

Tvorba databáze NIR spekter vybraných mléčných výrobků

Mgr. Libor Průša

Diplomová práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Mgr. Libor Průša**
Osobní číslo: **T17324**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Tvorba databáze NIR spekter vybraných mléčných výrobků**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Princip NIR spektroskopie.
2. Popis vybraných mléčných výrobků.
3. Využití spektroskopie v potravinářství.
4. Přístrojové vybavení pro NIR spektroskopii.
5. Princip tvorby kalibračních modelů.

II. Praktická část

1. Provedení základního chemického rozboru produktu.
2. Změření vzorků NIR spektroskopii.
3. Vytvoření kalibračních modelů základních složek výrobku.
4. Vyhodnocení výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] HAIBO, H. ET AL. Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review, 2008 Journal of Food Engineering 87, p. 303–313.
[2] POREP J. U., KAMMERER, D. R., REINHOLD C. On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production, 2015. Trends in Food Science Technology, 46, p. 211–230.
[3] KLOUDA, P. Moderní analytické metody, 2003. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 132 stran, ISBN 80-86369-07-2.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jana Šenkýřová, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

3. května 2019

Ve Zlíně dne 2. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo vytvořit databázi NIR spekter vybraných kysaných mléčných výrobků, provést analýzu těchto spekter a prozkoumat možnost využití infračervené spektrometrie v blízké oblasti spektra pro stanovení vybraných parametrů mléčných výrobků, konkrétně obsahu tuku, bílkovin, sušiny, titrační kyselosti a pH. Teoretická část práce je zaměřena na principiální základ infračervené spektrometrie a její experimentálním uspořádání. Dále je zde uveden popis výroby jogurtů a jogurtových mlék a přehled využití infračervené spektrometrie se zaměřením na oblast potravinářství. V rámci práce byly sestrojeny kalibrační modely založené na metodě infračervené spektrometrie v blízké oblasti spektra pro stanovení obsahu bílkovin, tuku a sušiny v neochucených jogurtech a v jogurtovém mléce. Sestrojené kalibrační modely pro tyto složky dosahují velmi dobré spolehlivosti s hodnotami koeficientu determinace v rozmezí od 0,9793 do 0,9985.

Klíčová slova: infračervená spektrometrie, kysané mléčné výrobky, bílkoviny, tuk, sušina, pH, titrační kyselost

ABSTRACT

Goal of this thesis was to create a database of NIR spectra of selected fermented milk products, subsequently to analyse obtained spectra and investigate whether it is possible to use created spectra database to develop calibration models for determination of content of fat, protein and dry matter and also to analyse pH and titratable acidity in used samples. Theory section of this thesis is focused on the theory bases of infrared spectrometry and its experimental layouts. Two chapters in this section are also focused on yoghurts and drinking-type yoghurts production and use of infrared spectrometry especially in area of food industry. Calibration models based on NIR spectrometry were developed for determination of content of protein, fat and dry matter in plain yoghurts and drinking-type yoghurts. Developed calibration models for determination of protein, fat and dry matter are reliable with coefficient of determination values ranging from 0,9793 to 0,9985.

Keywords: infrared spectrometry, fermented milk products, protein, fat, dry matter, pH, titratable acidity

V úvodu této práce bych rád poděkoval vedoucí diplomové práce Ing. Janě Šenkýřové Ph.D. a Ing. Ludmile Zálešákové za odborné vedení, rady a připomínky k mojí diplomové práci.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 MOLEKULOVÁ SPEKTROMETRIE V INFRAČERVENÉ OBLASTI.....	12
1.1 VIBRAČNÍ PŘECHODY	12
1.1.1 Dvouatomová molekula	12
1.1.2 Víceatomová molekula.....	14
1.1.3 Aktivita vibrací.....	15
1.2 ROTAČNÍ PŘECHODY	16
1.3 VIBRAČNĚ ROTAČNÍ PŘECHODY	16
1.4 VYHODNOCOVÁNÍ ABSORPCE ZÁŘENÍ	17
2 POPIS VYBRANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBKŮ	18
2.1 TECHNOLOGIE VÝROBY JOGURTŮ A JOGURTOVÝCH MLÉK.....	20
2.1.1 Technologické operace při výrobě jogurtů a jogurtových mlék	21
3 EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRIE.....	25
3.1 DISPERZNÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRY	25
3.2 INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRY ZALOŽENÉ NA FILTRECH A INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRY S LED ZDROJEM	26
3.3 INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRY S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ	26
3.4 MOŽNÉ MÓDY MĚŘENÍ	28
3.4.1 Transmisní měření.....	28
3.4.2 Reflexní měření	28
4 VYUŽITÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRIE	30
4.1 KVALITATIVNÍ ANALÝZA	30
4.1.1 Oblast charakteristických skupinových vibrací	30
4.1.2 Oblast otisku prstů.....	31
4.2 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA	31
4.2.1 Kalibrační modely	32
4.3 INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE V POTRAVINÁŘSTVÍ.....	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	35
5 CÍL PRÁCE	36
6 MATERIÁLY A METODIKA.....	37
6.1 VZORKY A CHEMIKÁLIE.....	37
6.2 PŘÍSTROJE	38
6.3 REFERENČNÍ STANOVENÍ.....	39
6.3.1 Stanovení obsahu celkové sušiny.....	39
6.3.2 Stanovení obsahu tuku	39
6.3.3 Stanovení obsahu bílkovin	40

6.3.4	Stanovení pH	41
6.3.5	Stanovení titrační kyselosti	41
6.4	MĚŘENÍ INFRAČERVENÝCH SPEKTER	41
6.5	TVORBA KALIBRAČNÍCH MODELŮ	42
6.6	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	44
7	EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY	46
7.1	REFERENČNÍ STANOVENÍ	46
7.2	KALIBRAČNÍ MODELY V MÓDU S INTEGRAČNÍM ČASEM 7x 12,5 MS	49
7.2.1	Kalibrační model obsahu bílkovin	49
7.2.2	Kalibrační model obsahu tuku	50
7.2.3	Kalibrační model obsahu sušiny	51
7.3	KALIBRAČNÍ MODELY V MÓDU S INTEGRAČNÍM ČASEM 8 x 12,5 MS	52
7.3.1	Kalibrační model obsahu bílkovin	53
7.3.2	Kalibrační model obsahu tuku	54
7.3.3	Kalibrační model obsahu sušiny	55
8	DISKUZE A VYHODNOCENÍ	56
9	ZÁVĚR	59
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	60
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	69
	SEZNAM OBRÁZKŮ	70
	SEZNAM TABULEK	71
	SEZNAM PŘÍLOH	72

ÚVOD

Navzdory tomu, že infračervené záření bylo objeveno již roku 1800 Williamem Herschelem, po dlouhou dobu nenacházelo uplatnění v praktických aplikacích. Zlom nastal ve druhé polovině dvacátého století, kdy dochází k prudkému rozvoji instrumentace a následným průmyslovým aplikacím této metody. V současnosti infračervená spektrometrie nachází širokou škálou uplatnění, k výraznému rozšíření a rozvoji této metody napomohl především rozvoj chemometrických statistických metod. [1]

Využití infračervené spektrometrie přináší řadu výhod, jedná se o jednoduchou, rychlou, nedestruktivní metodu, která je navíc vhodná pro stanovení více parametrů vzorku během jednoho stanovení. Díky těmto vlastnostem je infračervená spektrometrie velmi perspektivní metodou, vhodnou pro využití v laboratorních i průmyslových aplikacích.

V mlékárenském průmyslu bylo využití infračervené spektrometrie v blízké oblasti (NIR) studováno především pro stanovení hlavních parametrů mléka – obsahu tuku, bílkovin, sušiny a laktózy. Přičemž byly v mnoha případech získány velmi dobré kalibrační modely. Doposud však nebyla příliš prozkoumána aplikace NIR spektrometrie pro oblast kysaných mléčných výrobků na kterou je zaměřena tato práce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MOLEKULOVÁ SPEKTROMETRIE V INFRAČERVENÉ OBLASTI

Princip infračervené spektrometrie je založen na interakci elektromagnetického záření se zkoumanou látkou. V případě absorpce fotonu zkoumanou látkou se jedná o absorpční infračervenou spektrometrii, emisní infračervená spektrometrie vyhodnocuje záření zkoumanou látkou emitované.

Při vlastním měření dochází k absorpci záření v infračervené části spektra v intervalu vlnových délek 780 nm až 1000 μm , často se pro popis využívá na místo vlnové délky odpovídající vlnčet, tedy 12800 – 10 cm^{-1} . Infračervená oblast navazuje na viditelnou část spektra a přechází do mikrovlnné oblasti.

Infračervenou oblast spektra lze rozdělit do tří částí – blízká oblast v rozmezí 780 nm – 2,5 μm , střední infračervená oblast 2,5 μm – 50 μm a vzdálená infračervená oblast 50 – 1000 μm . Nejdůležitější oblast spektra pro analytické aplikace leží ve střední oblasti v rozmezí vlnčetů 4000 – 670 cm^{-1} , při které se projevuje většina charakteristických absorpčních pásů. [2]

Energie použitého záření u infračervené oblasti není dostatečná pro to, aby při absorpci vyvolala přechod elektronu do excitovaného stavu, při absorpci tedy dochází pouze ke změně vibračních a rotačních stavů molekul. Při absorpci záření ze vzdálené infračervené oblasti jsou ovlivněny rotační stavy molekul s dostatečně nízkou potřebnou energií, při absorpci záření z blízké a střední infračervené oblasti jsou ovlivněny jak rotační, tak i vibrační stavy molekuly, dochází k vibračně-rotačním přechodům. [3]

1.1 Vibrační přechody

Popis vibračních přechodů je nutné rozlišit pro dvouatomové a víceatomové molekuly.

1.1.1 Dvouatomová molekula

Vibrační pohyb dvouatomové molekuly lze popsat pomocí vztahů platných pro harmonický oscilátor, vibrační energie molekuly je kvantována vibračním kvantovým číslem ν , pro energii vibračního pohybu E_ν pak platí vztah [1]:

$$E_\nu = h\nu_m\left(\nu + \frac{1}{2}\right) \quad (1.1)$$

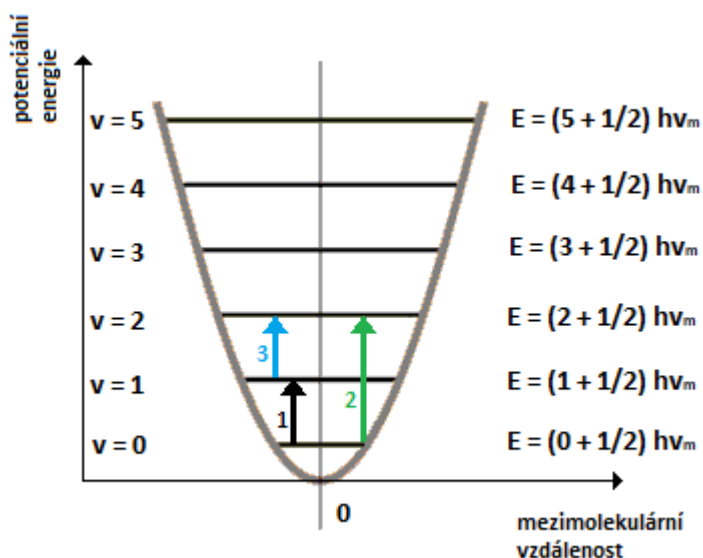
kde ν je vibrační kvantové číslo nabývající celočíselných hodnot, ν_m je frekvence vibrující molekuly a h Planckova konstanta.

