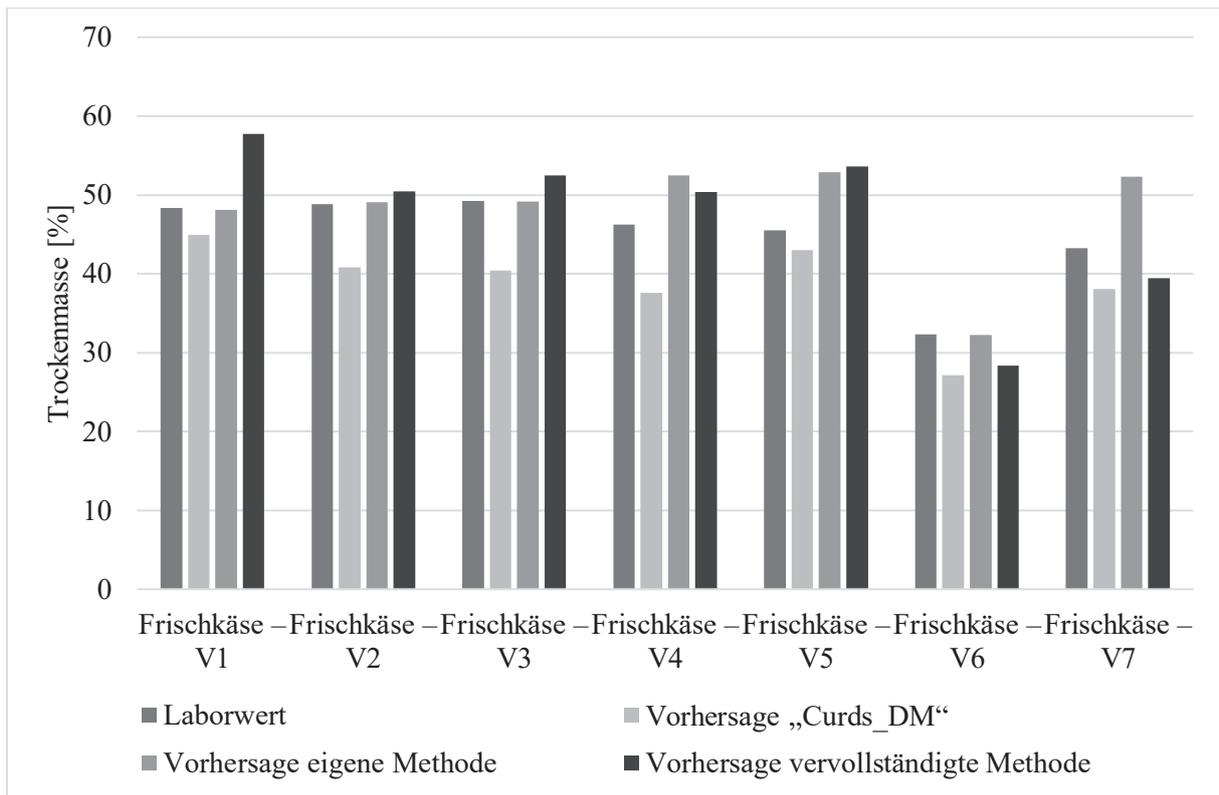


Abbildung 19: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Trockenmasse – Technikum – Frischkäse

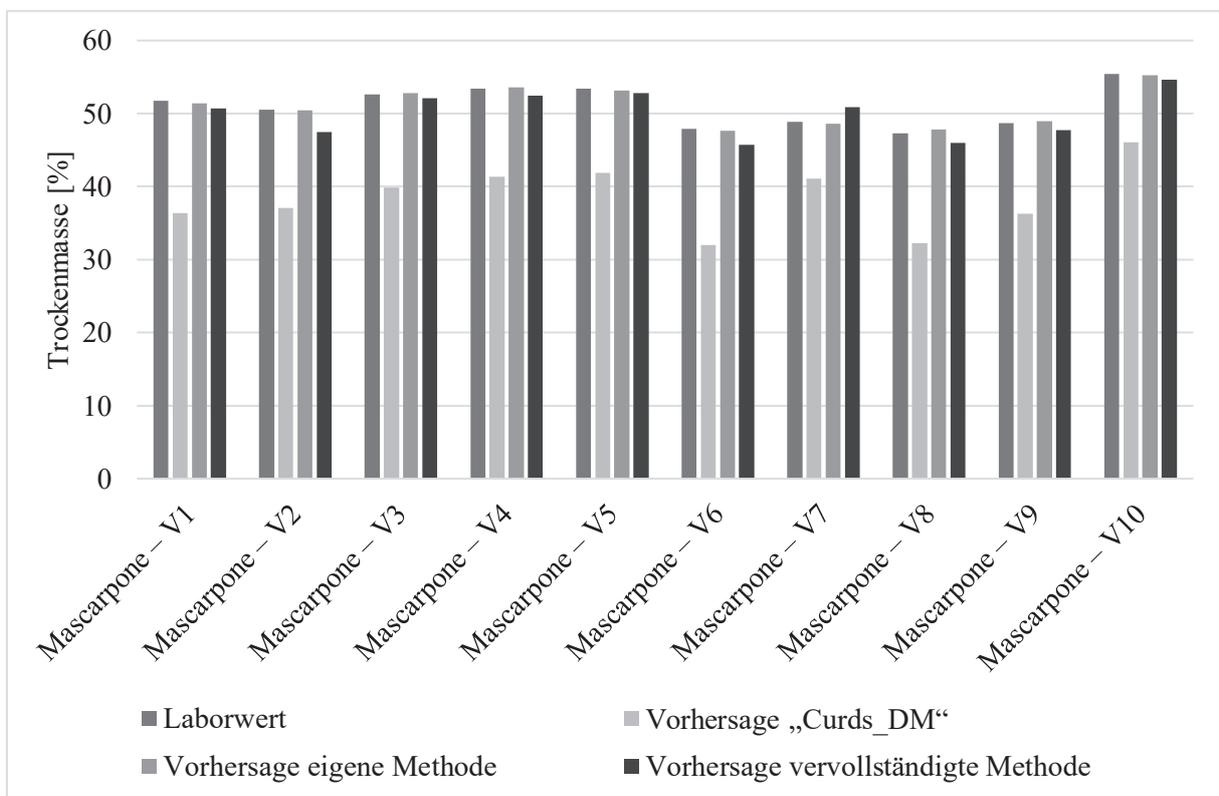


Abbildung 20: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Trockenmasse – Technikum – Mascarpone

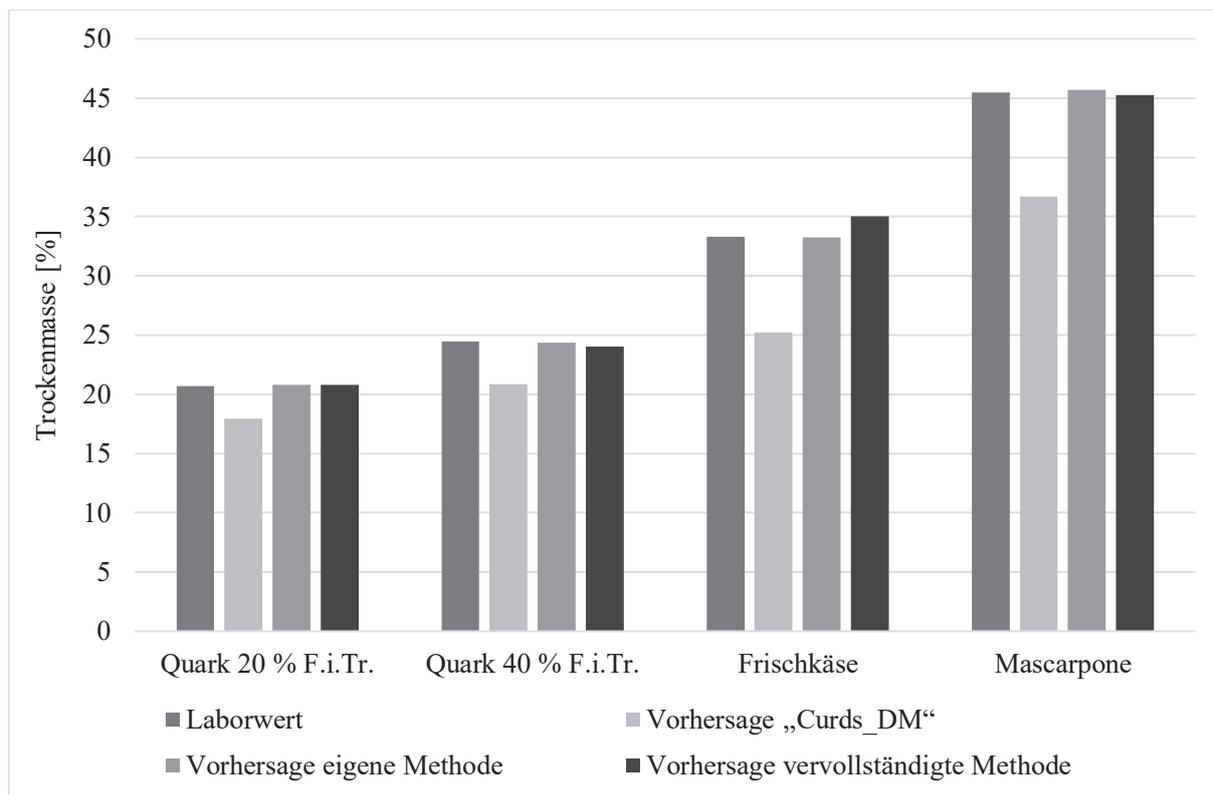


Abbildung 21: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Trockenmasse – industrielle Proben

Tabelle 11: Legende zu den Abbildungen 22, 23, 27, 28 und 30

Abkürzung	Erklärung	Querverweis (Kapitel)
<b>RMSEP</b>	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i>	3.2.3 Validierung, Gl. 3-8
<b>Bias</b>	systematischer Fehler	3.2.3 Validierung, Gl. 3-11
<b>RPD</b>	<i>Residual Prediction Deviation</i>	3.2.3 Validierung, Gl. 3-10
<b>Offset</b>	ist der y-Wert der Regressionsgeraden, wenn $x = 0$ .	Bruker, 2017
<b>Korr. Koeff.</b>	Der Korrelationskoeffizient beschreibt den linearen Zusammenhang mindestens zweier Variablen und kann einen Wert zwischen -1 und +1 annehmen. Ist der Wert +1 oder -1, hängen zwei Variablen vollständig voneinander ab. Nimmt der Korrelationskoeffizient einen Wert von 0 an, ist keine lineare Abhängigkeit zu verzeichnen.	Bruker, 2017

