

POSOUZENÍ VLIVU TEPLOT MĚŘENÍ SLOŽENÍ KRAVSKÉHO MLÉKA POMOCÍ FT NIR SPEKTROSKOPIE

K. Šustová

Došlo: 13. února 2007

Abstract

ŠUSTOVÁ, K.: *Appraisal of the influence of the temperature at the composition of cow's milk by FT NIR spectroscopy*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2007, LV, No. 4, pp. 95–102

NIR spectroscopy making use of a near infrared spectrum offers wide using in a food quality control. This quick method allows the measuring of numerous samples with minimal usage of chemicals. Due this fact it is also used in quantitative analyses of milk composition. In this study we observed an impact of different temperatures of cow's milk samples on measuring exactness. The milk samples were taken from separate dairy cows and immediately refrigerated to 6–8 °C. Until the analysis the samples were deposited in the refrigerator. Just before the analysis on FT NIR spectrometer they were warmed to 40 °C and then cooled down in water bath to the temperatures 20 °C, 21 °C, 23 °C and 25 °C. Afterwards the samples were measured on Petri dish in reflectance mode with resolution 8 and number of scans 100. The spectres of samples were evaluated using calibration models for determination of solids and contents of proteins, fat and lactose. Observed measures were statistically compared within separate temperatures in relation to standard temperature 20 °C.

Near-infrared spectroscopy, cow's milk, chemical composition, dry matter, fat, lactose, protein

Podle McCLUREHO (2003) nadešel ten správný čas pro NIR spektroskopii. Dnes tato technika zaujímá významné místo vedle dalších hlavních analytických technik. I přes některé nevýhody (nehodí se ke stanovení obsahu minoritních látek ve směsích, naměřená spektra jsou těžko interpretovatelná, vyhodnocení vyžaduje použití počítače vybaveného chemometrickým softwarem, věrohodnost kvantitativních výsledků dosažených pomocí NIR techniky závisí na přesnosti použité referenční metody, vyžaduje vyšší náklady na vytvoření kalibračního modelu – nejméně 30 referenčních vzorků, vyšší pořizovací cena přístroje) je tato technika přitažlivým nástrojem pro celou řadu rozličných vzorků a nachází uplatnění v celé řadě oblastí zahrnující potravinářství, zemědělství, chemii, farmacii, textilní průmysl, polymery, kosmetický průmysl i medicínu.

Stanovením hlavních složek kravského mléka (sušina, bílkoviny, tuk a sacharidy) při analýzách kvan-

titativního složení kravského mléka se zabývala řada autorů. Měřením složení homogenizovaného kravského mléka se zabývali RU & GLATZ, 2000; SASIC & OZAKI, 2001; ČURDA et al. (2002); ALBANELL et al., 2003. Problematice měření složení nehomogenizovaného mléka se věnuje méně prací (TSENKOVA et al., 1999; TSENKOVA et al., 2000; JANKOVSKÁ & ŠUSTOVÁ, 2003; JANKOVSKÁ, 2004). Někteří autoři se zabývali stanovením složení mléka pomocí sondy při použití optického vlákna (KUKAČKOVÁ et al., 2000; TURZA et al., 2002).

Vliv teplot skladování na jakost mléka sledovali pomocí Fourierovy transformační infračervené spektroskopie GIARDINA et al. (2003), kteří posuzovali vzorky delaktózovaného mléka skladované při teplotách 6, 25 a 32 °C po dobu 14, 30, 45, 60 a 90 dní. Autoři došli k závěru, že tato vyhodnocovací technika je vhodná pro detekci odlišných teplot skladování.

Problematikou vlivu teploty mléka na výsledky

měření infračerveným spektrometrem se zabývala KUKAČKOVÁ (2001). Aplikovala vyhodnocovací techniku (PLS algoritmus) na vzorky UHT mléka měřených při teplotách od 10 °C do 40 °C. Na základě zjištěných výsledků klade velký důraz na dodržování konstantních teplot měření.

Cílem naší práce bylo posoudit, jaký vliv má na výsledky měření složení mléka pomocí FT NIR spektrometru rozdílná teplota měřených vzorků.