Pro vibrační pohyb dvouatomové molekuly lze s využitím vztahů platných pro harmonický oscilátor odvodit vztah pro potenciální energii U_r :

$$U_r = \frac{1}{2}k \cdot (\Delta r)^2 \quad (1.2)$$

kde k je silová konstanta vazby a Δr rozdíl vzdálenosti atomů od rovnovážné polohy. Graficky lze tuto závislost znázornit jako parabolu s minimem odpovídajícím poloze atomů v rovnovážném stavu. [4]

Dle pravidel kvantové mechaniky jsou povolené přechody mezi sousedními vibračními hladinami. Je-li molekule dodána energie odpovídající rozdílu energií mezi vibračními hladinami, dojde k vibračnímu přechodu. Frekvence absorbovaného záření se tedy musí rovnat frekvenci vibrace dané molekuly. Obsazení energetických hladin se řídí Boltzmannovým distribučním zákonem, přičemž většina molekul je za normální teploty v základním stavu. Frekvence odpovídající přechodům mezi základním a prvním excitovaným stavem se nazývá základní nebo fundamentální. Schematické znázornění typů vibračních přechodů je uvedeno na obrázku č. 1.



Obr. č. 1: Energetické hladiny a vibrační přechody harmonického oscilátoru

1 – fundamentální přechod, 2 – svrchní přechod, 3 – horký přechod

Vibrační přechody, kdy dochází ke změně vibračního kvantového čísla o více než jedna, se nazývají svrchní přechody, horké přechody jsou přechody mezi dvěma excitovanými stavy.

V modelu aproximovaném harmonickým oscilátorem jsou všechny energetické hladiny vzdáleny od sebe stejně daleko, tedy ve spektru dvouatomové molekuly by měl být pozorován jeden absorpční pás. V reálných spektrech dvouatomových molekul je však pozorováno absorpčních pásů více, protože energie molekuly při stlačení narůstá rychleji než při natažení. Potenciální křivka tedy není symetrická, se zvyšováním vibračního kvantového čísla dochází ke zmenšování energetického rozdílu mezi jednotlivými energetickými hladinami, a tedy lze ve spektru pozorovat více vibračních pásů odpovídajících různým rozdílům energetických hladin. [3]

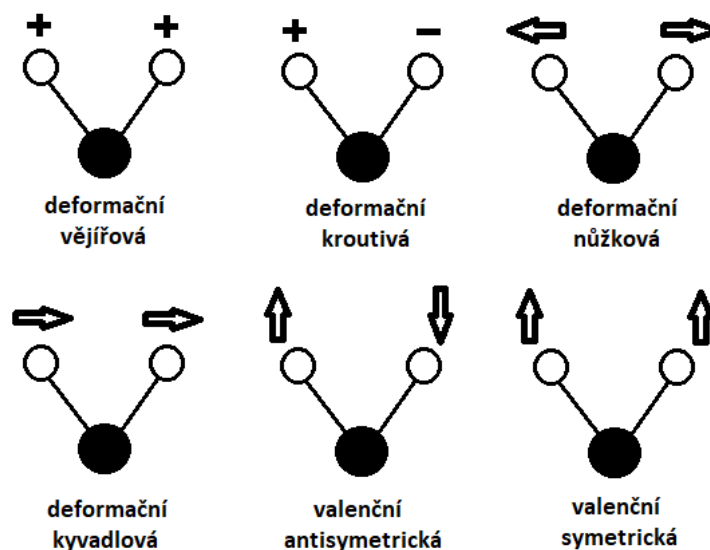
1.1.2 Víceatomová molekula

Pro popis vibračních spekter víceatomových molekul lze použít tzv. normálních vibrací, které jsou součtem jednoduchých harmonických pohybů, který dobře vystihuje většinu stabilních molekul v nižších vibračních stavech. U vyšších vibračních stavů se používá teorie lokálních módů. [5]

Při normálních vibracích všechny atomy v molekule vibrují se stejnou frekvencí a ve stejné fázi, ale s různými amplitudami, těžiště molekuly nevibruje. Vibrace molekuly lze popsat frekvencí, velikostí a směrem výchylky. Vibrace, při kterých se mění délka vazby, se nazývají valenční. Pokud se při vibraci mění vazebný úhel, jedná se o vibrace deformační. Vibrace mohou obecně probíhat v rovině nebo mimo rovinu, pokud některý z atomů vystupuje nad rovinu zbývajících atomů.

Deformační vibrace nastávají při nižších frekvencích než valenční, což je způsobeno faktem, že pro natáhnutí vazby je nutno dodat více energie než pro její ohnutí.

Některé z možných vibračních módů jsou znázorněny na obrázku č. 2.



Obr. č. 2: Příkladů možných vibračních módů molekul

Znaménko „+“ znázorňuje pohyb nad rovinu, znaménko „-“ pohyb pod rovinu ostatních atomů.

Počet normálních vibrací pro molekulu s N atomy lze vyjádřit vztahem $3N - 6$, výjimkou jsou lineární molekuly, pro které platí vztah $3N - 5$. [4]

Kromě normálních vibračních pásů lze ve spektru pozorovat i slabší pásy. Tyto pásy mohou odpovídat vyšším harmonickým frekvencím, při kterých je změna vibračního kvantového čísla větší než 1, případně se může jednat o slabší součtové, případně rozdílové pásy, které odpovídají součtu respektive rozdílu frekvencí dvou normálních vibrací. Nižší intenzita těchto pásů je dána nižší pravděpodobností toho, že tyto přechody nastanou. [3]

1.1.3 Aktivita vibrací

Vibrační energie vazby, případně celé molekuly, se může zvýšit absorpcí elektromagnetického záření, pouze pokud dojde při vibraci ke změně dipólového momentu, jen takové vibrace jsou v IR spektru aktivní. Pokud ke změně dipólového momentu vlivem symetrie nedojde, molekula záření neabsorbuje. [3]

Současně platí pravidlo zmíněné v předchozím oddílu, tedy že molekulou může být absorbováno nebo emitováno pouze elektromagnetické záření o frekvenci odpovídající rozdílu mezi vibračními hladinami dané molekuly.

Z počtu pásů v infračerveném spektru lze zjišťovat symetrii a strukturu molekul. Obecně je pak ve spektru obsažena primárně informace o polárních vazbách v molekule. Ve spektrech lze pozorovat tzv. charakteristické vibrace, které odpovídají vibracím lokalizovaným

v určité části molekuly, která vibruje nezávisle na zbytku molekuly. Poloha absorpčních pásů, kterými se daná funkční skupina projeví v IR spektru se v různých molekulách příliš neliší, čehož lze využít při identifikaci neznámých látek [3]. Toto využití je blíže popsáno v kapitole 4.1.

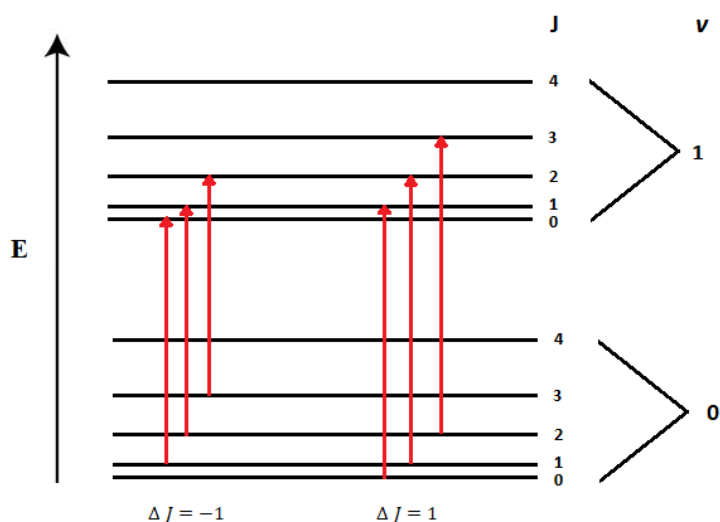
1.2 Rotační přechody

Rotace molekul se uplatňuje pouze u látek v plynném stavu, v kapalném a pevném stavu vlivem interakcí mezi jednotlivými molekulami splývají v kontinuum. Energetický rozdíl mezi jednotlivými rotačními hladinami je výrazně menší než mezi hladinami vibračními.

Rotační energie může stejně jako vibrační energie nabývat pouze určitých diskrétních hodnot, energie je kvantována rotačním kvantovým číslem, které může nabývat kladných celočíselných hodnot a 0. Pro povolené přechody platí analogické výběrové pravidlo, tedy že povolené přechody jsou ty, při kterých se rotační kvantové číslo mění o ± 1 . Zároveň jsou aktivní pouze ty rotace, při kterých se mění dipólový moment dané molekuly. [3]

1.3 Vibračně rotační přechody

Pokud molekula absorbuje NIR nebo MIR záření dochází současně ke změně vibračního i rotačního stavu dané molekuly, jak bylo zmíněno výše, tak rotační hladiny jsou mnohem blíže u sebe a v podstatě štěpí vibrační hladiny na rotační podúrovně. Schematicky je toto znázorněno na obrázku č. 3, včetně možných vibračně rotačních přechodů.



Obr. č. 3: Vibračně rotační přechody (převzato a upraveno [3])

E – energie, J – rotační kvantové číslo, v – vibrační kvantové číslo

Pro absorpční spektra není uvažován povolený přechod $\Delta v = -1$, poněvadž při něm nedochází k absorpci energie.

Naopak vzhledem k velkému energetickému rozdílu mezi jednotlivými vibračními hladinami má smysl uvažovat i přechody při kterých dochází ke změně rotačního kvantového čísla $\Delta J = -1$, protože výsledný přechod s absorpcí záření spojen je. Oba možné typy přechodů v dvouatomové molekule $\Delta v = +1, \Delta J = -1$ a $\Delta v = +1, \Delta J = 1$ jsou zobrazeny na obrázku č. 3. U víceatomových molekul je možný i přechod $\Delta J = 0$.

Ve vlastních absorpčních spektrech se přítomnost těchto hladin projeví jemnou strukturou spektra, která může být v případě nedostatečné citlivosti přístroje omezena pouze na obalovou křivku. [3]

1.4 Vyhodnocování absorpce záření

Jak bylo zmíněno v předcházejících kapitolách, infračervené záření molekulou emitované nebo absorbované musí mít energii odpovídající energetickému rozdílu mezi dvěma vibračními hladinami dané molekuly. Pokud dojde k absorpci záření molekulou, v infračerveném spektru se toto projeví přítomností absorpčního pásu. Infračervené spektrometry umožňují vyhodnocování takto absorbovaného záření v závislosti na vlnové délce, vlnočtu či frekvenci tohoto záření.

Pro vyhodnocování lze využít obecné vztahy využívané u ostatních spektrálních metod – transmitanci T a absorpenci A , které jsou definovány níže uvedenými vztahy.

$$T = \frac{\theta}{\theta_0} \quad (1.3)$$

$$A = -\log \frac{\theta}{\theta_0} \quad (1.4)$$

kde θ je tok záření propuštěného látkou, θ_0 je tok záření dopadajícího na vzorek.