Vorhersage vs Wahr / Dry Matter [%] / Mascarpone\_DRFK\_TM\_komplett.q2

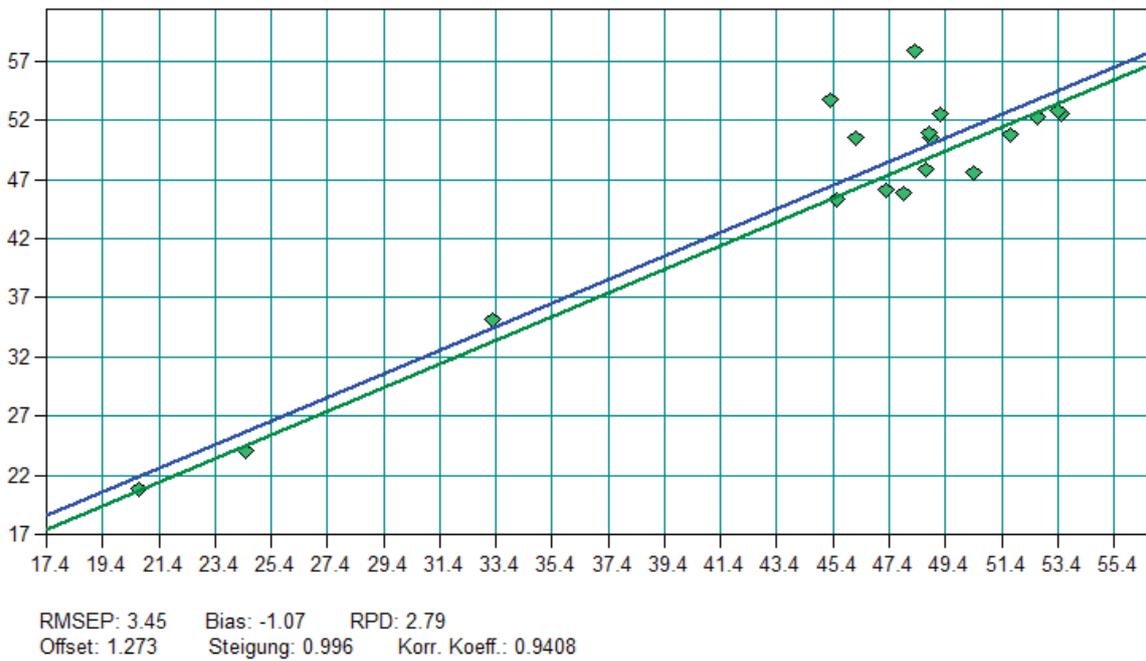


Abbildung 22: Datenanalyse – Trockenmasse (vervollständigt) (n = 19)

Vorhersage vs Wahr / TM [%] / Mascarpone\_DRFK\_TM\_eigeneWerte.q2

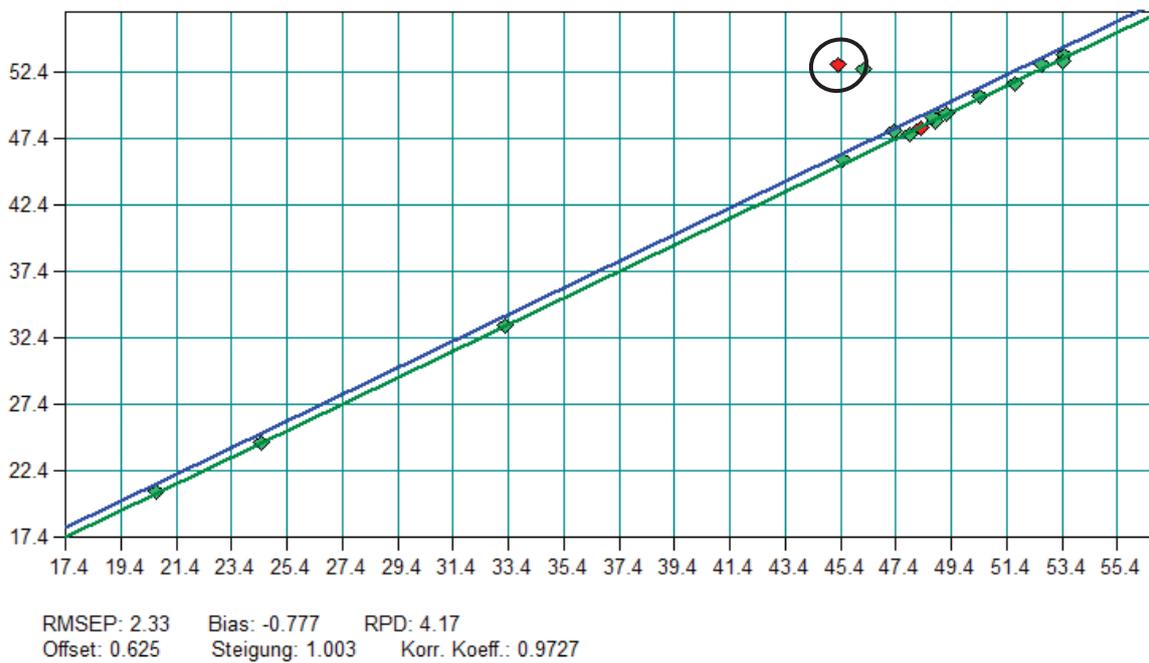


Abbildung 23: Datenanalyse – Trockenmasse (eigene Werte) (n = 19)

In den Abbildungen 24 bis 28 sowie in der Tabelle 14 (Anhang) sind die Datenanalysen der **Fettgehaltsbestimmung** aufgeführt. Wie bei der Trockenmasse ist es gelungen, durch das Erweitern der bestehenden Kalibrierung bessere Vorhersagen zu erzielen (Abbildungen 24, 25 und 26). Die Vorhersagen der selbst erstellten Methoden weichen weiterhin stark vom Laborwert ab, besonders bei den Fettgehalten der industriell hergestellten Käseproben (Abbildung 26). Aus diesem Grund ist der RPD-Wert so niedrig und die Standardfehler mit 8,2 sehr hoch (Abbildung 28).

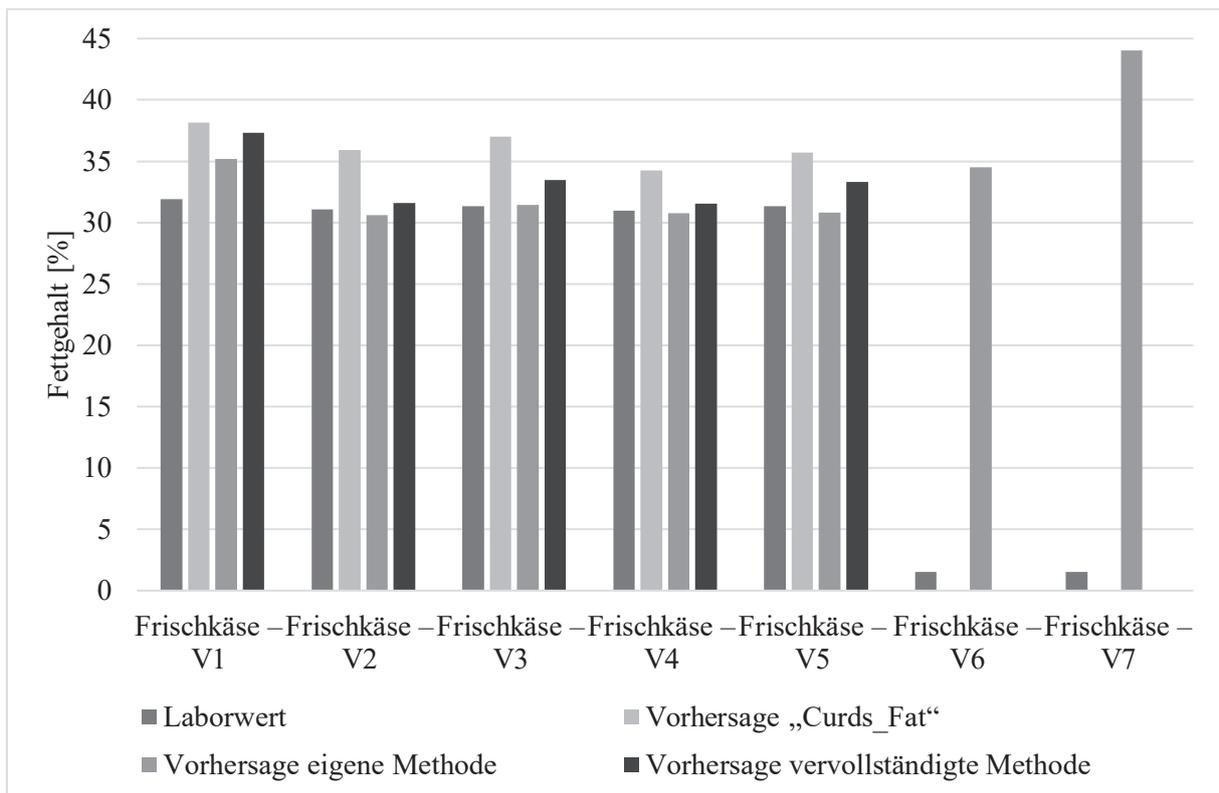


Abbildung 24: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Fettgehalt – Technikum – Frischkäse

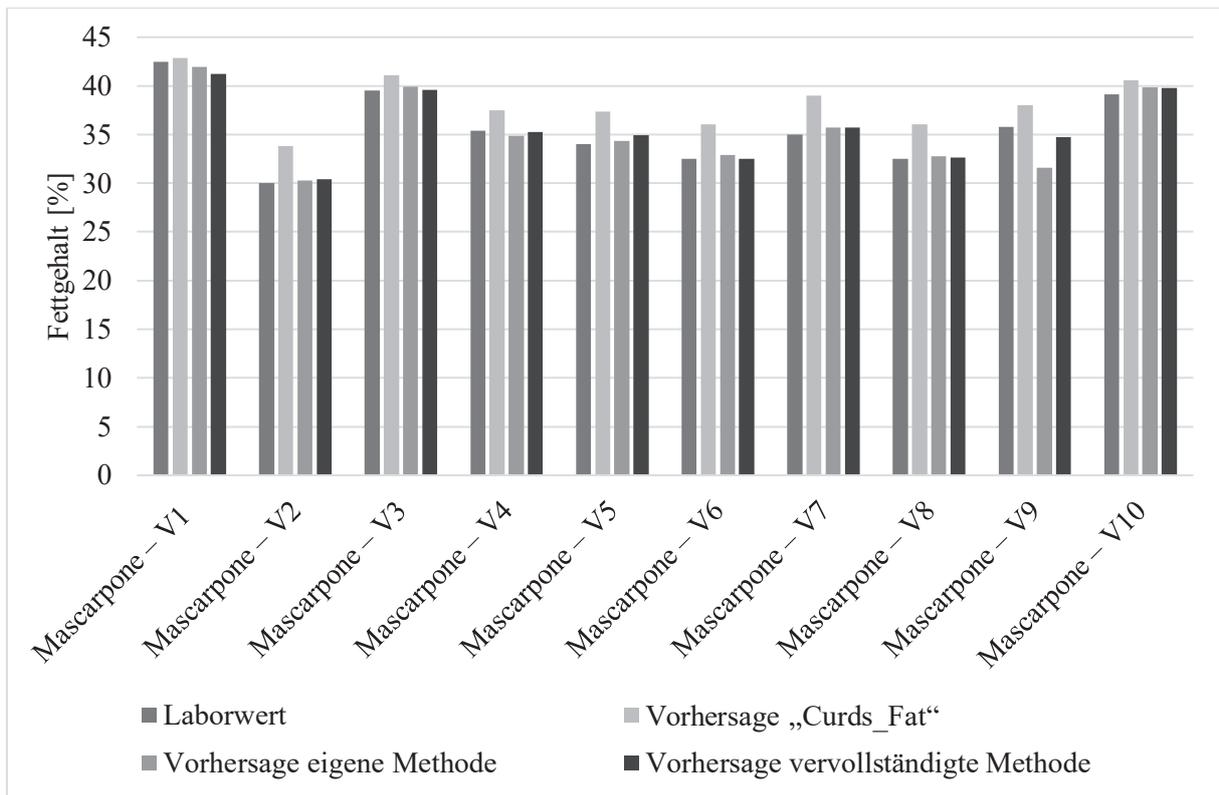


Abbildung 25: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Fettgehalt – Technikum – Mascarpone