MATERIÁL A METODY

MATERIÁL

Kravske mléko bylo získáváno na školním statku Žabčice od 24 dojnic plemene Holštýnského a Českého strakatého. Vzorky byly odebírány pomocí Tru-testu, jež umožňuje získat průměrný směsný vzorek během dojení od jednotlivých dojnic zvlášť. Následně byly vzorky mléka zchlazeny na cca 6 °C, odvezeny do laboratoře Ústavu technologie potravin MZLU v Brně a do 12 hodin po odběru změřeny. Vzorky mléka byly dodány k analýze bez přidání konzervačního činidla v syrovém stavu. V laboratoři se provedlo stanovení obsahu sušiny, obsah bílkovin, tuku a laktózy.

METODY

Referenční analytické metody

Obsah sušiny se stanovoval vázkovou metodou bez použití pisku při teplotě 102 ± 1 °C (ISO 6731: 1989). Obsah tuku byl stanovován acidobutyrometricky metodou podle Gerbera (ISO 488: 1983). Obsah hrubých bílkovin byl stanovován Kjeldahlovou metodou s přepočítávacím faktorem 6,38 (OFFICIAL JOURNAL L 206). Obsah laktózy byl stanovován polarimetricky (ISO/DIS 5765: 1998).

FT NIR analýza

Měření bylo prováděno na přístroji FT NIR Antaris. Základní charakteristika přístroje: Zdrojem záření je halogenová žárovka. Rozsah vlností (vlnových délek) je $10\,000\text{--}4\,000\text{ cm}^{-1}$ ($1\,000\text{--}2\,500\text{ nm}$). Detektor: InGaAs. Dělič paprsků: CaF₂. Ovládací software: Omnic, Result (ThermoNicolet Corp., USA).

Vzorky syrového kravského mléka byly snímány spektrometrem v režimu reflektance na integrační sféře pomocí transflektanční kyvety. Kyveta vymezuje množství vzorku, který byl umístěn v Petriho misce, kovovým zrcátkem o $h = 0,2\text{ mm}$. Vzorky byly snímány 100 scany a rozlišením 8 s dobou měření cca 50 sekund. Každý vzorek byl podroben měření dvakrát a k vyhodnocení kalibraci bylo použito průměrné spektrum.

U každého vzorku bylo odečteno složení základních jakostních ukazatelů (sušina, obsah bílkovin, tuku a laktózy) dle kalibračních modelů NIR spektroskopu vyhotovených pro teplotu 20 °C. Před vlastním měřením na FT NIR spektrometru byly vzorky mléka zahřáty na teplotu 40 °C, protřepány a vytemperovány na teplotu měření. Ke zjištění možného rozdílu mezi porovnávanými teplotami bylo použito 90 vzorků syrového kravského mléka vytemperované ve vodní lázni na teploty 20 °C, 21 °C, 23 °C a 25 °C.

Získané hodnoty obsahů základních složek kravského mléka pro jednotlivé nastavené teploty byly vyhodnoceny pomocí statistického programu S-plus 2000 ANOVA testem průkaznosti rozdílu mezi porovnávanými teplotami (MELOUN & MILITKÝ, 1998).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Příklady spekter vzorků mléka měřeného při různých teplotách jsou zobrazeny na obr. 1. Všechna získaná spektra při každé teplotě mléka byla podrobena rovněž diskriminační analýze (obr. 6). Výsledkem je rozvržení do klastrů, které by měly odpovídat vybraným teplotám měření. Z důvodu velkého počtu spekter (pro každou teplotu 90 vzorků) dochází k patrnému překrývání jednotlivých klastrů.

Výsledky analýz všech stanovených složek prokázaly, že mezi vybranými teplotami vzorků mléka existuje signifikantní rozdíl při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. U modelu pro sušinu je mezi teplotami zjištěn statisticky vysoce průkazný rozdíl ($p < 0,01$), pro kalibrační modely pro stanovení bílkovin a tuku jsme dospěli k velmi vysokému statisticky průkaznému rozdílu ($p < 0,001$). Výsledky ANOVA testu jsou shrnuty v tabulce I.