Absorpční pásy, tedy rozmezí vlnočtů, vlnových délek nebo frekvencí při kterých dochází k absorpci záření, jsou charakterizovány svojí polohou ve spektru – nejčastěji vlnočtem, a dále pak relativní intenzitou absorpce. Dle relativní intenzity absorpce se pásy dělí na silné, střední a slabé, přičemž u slabých dochází k poklesu transmitance o třetinu a méně, u středních pak až o polovinu a u silných o více než polovinu.

2 POPIS VYBRANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBKŮ

Mlékem se dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1308/2013 rozumí výhradně běžná tekutina vylučovaná mléčnou žlázou získaná z jednoho nebo více dojení bez toho, aby se do ní cokoli přidávalo nebo z ní odebíralo. Mléčné výrobky jsou dle tohoto nařízení definovány jako výrobky získané výlučně z mléka, přičemž se však mohou přidávat další látky nezbytné pro jejich výrobu, pokud tyto látky nejsou použity za účelem úplného nebo částečného nahrazení jakékoli mléčné složky. [6]

V rámci této práce byla pozornost věnována především výrobkům z kategorie kysaných mléčných výrobků, které jsou dle Vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 397/2016 Sb. (dále jen Vyhláška) definovány jako mléčné výrobky získané kysáním mléka, smetany, podmáslí, syrovátky nebo jejich směsi za použití mikroorganismů specifikovaných v příloze č. 1 k této vyhlášce, a které následně nejsou tepelně ošetřeny po kysacím procesu. [7]

Dle zmíněné vyhlášky rozlišujeme kategorie kysaných mléčných výrobků uvedených v tabulce č. 2.1.

Tabulka č. 2.1: Legislativní dělení kysaných mléčných výrobků [7]

Druh	Skupina	Podskupina
Kysaný nebo zakysaný mléčný výrobek	Jogurt	Bílý
		Smetanový
		Řecký
		Řeckého typu
	Jogurtové mléko	
	Acidofilní mléko	
	Kefír	
	Kefírové mléko	
	Kysané mléko nebo smetanový zákys	
	Kysaná nebo zakysaná smetana	
Kysané podmáslí		
Kysaný mléčný výrobek s bifido kulturou		

Jako jogurt lze dle Vyhlášky označit pouze kysaný mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmáslí nebo jejich směsí, pro kysání přípustné je využití protosymbiotické směsi *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii subsp.*

bulgaricus s minimální mléčnou mikroflórou v 1 g výrobku v počtu 10^7 . Kromě této základní jogurtové kultury mohou být přidávány i kmeny bakterií mléčného kvašení, které pomáhají dotvářet chuť a texturu daného výrobku. Pro jogurtové mléko platí dle Vyhlášky shodné požadavky na mikroflóru jako pro jogurty.

Jogurt nesmí být tepelně ošetřen po kysacím procesu a obsah sušiny je přípustné zvýšit pouze přidáním mléčné bílkoviny, sušeného nebo zahuštěného mléka, nebo odebráním syrovátky.

Jak je uvedeno v tabulce č. 2.1 rozlišujeme 4 podskupiny jogurtů – jogurty bílé, smetanové, řecké a řeckého typu. Všechny druhy jogurtů bez přidané ochucující složky mohou být označeny jako bílé jogurty, přičemž musí současně splňovat kritérium na obsah tuku nejméně 3,0 % hmot. a zároveň obsahují nejméně 8,2 % tukuprosté sušiny. Pro smetanové jogurty je vyžadován obsah nejméně 10,0 % hmot. tuku.

U jogurtů řeckého typu nebo řeckého stylu je Vyhláškou vyžadován obsah nejméně 5,6 % bílkovin, přičemž tohoto obsahu bylo dosaženo přidávkem koncentrovaných bílkovinných mléčných složek před zahájením procesu. U řeckého jogurtu je vyžadován shodný obsah mléčných bílkovin, které ale do výrobku na rozdíl od jogurtů řeckého typu nebyly přidány záměrně v koncentrované formě.

Jogurtové mléko dle Vyhlášky obsahuje nejméně 0,5 % hmot. tuku a 8,0 % hmot. tukuprosté sušiny.

Jogurty lze dále dělit dle textury, typu použitého mléka a použití příchutí. Dle druhu použitého mléka jogurty dělíme na kravské, kozí nebo ovčí a dle jeho původu na konvenční a organické (BIO).

Dle konzistence lze jogurty rozčlenit do několika kategorií na jogurty s rozmíchaným koagulátem („stirred type“), jogurty s nerozmíchaným koagulátem („set type“), jogurtová mléka („drinking type“), zahuštěné jogurty, mražené jogurty a jogurty sušené.

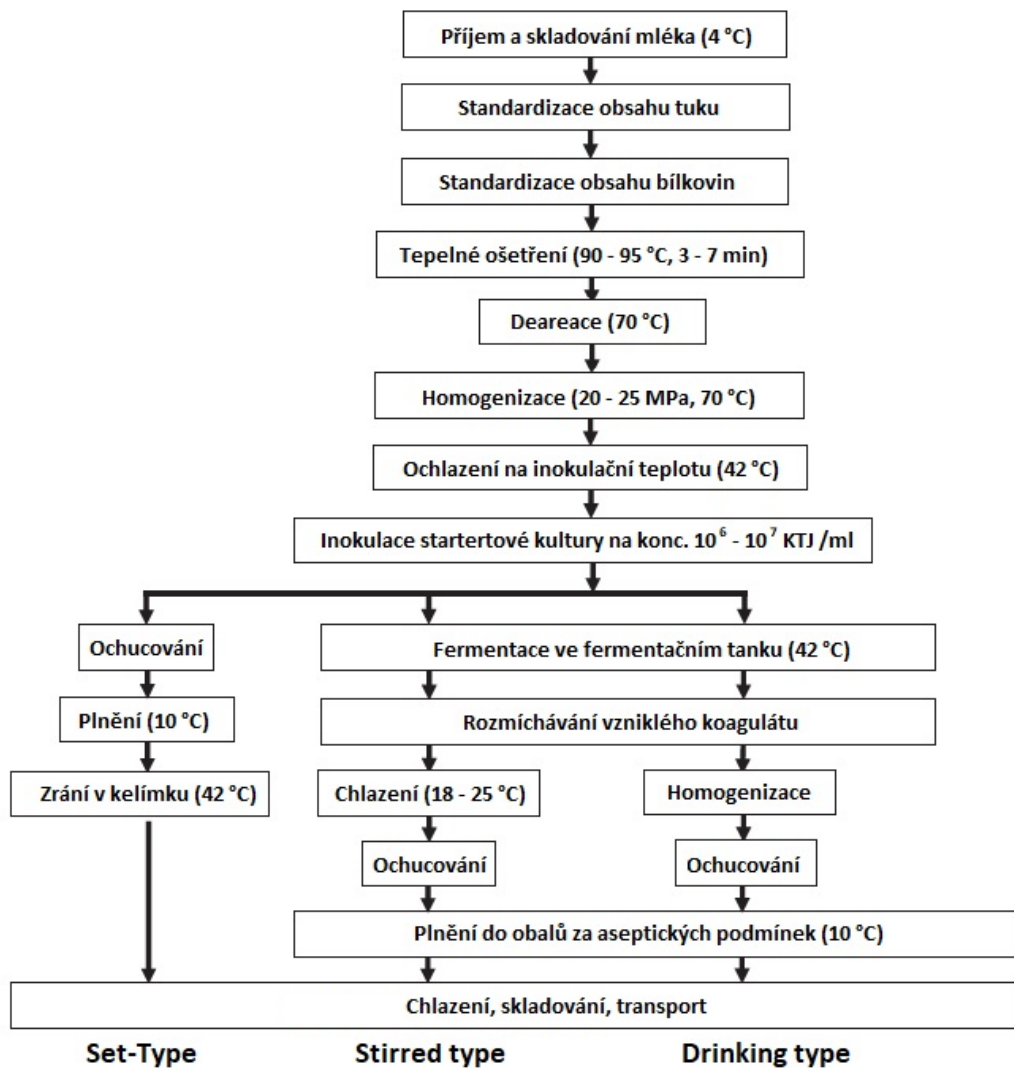
Na základě použití příchutí lze jogurty dělit na neochucené (bílé, plain), slazené, ochucené a s přidanými kousky ovoce nebo medu. [8]

V poslední době stoupá popularita Skyru, který nemá ve stávající české legislativě v tuto chvíli definovány speciální požadavky na složení. Tradičně je tento výrobek klasifikován jako islandský kysaný mléčný výrobek vyráběný z odtučněného mléka přidávkem chymozinu a termofilních startérových kultur obsahujících *Streptococcus salivarius subsp. ther-*

mophilus, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* a laktózu fermentují kvasinky. Současná islandská legislativa tento výrobek klasifikuje jako měkký čerstvý sýr. [9]

2.1 Technologie výroby jogurtů a jogurtových mlék

Průmyslová výroba jogurtů je založena na třech základních krocích. Prvním krokem je příprava směsi a všechna související ošetření mléka. Druhým krokem je vlastní fermentační proces po naočkování připravené směsi a posledním třetím krokem jsou dodatečné úpravy a balení [8]. Schematické znázornění výroby základních typ jogurtů je uvedeno na obrázku č. 4.



Obr. č. 4: Orientační schéma základních typů jogurtů (převzato a upraveno [8])

Jak je zřejmé z obrázku č. 4, dříve zmíněné tři základní typy jogurtů – set type, stirred type a drinking type – se liší ve výrobním procesu po inokulaci připravené směsi.

Při výrobě jogurtů s nerozmíchaným koagulátem (set type) je zaočkovaná směs dávkována přímo do kelímku a jogurty následně zrají přímo v uzavřených spotřebitelských obalech ve zracích komorách, skříních nebo lázních. Takto vyrobené jogurty mají pevnější konzistenci, protože obsahují nerozmíchaný koagulát, proces fermentace je však pracnější.

Jogurty s rozmíchaným koagulátem (stirred type) jsou do spotřebitelských obalů plněny až po dokončení procesu fermentace ve fermentačním tanku a následném rozmíchání fermentací vzniklého koagulátu. Původní koagulát je tedy narušen a konzistence výsledného výrobku již není tak pevná jako u jogurtů set type.

Výroba jogurtového mléka (drinking type) je velmi podobná výrobě stirred type jogurtů, přičemž je před vlastní plnění do spotřebitelských obalů vložen krok homogenizace, zajišťující požadovanou tekutou konzistenci. Tyto výrobky tak mají nižší viskozitu a jsou určeny k pití.

2.1.1 Technologické operace při výrobě jogurtů a jogurtových mlék

Mezi základní technologické operace patří standardizace mléka, tepelné ošetření, deareace, homogenizace, aplikace kultur, fermentace, chlazení a balení.

Standardizace mléka

V mléku určeném pro fermentaci se provádí standardizace obsahu tuku a bílkovin. Standardizace obsahu tuku se provádí nejprve odstraněním podílu tuku centrifugací při teplotě okolo 55 °C a následným zaváděním tuku zpět pomocí směšovacího zařízení, kdy je tučnost upravena na požadovanou hodnotu dle daného typu jogurtu.

Standardizace obsahu bílkovin se obvykle provádí s cílem zvýšit obsah bílkovin z původních přibližně 3 % na hodnoty okolo 5 % a více, větší podíl bílkovin ve výrobku zlepšuje texturu výrobku, tím že zvyšuje pevnost koagulátu a omezuje možnou synerezi. Obvykle se toto provádí přidavkem sušeného mléka, koncentrátů mléčných bílkovin, podmáslím nebo přidavkem sušené syrovátky. Alternativně je možné upravovat obsah bílkovin s využitím membránových procesů. [8]

Standardizaci je možné provádět šaržovitě ve standardizačním tanku nebo kontinuálně s využitím průtokových standardizačních zařízení.