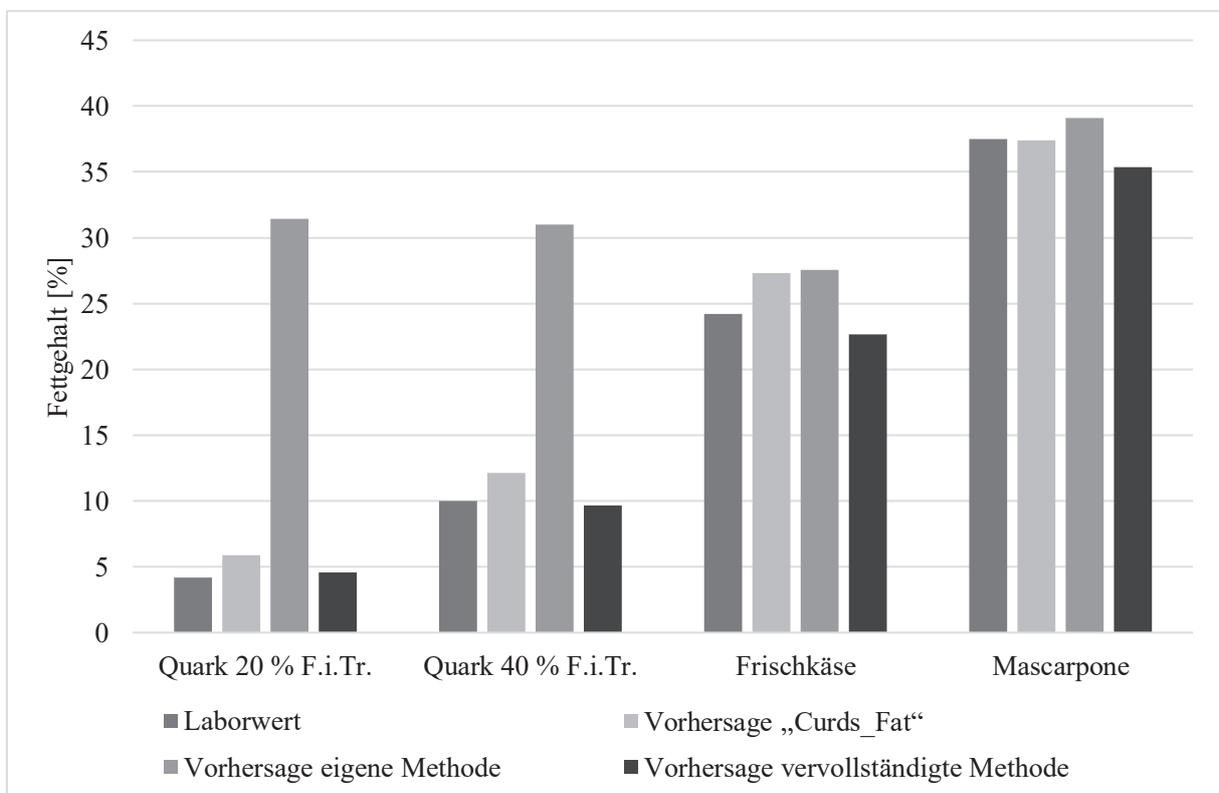


Abbildung 26: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Fettgehalt – industrielle Proben

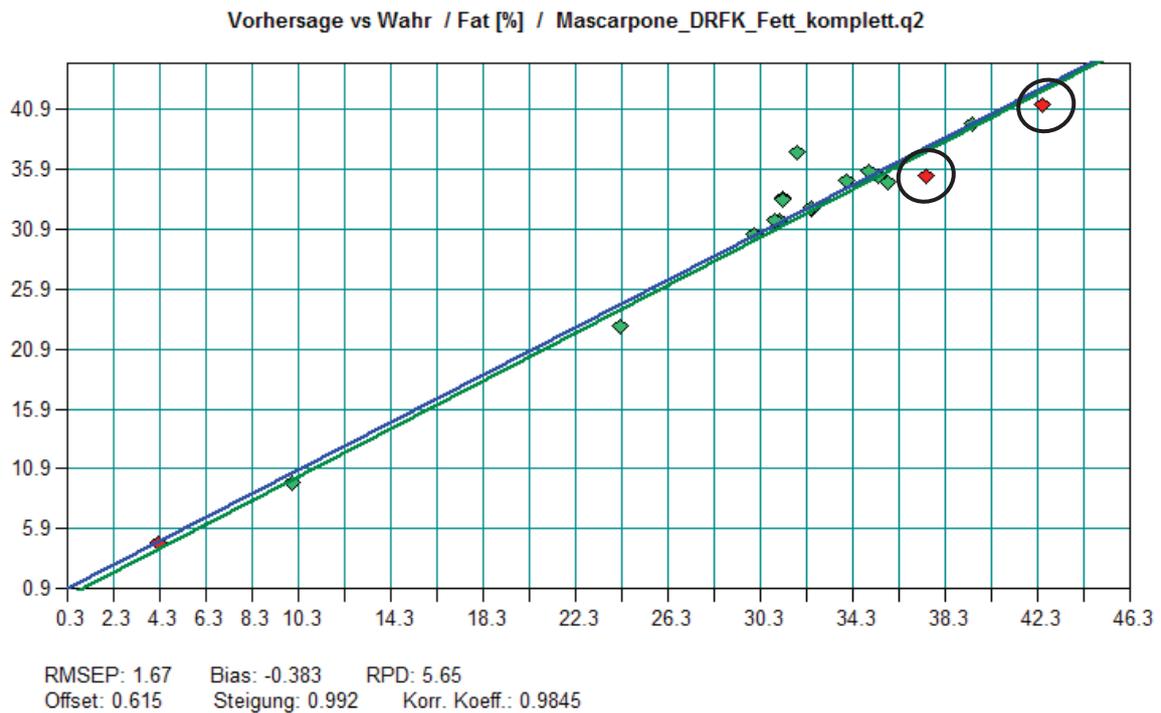


Abbildung 27: Datenanalyse – Fett (vervollständigt) (n = 19)

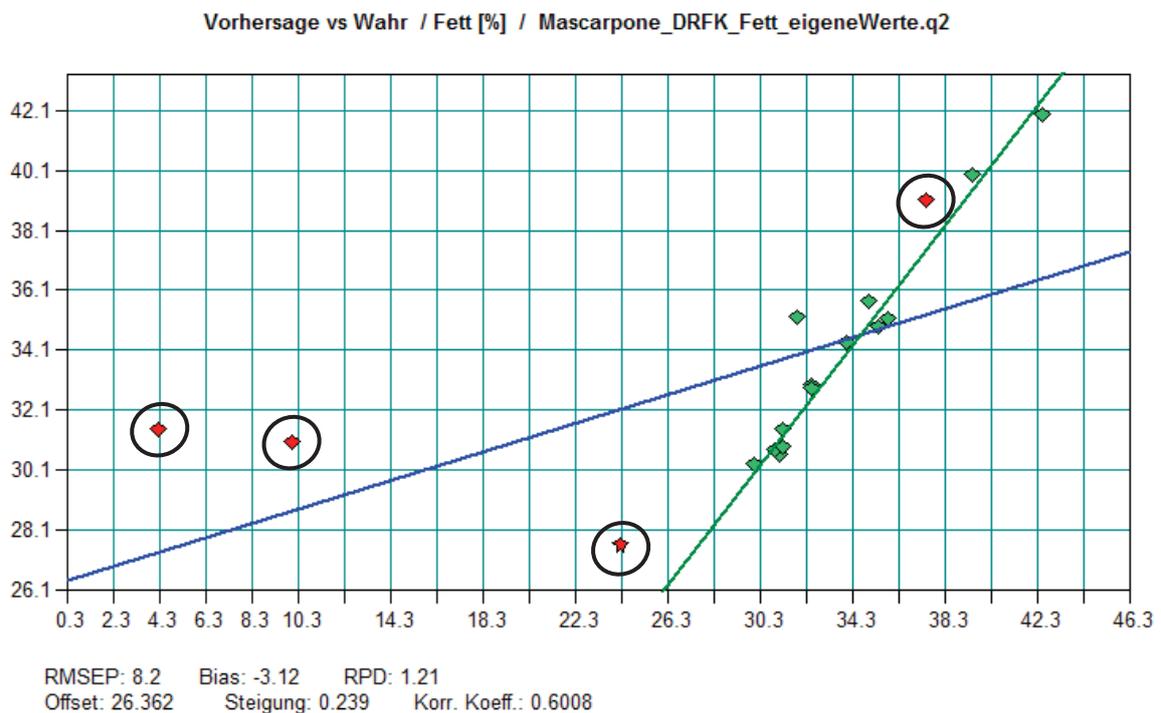


Abbildung 28: Datenanalyse – Fett (eigene Werte) (n = 19)

Bei der Datenanalyse des **Proteingehaltes** werden nur die Werte berücksichtigt, bei denen ein Laborwert vorliegt. Durch die geringe Probenmenge kann nicht davon ausgegangen werden, dass die NIR-Vorhersagen korrekt angezeigt werden. Wie in Tabelle 15 (Anhang) und der

Abbildung 29 zu sehen ist, können durch die Optimierung der Methode die Ergebnisse wesentlich genauer vorhergesagt werden. Abbildung 30 veranschaulicht, dass die Erweiterung und Optimierung der Methode „Curds\_Protein“ erfolgreich waren.

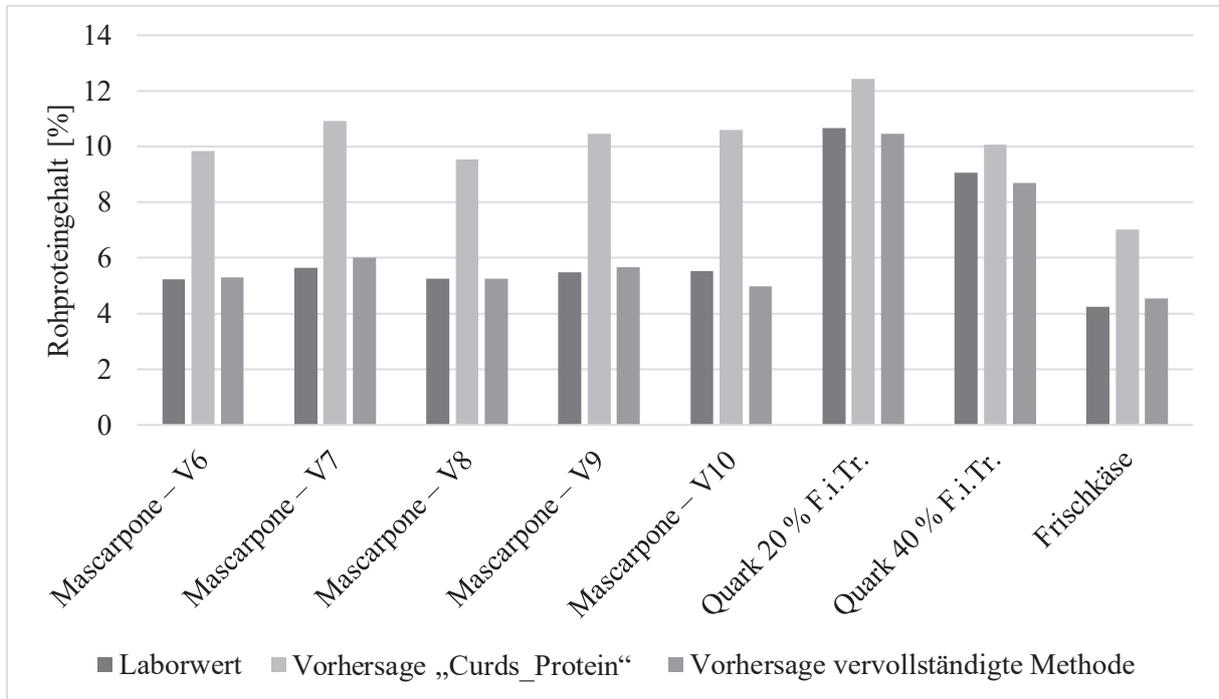


Abbildung 29: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Rohproteingehalt

