

COMPARISON OF DIFFERENT TECHNIQUES OF MEASUREMENT OF QUALITATIVE PARAMETERS WITH USING NEAR INFRARED SPECTROSCOPY

Kozelková M., Šustová K., Lužová T.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xkozelk2@mendelu.cz

ABSTRACT

Near infrared spectroscopy (NIR) is very fast non-destructive analysis physical method, which use the radiation of known wavelength usually 800–2 500 nm (wave number 12 500–4 000 cm^{-1}) and is useful to measure several of parameters concurrent in one sample. Since 1981 can be used the term “rennet” for all enzyme preparates, which can coagulate milk for production cheese.

The aim of this study was compared for different techniques measure of rennet and after that to determine, which technique is suitable for other analysis. The next point my study was to evaluate, whether the FT-NIR spectroscopy with using algorithm for discriminant analysis is can to determine the age of rennet. Six samples were stored in fridge (5 °C) during three months. Spectra were measured: by opened and truth mount by opened, in the reflectance (integrate sphere) transmittance (cell) and interactance (optical probe) mode between 4 000 and 10 000 cm^{-1} , averaging 80 scans and spectral resolution 4 cm^{-1} . Each sample was analyzed three times and average spectrum was used for calibration. The measured data were processed using the TQ Analyst. We can say, that change of spectrum rennet after three months is associated with the change properties of rennet (power rennet). The results showed that FT NIR was able to distinguish rennet measured after opened and rennet measured after three months.

Key words: near infrared spectroscopy, FT-NIR, rennet, qualitative analysis

Acknowledgement: This research has been supported by the No. 12/2011 “Using of near infrared reflectant spectroscopy (FT-NIR) for evaluation of quality of rennet and cheese curd in during storage” which is financed by the Internal Grant Agency of Mendel University in Brno.

ÚVOD

Blízká infračervená spektroskopie (FT-NIR s Fourierovou transformací) je analytická metoda, kterou řadíme k tzv. nedestruktivním metodám. Vzorky není třeba před analýzou nijak upravovat a měření je proto velmi rychlé (Šustová, Kuchtík, 2007). Spektrofotometr využívá zdroje emitujícího záření známé vlnové délky obvykle 800 – 2 500 nm, tj. 12 500 – 4 000 cm^{-1} a umožňuje získat kompletní obraz složení analyzovaného materiálu (Mlček, 2008). Principem metody je absorpce, nebo reflexe vlnových délek záření při průchodu vzorkem. Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance (T) nebo jednotkách absorbance (A) na vlnové délce dopadajícího záření (Snášelová at al., 2002). V potravinářství se NIR využívá při kontrole jakostních ukazatelů potravinářských surovin, meziproductů i finálních výrobků. Avšak použití NIR spektroskopie je mnohem širší a zahrnuje i stanovení senzorických a fyzikálně-chemických parametrů (hustota, bod mrznutí, pH, velikost částic) (Rodríguez-Otero, a kol, 1997).

The Food and Nutrition Board of the United States National Research Council přijal roku 1981 klasifikační systém, v němž může být termín „syřidlo“ použit na všechny enzymatické přípravky, které mohou srážet mléko pro výrobu sýrů (Jenness, 1999). Syřidlo je proteolytický enzym s optimem působení v kyselé oblasti. Živočišná syřidla jsou získána z žaludečních (slezových) výtažků sajících telat. Hlavním syřidlovým enzymem je chymosin a pepsin. Obvykle se jedná o čirou žlutavě-hnědou kapalinu bez sedimentu nebo zákalu, kořeněně vůně s pH 4 až 6, s obsahem NaCl 18-22 %, bez škodlivých mikroorganismů. Je-li skladováno v temnu při teplotách okolo 5 °C má trvanlivost 6 měsíců (Zimák, 1988). Vzhledem k vysoké spotřebě začaly být pro průmyslové použití syřidlové enzymy vyráběny i ze žaludků hovězích, vepřových a kuřecích, nebo také mikrobiologickou cestou s použitím kvasinek, bakterií nebo plísní (Šustová, 2005).