Obdobného efektu na texturu výrobku jako při přidavku bílkovin lze dosáhnout s využitím stabilizátorů na bázi hydrokoloidů např. pektinu, modifikovaných škrobů nebo želatiny, které dobře váží vodu, stabilizují texturu a zabraňují vylučování syrovátky. [8], [10]

Tepelné ošetření mléka

Tepelné ošetření mléka je nezbytným krokem při výrobě jogurtů, jakož i při zpracování mléka obecně a výrobě většiny druhů mléčných výrobků. Při tepelném ošetření dochází k eliminaci nežádoucích mikroorganismů a inaktivaci části přítomných enzymů, což napomáhá dosažení zdravotní nezávadnosti výrobků a prodloužení jejich trvanlivosti. Při průmyslové výrobě jogurtů se provádí pasteurace mléka při teplotách mezi 90 – 95 °C s výdrží 3 – 7 minut. Takto vysoké tepelné ošetření zajistí vysoký podíl denaturace sérových bílkovin, což pozitivně ovlivňuje konzistenci a texturu výsledného jogurtu, dojde k omezení synerese a zvýšení pevnosti vzniklého gelu [8].

Deareace a homogenizace

Tyto procesy jsou úzce spjaty s tepelným ošetřením, obvykle následují po tepelném ošetření – zařazují se za výstup mléka z výdržníku pastéru a probíhají tak za zvýšené teploty okolo 70 °C.

Homogenizace je velmi významným krokem při výrobě jogurtů, protože dochází ke snížení velikosti tukových kapiček, aby nedocházelo k jejich samovolnému vyvstávání, a porušení kaseinových micel. To má za následek lepší vaznost kaseinových micel pro vodu a jejich snazší propojení s tukovými kuličkami, což pozitivně ovlivňuje texturu výsledného výrobku. Obvykle se provádí vysokotlaká homogenizace při tlacích 20 – 25 MPa, pro jogurty s vyšším obsahem tuku je doporučována homogenizace dvoustupňová [8].

Přítomnost vzduchu ve směsi má negativní dopady při výrobě i na vlastnosti finálního výrobku. Dochází k prodloužení fermentační doby, zhoršení textury výrobku, nejsou odstraněny nežádoucí těkavé látky a dochází ke vzniku cizích přípachů [11], [12].

Některé suroviny přidávané do připravované směsi, především sušené mléko a podobné produkty, mohou zvýšit obsah vzduchu ve směsi, je tedy vhodné provádět deareaci již při-

pravené směsi pro inokulaci, přičemž je deareace standardně předřazena homogenizaci, protože zlepšuje její průběh. Nejčastěji se provádí rozstříkem mléka do podtlakové komory, kde dochází k stržení dispergovaných plynů a těkavých látek.

Inokulace

Před vlastní fermentací musí být nejprve odvzdušněná a homogenizovaná směs ochlazená na zakysávací teplotu, která se může lišit v závislosti na typu použité mikrobiální starterové kultury. Inokulaci směsi lze v zásadě provést smísením připravené směsi s promíchaným provozním zákysem, nebo přímou aplikací koncentrovaných hluboce zmrazených starterových kultur. Směs po inokulaci je v případě výroby jogurtů s rozmíchaným koagulátem a jogurtových mlék vedena do fermentačního tanku, při výrobě jogurtu s nerozmíchaným koagulátem je pak přímo plněna v balící lince do jednotlivých spotřebitelských balení. [8]

Komerční starterové kultury jsou vysoce specifické směsi bakterií *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* o koncentracích vyšších než 10^{10} kolonií tvořících jednotek na gram hmoty (KTJ/g). Kultury jsou dodávány lyofilizované nebo hluboce zmrazené.

Fermentační proces

Při mléčném kvašení mléka dochází nejprve k růstu bakterií *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, následovaným růstem bakterií *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, při ukončení fermentace je koncentrace obou druhů bakterií přibližně 10^9 KTJ/g. V průběhu kvašení dochází vedle kyseliny mléčné ke vzniku i celé řady dalších metabolitů, přičemž nejvýznamněji k chuti a výsledné textuře výrobku přispívají kyselina mléčná, galaktóza, acetaldehyd a exopolysacharidy. Vznik kyseliny mléčné má za následek snížení pH směsi, které vyvolá koagulaci mléčných proteinů a tvorbu gelu, exopolysacharidy pozitivně ovlivňují texturu výrobku. Acetaldehyd ovlivňuje výsledné aroma výrobku. [8]

Fermentace je řízena na základě pH směsi, po dosažení požadované hodnoty pH je fermentace zastavena rychlým zchlazením směsi, přičemž cílová hodnota pH před zchlazením je obvykle v rozmezí pH 4,8 - 4,5, přičemž tato hodnota není konečnou hodnotou pH, ale je dále snížena dodatečným okyselením směsi během jejího zchlazování a skladování. Doba

fermentace se liší v závislosti na typu výrobku, u jogurtů s probiotickou kulturou může fermentace probíhat 6 - 8 hodin, u jogurtů stirred type obvykle trvá pouze 3 - 4 hodiny. [8]

Chlazení a balení jogurtu

Rychlé zchlazení jogurtu se provádí po dosažení požadované hodnoty pH. Zchlazování se provádí jednostupňově nebo dvoustupňově. Při jednostupňovém chlazení je výrobek zchlazen přímo na konečnou skladovací teplotu. Při dvoustupňovém chlazení je nejprve teplota snížena na přibližně 20 °C a následně je provedeno dochlazení na konečnou skladovací teplotu obvykle 4 nebo 5 °C. [8]

K zchlazování set type jogurtů mohou být použity chladicí skříně, chladicí místnosti nebo tunely. Jogurty stirred type jsou zchlazovány v tepelných výměnících, přičemž po prvním stupni chlazení na teplotu přibližně 20 °C může být vložen krok ochucení jogurtu, kdy se do jogurtu nadávkuje ochucující složka. Ochucující složka může být dávkována do směsi před plněním, nebo na dno spotřebitelského obalu. V moderních provozech je často přídavek ochucující složky realizován online v rámci balící linky [8].

Výsledná textura jogurtů je ovlivňována mnoha faktory například složením původní směsi, použitými mikrobiálními kulturami a vlastní použitou výrobní technologií. Obzvláště u jogurtů stirred type je důležité šetrné čerpání prokysané směsi, aby nedošlo ke zhoršení textury výsledného výrobku.

Balení se provádí do sklenic nebo plastových kelímků. Moderní balící linky zajišťují termoplastické tvarování plastového obalu, jeho naplnění i uzavření. Plastový kelímek je tedy při teplotě 150 – 200 °C vytvarován, následně je v uzavřeném prostředí za přetlaku sterilního vzduchu naplněn a v posledním kroku obal uzavře svařením plastu obvykle s hliníkovým víčkem. Tyto balící linky mají vysoký výkon v řádech desetitisíců jednotlivých balení za hodinu. V dalším kroku probíhá balení spotřebitelských balení do přepravních obalů. Následně jsou výrobky skladovány při snížené teplotě dle příslušné legislativy případně podmínek stanovených výrobcem. [8]

3 EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRIE

Dle technologie použité pro selekci požadovaných vlnových délek lze v zásadě rozlišit čtyři typy uspořádání infračervených spektrometrů – disperzní infračervené spektrometry, infračervené spektrometry založené na filtrech, infračervené spektrometry s LED zdrojem a infračervené spektrometry s Fourierovou transformací [13].

V současnosti jsou používány standardně především IR spektrometry s Fourierovou transformací (FTIR), které preferuje většina výrobců [14], téměř všechny moderní přístroje pro MIR využívají právě uspořádání FTIR [15], [16].

3.1 Disperzní infračervené spektrometry

Infračervené spektrometry založené na disperzi byly prvním typem přístrojů, který se pro IR spektrometrii využíval a do jisté míry jsou využívány i v současnosti [13].

Uspořádání přístroje může být jednopaprskové nebo dvoupraprskové. Hlavní tři části přístroje jsou zdroj záření, monochromátor a detektor. Zdroj infračerveného záření musí poskytovat polychromatické spojité IR záření v dostatečně širokém intervalu vlnových délek, nejčastěji se využívá Nernstova tyčinka nebo Globar, což je elektricky žhavená tyčinka z karbidu křemíku. Jako monochromátor jsou nejčastěji využívány různé typy odrazových mřížek. Detekce záření je prováděna pomocí termoelektrických článků, případně polovodičových nebo pyroelektrických detektorů. [3]

Pyroelektrické detektory jsou díky své rychlé odezvě na změnu signálu využívány primárně u FTIR spektrometrů a jsou založeny na změně polarizovatelnosti ferroelektrických látek v závislosti na teplotě, kdy změna v intenzitě ozáření detektoru vyvolá změnu v teplotě daného pyroelektrického materiálu, čímž dojde k odpovídající změně polarizace molekul daného materiálu. Tato změna má za následek vznik elektrického proudu, který je zesilován a následně detekován.

Záření lze detekovat pomocí polovodičových detektorů, je možné využít detekci diodovým polem, kdy je detektor realizován polem několika set miniaturních polovodičových detektorů na čipu, který detekuje dopadající záření o všech vlnových délkách současně. [17]

Nevýhodou disperzních infračervených spektrometrů je menší citlivost a rychlost měření, nízký poměr signálu k šumu, horší rozlišení a reprodukovatelnost. Proto jsou postupně nahrazovány modernějším typem přístrojů v uspořádání FTIR. [14]

3.2 Infračervené spektrometry založené na filtrech a infračervené spektrometry s LED zdrojem

Pro selekci jednotlivých vlnových délek mohou být využity interferenční nebo akusto-optické laditelné filtry. Přístroje s interferenčními filtry v současnosti nejsou příliš rozšířeny, naopak přístroje založené na akusto-optických laditelných filtrech jsou moderním designem spektrometrů, které umožňuje konstrukci přístrojů bez využití pohyblivých částí a velmi vysokou rychlostí měření. [13]

Akusto-optický filtr využívá dvojlomný krystal nejčastěji TeO_2 , na jehož jeden konec je připevněn piezoelektrický materiál, který při excitaci radiofrekvenčním signálem emituje mechanickou (akustickou) vlnu. Interakce této akustické vlny v krystalu se zářením ze zdroje na krystal dopadajícím vyvolá difrakci monochromatického paprsku, který je následně využit pro měření. [13]

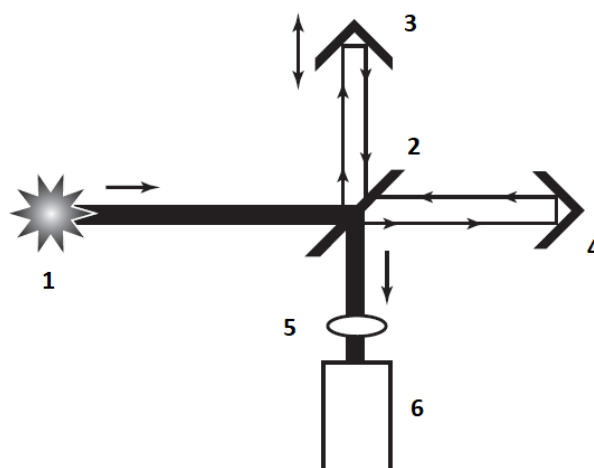
Infračervené spektrometry s LED zdrojem mohou využívat diody jako zdroj záření o úzkém rozmezí vlnových délek, nebo mohou být použity jako zdroj polychromatického záření, ze kterého je požadovaná vlnová délka izolována použitím disperzního systému. Přístroje tohoto typu nemají dostatečné přesnost pro využití pro komerční laboratorní spektrometry, nicméně díky nízké ceně a jednoduchosti jsou vhodné především pro přenosné přístroje určené pro měření v terénu. [18]