Dalším možným ověřením, zda jsou spektra mléka odlišná při různých teplotách, je použití parametrického T-testu v programu UNISTAT. Z tabulky II. je zřejmé, že v modelech pro stanovení obsahu sušiny, bílkovin a laktózy jsme zaregistrovali, že vyšší teploty než teplota referenční (20 °C) dávají průkazně vyšší hodnoty vybraných jakostních ukazatelů. Výjimkou je kalibrační model pro obsah tuku v kravském mléce, v tomto případě vyšší teploty měření obsah tuku podhodnocují.

U modelu pro obsah sušiny jsme zjistili statisticky průkazný rozdíl mezi referenční teplotou a teplotami 21 a 23 °C při hladině významnosti $\alpha = 0,05$, u teploty 25 °C velmi vysoký statisticky průkazný rozdíl ($\alpha = 0,001$). Kalibrační model obsahu bílkovin v kravském mléce vykázal velmi vysoce statisticky průkazné rozdíly už při teplotě měření 23 °C a rovněž při teplotě 25 °C, ale i u vzorků s teplotou lišící se pouze o 1 °C je rozdíl statisticky průkazně odlišný. U modelu pro stanovení obsahu tuku jsme nezazna-

menali rozdíl mezi teplotami přímo spolu sousedícími (20 a 21 °C), avšak opět mezi vzdálenějšími teplotami je zaznamenán velmi vysoký rozdíl. Tato statistická metoda potvrdila předchozí způsob statistického vyhodnocení ANOVOU.

Na obr. 2 až 5 jsou graficky zaznamenány rozdíly mezi porovnávanými teplotami pro jednotlivé složky mléka znázorněné jako konfidenční intervaly průměrných hodnot vybraných jakostních ukazatelů. Obrázek 2 vyjadřuje rozdílnost zjištěných vážených průměrů u modelu sušiny, je zde patrný zvyšující se obsah sušiny se stoupající teplotou (kolísání mezi 21 °C a 23 °C). Dochází k prolínání konfidenčních intervalů mezi teplotami 20 °C a 21 °C a 23 °C. Teplota 25 °C je velmi výrazně rozdílná od ostatních.

U kalibračního modelu pro obsah bílkovin syrového kravského mléka je zřejmý lineárně se zvyšující se rozdíl mezi váženými průměry, viz obrázek 3, přičemž dochází k malému prolínání konfidenčních intervalů (mezi teplotami 20–21 °C a 23–25 °C). U obsahu tuku (obr. 4) je zaznamenán jistý pokles mezi 21 °C a 23 °C, nejedná se o čistě lineární prů-

běh změny. Mezi zmiňovanými teplotami je patrný velmi vysoce průkazný rozdíl, protože se konfidenční intervaly neprolínají. Nejmenší rozdíl byl zaznamenán u kalibračního modelu pro laktózu mezi teplotou 20 °C a 21 °C, avšak opět se objevil větší rozdíl mezi teplotou 21 °C a 23 °C (obr. 5).

Podle dosažených výsledků lze usuzovat, že teplota vzorků při měření NIR spektroskopem je důležitá. Po statistickém vyhodnocení byl prokázán statistický rozdíl mezi porovnávanými teplotami, přičemž byl zaznamenán největší rozdíl mezi teplotou 20 °C a 25 °C. Menších variací rozdílu bylo zjištěno mezi sousedními teplotami 20 °C a 21 °C a taktéž 23 °C a 25 °C. Proto je třeba důsledně dodržovat teplotu vzorku shodnou s teplotou, na níž je kalibrován model NIR spektroskopu pro danou složku.

KUKAČKOVÁ (2001) došla ke stejným závěrům, i když aplikovala jinou vyhodnocovací techniku (PLS algoritmus) na vzorky UHT mléka měřených při teplotách od 10 °C do 40 °C. Klade také velký důraz na dodržování konstantních teplot měření.