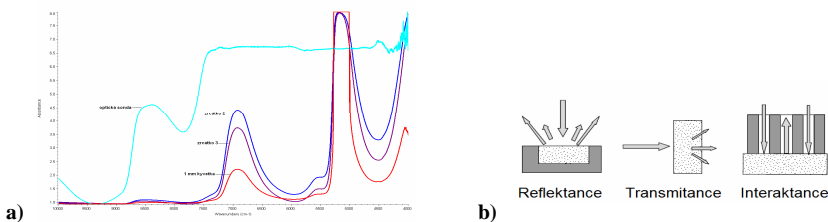
MATERIÁL A METODIKA

Pro analýzy a vytvoření kalibračních modelů bylo použito šest různých tekutých syřidel běžně dostupných v tržní síti České republiky. Syřidlo Laktochym a Laktosin (Milcom a.s.), Leb Stremsel (Ketris s.r.o.), Naturen@Premium, CHy-Max@M a Hannilase@2000L (Chr. Hansen s.r.o.) Syřidla byla skladována na Ústavu technologie potravin, AF MENDELU v Brně v lednici (5 °C) po dobu 3 měsíců, kde byly i analyzovány. Syřidla byla proměřena ihned po jejich prvním otevření, a pak po 3 měsících skladování. K měření vzorků byl použit spektrofotometr FT-NIR Antaris (Thermo Nicolet, USA) měřící v rozsahu 4 000 - 10 000 cm^{-1} s 80 scany, s časem snímání jednoho spektra ~ 1,25 min, při spektrálním rozlišením 4 cm^{-1} . Každý vzorek byl proměřen dvakrát, a pro kalibraci bylo použito průměrné spektrum (*obr.1.*).

Pro měření infračervených spekter byly použity tři různé techniky měření:

1. Měření v režimu **reflektance** na integrační sféře, kde byl zajištěn odraz paprsku kovovým zrcátkem s $h = 2$ a 3 ;
2. Měření v režimu **transmitance** s využitím transflektanční kvyety s optickou drahou 1mm;
3. Měření v režimu **interaktance** s využitím optické sondy.

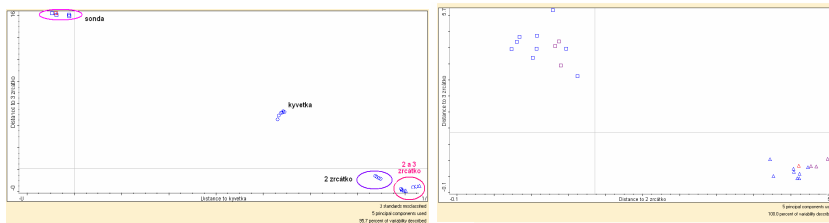
Naměřená data byla zpracována pomocí programu TQ Analyst. K vytvoření kalibračního modelu pro kvantitativní analýzu byl použit algoritmus Diskriminační analýzy. Programem TQ Analyst funkcí Diagnostic Multiple Summary byli i vytvořené modely validovány



Obr. 1a) Průměrná NIR spektra syřidla získané různými technikami měření: světle modré spektrum – optická sonda (interactance), tmavomodré a fialové spektrum-integrační sféra(reflektance), červené spektrum - kvjeta (transmitance). **b)** Schematické znázornění odrazu či průchodu záření u jednotlivých technik měření.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem práce bylo porovnat různé metody měření syřidel, a poté určit, která technika je vhodná pro následné kvalitativní analýzy. Dále zhodnotit, zda je FT-NIR spektroskopie schopna pomocí Diskriminační analýzy (DA) rozlišit stáří. Rozlišovací analýza je spektrální klasifikační technika, která využívá schůdnosti vzorku se standardem resp. řadí spektra do charakterově nejbližší předem definované třídy. Pokud je spektrofotometr schopen rozlišit spektra náležející do jednotlivých tříd, tak se nám vytvoří tzv. CLUSTER, což je shluk shodných spekter, které mají shodné vlastnosti. Při porovnávání spekter jednotlivých technik měření syřidel došlo k vytvoření clusterů, a i k tvorbě tzv. DISKRIMINAČNÍHO KŘÍŽE, což značí, že FT - NIR spektrometr dokázal spolehlivě rozlišit jednotlivé techniky měření (**obr. 2**). Pro velkou podobnost spekter získaných měřením na optické sféře s využitím zrcátka 2 a 3, byla provedena samostatná diskriminační analýza, která spolehlivě rozlišila tyto dvě techniky od sebe. Pro validaci bylo použito 12 vzorků.