3.3 Infračervené spektrometry s Fourierovou transformací

V tomto uspořádání je monochromátor přístroje nahrazen Michelsonovým interferometrem a interferometricky získaný signál se pomocí Fourierovy transformace převede na výsledné IR spektrum. [19]

Zdroje záření lze využít analogicky jako u disperzních infračervených spektrometrů, obvykle se využívá Globar, případně wolframová nebo halogenová výbojka. Detektor je obvykle pyroelektrického typu, umožňující s dostatečně rychlou odezvou registrovat signál v širokém rozsahu vlnočtů. Nejčastěji jsou využívány detektory DTGS a TGS, nazývané tak dle použitého pyroelektrického materiálu – deuterovaného triglycinsulfátu pro DTGS, respektive triglycinsulfáru pro TGS. Kromě těchto dvou typů je rovněž možné využít detektory MCT, které jsou rovněž založeny na pyroelektrickém jevu, jsou ale citlivější a mají rychlejší odezvu. Jejich nevýhoda však spočívá v ceně, pracují za chlazení kapalným dusíkem. [2]

Jak bylo zmíněno výše, monochromátor je v tomto uspořádání nahrazen interferometrem. Interferometr se skládá ze zdroje záření, děliče paprsků, dvou zrcadel a detektoru. Záření ze zdroje prochází děličem paprsků, přičemž je rozděleno na dvě části. Jedna část putuje k pohyblivému zrcadlu a druhá část k zrcadlu stacionárnímu. Pohyblivé zrcadlo se konstantní rychlostí pohybuje blíže a dále od děliče paprsků. Na základě polohy pohyblivého zrcadla pak následně dochází k interferenci při rekombinaci odražených paprsků, které se na děliči buď sčítají, nebo odčítají, v závislosti na dráhovém rozdílu paprsků. Signál dopadající na detektor je zaznamenáván, přičemž jsou zachyceny hodnoty pro všechny vlnové délky IR spektra současně. Signál je pak následně pomocí Fourierovy transformace převeden počítačem na výsledné infračervené spektrum. Schéma FTIR spektrometru je uvedeno na obrázku č. 5.



Obr. č. 5: Schematické uspořádání spektrometru FTIR (převzato a upraveno [14])

*1 – zdroj záření, 2 – dělič paprsků, 3 – pohyblivé zrcadlo, 4 – pevné zrcadlo, 5 – vzorek,
6 – detektor*

Klíčovým pro funkci spektrometru je pohon pohyblivého zrcadla, který musí zajistit konstantní rychlost posunu zrcadla při zachování minimální odchylky roviny zrcadla. Pohyb zrcadla je řízen pomocí velmi přesného laseru, který zároveň slouží i jako vnitřní kalibrace vlnové délky. [20]

Spektrometry FTIR mají v porovnání s disperzními infračervenými spektrometry řadu výhod, především vyšší intenzitu záření dopadajícího na detektor, vyšší citlivost, větší rozlišovací schopnost a rychlost měření. [19]

3.4 Možné módy měření

Měření vzorků je možno provádět ve všech skupenstvích. Skupenství měřeného vzorku významně ovlivňuje naměřené infračervené spektrum. U plynných vzorků lze získat spektra s rotační strukturou, u kapalných vzorků je rotační pohyb molekul rušen kolizemi s ostatními molekulami, což má za následek rozšíření absorpčních pásů. Pevné látky mají obvykle spektra složitější, kdy molekuly vázané do krystalové mřížky mohou vykazovat dodatečné vibrace, případně může docházet ke změnám aktivity vibrací nebo jejich frekvence. [3]

3.4.1 Transmisní měření

Transmisní měření se provádí nejčastěji v kyvetách, které jsou naplněny stanovovaným vzorkem. Materiály použité na výrobu destiček nebo kyvet musí být propustné pro IR záření a nesmějí interagovat s měřenými vzorky. Využívají se monokrystaly halogenidů alkalických kovů, jejichž nevýhodou však je jejich rozpustnost ve vodě, z materiálů ve vodě nerozpustných jsou využívány např. CaF_2 , BaF_2 , AgCl , ZnSe nebo polyethylen. [3]

U plynných látek je nutné prodloužení dráhy paprsku kvůli inherentně malé hustotě plynů. Pro měření jsou využívány kyvety ve formě trubic se základnami z materiálu propustného pro IR záření. Citlivost měření může být zvýšena využitím násobného odrazu, kdy paprsek prochází kyvetou několikanásobně díky odrazu na soustavě zrcadel.

Kapalné vzorky se měří přímo v kyvetách nebo ve formě kapilárního filmu mezi dvěma destičkami [3]. Výrazný vliv na výsledné spektrum má použité rozpouštědlo, které ovlivňuje tvar a intenzitu absorpčních pásů i vlnčet, při kterém je záření absorbováno.

U tuhých látek lze provádět přímé transmisní měření u vzorků ve formě filmů polymerů. V ostatních případech je nutná úprava vzorku, využívá se technika lisovaných tablet, případně lze práškové vzorky měřit suspenzní metodou po smíchání s olejem, kdy je měřeno infračervené spektrum kapilární vrstvy takto získané suspenze. [3]

3.4.2 Reflexní měření

Pro eliminování v některých případech poměrně náročné přípravy vzorků pro transmisní měření se často využívají reflexní měření. Měření je možno provádět s využitím spekulární reflektance, metodou zeslabení úplného odrazu nebo metodou difúzní reflexe.

Metoda zeslabení úplného odrazu

Tato metoda využívá jevu, kdy dochází k úplnému odrazu záření procházejícího prostředím s vyšší optickou hustotou při dopadu na mezifázi s prostředím s nižším indexem lomu - pokud záření dopadá pod úhlem větším než je kritický úhel dopadu.

Při měření část záření pronikne do hloubky několika μm , přičemž dojde k absorpci těch vlnů, jež odpovídají příslušným vibračním frekvencím molekul vzorku. Odražené zeslabené záření je vyhodnoceno a je získáno odpovídající absorpční infračervené spektrum.

[3]

Spekulární reflektance (metoda zrcadlového odrazu)

Podstatou této metody je zrcadlový odraz od povrchu vzorku. Metodu lze v zásadě využít ve dvou módech. Lze sledovat přímou reflexi na zrcadlových površích, nebo pro měření tenkých filmů na površích, které záření odráží. Spektrum získané přímou reflexí se liší od transmisního spektra, lze je ale Kramersovou-Kronigovou transformací na transmisní spektrum převést. [21]

Ve druhém módu prochází záření tenkou vrstvou filmu na povrchu odrazivého materiálu, od jehož povrchu se odrazí zpět, znovu projde vrstvou filmu a vystupuje do prostoru. Záření tedy prochází vzorkem dvakrát, což má za následek zvýšení citlivosti metody v porovnání s klasickou transmisní technikou. [21]

Metoda difúzní reflexe

V této metodě je využíváno faktu, že při dopadu záření na vzorek dochází částečně k odrazu záření a částečně ke vstupu paprsku pod povrch vzorku. Odražený paprsek je pak tvořen dvěma složkami – spekulární složkou a difúzní složkou. Spekulární složka je záření odražené od povrchu vzorku. Difúzní složka je část záření, která proniká pod povrch vzorku, přičemž dochází k rozptylu záření a částečné absorpci záření molekulami vzorku a až poté dochází k vystoupení takto difúzně rozptýleného záření. Spekulární paprsek narušuje difúzní spektrum, proto je tato složka záření potlačována. Využití difúzního odrazu pro kvalitativní stanovení je komplikováno faktem, že neexistuje lineární vztah mezi intenzitou absorpčních pásů a koncentrací. [21]

4 VYUŽITÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROMETRIE

Infračervená spektrometrie má široké uplatnění jak v kvalitativní, tak i v kvantitativní analýze. Metodu lze využít pro stanovení vzorků všech skupenství.

4.1 Kvalitativní analýza

Kvalitativní analýza vzorků metodou infračervené spektrometrie je založena na přítomnosti dvou charakteristických oblastí v rámci infračervených spekter – oblasti charakteristických skupinových vibrací a tzv. oblasti otisku prstu.

4.1.1 Oblast charakteristických skupinových vibrací

Tato oblast je využívána při strukturní analýze zkoumané látky a leží přibližně v rozmezí vlnočtů $4000 - 1600 \text{ cm}^{-1}$. Určité vibrace mohou být omezeny na určitou funkční nebo strukturní část molekuly, atomy v této části molekuly jsou pak při vibraci jen velmi málo ovlivněny zbytkem molekuly. Absorpční pásy odpovídající těmto vibracím jsou pak charakteristické pro danou funkční nebo strukturní jednotku v infračervených spektrech různých látek. Příklady některých charakteristických absorpčních pásů jsou uvedeny v tabulce č. 4.1.

Tabulka č. 4.1: Charakteristické infračervené absorpční pásy vybraných funkčních skupin [22]

Funkční skupina	Absorpční pás (cm^{-1})	Funkční skupina	Absorpční pás (cm^{-1})
$\equiv\text{C-H}$	3300	Karboonylové sloučeniny	1670 - 1780
$\text{C}\equiv\text{C}$	2100 – 2260	C=O	
C-Cl	600 – 800	- aldehyd	1730
C-Br	500 – 600	- keton	1715
O-H	3400 – 3650	- esterová skupina	1735
C-O	1050 – 1150	- amidová skupina	1690
N-H	3300 – 3500	- karboxylová kyselina	1710
		NO_2	1540

Hodnoty těchto charakteristických pásů byly stanoveny empiricky, šířka intervalu vlnočtů je dána ovlivněním vibrace dané funkční skupiny nebo strukturní jednotky zbytkem mole-

kuly. Na základě přítomnosti, respektive nepřítomnosti těchto charakteristických absorpčních pásů pak lze usuzovat na strukturu zkoumané molekuly.

4.1.2 Oblast otisku prstů

Komplexní část spektra ležící přibližně v rozmezí vlnočtů $1500 - 400 \text{ cm}^{-1}$ je nazývána oblast otisku prstů. V této oblasti jsou obsaženy některé charakteristické pásy pro určité vazby. Zároveň zde leží i absorpční pásy odpovídající řadě možných vibračních módů jednotlivých molekul. Tyto pásy nelze jednoznačně přiřadit jednotlivým vazbám nebo funkčním skupinám, jde o vibrace delokalizované, které nejsou projevem pouze jednotlivé funkční skupiny nebo vazby, ale samotné molekuly jako celku. [3], [22]

Pokud mají dva různé vzorky shodnou absorpční oblast v tomto rozmezí vlnočtů, tak je lze s velmi vysokou pravděpodobností považovat za totožné. Tuto oblast spektra lze využít pro identifikaci neznámých látek s využitím spektrálních knihoven. [22]

4.2 Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýza obdobně jako ostatní spektrální metody využívá Lambertova-Beerova zákona, který lze definovat vztahem:

$$\theta = \theta_0 \cdot 10^{-\varepsilon c l} \quad (4.1)$$

který lze po zavedení vztahu 1.4 zjednodušit na:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (4.2)$$

kde ε je molární absorpční koeficient, c je koncentrace a l je délka absorbujícího prostředí. Množství analytu se pak následně vyhodnocuje na základě sestrojené kalibrační křivky.