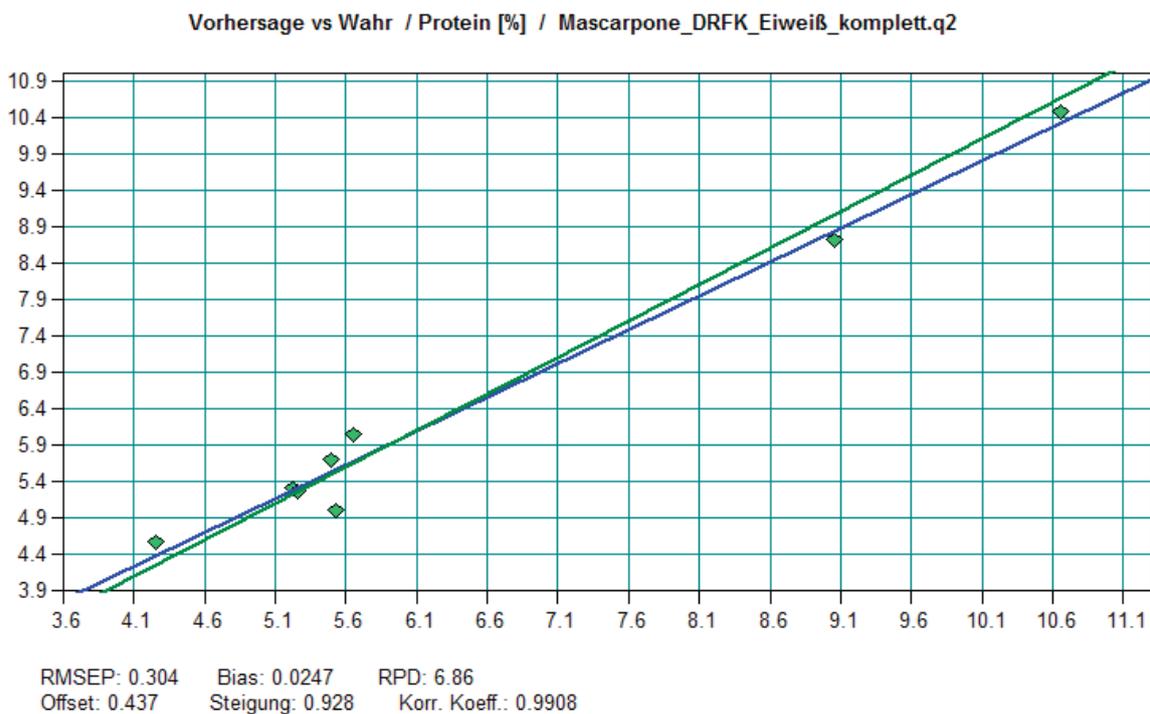


Abbildung 30: Datenanalyse – Eiweiß (vervollständigt) (n = 8)

### 4.3 Fehlerhinweise

Bei der butyrometrischen Bestimmung des Fettgehaltes ist die Ablesegenauigkeit als Nachteil zu kritisieren. Anhand der Skalierung der Butyrometer kann nur auf 0,50 bzw. 0,25 und 0,75 Skalenteile genau abgelesen werden.

Die Bestimmung des Trockenmassegehaltes mit der Folienmethode ist gravimetrisch. Es handelt sich also bei korrekter Handhabung um eine ziemlich genaue Methode. Als Fehlerquelle kann die unsachgemäße Benutzung der Waagen genannt werden. Die Waagen müssen die angegebene Ablesegenauigkeit haben. Außerdem müssen sie der Unterlage entsprechend austariert sein.

Wenn die Folien aus dem Trockenschrank zum Zwischenwiegen genommen werden, ist darauf zu achten, dass keine getrockneten Frischkäsepartikel von der Folie entfernt werden. Eine genaue Rückwaage ist wichtig für ein genaues Messergebnis. Sollten Frischkäsepartikel ungewollt entfernt werden, kann der kalkulierte Gehalt der Trockenmasse niedriger sein als der tatsächliche Wert.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für einen reproduzierbaren Trockenmassegehalt ist die Verteilung der Probe zwischen den beiden Aluminiumfolien. Die Verteilung sollte gleichmäßig mit einer homogenen Schichtdicke sein. Anhäufungen oder ungleichmäßige Schichtdicken verlängern die Trocknung unnötig und führen zu häufigeren und längeren Nachtrocknungen. Da diese Methode auf der Konvektionstrocknung beruht, verläuft die Trocknung von außen nach innen. Durch die Anhäufungen kann sich eine Kruste bilden. Die darunter gelegenen Probenschichten können nicht optimal getrocknet werden, wodurch es wiederum zu Messungenauigkeiten kommt.

Es sollte außerdem darauf geachtet werden, dass beim Auswalzen der Folien kein Probenmaterial herausgepresst wird. Sollte die Probe am Auswalzgerät hängen bleiben, kommt es erneut durch Messfehler zu einem fehlerhaften Endergebnis.

Auch bei der Methode nach Kjeldahl können durch falsche Handhabung die Ergebnisse verfälscht werden. Darunter zählen beispielsweise eine nicht vollständig aufgeschlossene Probe. Ist die Probe nicht aufgeschlossen, befinden sich noch Stickstoffmoleküle in der Probe, die bei

der Titration nicht erfasst werden können. Des Weiteren spielt die korrekte Funktionsweise der Destillationsanlage eine wichtige Rolle. Zudem sollte die Destillation beendet sein, bevor titriert wird. Ebenfalls ist die korrekt durchgeführte Titration maßgeblich für ein nachzuvollziehendes Endergebnis. Wurde zu viel Salzsäure titriert, kann kein korrekter Endgehalt an Gesamtstickstoff ermittelt werden. Die Farbe des Indikators sollte blassviolett sein. Ist dessen Farbe kräftig violett, kann davon ausgegangen werden, dass übertitriert, also zu viel Salzsäure verwendet wurde.

## 5 Diskussion

### 5.1 Methodvalidierung

Die Methodvalidierung ist der erste Schritt zum Aufbau einer NIR-Bibliothek. Werden die Kalibrierungen nicht durch eine Validierung überprüft, können folglich keine genauen Vorhersagen getroffen werden.

Der Vorteil, die Laborwerte in bereits vorhandene Kalibrierungen einzuarbeiten, besteht darin, dass die Anzahl der Kalibrationsproben größer ist. Mit jeder neu hinzugefügten Probe wird die Kalibrierung besser und robuster, was anhand des RPD-Wertes (Kapitel 3.2.3 Validierung, Gleichung 3-10) gemessen werden kann.

Beispielhaft wurde anhand der Methode „Curds\_Protein“ eine Optimierung einer Kalibrierung verdeutlicht. Abbildung 15 (Seite 68) zeigt die ursprüngliche Methode „Curd-Protein“ mit den neuen eingetragenen Werten der gemessenen Eiweißproben. Wird nun eine Optimierung mit der Software OPUS durchgeführt, können beide Werte in eine positive Richtung geändert werden (Seite 69 Abbildung 16). Zusätzlich zur Optimierung wurden auch die Laborwerte der Proben „Frischkäse – V6“ und „Frischkäse – V7“ eingetragen (Seite 69 Abbildung 17). Die Kalibrierung konnte nicht nur erweitert, sondern auch verbessert werden. Nun ist es möglich Frischkäse, Quark und Mascarpone bis zu einem Proteingehalt von 30 % vorherzusagen. Für eine genaue Vorhersage fehlen jedoch noch weitere Messwerte in diesem Bereich. Es wird grundsätzlich ein hohes Bestimmtheitsmaß und ein niedriger Standardfehler angestrebt (Kapitel 3.2.3 Validierung). (Bruker, 2019)

## 5.2 Datenanalyse

Im ersten Schritt wurden alle Proben mit den unveränderten Curds-Kalibrierungen analysiert. Die Vorhersagen der NIR-Spektroskopie waren nicht zufriedenstellend. Als im nächsten Schritt die Kalibrierungen durch die nasschemisch ermittelten Referenzwerte erweitert und anschließend eine erneute Datenanalyse durchgeführt wurde, konnte eine deutliche Verbesserung der Werte beobachtet werden (Anhang, Tabellen 13 bis 15). Doch auch mit diesen neuen Kalibrierungen, die auf weitaus fettere und weniger feuchte Produkte, vor allem Mascarpone und Doppelrahmfrischkäse, zugeschnitten wurden, können noch keine verlässlichen Werte vorhergesagt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Vorhersage des Fettgehaltes (Seite 77 Abbildung 28).

Es ist zu erkennen, dass die Werte der NIR-Spektroskopie dem Laborwert nach der Methodenvalidierung weitestgehend entsprechen. Im Folgenden soll die Vorhersage des Trockenmassegehaltes betrachtet werden (Seite 71 ff). Grundsätzlich werden die Proben mit einem niedrigen Gehalt an Trockenmasse mit einer höheren Genauigkeit vorhergesagt als solche mit einem höheren Gehalt. Das kann damit erklärt werden, dass bereits viele Proben mit einem geringeren Gehalt an Trockenmasse als 30 % in die Kalibrierung eingetragen wurden. Die übliche Trockenmasse für Quark, für welchen diese Kalibrierung entwickelt wurde, liegt bei ca. 20 % (Spreer, 2010). Für diese Produkte wurden bereits viele Laborwerte hinterlegt, weshalb die Vorhersage in diesem Bereich besser ist als im Bereich einer höheren Trockenmasse (Seite 72 f. Abbildungen 19 bis 21). Im Bereich der höheren Trockenmasse (> 30 %) liegen nur wenige Kalibrationsproben vor. Deshalb ist die Vorhersage der NIR-Spektroskopie nicht korrekt. Durch das Hinzufügen der Trockenmassegehalte der Mascarpone und des Doppelrahmfrischkäses konnte die Methode verbessert werden (Abbildung 12).

Wird die Vorhersage des Fettgehaltes (Seite 75 ff) betrachtet, können gegensätzliche Beobachtungen zu denen der Trockenmasse gemacht werden. Aus Abbildung 14 auf Seite 67 kann entnommen werden, dass sich die Kalibrierung „Curds\_Fat“ des Herstellers eher auf einen Fettgehalt von ca. 0 bis 15 % konzentriert. Dadurch, dass die hergestellten Proben aus dem Technikum einen weitaus höheren Fettgehalt haben (30 bis 45 % (Seite 39 Tabelle 8)), können diese mit der ursprünglichen Methode des Herstellers nicht genau vorhergesagt werden. Sie liegen außerhalb des Kalibrationsbereiches, womit die Vorhersagen der Werte nicht mehr fundiert, sondern spekulativ sind (siehe Kapitel 3.2.1 Software OPUS 8). Aus diesem Grund kann der

Fettgehalt der industriellen Proben mit der ursprünglichen Kalibrierung „Curds\_Fat“ besser vorhergesagt werden als der der anderen Proben (Seite 76 Abbildung 26).