I: Výsledky statistického vyhodnocení výsledků měření pomocí ANOVA

Ukazatel	DF	F	P
Sušina	3	7,73918	**
Bílkoviny	3	48,23577	***
Tuk	3	13,17333	***
Laktóza	3	2,918447	*

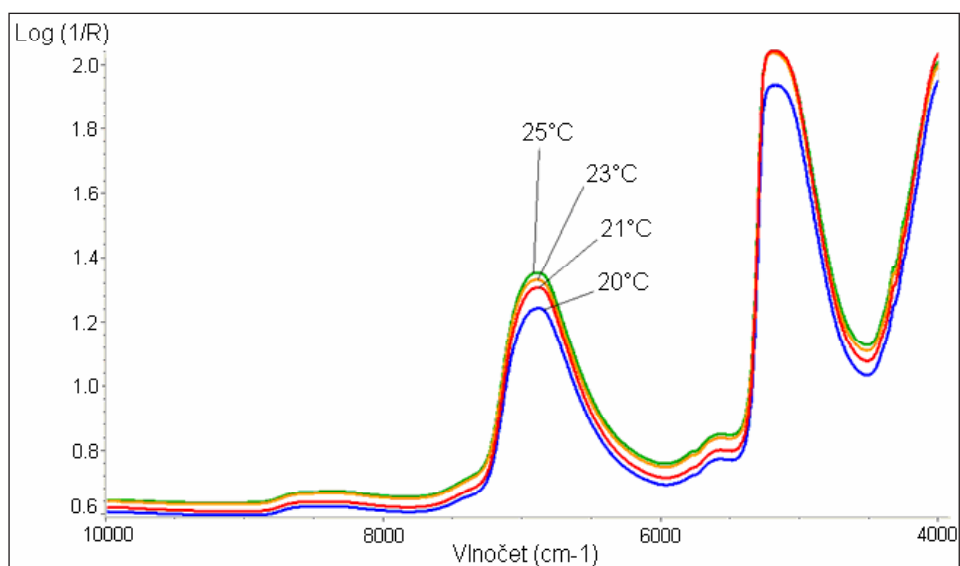
DF – stupně volnosti; F – faktor průkaznosti; P – pravděpodobnost; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

II: Statistické vyhodnocení diferencí výsledků měření pomocí T-testu v programu UNISTAT

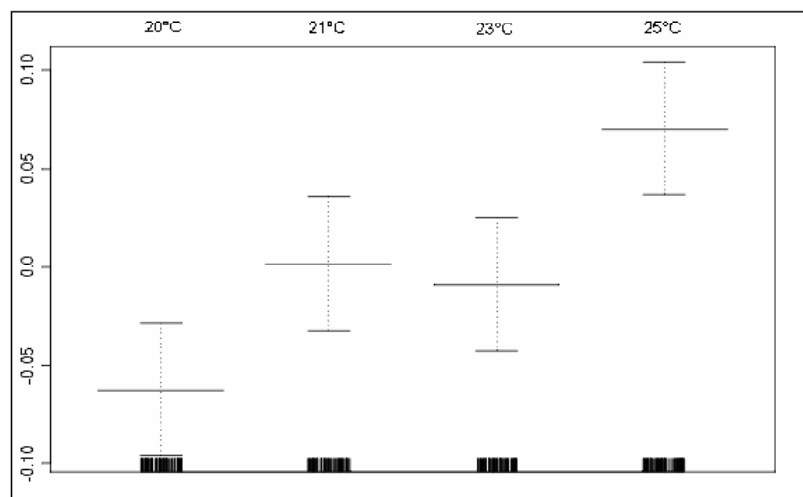
SUŠINA	20–21 °C	20–23 °C	20–25 °C
Počet	90	90	90
Průměrné difference	–0,0597	–0,0530	–0,1253
Rozptyl	0,0848	0,0781	0,0816
P	*	*	***
BÍLKOVINY	20–21 °C	20–23 °C	20–25 °C
Počet	90	90	90
Průměrné difference	–0,0222	–0,0532	–0,0796
Rozptyl	0,0128	0,0119	0,0073
P	*	***	***
TUK	20–21 °C	20–23 °C	20–25 °C
Počet	90	90	90
Průměrné difference	0,0117	0,1110	0,0964
Rozptyl	0,0364	0,0497	0,0533
P		***	***
LAKTÓZA	20–21 °C	20–23 °C	20–25 °C