Platnost Lambertova-Beerova zákona je omezena na transparentní vzorky, u kterých lze vyloučit rozptyl záření ve vzorku, není tedy použitelný pro stanovení kalných vzorků a obecně vzorků u kterých tento rozptyl hrozí, jako jsou např. biologické materiály. [15]

U vícesložkových směsí, u nichž analyzovaný vzorek obsahuje více analytů absorbujících ve stejné oblasti vlnových délek, je nutné využít statistické a matematické modely pro získání požadovaných dat. Nejčastěji jsou využívány metody multivariantní kalibrace a multivariantní klasifikace. Multivariantní kalibrace je obecně využívána pro nalezení vztahu mezi dvěma sadami dat, v tomto případě jde obvykle o data získaná pomocí standardních laboratorních měření a data získaná měřením infračervenou spektrometrií. [15]

4.2.1 Kalibrační modely

Kvalita kalibračního modelu je silně ovlivněna počtem kalibračních vzorků, které byly použity pro danou analýzu, obvykle s růstem počtu použitých kalibračních vzorků je získána robustnější kalibrační závislost. Vzorky, použité pro kalibraci musí být zvoleny tak, aby dobře vystihovaly zamýšlený rozsah použití kalibrace. Musí tedy co nejvíce vystihovat variabilitu všech proměnných, které kalibraci ovlivňují, přičemž kalibrační vzorky by měly být distribuovány rovnoměrně v daném rozsahu měření. [15]

Pro analýzu spektrálních dat jsou využívány metody vhodné pro analýzu souborů dat s velkým počtem proměnných. Využívány jsou metody regrese hlavních komponent - PCR (principal component regression) a metoda částečných nejmenších čtverců - PLS (partial least squares). Obě tyto metody jsou založeny na konverzi původních proměnných na tzv. latentní proměnné, které jsou lineární kombinací původních proměnných. Původní velký počet proměnných je tak redukován na menší počet nových proměnných. [23]

Metoda PCR zahrnuje analýzu hlavních komponent, přičemž jsou původní proměnné redukovány na relevantní proměnné – tzv. hlavní komponenty s cílem snížit celkovou variabilitu dat [24]. Následně je provedena vlastní regrese na hlavních komponentách, tedy kalibrace závisle proměnné – koncentrace dané látky – pomocí metody nejmenších čtverců aplikované na zvolený podsoubor hlavních komponent. [23]

Metoda částečných nejmenších čtverců (PLS) je v porovnání s metodou PCR výhodnější v tom, že se při konstrukci modelu zaměřuje pouze na zdroj variability ve spektru, který koreluje s koncentrací dané látky. Jsou tedy eliminovány možné zdroje variability v datech, které jsou způsobeny zahrnutím do konstrukce modelu všech hlavních komponent v metodě PCR. Některé z těchto komponent mohou popisovat zdroj variability v datech, který není ovlivňován koncentrací a mohou tedy negativně ovlivnit predikci daného modelu. [15], [23]

Velmi důležitým krokem při metodě PLS je výběr počtu latentních proměnných (faktorů), které budou při tvorbě kalibračního modelu použity. Pokud je zvolen nedostatečný počet faktorů, dochází ke ztrátě relevantních dat a vytvořený model není spolehlivý. Naopak při příliš velkém počtu faktorů je do modelu vnášen i spektrální šum, což má za následek zhoršenou predikční schopnost daného modelu. [15]

Optimální počet PLS faktorů lze určit s využitím cross-validační statistiky. Lze použít funkci PRESS (predicted residual error sum of squares) přepsanou vztahem [25]:

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - c_i)^2 \quad (4.3)$$

kde n je celkový počet použitých vzorků, \hat{c}_i je odhadovaná koncentrace, c_i je referenční koncentrace i -tého vzorku vynechaného z kalibrace při cross-validaci. Optimální počet faktorů pak lze zvolit jako počet faktorů odpovídajících minimum hodnoty funkce PRESS. [26]

4.3 Infračervená spektrometrie v potravinářství

IR spektrometrie se v potravinářství začínala uplatňovat již od 80. let minulého století, kdy byla využívána pro analýzu různých složek potravin např. tuků, bílkovin a vlhkosti v masě, mléce a ovoci a zelenině [27]. IR spektrometrie má potenciálně velmi širokou škálu použití i v současnosti, především NIR spektrometrie která je obzvláště vhodná pro využití v lékárenském průmyslu díky svojí schopnosti použití pro analýzu čtyřech základních složek mléčných výrobků – bílkovin, tuku, vody a sacharidů [28]. Tradiční metody stanovení vlhkosti, tuku, bílkovin nebo laktózy v mléku jsou časově a finančně náročné, výhoda NIR spektrometrie spočívá v tom, že umožňuje přímé stanovení jednotlivých parametrů bez předchozí úpravy vzorků a bez použití drahých chemikálií [29].

Využití NIR spektrometrie nachází při nedestruktivním on-line měření kvality ovoce. V transmisním uspořádání byla NIR spektrometrie použita například pro odhalování vnitřního hnědnutí [30] a detekci vnitřního plísnivění u jablek [31]. Metoda byla rovněž použita pro třízení peckovin na základě celkového obsahu rozpustných látek [32].

NIR spektrometrie se ukazuje být jednou z nejefektivnějších metod pro určování kvality masa a masných výrobků [33], byly publikovány články zabývající se využitím této metody mimo jiné pro stanovení obsahu intramuskulárního tuku ve vepřovém [34], [35], [36], hovězím [35], [36] a drůbežím masě [37], [38]. Dále bylo zkoumáno využití metody pro klasifikaci vepřového masa dle schopnosti vázat vodu [39], klasifikaci šunky na základě textury a barvy [40], hodnocení kuřecího masa [41], [42]. Metoda v uspořádání hyperspektrálního zobrazování byla použita pro hodnocení schopnosti vázat vodu u lososího [43] a hovězího masa [44] i pro posouzení obsahu vody a obsahu bílkovin u španělských vařených šunek [45].

Byla studována řada aplikací NIR reflexní spektrometrie, která byla použita pro analýzu škrobu, bílkovin, vody a popelovin v rýži [46] a pšenici [47], pro analýzu obsahu bílkovin, vody a dalších složek v kukuřici a sójových bobech [48]. Bylo zkoumáno využití této me-

tody pro stanovení obsahu cukru v ovoci, konkrétně broskvích [49], hruškách [50] a jablčích [51]. Dále byly zveřejněny publikace zkoumající využití této metody pro stanovení určitých složek mléka a mléčných výrobků, zejména tuku, bílkovin, laktózy a vlhkosti v sýru [52], mléce [53] a syrovátce [54].

Fagan et al. (2009) se zabýval využitím NIR spektrometrie pro stanovení vlhkosti a obsahu tuku v sýřenině a syrovátce během výroby sýrů [55]. Kawasaki et al. (2008) využil metodu pro přímou kontinuální analýzu syrového mléka v automatickém dojícím robotovi – zkoumán byl obsah tuku, laktózy a bílkovin [56]. Obdobně zaměřené stanovení prováděl Melfsen et al. (2013) pro syrové mléko získané z více farem v průběhu šesti měsíců [57]. V obou případech byl získán robustní kalibrační model především pro stanovení tuků, kde byla získána kalibrace s R^2 0,96, respektive 0,99 získaný Melfsen et. al. Poptávku po levném spolehlivém senzoru pro on-line kontrolu kvality mléka reflektoval Brennan et al. (2003) v práci zaměřené na vývoj mikro NIR spektrometru použitelného pro tento typ analýzy [58].

Rovněž bylo zkoumáno využití NIR spektrometrie pro stanovení vlhkosti v sušených mléčných výrobcích. Byly publikovány články zabývající se stanovením vlhkosti v sušeném odtučněném i plnotučném mléce a sušeném podmásí [59].

Núñez-Sánchez et al. (2016) použil NIR spektrometrii pro analýzu profilu mastných kyselin v kozím mléce, přičemž nejlepšího výsledku dosáhl při stanovení celkového obsahu nasycených mastných kyselin s R^2 odpovídajícím 0,78 [60].

Păucean et al. (2017) metodu použil pro stanovení obsahu kyseliny mléčné produkované bakteriemi mléčného kvašení přičemž koeficient determinace R^2 získaného kalibračního modelu byl 0,986 [61].

Shao a He (2009) se zabývali použitím NIR pro stanovení celkového obsahu rozpustných látek a hodnoty pH jogurtu, přičemž dosažený korelační koeficient kalibrace pro celkový obsah rozpustných látek byl 0,9427 a pro pH 0,9208 [62]. He at al. (2006) při stanovení pH obdobnou metodou dosáhl korelačního koeficientu 0,890 [63].

Shao et al. (2007) v další práci rovněž zkoumal využití NIR pro stanovení kyselosti a obsahu cukru v jogurtech, kdy dosáhl s využitím metody PLS korelačního koeficientu 0,91 pro obsah cukru a 0,90 pro kyselost jogurtů [64].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vytvoření databáze NIR spekter vybraných kysaných mléčných výrobků, provedení analýzy těchto spekter a prozkoumání možnosti využití infračervené spektrometrie v blízké oblasti spektra pro stanovení vybraných parametrů mléčných výrobků – obsahu tuku, bílkovin, sušiny, titrační kyselosti a pH. Pro analýzu byly použity vzorky jogurtů bílých, smetanových, řeckých a jogurtů řeckého typu z tržní sítě i vzorky jogurtů a jogurtových mlék vlastní výroby v širokém rozmezí tučnosti.

Pro teoretickou část práce byly stanoveny dílčí cíle a to popsání principu infračervené spektrometrie, jejího experimentálního uspořádání a využití v potravinářském průmyslu. Dále pak popis technologie výroby vybraných typů mléčných výrobků a popis principu tvorby kalibračních modelů.

Dílčími cíli pro praktickou část práce byli provedení základního chemického rozboru jednotlivých vzorků a proměření těchto vzorků pomocí NIR spektrometrie ve dvou režimech měření, na základě získaných údajů pak vytvoření kalibračních modelů pro stanovení základních složek použitých mléčných výrobků pro oba měřicí režimy a v posledním kroku vyhodnocení získaných výsledků, jejich porovnání mezi sebou a s dostupnou literaturou a posouzení využitelnosti získaných výsledků.

6 MATERIÁLY A METODIKA

6.1 Vzorky a chemikálie

Pro analýzu byly použity jednak vzorky bílých neochucených jogurtů komerčně dostupných v tržní síti v širokém rozmezí tučnosti od jogurtů se sníženým obsahem tuku po smetanové jogurty, a jednak byly použity i připravené vzorky vlastní výroby. V tabulce č. 6.1 je uveden přehled jogurtů zakoupených v tržní síti, které byly použity pro jednotlivá stanovení, společně s výrobcem na obalu deklarovanými hodnotami obsahu tuku a bílkovin.