Wird im Gegenzug die eigene entwickelte Kalibrierung betrachtet, ist bei den industriellen Proben eine große Abweichung zu erkennen (Seite 103 Tabelle 14 und Seite 76 Abbildung 26). In dieser Methode überwiegt die Anzahl der Proben mit einem höheren Fettgehalt ( $> 30\%$  (Seite 66 Tabelle 13)). Neben den industriellen Proben (Quark 20 % und 40 % F.i.Tr) liegen keine weiteren Proben vor, die einen niedrigeren Fettgehalt ( $< 10\%$ ) besitzen. Deshalb kann keine genaue Vorhersage getroffen werden (Seite 77 Abbildung 28).

Die genauesten Ergebnisse können mit der vervollständigten Methode erzielt werden. Bei dieser Methode wird sowohl der Bereich des niedrigeren als auch der des höheren Fettgehaltes abgedeckt (Seite 103 Tabelle 14 und Seite 75 f. Abbildungen 24 bis 26).

Die Kalibrierung „Curds\_Protein“ steht noch am Anfang der Entwicklung, da noch nicht viele Proben in die Kalibrierung eingetragen wurde. Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass die Vorhersagen der Methode „Curds\_Protein“ mit einer Abweichung von ca. 4 bis 6 % (absolut, Seite 104 Tabelle 15) zu den Laborwerten getroffen werden. Der Proteingehalt der ursprünglichen Kalibrierung befindet sich ursprünglich bei ca. 8 bis 17 % (Seite 68 Abbildung 15). Die Kalibrationsbandbreite wird durch den niedrigen Eiweißgehalt der untersuchten Proben im Bereich  $< 8\%$  erweitert (markierte Werte, Seite 68 Abbildung 15).

Sowohl bei der Vorhersage der Trockenmasse als auch bei der von Fett können durch das Einfügen der ermittelten Laborwerte Verbesserungen erzielt werden. Wurden einige Werte durch die Methode „Curds\_DM“ und „Curds\_Fat“ noch als Ausreißer gekennzeichnet, so können diese durch die neuen Kalibrierungen nahezu korrekt vorhergesagt werden (Anhang Tabellen 13 bis 15). Werden Vergleiche zwischen den Laborwerten und der Vorhersage der „Curds“-Methoden gezogen, dann werden zwar keine korrekten Werte angezeigt, aber die Tendenz ist meist zu erkennen.

Die Methoden, die erweitert wurden, entsprechen eher den vielfältigen Produkten, die zum Beispiel während eines milchtechnologischen Praktikums hergestellt werden. Deshalb ist es sinnvoll, nur eine Methode zu entwickeln, die eine große Bandbreite an verschiedenen zusammengesetzten Proben abdeckt. In der Industrie unterscheiden sich die Produkte einer Charge oft nur wenig voneinander, da es sich um automatisierte und standardisierte Herstellungsprozesse handelt. Deshalb werden herstellungsbedingt häufig ähnliche Proben mit der NIR-Spektroskopie

untersucht. Ein weiterer Vorteil der Verwendung der NIR-Spektroskopie in der Industrie ist das hohe Probenaufkommen. Dadurch, dass viele ähnlich zusammengesetzte Proben anfallen, können zu Beginn eines NIR-Bibliothekaufbaus viele nasschemische Analysemethoden durchgeführt werden. All diese intensive Arbeit im Vorfeld verbessert letztendlich die Genauigkeit der NIR-Messtechnik. Sultaneh beschreibt in seinem Paper „*Using near infrared spectroscopy for the determination of total solids and protein content in cheese curd*“ (2007), dass insgesamt 242 Proben für die NIR-Spektroskopie untersucht wurden. Diese Proben hatten alle eine ähnliche Zusammensetzung aus Fett und Eiweiß. In weiteren Quellen werden 259 (Yang, 2013) oder 287 (Bendini, 2007) Proben verwendet.

Gemäß der einschlägigen Literatur ist eine große Menge an Proben notwendig, um überhaupt die Basis einer NIR-Methode zu legen (Antony, 2018; Yang, 2013). Die Methode „Curds\_DM“ konnte mit 16 Werten auf insgesamt 115 Kalibrationproben erweitert werden (Seite 64 f. Abbildungen 11 und 12). Die Methode „Curds\_Fat“ konnte mit 24 Ergebnissen der Fettgehaltsbestimmung auf insgesamt 143 Proben erweitert werden (Seite 66 f. Abbildungen 13 und 14). Abschließend ist es gelungen, den Kalibrationsbereich der Methode „Curds\_Protein“ durch 10 Ergebnisse der Rohproteinbestimmung auf insgesamt 40 Proben zu erhöhen (Seite 69 Abbildung 17). Die ergänzten Kalibrierungen sind in Hinblick auf die Anzahl der Proben bereits mit denen aus der Literatur vergleichbar. Durch neue Proben müssen allerdings die Ränge und die RMSECV-Werte reduziert sowie das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  erhöht werden (Kapitel 3.2.3 Validierung).

### 5.3 Nächste Schritte

Für die Erstellung einer neuen Kalibrierung ist jedoch eine viel größere Probenzahl notwendig. Zudem sind teilweise Nachmessungen notwendig. Dadurch, dass es sich bei Mascarpone und Frischkäse um ein leicht verderbliches Produkt handelt, können diese Nachmessungen oft nicht durchgeführt werden.

Es ist vorteilhaft, im Hinblick auf eine möglichst gute und genaue Kalibrierung weitere Probenmessungen und Referenzanalysen vorzunehmen und die bestehenden Kalibrierungen laufend zu verbessern. Außerdem ist es zukünftig wichtig, mindestens zwei Spektren von einer Probe aufzunehmen. Durch die diversen Datenvorbehandlungsmethoden können die Spektren aneinander angeglichen werden, sollten sie nicht zueinander passen. Dadurch wird die Genauigkeit der Methoden verbessert.

In Kapitel 4.2.1 Praxisanleitungen wird auf Seite 50 auf das Eintragen der Laborwerte in die Kalibrierungen eingegangen. In dieser Arbeit wurde aufgrund der geringen Probendichte zu einem Spektrum immer der Mittelwert einer Mehrfachbestimmung angegeben. Oft war nur ein Spektrum, aber zwei oder drei Messwerte verfügbar. Zukünftig ist es ratsam, von einer Probe beispielsweise drei Spektren aufzunehmen. Anschließend werden die Proben nasschemisch untersucht. Dabei sollte ebenfalls eine Dreifachbestimmung durchgeführt werden. So kann jedem aufgenommenen Spektrum ein Laborwert zugeordnet werden. Werden zukünftig keine Mittelwerte mehr eingetragen, können Messfehler nicht mehr komprimiert werden. Außerdem kann auf diese Weise schneller ein großer Datensatz an Kalibrationsproben erreicht werden. Werden in Zukunft alle Einzelwerte in die Kalibrierungen eingetragen, ist es wichtig, dass die Messergebnisse einer Dreifachbestimmung zueinander passen. Ist dies nicht der Fall, bietet sich die Durchführung eines Ausreißertests an.

Zudem sollte die Arbeit mit der Software OPUS 8 laufend verbessert werden. Sobald auch speziellere Funktionen der Software bedient werden können, ist es möglich, bessere Spektren aufzunehmen und diese zu bearbeiten. Basierend auf den Erfahrungen mit der Spektrenaufnahme, können geeignete Spektren schneller identifiziert und bei Bedarf die Aufnahme der Spektren wiederholt werden.

Ein weiterer wichtiger Schritt ist, nach allen vorbereitenden Maßnahmen, nun verschiedene Sorten Frischkäse, Quark und Mascarpone mit dem NIR-Spektrometer zu messen, um zu überprüfen, wie gut die Kalibrierungen sind. Gleichzeitig kann dadurch herausgefunden werden, in welchem Fett-, Trockenmasse- und Proteinbereich neue Proben in Methoden eingetragen werden müssen. Zusätzlich sollten künftig Testset-Validierungen durchgeführt werden, um zu überprüfen, wie robust die Kalibrierung ist. Dabei werden unabhängige Proben, also Proben die nicht in der Kalibrierung eingetragen sind, mit dem NIR-Spektrometer gemessen und analysiert.

Eine weitere Möglichkeit, eine größere Bandbreite an Produkten in das Spektrometer einzutragen, ist zum Beispiel das Verdünnen der Mascarpone mit Wasser. Das hätte den Vorteil, dass diese Produkte nicht speziell hergestellt werden müssen, und die Erweiterung der NIR-Bibliothek mit bereits vorhandenen, jedoch leicht veränderten Proben realisiert werden könnte. Der Nachteil ist die Vertrauenswürdigkeit der untersuchten Laborwerte. Ein weiterer Punkt, der zukünftig berücksichtigt werden könnte, ist der Einfluss des pH-Wertes auf die Vorhersagegenauigkeit der NIR-Spektroskopie.

## 6 Zusammenfassung

Damit das NIR-Spektrometer kalibriert werden kann, ist es notwendig, zu Beginn eine nasschemische Referenzanalytik im Labor durchzuführen. Bei dem zu untersuchenden Probenmaterial handelte es sich um verschiedene Sorten Frischkäse, Mascarpone und Quark (20 % und 40 % F.i.Tr.). Diese wurden sowohl im Technikum der Hochschule Neubrandenburg als auch industriell hergestellt. Die für den Versuch relevanten Inhaltsstoffe sind der Fettgehalt, der Gehalt an Rohprotein und Trockenmasse. Nasschemisch wurde der Fettgehalt nach dem butyrometrischen Verfahren Van Gulik (VDLUFA) ermittelt. Für die Untersuchung der Trockenmasse wurde die Folienmethode (VDLUFA) verwendet, und die Bestimmung des Rohprotein-gehaltes erfolgte nach der Kjeldahl-Methode (LFGB).

Die nasschemischen Analyseergebnisse wurden anschließend in die bereits vorhandene Quark-Kalibrierung eingetragen und die neuen Ergebnisse verglichen. Durch die Erweiterung der Quark-Kalibrierungen mit den Analyseergebnissen ist es nun möglich, auch fettreichere Produkte, wie Mascarpone oder Frischkäse, auf den Fett-, Trockenmasse- und Proteingehalt zu untersuchen. In einem weiteren Versuch wurden mit den gleichen Untersuchungsergebnissen eigene Kalibrierungen erstellt, um die fettreicheren Produkte, wie Mascarpone und Frischkäse, von den weniger fettreichen Produkten, wie Quark, zu differenzieren. Diese neuen Kalibrierungen, bei denen es um die Bestimmung des Fett- und Trockenmassegehaltes geht, können allerdings noch nicht als eigenständige Methoden betrachtet werden. Die Anzahl der Proben, mit denen die neuen Kalibrierungen aufgebaut wurden, liegt zwischen 16 und 24. Diese Probengröße reicht nur aus, um den Grundstein einer neuen Methode zu legen. Für eine sichere und stabile NIR-Methode werden laut Hersteller und in Anlehnung an die Literatur weitaus mehr Proben ( $n > 100$ ) benötigt. Für die Bestimmung des Eiweißgehaltes wurde jedoch keine neue Kalibrierung entwickelt, da die Probenmenge zu klein ist. Allerdings konnte die bestehende NIR-Methode „Curds-Protein“ mit den neu ermittelten Werten erweitert werden und weist nun eine größere Bandbreite des vorherzusagenden Proteingehaltes auf (bis ca. 33 %).