Počet	90	90	90
Průměrné difference	-0,0016	-0,0473	-0,0354
Rozptyl	0,0556	0,0171	0,0209
P		***	*

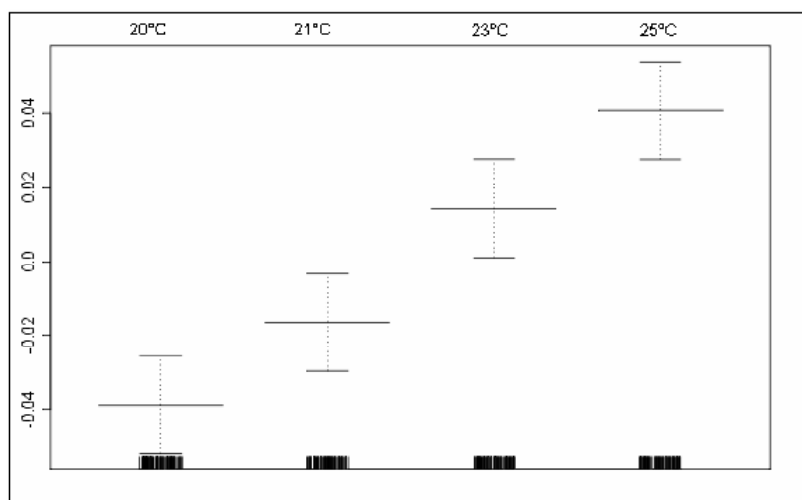
P – pravděpodobnost; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$



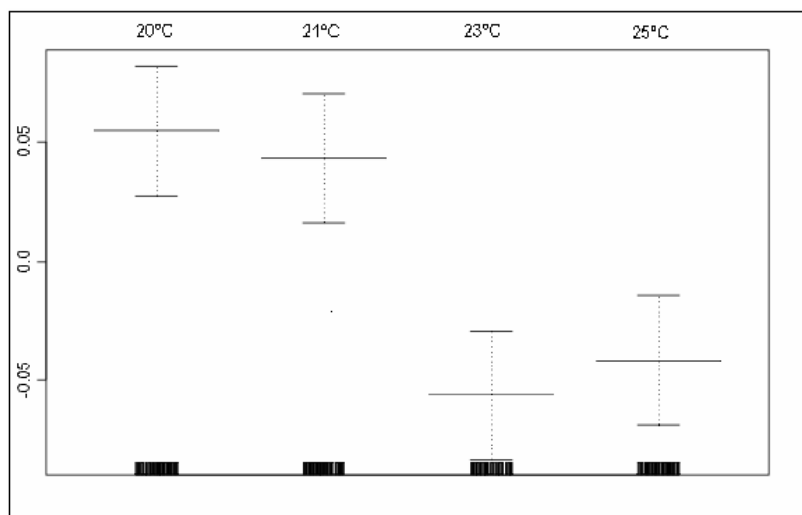
1: Spektra vzorku kravského mléka měřeného při různých teplotách



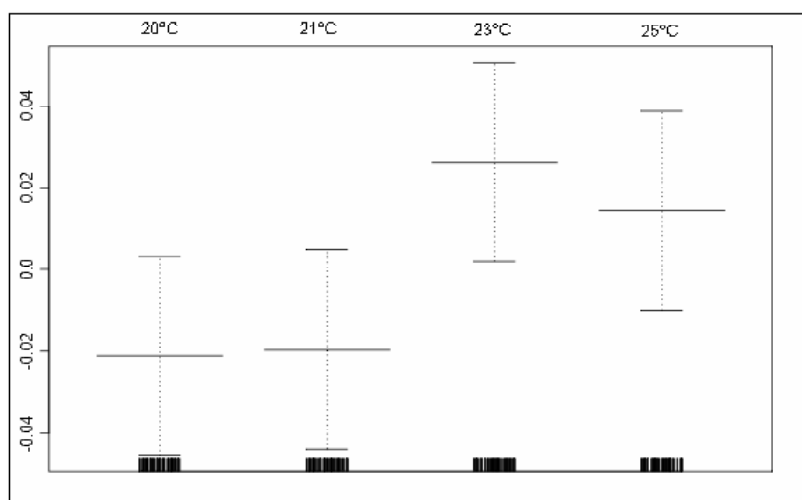
2: Grafické znázornění konfidenčních intervalů při jednotlivých teplotách měření u obsahu sušiny kravského mléka