Tabulka č. 6.1: Přehled použitých vzorků bílých jogurtů z tržní sítě

Značka	Název	Výživové údaje na 100g	
		Tuky	Bílkoviny
A	Skyr	0,1	12
B	Bílý jogurt	3,8	3,8
C	Bílý jogurt selský	3,7	4
D	Skyr natural	0,1	12
E	Řecký jogurt bílý se sníženým obsahem tuku	0,3	10
F	Bílý jogurt se sníženým obsahem tuku	1,5	4,5
G	Bílý jogurt	2,7	4,9
H	Bílý jogurt	3,1	4,3
I	Bílý jogurt	3,1	4,8
J	Bílý jogurt s bifidokulturou	3,4	4,5
K	Selský jogurt bílý s kulturou BIFI	3,8	3,7
L	Řecký jogurt bílý	5	8,4
M	Jogurt řeckého typu	9,4	3,3
N	Smetanový jogurt	10,2	3,5
O	Smetanový jogurt	10,2	3,5

Pro měření byly rovněž použity vzorky vyrobené v laboratoři Ústavu technologie potravin, které byly připraveny smísením odtučněného mléka a smetany na požadovanou tučnost a následně zakysány jogurtovou kulturou Lacrum obsahující kultury *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Takto připravené vzorky byly připraveny v rozmezí tučností 0,5 % do 10 % s krokem 1 % od obsahu tuku 1 % výše.

Použité chemikálie

V rámci provedených stanovení byly použity níže uvedené chemikálie:

- Hydroxid sodný
- Kyselina sírová 96%
- Peroxid vodíku
- Katalyzátor $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Indikátor Tashiro
- Kyselina boritá
- Kyselina chlorovodíková
- Hexan
- Deionizovaná voda

6.2 Přístroje

Měření infračervených spekter bylo prováděno na přístroji HK 10 particuLAB od výrobce Harrer & Kassen GmbH. Přístroj je založen na měření difúzní reflexe, zdrojem záření je halogenová lampa a přístroj využívá detekci pomocí diodového pole.

Pro vyhodnocování naměřených spekter byl použit program Specter v. 4.0 dodávaný stejným výrobcem.

Používaná deionizovaná voda byla vyráběna v laboratoři na přístroji Aqua MAX-Ultra System od výrobce Younglin Instrument Co. Ltd.

Dále byly použity tyto přístroje:

- Analytické váhy LA214 (VWR International, ČR)
- Váhy PLJ (Kern, ČR)
- Přenosný pH metr HI 99161 (HANNA Instruments, USA) a pH metr pHSphear (Eutech Instruments, USA)
- Lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, CHRIST (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Německo)
- Sušárna BMT Venticell (Brněnská medicínská technika, ČR)
- Mineralizátor Digesdahl model 23130-20 (HACH, USA)
- Destilační přístroj (Behr, Německo)
- Minititrátor pro analýzu mléka HI-84529 (HANNA Instruments, USA)

6.3 Referenční stanovení

Pro sestavení jednotlivých kalibračních modelů bylo nezbytné provedení referenčních stanovení obsahu sušiny, tuku, bílkovin, hodnoty pH a titrační kyselosti vzorků jogurtů a jogurtových mlék.

6.3.1 Stanovení obsahu celkové sušiny

Sušina byla stanovena sušením vzorku smíšeného s pískem do konstantní hmotnosti. Každé stanovení bylo provedeno ve 3 opakováních pro každý vzorek.

Hliníkové misky obsahující písek a skleněnou tyčinku na roztírání vzorku byly vysušeny a následně zváženy. Do takto připravených misek byly následně přibližně přesně odváženy 3 g vzorku. Miska byla pomocí skleněné tyčinky promíchána a umístěna do sušárny, kde byla při teplotě 102 °C sušena do konstantní hmotnosti.

Z rozdílu hmotností byl obsah sušiny vypočten pomocí vzorce:

$$\text{obsah sušiny (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1} \cdot 100 \quad (6.1)$$

ve kterém je:

m_2 hmotnost misky se vzorkem po sušení

m_1 hmotnost navážky vzorku

m_0 hmotnost misky před sušením

6.3.2 Stanovení obsahu tuku

Stanovení obsahu tuku bylo provedeno metodou dle Soxhleta, tato metoda je založena na extrakci tuku ze vzorku nepolárním rozpouštědlem, následném odpaření rozpouštědla a zvážení vyextrahovaného podílu tuku.

Vzorek 0,20 g byl navážen do extrakční patrony, patrona byla utěsněna vatou a vložena do extraktoru. Do předem zvážené extrakční baňky s varnými kuličkami bylo přilito 100 ml extrakčního činidla hexanu. Baňka byla pomocí topného hnízda vyhřívána po dobu tří hodin. Po vychladnutí byla extrakční baňka na vakuové odparce odpařena do konstantní hmotnosti a zvážena. Každé stanovení bylo provedeno ve třech opakováních.

Obsah tuku byl vypočten pomocí vzorce:

$$\text{obsah tuku (\%)} = \frac{m_2 - m_0}{m_1} \cdot 100 \quad (6.2)$$

ve kterém je:

m_2 hmotnost extrakční baňky s tukem po odpaření rozpouštědla

m_1 hmotnost navážky vzorku

m_0 hmotnost extrakční baňky s varnými kamínky

6.3.3 Stanovení obsahu bílkovin

Obsah bílkovin byl stanoven Kjeldahlovou metodou modifikovanou dle Behra. Principem metody je mineralizace vzorku pomocí kyseliny sírové, přičemž je pomocí katalyzátoru veškerý organicky vázaný dusík převeden na síran amonný. Přebytkem hydroxidu sodného je poté uvolněn amoniak, který je jímán do roztoku kyseliny borité a následné titraci vzniklého roztoku kyselinou. [65]

Při vlastním stanovení bylo 0,25 g vzorku odváženo do mineralizační zkumavky, poté bylo přidáno 10 ml koncentrované kyseliny sírové, 0,5 ml peroxidu vodíku a 0,1 g katalyzátoru tvořeného síranem sodným a síranem měďnatým pentahydrátem v poměru 10 : 1. Po promíchání byla mineralizační zkumavka vložena do mineralizátoru a byla prováděna mineralizace při teplotě 400 °C po dobu 1 hodiny. Po dokončení mineralizace a vychladnutí mineralizační zkumavky byl její obsah kvantitativně převeden do odměrné baňky. Do destilační baňky bylo odpipetováno 10 ml mineralizátu a spolu s baňkou obsahující 50 ml 2% kyseliny borité byly vloženy do destilačního přístroje Behr. Do destilačního přístroje byl nasát roztok 30 % hydroxidu sodného a byla provedena destilace. Po ukončení destilace byly do destilátu přidány 3 až 4 kapky indikátoru Tashiro a obsah baňky byl pomocí odměrného roztoku 0,025 mol.l⁻¹ kyseliny sírové ztitrován do červenofialového zbarvení.

Obsah hrubé bílkoviny pak byl vypočten dle vzorce:

$$m_B (g) = M_N \cdot c_{H_2SO_4} \cdot V \cdot f_z \cdot f_t \cdot f_f \quad (6.3)$$

ve kterém je:

M_N molární hmotnost dusíku

$c_{H_2SO_4}$ koncentrace odměrného roztoku kyseliny sírové

V spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové při titraci

f_z	titrační faktor
f_t	titrační faktor
$f_{př}$	přepočítávací faktor dle druhu potraviny

6.3.4 Stanovení pH

Měření pH každého vzorku bylo provedeno v šesti opakováních v různých místech vzorku a různé hloubce ponoření pH sondy. Za výslednou hodnotu pH daného vzorku byla považována průměrná hodnota z těchto šesti měření.

6.3.5 Stanovení titrační kyselosti

Stanovení titrační kyselosti bylo prováděno s využitím automatického titrátoru s potenciometrickou detekcí dle modifikované metody ISO/TS 11869. S přesností na 4 desetinná místa bylo naváženo 10 g daného vzorku s přesností na 0,01 g, odvážené množství bylo doplněno deionizovanou vodou do takové výšky, aby byla měřicí sonda titrátoru ponořena. Následně byl připravený vzorek na automatickém titrátoru za stálého míchání ztitrován odměrným roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 0,1 mol.l⁻¹. Stanovení bylo pro každý vzorek provedeno ve třech opakováních.

6.4 Měření infračervených spekter

Infračervená spektra byla měřena na infračerveném spektrometru HK 10 particuLAB výrobce Harrer & Kassen. Měření probíhalo v módu difúzní reflexe v rozmezí vlnových délek 925 – 1375 nm. Všechny měření byly provedeny ve dvou různých integračních časech – 7 x 12,5 ms a 8 x 12,5 ms. Celková doba jednoho měření byla 30 sekund, přičemž každé měření bylo provedeno ve čtyřech opakováních.

Integrační čas je doba, po kterou je zaznamenáváno vlastní spektrum a ovlivňuje citlivost provedeného měření. S růstem integračního času dochází k růstu výšky naměřeného spektra, zároveň však narůstá i šum měření a při dlouhém integračním času může dojít až k zahlcení detektoru, kdy již nedochází k záznamu spektrálních informací.

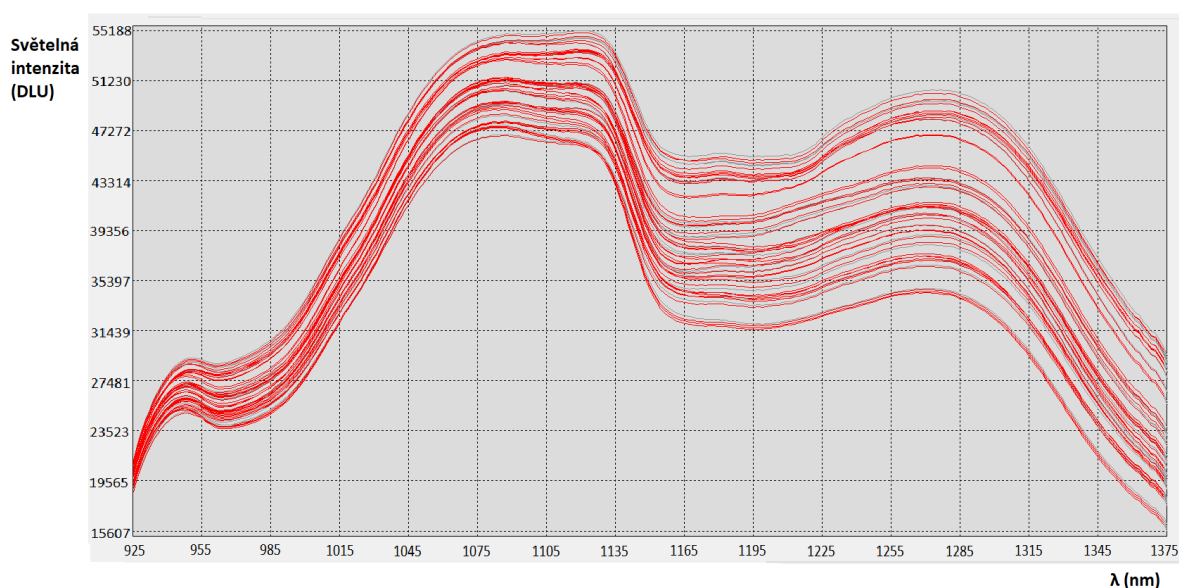
Vlastní měření bylo prováděno tak, že daný vzorek byl nejprve důkladně promíchán. Po promíchání byl následně převeden do skleněné Petriho misky, která byla vzorkem naplněna až po okraj. Povrch vzorku byl uhlazen nožem a přebytečné množství vzorku bylo od-

straněno. Poté bylo provedeno vlastní měření IR spektra. Mezi jednotlivými opakováními byl vzorek v Petriho misce vždy promíchán.