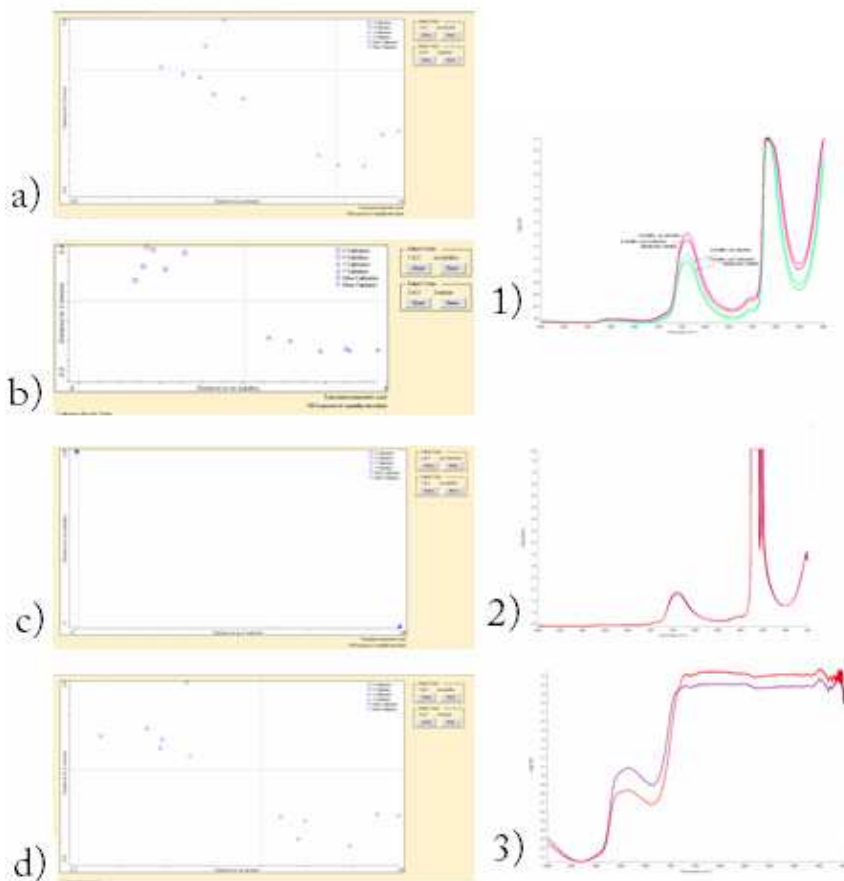


a)

b)

Obr.2 a) Diskriminační analýza různých technik měření syřidel (□ optická sonda, o kyvetka a 2 zrcátka, Δ 3 zrcátka). b) Diskriminační analýza techniky měření syřidel na optické sféře s využitím zrcátka 2 a 3 (□ zrcátka 2, Δ zrcátka 3)

Z obrázku 2 vyplývá zjištění, že rozdíl mezi spektry jednotlivých měřících technik je patrný, a proto pro další analýzy nemůžeme spektra naměřena jednou technikou použít pro vyhodnocení spekter naměřených jinou technikou. Tyto spektra také nesmíme sloučit do jedné skupiny, pro tvorbu kalibračních modelů, protože od sebe průkazně liší a kalibrační modely by byly nefunkční. Pro rozlišení stárí syřidel jsme tedy vytvořily pro každou techniku měření svůj kalibrační model (**obr.3**).



Obr. 3 Diskriminační analýza syřidel měřených po otevření a po třech měsících otevření a skladování v lednici: **a)** optická sféra se zrcátkem 2, **b)** optická sféra se zrcátkem 3, **c)** kyveta, **d)** optická sonda. Průměrná NIR spektra syřidla měřeného po otevření po 3 měsících skladování v lednici: **1)** zrcátko 2 a 3, **2)** kyveta, **3)** optická sonda.