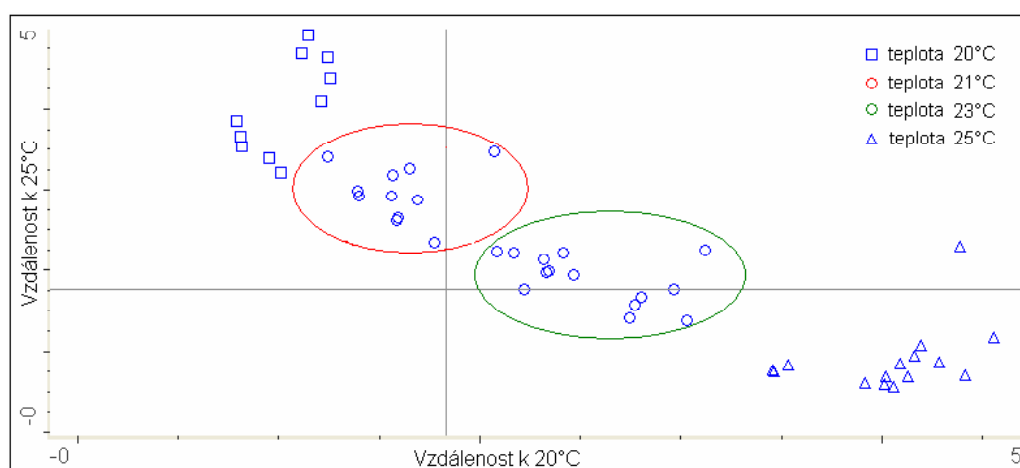
3: Grafické znázornění konfidenčních intervalů při jednotlivých teplotách měření u obsahu bílkovin kravského mléka



4: Grafické znázornění konfidenčních intervalů při jednotlivých teplotách měření u obsahu tuku kravského mléka



5: Grafické znázornění konfidenčních intervalů při jednotlivých teplotách měření u obsahu laktózy kravského mléka



6: Diskriminační analýza spekter kravského mléka pro teploty 20 °C, 21 °C, 23 °C a 25 °C

SOUHRN

Práce se zabývala vlivem rozdílných teplot vzorků mléka na výsledky měření složení mléka pomocí FT NIR spektrometru. Ke zjištění možného rozdílu bylo použito 90 vzorků syrového kravského mléka temperovaného ve vodní lázni na teploty 20 °C, 21 °C, 23 °C a 25 °C. Obsahy sušiny, bílkovin, tuku a laktózy byly stanoveny referenčními analýzami. Vzorky mléka byly proměřeny na přístroji FT NIR Antaris a byly snímány v režimu reflektance na integrační sféře pomocí transflektanční kyvety. Výsledky měření mléka temperovaného na teploty 21 °C a 23 °C vykazují mezi sebou vysoce průkazný rozdíl. Největší rozdíl byl zaznamenán mezi teplotou 20 °C a 25 °C. Menších variací rozdílu bylo zjištěno mezi sousedními teplotami 20 °C a 21 °C a také 23 °C a 25 °C. Z výsledků je zřejmé, že je nutné důsledně dodržovat teplotu vzorku shodnou s teplotou, na níž je kalibrován model FT NIR spektrometru pro danou složku.

blízká infračervená spektroskopie, kravské mléko, chemické složení, sušina, tuk, bílkoviny, laktóza