Um die NIR-Methodik der Hochschule Neubrandenburg allerdings als alleinige Untersuchungsmethode betrachten zu können, ist es notwendig, weitere nasschemische Untersuchungen durchzuführen. Mit den Ergebnissen, vor allem der Komponenten Fett, Trockenmasse und Eiweiß, kann die „Bibliothek“ des NIR-Spektrometers stetig erweitert werden. Durch diese

Erweiterung können zukünftig robustere Methoden erstellt und genauere Vorhersagen getroffen werden.

Das Ziel der Arbeit, neue Kalibrierungen für die im Technikum hergestellten Produkte zu erstellen bzw. bestehende Methoden zu vervollständigen, wurde weitestgehend erreicht. Zudem wurden Praxisanleitungen erstellt, die die nachfolgenden Arbeiten am NIR-Spektrometer erleichtern sollen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Antony, B., al., et. „Study of Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectra of ghee (anhydrous milk fat) [online].“ *International Journal of Dairy Technology* 2018. 02. Oktober 2019. <<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12450>>.
- Aschenbroich, G. *Identitätskontrolle pharmazeutischer Hilfsstoffe mit Hilfe der NIR-Spektroskopie und Aufbau einer entsprechenden Datenbank [online]*. Dissertation. Langenfeld, 2005. 15. Oktober 2019. <[https://duepublico2.uni-due.de/servlets/MCRFileNodeServlet/duepublico\\_derivate\\_00005679/Aschenbroich\\_Diss.pdf](https://duepublico2.uni-due.de/servlets/MCRFileNodeServlet/duepublico_derivate_00005679/Aschenbroich_Diss.pdf)>.
- Bake, K. *Handbuch der Milch- und Molkereitechnik*. Glinde: Th. Mann, 2003.
- Bendini, A., et al. „In-process monitoring in industrial olive mill by means of FT-NIR [online].“ *European Journal of Lipid Science and Technology* 2007: 498 - 504. 12. Dezember 2019. <<https://doi.org/10.1002/ejlt.200700001>>.
- Bruker-Optik. *Betriebliche Quelle*. Ettlingen, 2019.
- . *Handbuch OPUS 8*. Ettlingen, 2017.
- Cámara-Martos, F., et al. „Detection and quantification of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in cow milk by near infrared spectroscopy. [online].“ *International Journal of Dairy Technology* August 2015. 12. Dezember 2019. <<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12191>>.
- Cao, S. *Fettreduzierung bei Mascarpone*. Masterarbeit. Neubrandenburg, Fertigstellung 2020.
- Conzen, J.-P. *Multivariate Kalibration. Ein praktischer Leitfaden zur Methodenentwicklung in der quantitativen Analytik*. 4. Ettlingen: Bruker Optik, 2005.
- Döhmman, F. *Herstellung von Mascarpone im Technikumsmaßstab*. Studienarbeit. Neubrandenburg, 2018.
- Figura, L. *Lebensmittelphysik*. Berlin: Springer, 2004.
- Finke, M. *Einsatz der Nah-Infrarot (NIR)-Spektroskopie zur quantitativen Bestimmung ausgewählter pflanzlicher Inhaltsstoffe [online]*. Dissertation. Braunschweig, 2003. 17. November 2019. <<https://d-nb.info/968061184/34>>.
- Günzler, H., Böck, H. *IR-Spektroskopie: Eine Einführung*. 2. Weinheim: Verlag Chemie, 1983.
- Herschel, W. *XIV. Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the sun [online]*. *Philos. Trans.*, 1800. 13. November 2019. <<https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rstl.1800.0015>>.

- Joshi, A. M., Olsen, G. H. *Handbook of Optics: Design, Fabrication and Testing, Sources and Detectors, Radiometry and Photometry 3. Chapter 16: Photodetection*. 3. Bd. II. USA: McGraw-Hill Professional, 2010.
- Käseverordnung. 05. Juli 2017. 15. Oktober 2019.
- Kessler, H. G. *Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik: Molkereitechnologie*. 4. München-Weihenstephan: A. Kessler, 1996.
- LFGB. „§ 64: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren.“ 03. Juni 2013. 15. Oktober 2019.
- Li, Z. *Fettverringern bei Doppelrahmfrischkäse durch Erhöhung des Proteingehaltes*. Masterarbeit. Neubrandenburg, Fertigstellung 2020.
- Matissek, R., et al. *Lebensmittelanalytik*. 6. Berlin: Springer, 2018.
- Melfen, A. „Analyse von Milchinhaltstoffen auf Basis der NIR-Spektroskopie.“ 3. *Tänikonerkonferenz Melktechniktagung*. Ettenhausen: Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, 2011.
- Müller, K. *Vergleichende Untersuchungen der Trockenmassebestimmung verschiedener Frischkäseerzeugnisse*. Studienarbeit. Ottenstein/Glesse, 2019.
- Polytec-GmbH. *Prozesskontrolle mit NIR-Spektroskopie [online]*. November 2007. 15. Oktober 2019. <[http://www.analyticjournal.de/downloads\\_firmen/polytec\\_prozess\\_mit\\_nir.pdf](http://www.analyticjournal.de/downloads_firmen/polytec_prozess_mit_nir.pdf)>.
- Rager, I. *Einsatz der NIR Spektroskopie in der pharmazeutischen Analytik: Charakterisierung von Johanniskraut Trockenextrakten und Kopplungsmöglichkeiten mit der HPTLC [online]*. Dissertation. Tübingen, 2001. 15. Oktober 2019. <<https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/bitstream/handle/10900/48314/pdf/DissBibliothek.pdf?sequence=1>>.
- Rocha, R., et al. „Detection and quantification of whey in raw milk by near infrared spectroscopy [online].“ *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement* 2015. 12. Dezember 2019. <[http://apps.webofknowledge.com/full\\_record.do?product=FSTA&search\\_mode=GeneralSearch&qid=4&SID=F2UgunjYtCLpxpIKvK9&page=1&doc=4&cacheurlFromRichtClick=no](http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=FSTA&search_mode=GeneralSearch&qid=4&SID=F2UgunjYtCLpxpIKvK9&page=1&doc=4&cacheurlFromRichtClick=no)>.
- Rudzik, L., Wüst, E. „Infrarotspektroskopie in der Milchwirtschaft.“ *Spektrum der Wissenschaft* November 1998. 17. September 2019. <Verfügbar unter: <https://www.spektrum.de/magazin/infrarotspektroskopie-in-der-milchwirtschaft/824961>>.

- Spreer, E. *Technologie der Milchverarbeitung*. 9. Hamburg: Behr's, 2010.
- Sultaneh, A., Rohm, H. „Using near infrared spectroscopy for the determination of total solids and protein content in cheese curd [online].“ *International Journal of Dairy Technology* November 2007. 15. Oktober 2019.  
<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1471-0307.2007.00347.x>>.
- Töpel, A. *Chemie und Physik der Milch*. 3. Hamburg: Behr's, 2007.
- VDLUFA. *Methodenbuch Band IV: C 15.3.8 Butyrometrische Bestimmung des Fettgehaltes von Käse - Verfahren nach Van Gulik*. 4. 1985.
- . *Methodenbuch Band IV: C 30.2 Bestimmung des Gesamt-Stickstoffgehaltes von Milch und Milchprodukten nach Kjeldahl*. 4. 1985.
- . *Methodenbuch Band IV: C 35.4 Bestimmung des Trockenmassegehaltes von Käse - Folienmethode*. 4. 1985.
- Wehlen, S. *Mascarpone - Fettreduzierung zugunsten von Protein und Wasser*. Studienarbeit. Neubrandenburg, 2019.
- . *Veredelung einer Doppelrahmfrischkäserezeptur durch den Metabolismus von Aromakulturen*. Bachelorarbeit. Neubrandenburg, Fertigstellung 2020.
- Williams, P und K. Norris, *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. USA: American Association of Cereal Chemists, 2001.
- Yang, X. „Determination of Protein, Fat, Starch, and Amino Acids in Foxtail Millet [*Setaria italica* (L.) Beauv.] by Fourier Transform Near-Infrared Reflectance Spectroscopy [online].“ *Food Science Biotechnology* Dezember 2013: 1495 - 1500.  
02. Oktober 2019. <<https://doi.org/10.1007/s10068-013-0243-1>>.

## Bildquellen

- <https://chemieplanet.org/wiki/Infrarotspektroskopie> [Letzter Aufruf am 28.12.2019]
- <https://opranic.de/infrarotheizung/> [Letzter Aufruf am 11.11.2019]
- <https://www.gettyimages.de/detail/nachrichtenfoto/the-michelson-interferometer-measures-the-effect-on-nachrichtenfoto/143064382> [Letzter Aufruf am 11.11.2019]
- [https://www.univie.ac.at/mikroskopie/1\\_grundlagen/optik/wellenoptik/5b\\_destruktiv.htm](https://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/optik/wellenoptik/5b_destruktiv.htm) [Letzter Aufruf am 26.11.2019]

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erläuterungen zum Strahlengang (Abbildung 5).....	15
Tabelle 2: Anzahl der Versuche, Wiederholungen je Versuch und Angabe des erwarteten Wertebereiches.....	23
Tabelle 3: Übersicht über den im Technikum hergestellten Frischkäse und Mascarpone (theoretisch ermittelt) .....	24
Tabelle 4: Beispielrechnung .....	25
Tabelle 5: Angaben zu industriell hergestelltem Käse .....	26
Tabelle 6: Curds-PSPD.....	29
Tabelle 7: Verteilung der RPD-Werte.....	34
Tabelle 8: Ergebnisse der nasschemischen Analyse .....	39
Tabelle 9: Erläuterungen zum Analysereport (Abbildung 10).....	63
Tabelle 10: Legende zu den Abbildungen 11 bis 17 .....	63
Tabelle 12: Legende zu den Abbildungen 22, 23, 27, 28 und 30 .....	73
Tabelle 12: Einzelergebnisse der nasschemischen Untersuchungen.....	100
Tabelle 13: Vergleich von Laborwerten und der NIR-Vorhersage (Trockenmasse) .....	102
Tabelle 14: Vergleich von Laborwerten und der NIR-Vorhersage (Fett) .....	103
Tabelle 15: Vergleich von Laborwerten und der NIR-Vorhersage (Eiweiß) .....	104