Cílem rozlišovací analýzy bylo určit zda lze rozpoznat různě stará syřidla. V DA byly použity syřidla měřena ihned po otevření a syřidla skladována 3 měsíce v lednici. Na **obrázku 3. 1-3)** lze vidět, že spektra syřidla měřeného po 3 měsících skladování se viditelně liší od spektra syřidla měřeného ihned po otevření. Pro vyhodnocení spekter a vytvoření kalibračních modelů, byly použity pouze některé části regionů (viz. **tab. 1**). Spektra nebyla dále nijak upravována.

Tab. 1 Použité regiony pro vytvoření kalibračních modelů DA při určení stáří syřidel.

Technika měření	Použitý region (cm ⁻¹)
Optická sféra – zrcátko h=2mm	9004,01 - 5 401,21
Optická sféra – zrcátko h=3mm	7514,57 - 4510,03
Kyveta	8838,53 – 5306,08
Optická sonda	9348,32 – 785151

Na obr. 3 lze vidět přehledně rozdělení spekter do clusterů a vytvoření diskriminačního kříže. Přístroj FT-NIR tedy s vysokou spolehlivostí rozeznal u všech technik měření rozdíl mezi různě starými syřidly. Kalibrační metoda pro rozlišení stáří syřidel vytvořena ze spekter naměřených s použitím kyvety, se nám jeví jako velice přesná, protože vzdálenost clusterů je velká a vzdálenost spekter v clusteru je nepatrná. Pro validaci metody bylo použito opět 12 vzorků.

ZÁVĚR

Výsledky získané diskriminační analýzou nám potvrdily, že existuje rozdíl mezi spektry získanými použitím různých technik měření. Kalibrační model je tedy nutno vytvořit pouze ze spekter naměřených stejnou technikou měření (optická sféra, kyveta nebo sonda). Stárnutím syřidla se mění jeho charakteristiky. Nejdůležitější charakteristika pro mlékárenský průmysl je síla syřidla, která se po otevření syřidla pomalu snižuje, což prokázali i naše laboratorní pokusy. Určení stáří syřidel pomocí FT-NIR spektrometrie, by mohlo sloužit jako rychlá metoda jak stanovit, že syřidlo nemá takové vlastnosti jako mělo na začátku. Všechny vytvořené kalibrační modely pro rozlišení stáří syřidel nám s vysokou přesností rozlišily syřidla po otevření a syřidla skladovaná 3 měsíce v lednici. Kalibrační metoda vytvořena ze spekter naměřených s použitím kyvety, se nám jeví jako velice přesná, protože vzdálenost clusterů je velká a vzdálenost spekter v clusteru je nepatrná. Avšak i ostatní metody dokáží určit stáří syřidla, a proto je jen na obsluze spektrometru, který způsob měření se jim bude jevit jako nejvhodnější. Tato práce pouze ověřovala, zda lze vytvořit funkční kalibrační modely pro určení stáří syřidel. Získané výsledky nám potvrdil, že FT-NIR spektrofotometr lze použít. Pro použití do praxe by bylo vhodné kalibrační modely rozšířit o větší škálu vzorků (syřidel).

LITERATURA

Jeness, R., Wong, N., P., Marth, E., H., Keeney, M., (1999): *Fundamentals of dairy chemistry*, Third edition, 796,.

Mlček J., (2008): Využití NIR spektrometrie pro hodnocení kvality potravin a potravinových surovin, *Disertační práce*, Mendelova univerzita v Brně, s. 12-18.

Snášelová J., aj.(2002): Měření na IR analyzátoru s Fourierovou transformací, *Mlékařské listy* 74, s. 19-21.

Šustová, K., *Mlékárenské technologie – návody do cvičení*, Mendelova univerzita v Brně, 2005
V tištěné podobě nevydáno.

Rodriguez-Otero J., Hermida M, Centeno A., (1997): Analysis of Dairy products by Near – Infrared Spectroscopy, *A Review J. Agric. Food Chem.*, 5(8).

Šustová K., Kuchtík J.,(2007): Stanovení obsahových složek kozího mléka pomocí FT NIR spektrometrie, *Acta univ. Agric.et silvic.Mendel. Brun.*, LV, no 4, str. 103-110.

Zimák E., (1988): *Technologie pro 4. ročník SPŠ studijního oboru zpracování mléka.*