LITERATURA

- ALBANELL, E., CAJA, G., SUCH, X., ROVAL, M., SALAMA, A. A. K., CASALS, R.: Determination of Fat, Protein, Casein, Total Solids, and Somatic Cell Count in Goat's Milk by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of AOAC International*, 2003, 86, 4: 746–752.
- ČURDA L., KUKAČKOVÁ O., NOVOTNÁ M.: NIR spektroskopie a její využití při analýze mléka a mléčných výrobků. *Chemické listy*, 2002, 96, 5: 305–310.
- GIARDINA, C., CATTANEO, T. M. P., BARZAGHI, S.: Study of modifications in delactosated milk during shelf-life by NIR and FT-IR spectroscopy. *Milchwissenschaft*, 2003, 58: 363–366.
- ISO 488: 1983 Mléko. Stanovení obsahu tuku. Gerberův butyrometr.
- ISO 6731: 1989 Mléko, smetana, kondenzované mléko. Stanovení sušiny. Referenční metoda.
- ISO/DIS 5765: 1998 Mléko, mléčné výrobky a potraviny obsahující mléčné výrobky. Stanovení laktózy za přítomnosti ostatních redukujících složek.
- JANKOVSKÁ, R.: *Využití blízké infračervené spektroskopie (NIR) při hodnocení vybraných mléčných produktů*. Doktorská disertační práce, MZLU v Brně, 2004, 176 s.
- JANKOVSKÁ, R., ŠUSTOVÁ K.: Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. *Czech J. Food Sci.*, 2003, 21, 4: 123–128.
- KUKAČKOVÁ, O., ČURDA, L., JINDŘICH, J.: Multivariate calibration of raw cow milk using NIR spectroscopy. *Czech J. Food Sci.*, 2000, 18: 1–4.
- KUKAČKOVÁ, O.: *Aplikační možnosti NIR spektroskopie při kontrole mléka a mlékárenských výrobků*. Disertační práce, VŠCHT v Praze, 2001, 198 s.
- GIARDINA, C., CATTANEO, T. M. P., BARZAGHI, S.: Study of modifications in delactosated milk during shelf-life by NIR and FT-IR spectroscopy. *Milchwissenschaft*, 2003, 58: 363–366.
- McCLURE, F.W.: Review: 204 years of near infrared technology: 1800–2003. *J. Near Infrared Spectrosc.*, 2003, 11: 487–518.
- MELOUN M., MILITKÝ J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. 1. vyd. Praha: Ars magna, 1998, 839 s.

- OFFICIAL JOURNAL, L., 206: Eighth Commission Directive 78/633/EEC of June 15, 1978 Establishing Community Methods of Analysis for the Official Control of Feeding Stuffs, July 29, 1978, 0043–0055.
- RU, Y. J., GLATZ, P. C.: Application of Near Infrared Spectroscopy (NIR) for Monitoring the Quality of Milk, Cheese, Meat and Fish. *J. Anim. Sci.*, 2000, 13, 7: 1017–1025.
- SASIC S., OZAKI Y.: Short-wave near-infrared spectroscopy of biological fluids. 1. Quantitative analysis of fat, protein, and lactose in raw milk by partial least squares regression and band assignment. *Analytical Chemistry*, 2001, 73, 1: 64–71.
- TURZA, S., CHEN, J. Y., TERAZAWA, Y., TAKU-SARI, N., AMARI, M., KAWANO, S.: On-line monitoring of Rumen Fluid in Milking Cow's by Fibre Optics in Transmittance Mode Using the Longer NIR Region. *J. Near Infrared Spectroscopy*, 2002, 10: 111–120.
- TSENKOVA, R., ATANASSOVA, S., ITOH, K., OZAKI, Y., TOYODA, K.: Near Infrared Spectroscopy for biomonitoring: Cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers. *J. Anim. Sci.*, 2000, 78: 515–522.
- TSENKOVA, R., ATANASSOVA, S., TOYODA, K., OZAKI, Y., ITOH, K., FEARN, T.: Near-Infrared Spectroscopy for Dairy Management: Measurement of Unhomogenized Milk Composition. *J. Dairy Sci.*, 1999, 82: 2344–2351.

Adresa

Ing. Květoslava Šustová, Ph.D., Ústav technologie potravin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, sustova@mendelu.cz