## 9      **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Lage des NIR im elektromagnetischen Spektrum .....	10
Abbildung 2: Modell des anharmonischen Oszillators.....	11
Abbildung 3: Transmission.....	13
Abbildung 4: Diffuse Reflektion.....	13
Abbildung 5: Strahlengang (orange eingezeichnet) .....	15
Abbildung 6: Michelson-Interferometer.....	16
Abbildung 7: Konstruktive (a) und destruktive (b) Interferenz .....	17
Abbildung 8: Integrationskugel.....	18
Abbildung 9: Überladender Detektor (a) und „verraushtes“ Spektrum (b) .....	27
Abbildung 10: Auszug aus einem Analysereport: Beispiel eines aufgezeichneten Spektrums	62
Abbildung 11: Kreuzvalidierung der Methode „Mascarpone“ mit ausschließlich neuen Werten: Trockenmasse (n = 16).....	64
Abbildung 12: Kreuzvalidierung der vervollständigten Methode „Curds_DM“ des Herstellers: Trockenmasse (n = 115) .....	65
Abbildung 13: Kreuzvalidierung der Methode „Mascarpone“ mit ausschließlich neuen Werten: Fettgehalt (n = 24).....	66
Abbildung 14: Kreuzvalidierung der vervollständigten Methode „Curds_Fat“ des Herstellers: Fettgehalt (n = 143) .....	67
Abbildung 15: Kreuzvalidierung der vervollständigten Methode „Curds_Protein“ des Herstellers: Eiweiß (n = 38).....	68
Abbildung 16: Kreuzvalidierung der vervollständigten Methode „Curds_Protein“ des Herstellers: Eiweiß nach Optimierung (n = 38) .....	69
Abbildung 17: Kreuzvalidierung der vervollständigten Methode „Curds_Protein“ des Herstellers: Eiweiß nach Optimierung (n = 40) .....	69
Abbildung 18: RMSECV vs. Rang – Trockenmasse .....	70
Abbildung 19: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Trockenmasse – Technikum – Frischkäse .....	72
Abbildung 20: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Trockenmasse – Technikum – Mascarpone.....	72
Abbildung 21: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Trockenmasse – industrielle Proben.....	73
Abbildung 22: Datenanalyse – Trockenmasse (vervollständigt) (n = 19).....	74

Abbildung 23: Datenanalyse – Trockenmasse (eigene Werte) (n = 19).....	74
Abbildung 24: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Fettgehalt – Technikum – Frischkäse .....	75
Abbildung 25: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Fettgehalt – Technikum – Mascarpone.....	76
Abbildung 26: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Fettgehalt – industrielle Proben.....	76
Abbildung 27: Datenanalyse – Fett (vervollständigt) (n = 19).....	77
Abbildung 28: Datenanalyse – Fett (eigene Werte) (n = 19).....	77
Abbildung 29: Gegenüberstellung von Laborwerten und NIR-Vorhersagen: Rohproteingehalt .....	78
Abbildung 30: Datenanalyse – Eiweiß (vervollständigt) (n = 8).....	78

## 10 Anhang

### 10.1 Untersuchungsmethoden

#### 10.1.1 Bestimmung des Fettgehaltes (gemäß VDLUFA)

##### Durchführung

Zuerst werden  $3 \pm 0,005$  g der Probe mittels der Analysewaage in den Käsebecher eingewogen. Der Käsebecher verschließt das Butyrometer an seiner großen Öffnung. Nun wird durch die kleinere Öffnung Schwefelsäure eingefüllt, sodass sie bis kurz unter den Becherrand reicht. Das Butyrometer wird mit einem passenden Stopfen an der kleinen Öffnung verschlossen und kräftig geschüttelt. Wichtig ist, dass die Sicherheitsvorkehrungen beachtet werden und an die persönliche Schutzausrüstung gedacht wird. Das Butyrometer wird in das Wasserbad gestellt, so dass sich der Käse auflöst. Das Wasserbad ist notwendig, da die Butyrometer auf 65 °C geeicht sind und die Auflösung der Probe schneller geht. Es ist sinnvoll, das Butyrometer zur schnelleren Auflösung zu Beginn mit der Schüttelhülse per Hand zu schütteln. Die Verbleibzeit des Butyrometers im Wasserbad beträgt 15 Minuten.

Anschließend wird durch die kleine Öffnung des Butyrometers 1 ml Amylalkohol zugefügt und der Inhalt geschüttelt. Weiterhin wird das Butyrometer bis zur Hälfte der Skala mit Schwefelsäure aufgefüllt und erneut geschüttelt. Es wird wieder ins Wasserbad gestellt, in dem es 5 Minuten nachgewärmt wird. Bevor das Butyrometer zentrifugiert wird, wird der Inhalt erneut gestürzt und leicht geschüttelt. Die Butyrometer werden so in der Zentrifuge platziert, dass die kleine Öffnung nach innen und die große Öffnung nach außen zeigt. Aufgrund der Zentrifugalkraft werden die schweren Bestandteile, bzw. diejenigen, die eine höhere Dichte aufweisen, in diesem Fall die Schwefelsäure und alle Nichtfettbestandteile der Probe nach außen gedrückt. Die leichteren Bestandteile, also das in der Probe befindliche Fett, werden in Richtung der Zentripetalkraft nach innen transportiert. Die Probe wird für 10 Minuten bei der oben genannten (Kapitel 3.3.1 Bestimmung des Fettgehaltes) g-Zahl zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren muss das Butyrometer für 5 Minuten im Wasserbad nachgewärmt werden. Es ist zu beachten, dass sich das Fett währenddessen nicht in die Birne ausdehnen kann. Dementsprechend ist die Fettsäule durch Veränderung der Stopfenposition einzustellen. Außerdem muss die Fettsäule vollständig mit Wasser bedeckt sein. Geschieht dies nicht, kann es zu späteren Ablesefehlern und ungenauen Ergebnissen kommen.

Der Fettgehalt wird dabei aus der Differenz des tiefsten und des höchsten Wertes der Fettphase gebildet. Die Wiederholbarkeit beträgt 0,5 % bzw. einen Skalenteil.

#### Anmerkung

Sollten die oben genannten 3 g nicht genau abgewogen worden sein, so ist der Fettgehalt mit der nachfolgenden Gleichung zu korrigieren. Die Angabe des Fettgehaltes erfolgt in %.

$$\text{Fettgehalt}_{\text{neu}} [\%] = \frac{\text{abgelesener Fettgehalt} [\%] * 3}{\text{Einwaage [g]}}$$

### **10.1.2 Bestimmung des Trockenmassegehaltes (gemäß VDLUFA)**

#### Durchführung

Zwei der auf die oben (Kapitel 3.3.2 Bestimmung des Trockenmassegehaltes) angegebene Größe zugeschnittenen Folien werden übereinandergelegt und an einer der Längsseiten doppelt gefaltet. Der Falz beträgt etwa 1 cm. Das Leergewicht wird ermittelt. Anschließend wird zwischen beiden Aluminiumfolien etwa 3 bis 4 g der Probe abgewogen und die genaue Masse notiert. Die drei offenen Seiten der Folie werden nun durch einfaches Falten verschlossen und die Probe mit einem geeigneten Gegenstand über die gesamte Oberfläche der Folie verteilt.

Anschließend sind die drei zuvor geschlossenen Seiten wieder zu öffnen und die Aluminiumfolie wie ein geöffnetes Buch in den Trockenschrank zu legen. Die Falzränder sollten dabei nach oben zeigen. Da der Frischkäse beim Trocknen porös wird, wird durch das Falten der Ränder verhindert, dass Teile der Probe zu Boden fallen und so das Messergebnis verfälschen. Die Trocknung erfolgt über 2 Stunden bei  $102 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Nach Ablauf der Zeit können die Aluminiumfolien sofort zurückgewogen werden, da das Abkühlen im Exsikkator entfällt. Die Folien sind nach kurzer Zeit auf Raumtemperatur abgekühlt. Beim Wiegen müssen die Folien zusammengefaltet werden. Es ist darauf zu achten, dass sich kein getrockneter Käse von der Folie ablöst, was das Ergebnis verfälschen könnte. Dabei ist es hilfreich, die Folien auf einer schwarzen Unterlage zu transportieren. Sollte sich der Käse doch ablösen, kann er mit einem Pinsel vorsichtig auf die Folien zurückgeschoben werden.

Anschließend muss die Probe für 30 Minuten nachgetrocknet werden. Das erfolgt so lange, bis die Masse zweier aufeinanderfolgender Wägungen weniger als 1 mg voneinander abweicht oder bis ein Masseanstieg erfolgt. Sollte das geschehen, wird zur Berechnung die Masse der Wägung zuvor herangezogen.

#### Auswertung

$$TM [\%] = \frac{\text{Rückwaage [g]} - \text{Leergewicht Aluminiumfolie [g]}}{\text{Einwaage [g]}} * 100 \%$$

Die Wiederholbarkeit beträgt 0,3 %. Die Angabe der Trockenmasse erfolgt auf zwei Dezimalstellen.

### **10.1.3 Bestimmung des Rohproteingehaltes (gemäß LFGB § 64)**

#### Durchführung

##### 1. Aufschluss

Die Höhe der Einwaage hängt von dem zu erwartenden Stickstoffgehalt ab. Außerdem wird der Proteinfaktor zur anschließenden Berechnung des Stickstoffgehaltes benötigt. Dieser beträgt bei Lebensmitteln im Allgemeinen 6,25 und speziell bei Milchprodukten 6,38. Es wird immer eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Einwaage erfolgt verlustfrei über ein stickstofffreies Wägeschiffchen. Der Inhalt wird verlustfrei in das Kjeldahl-Aufschlussglas überführt. Das Wägeschiffchen löst sich bei der Zugabe der Schwefelsäure auf. Die vorbereitenden Arbeiten für den Aufschluss sind unter dem Abzug mit vollständiger persönlicher Schutzausrüstung durchzuführen, da mit hochkonzentrierter Schwefelsäure gearbeitet wird.

Anschließend werden zwei Glasperlen, ein Kjeltab und 20 ml 98 %-ige Schwefelsäure hinzugefügt. Die Proben werden in den Aufschlussblock gestellt und nach folgendem Temperatur-Zeit-Schema erhitzt. Dabei wird die Zeit erst gestartet, sobald die gewünschte Temperatur erreicht ist.

20 Minuten bei 250 °C: Entwässerungsphase

45 Minuten bei max. 380 °C: Hauptphase

45 Minuten bei max. 380 °C: Nacherhitzung

30 Minuten bei Raumtemperatur: Abkühlen

Der Aufschluss ist abgeschlossen, sobald die Probe frei von festen schwarzen Bestandteilen ist und eine grün-bläuliche Farbe angenommen hat. Sollte nach der vorgeschriebenen Zeit die Probe noch nicht vollständig aufgeschlossen sein, kann die Erhitzung bei 380 °C verlängert werden. Sollte während des Aufschlusses die Probe zu sehr kochen bzw. Bestandteile an der Wandung des Kjeldahlkolben hängen, ist die Probe nach dem Abkühlen aus dem Aufschlussblock zu entfernen und die Bestandteile mit entionisiertem Wasser herunterzuspülen. Anschließend sollte eine erneute Erhitzung durchgeführt werden.

## 2. Destillation

Nachdem die Proben aufgeschlossen wurden, können 50 ml destilliertes Wasser hinzugegeben werden. Das verhindert das Festwerden des Aufschlusses. Dieses ist notwendig, wenn die Destillation zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden soll.

Anschließend werden 50 ml Borsäurelösung (4 %-ig) und 1 bis 3 Tropfen des Mischindikators in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt. Dieser dient als Vorlagegefäß, in welchem das Destillat aufgefangen wird. Der Kjeldahlkolben wird in die Destillationsapparatur eingespannt und der Erlenmeyerkolben mit einem Schlauch damit verbunden. Die Destillation kann gestartet werden und dauert 6 Minuten.

## 3. Titration

Das Destillat hat den Indikator grün werden lassen. Die Borsäure mit dem Destillat wird nun mit 0,1 molarer Salzsäure titriert. Die Farbe des Indikators wechselt von grün nach farblos und anschließend nach violett. Ist dieser Farbton erreicht, ist die Titration abgeschlossen und der Gehalt an Stickstoff in der Probe kann mit der nachfolgenden Gleichung errechnet werden.

### Auswertung

$$\text{Eiweiß [\%]} = \frac{\text{Verbrauch an HCl - Lösung [ml]} * 6,38 * 1,4 \text{ mg N}}{1000 * \text{Einwaage [g]}} * 100$$

Der Gesamt-Stickstoffgehalt ist in g/100 g anzugeben. Der Faktor 6,38 erlaubt es jedoch, den Eiweißgehalt in Prozent [%] umzurechnen. Dieser Faktor ist produktspezifisch und bezieht sich auf Milch- und Milchprodukte.

Die Menge 1,4 mg ist der Gehalt an Stickstoff, der 1 ml der verbrauchten Salzsäurelösung äquivalent ist.

#### Beispielrechnung

Quark 20 % F.i.Tr.

Einwaage: 1,5127 g

Verbrauch an HCl: 17,9 ml

Auswertung: 17,9 ml \* 1,4 mg N (aus 1 ml HCl ergeben sich 1,4 mg N) = 25,06 mg N

Rohproteinmenge = 25,06 mg N \* 6,38 = 159,88 mg N  $\hat{=}$  0,15988 g N

Rohproteingehalt =  $\frac{0,15988 \text{ g}}{1,5127 \text{ g}} * 100 \% = \mathbf{10,56 \%}$

## 10.2 Rohdaten

Tabelle 12: Einzelergebnisse der nasschemischen Untersuchungen

	Probe	TM	Fett	EW
Technikum	Friskäse – V1,1	46,91	32,20 31,60	k. A.
	Friskäse – V1,2	49,28		k. A.
	Friskäse – V1,3	48,76		k. A.
	Friskäse – V2,1	48,84	31,00 31,20	k. A.
	Friskäse – V2,2	48,73		k. A.
	Friskäse – V2,3	49,01		k. A.
	Friskäse – V3,1	49,73	30,60 32,10	k. A.
	Friskäse – V3,2	48,73		k. A.
	Friskäse – V3,3	49,25		k. A.
	Friskäse – V4,1	45,38	30,40 31,50	k. A.
	Friskäse – V4,2	46,23		k. A.
	Friskäse – V4,3	47,02		k. A.
	Friskäse – V5,1	44,40	32,00 30,70	k. A.
	Friskäse – V5,2	45,34		k. A.
	Friskäse – V5,3	46,82		k. A.
	Friskäse – V6,1	32,12	1,50	23,28
	Friskäse – V6,2	32,45	1,50	23,24
	Friskäse – V7,1	43,28	2,00	31,88
	Friskäse – V7,2	43,25	1,50	31,99
	Mascarpone – V1,1	51,65	42,50	k. A.
	Mascarpone – V1,2	51,80	42,40	k. A.
	Mascarpone – V2,1	50,68	30,00	k. A.
	Mascarpone – V2,2	50,30	30,00	k. A.
	Mascarpone – V3,1	52,20	39,10	k. A.
	Mascarpone – V3,2	53,14	40,00	k. A.
	Mascarpone – V4,1	53,31	35,80	k. A.
	Mascarpone – V4,2	53,58	35,00	k. A.
	Mascarpone – V5,1	53,45	34,00	k. A.
Mascarpone – V5,2	53,39	34,00	k. A.	

	<b>Mascarpone – V6,1</b>	47,99	32,50	5,33
	<b>Mascarpone – V6,2</b>	47,80		
	<b>Mascarpone – V6,3</b>	47,90		
	<b>Mascarpone – V7,1</b>	48,91	35,00	5,66
	<b>Mascarpone – V7,2</b>	48,84		
	<b>Mascarpone – V7,3</b>	48,78		
	<b>Mascarpone – V8,1</b>	47,24	32,50	5,22
	<b>Mascarpone – V8,2</b>	47,44		
	<b>Mascarpone – V8,3</b>	47,23		
	<b>Mascarpone – V9,1</b>	48,82	35,80	5,44
	<b>Mascarpone – V9,2</b>	48,63		
	<b>Mascarpone – V9,3</b>	48,71		
	<b>Mascarpone – V10,1</b>	55,30	39,08	5,53
	<b>Mascarpone – V10,2</b>	55,85	39,16	5,45
	<b>Mascarpone – V10,3</b>	55,22	39,19	5,55
	<b>Mascarpone – V10,4</b>	55,39	39,09	5,58
<b>Industrie</b>	<b>Quark 20 % F.i.Tr – 1</b>	20,68	4,20	10,56
	<b>Quark 20 % F.i.Tr – 2</b>	20,64		
	<b>Quark 20 % F.i.Tr – 3</b>	20,82		
	<b>Quark 40 % F.i.Tr – 1</b>	24,46	10,00	9,01
	<b>Quark 40 % F.i.Tr – 2</b>	24,49		
	<b>Quark 40 % F.i.Tr – 3</b>	24,52		
	<b>Frischkäse – 1</b>	33,12	24,20	4,16
	<b>Frischkäse – 2</b>	33,34		
	<b>Frischkäse – 3</b>	33,40		
	<b>Mascarpone – 1</b>	44,76	37,50	k. A.
	<b>Mascarpone – 2</b>	45,84		
	<b>Mascarpone – 3</b>	45,78		

Tabelle 13: Vergleich von Laborwerten und der NIR-Vorhersage (Trockenmasse)

Probe	Laborwert [%]	Vorhersage „Curds_DM“ [%]	Vorhersage eigene Methode [%]	Vorhersage vervollständigte Methode [%]
Frischkäse – V1	48,32	<b>44,95</b>	<b>48,09</b>	<b>57,74</b>
Frischkäse – V2	48,86	<b>40,84</b>	49,07	50,48
Frischkäse – V3	49,24	<b>40,44</b>	49,17	52,47
Frischkäse – V4	46,21	<b>37,59</b>	52,46	50,37
Frischkäse – V5	45,52	<b>43,04</b>	<b>52,88</b>	<b>53,62</b>
Frischkäse – V6	32,28	<b>27,10</b>	<b>32,27</b>	<b>28,39</b>
Frischkäse – V7	43,27	<b>38,08</b>	<b>52,33</b>	<b>39,40</b>
Mascarpone – V1	51,73	<b>36,33</b>	51,43	50,69
Mascarpone – V2	50,49	<b>37,08</b>	50,43	47,49
Mascarpone – V3	52,67	<b>39,88</b>	52,84	52,11
Mascarpone – V4	53,45	<b>41,37</b>	53,63	52,46
Mascarpone – V5	53,42	<b>41,88</b>	53,15	52,76
Mascarpone – V6	47,90	<b>32,01</b>	47,61	45,76
Mascarpone – V7	48,84	<b>41,13</b>	48,61	50,84
Mascarpone – V8	47,30	<b>32,25</b>	47,86	45,99
Mascarpone – V9	48,72	<b>36,25</b>	48,96	47,75
Mascarpone – V10	55,44	<b>46,07</b>	55,25	54,68
Quark 20 % F.i.Tr.	20,71	<b>17,96</b>	20,78	20,78
Quark 40 % F.i.Tr.	24,49	<b>20,84</b>	24,36	24,02
Frischkäse	33,29	<b>25,21</b>	33,27	35,02
Mascarpone	45,46	<b>36,72</b>	45,67	45,27

Bei den fett markierten Werten handelt es sich laut der Software OPUS 8 um Ausreißer bzw. um Vorhersagen, die außerhalb der Kalibrationsbandbreite liegen.

Tabelle 14: Vergleich von Laborwerten und der NIR-Vorhersage (Fett)

Probe	Laborwert [%]	Vorhersage „Curds_Fat“ [%]	Vorhersage eigene Methode [%]	Vorhersage vervollständigte Methode [%]
Frischkäse – V1	31,90	<b>38,16</b>	35,16	37,30
Frischkäse – V2	31,10	<b>35,93</b>	30,60	31,60
Frischkäse – V3	31,35	<b>36,99</b>	31,42	33,46
Frischkäse – V4	30,95	<b>34,24</b>	30,74	31,53
Frischkäse – V5	31,35	<b>35,69</b>	30,82	33,32
Frischkäse – V6	1,50	<b>k. A.</b>	<b>34,51</b>	<b>k. A.</b>
Frischkäse – V7	1,50	<b>k. A.</b>	<b>44,01</b>	<b>k. A.</b>
Mascarpone – V1	42,45	<b>42,85</b>	41,93	41,20
Mascarpone – V2	30,00	<b>33,80</b>	30,29	30,43
Mascarpone – V3	39,55	<b>41,10</b>	39,92	39,59
Mascarpone – V4	35,40	<b>37,47</b>	34,85	35,27
Mascarpone – V5	34,00	<b>37,33</b>	34,31	34,93
Mascarpone – V6	32,50	<b>36,03</b>	32,89	32,50
Mascarpone – V7	35,00	<b>38,97</b>	35,69	35,73
Mascarpone – V8	32,50	<b>36,02</b>	32,80	32,62
Mascarpone – V9	35,80	<b>38,04</b>	31,60	34,76
Mascarpone – V10	39,11	<b>40,54</b>	39,83	<b>39,79</b>
Quark 20 % F.i.Tr.	4,20	<b>5,89</b>	<b>31,44</b>	<b>4,56</b>
Quark 40 % F.i.Tr.	10,00	<b>12,16</b>	<b>31,01</b>	9,67
Frischkäse	24,20	<b>27,31</b>	<b>27,57</b>	22,68
Mascarpone	37,50	<b>37,41</b>	<b>39,09</b>	<b>35,34</b>

Bei den fett markierten Werten handelt es sich laut der Software OPUS 8 um Ausreißer bzw. um Vorhersagen, die außerhalb der Kalibrationsbandbreite liegen.

Tabelle 15: Vergleich von Laborwerten und der NIR-Vorhersage (Eiweiß)

<b>Probe</b>	<b>Laborwert [%]</b>	<b>Vorhersage „Curds_Protein“ [%]</b>	<b>Vorhersage vervollständigte Methode [%]</b>
<b>Mascarpone – V6</b>	5,22	<b>9,85</b>	5,30
<b>Mascarpone – V7</b>	5,65	<b>10,91</b>	6,02
<b>Mascarpone – V8</b>	5,26	<b>9,55</b>	5,25
<b>Mascarpone – V9</b>	5,49	<b>10,45</b>	5,67
<b>Mascarpone – V10</b>	5,53	<b>10,60</b>	4,98
<b>Quark 20 % F.i.Tr.</b>	10,66	12,44	10,46
<b>Quark 40 % F.i.Tr.</b>	9,06	10,06	8,69
<b>Frischkäse</b>	4,25	<b>7,01</b>	4,54

Bei den fett markierten Werten handelt es sich laut der Software OPUS 8 um Ausreißer bzw. um Vorhersagen, die außerhalb der Kalibrationsbandbreite liegen.

## **Erklärung über die selbständige Anfertigung der Arbeit**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Textstellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen entnommen wurden, sind durch Zitate als solche gekennzeichnet.

Ich erkläre weiterhin, dass die abgegebene digitale Version mit der eingereichten schriftlichen Arbeit übereinstimmt.

Neubrandenburg, den \_\_\_\_\_

Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Karolin Müller