6.5 Tvorba kalibračních modelů

Po změření spekter vzorků postupem uvedeným v předcházející kapitole 6.4 bylo provedeno sestavení kalibračních modelů pro stanovení jednotlivých parametrů daných vzorků.

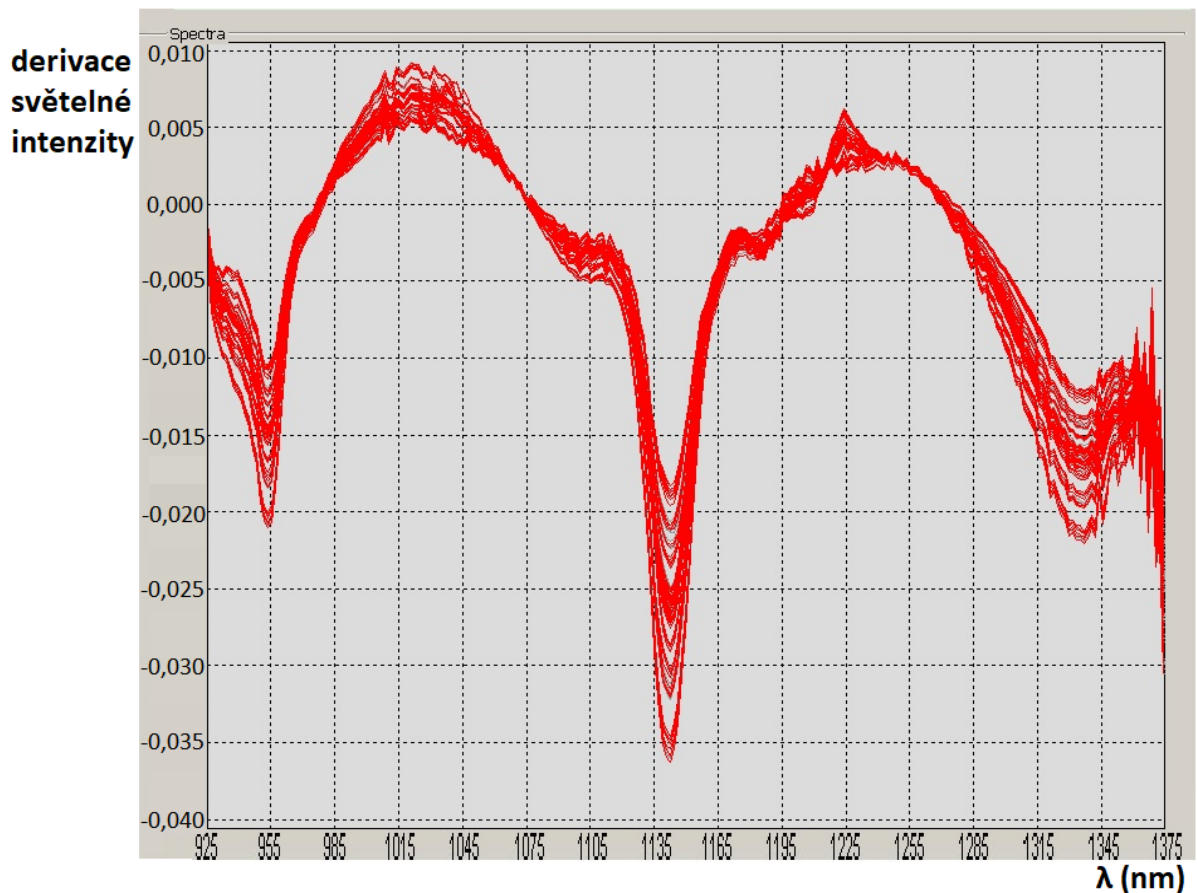
Získané záznamy spekter, jejichž příklad v nestandardizované formě je uveden na obrázku č. 6, byly nahrány do kalibračního programu Specter.



Obr. č. 6: Záznam NIR spekter vzorků jogurtů z tržní sítě

Po nahrání spekter do kalibračního podprogramu byly k jednotlivým změřeným spektrům zadány jejich referenční hodnoty stanovené pomocí metod popsanych v kapitole 6.3 a jejich podkapitolách.

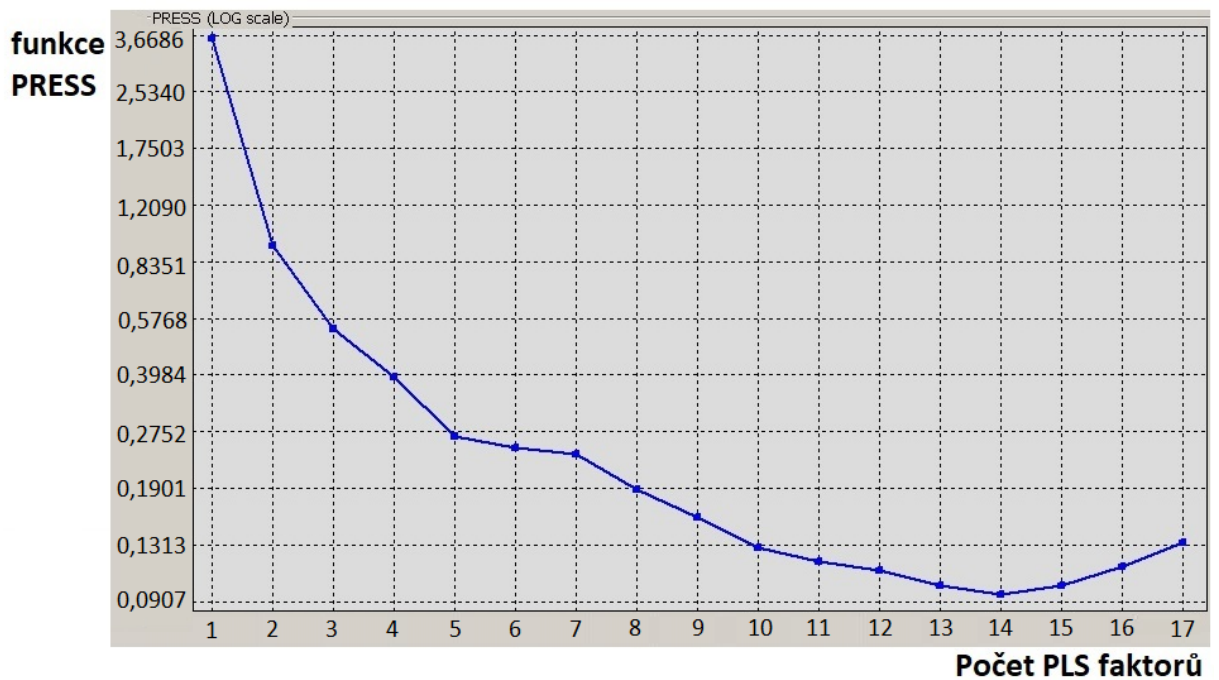
Následně byl vybrán mód standardizace naměřených spekter. V rámci této práce byl používán standardizační mód „Special“, který kompenzuje i vliv stáří lampy a změny v barevnosti vzorků na výsledné spektrum. Příklad standardizovaného spektra je uveden na obrázku č. 7.



Obr. č. 7: Standardizovaný záznam naměřených NIR spekter

V dalším kroku byla vybrána spektra, která byla využita pro sestavení kalibrace a která použita nebudou. 20 – 30 % naměřených spekter nebylo použito pro sestavení kalibrace, tak aby mohly být použity pro ověření sestaveného modelu. Toto rozmezí je doporučováno výrobcem použitého spektrometru.

Poté byl proveden výpočet počtu faktorů PLS. V rámci této práce byla použita metoda výpočtu „CROSS“. V této metodě je proveden výpočet takovým způsobem, že každý jednotlivý vzorek je postupně z kalkulace vyloučen a kalibrační model je přepočítán s využitím zbylých vzorků. Díky tomuto postupu lze pomocí funkce PRESS určit optimální počet PLS faktorů. Tento počet byl určen tak, že v tomto bodě měla hodnota funkce PRESS svoje minimum. Příklad grafu závislosti hodnoty funkce PRESS na počtu PLS faktorů je uveden na obrázku č. 8.



Obr. č. 8: Závislost hodnoty funkce PRESS na počtu PLS faktorů pro kalibrační model tuku s integračním časem 8 x 12,5 ms

Na základě zvoleného počtu PLS faktorů byl poté přístrojem vypočítán kalibrační model pro daný parametr. Získané kalibrační modely s jejich statistickými charakteristikami jsou uvedeny v kapitole 7.

6.6 Statistické vyhodnocení výsledků

Pro validaci dat získaných na základě spektrálních měření byla použita referenční stanovení jednotlivých sledovaných parametrů. Opakovaná měření získaná při referenčních analýzách byla použita pro odhad střední hodnoty, která byla následně použita při sestrojování kalibračního modelu v programu Specter.

Střední hodnota výsledků referenčních stanovení byla odhadnuta pomocí aritmetického průměru vypočteného pomocí vztahu:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (6.4)$$

ve kterém je x_i hodnota stanovované veličiny pro i -té měření a n je počet měření.

Směrodatná odchylka referenčních stanovení byla použita pro charakterizaci přesnosti měření, přičemž byla vypočtena dle vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (6.5)$$

kde \bar{x} je hodnota aritmetické průměru daných hodnot, x_i je i -tá hodnota a n je počet provedených měření.

Pro posouzení přesnosti vytvořeného kalibračního modelu byl proveden výpočet střední kvadratické chyby kalibrace (RMSEC) a střední kvadratické chyby validace (RMSEV). RMSEC byla vypočtena pomocí vztahu:

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{x}_i - x_i)^2}{n_{cal}}} \quad (6.6)$$

ve kterém n_{cal} je počet měření použitých pro sestavení kalibračního modelu, \hat{x}_i je hodnota parametru daného vzorku určená pomocí kalibračního modelu NIR a x_i je referenční hodnota daného parametru pro příslušný vzorek.

Hodnota RMSEV byla vypočtena pomocí vztahu:

$$RMSEV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{x}_i - x_i)^2}{n_{val}}} \quad (6.7)$$

ve kterém n_{val} je počet měření použitých pro validaci – tyto měření nebyly součástí dat použitých pro tvorbu kalibračního modelu, \hat{x}_i je hodnota parametru daného vzorku určená pomocí kalibračního modelu NIR a x_i je referenční hodnota daného parametru pro příslušný vzorek.

Počet PLS faktorů – viz. kapitola 4.2.1 – byl stanoven pomocí funkce PRESS definované vztahem 4.3 s využitím programu Specter.

Rozdíl mezi středními hodnotami obsahu daného parametru stanovenými pomocí referenční metody a NIR byl otestován pomocí t testu na statisticky významnou rozdílnost pomocí vztahu:

$$t = \frac{|\bar{x}_{NIR} - x_{ref}|}{\sqrt{\frac{s_{NIR}^2}{N_{NIR}} + \frac{s_{ref}^2}{N_{ref}}}} \quad (6.8)$$

kde N_{NIR} a N_{ref} jsou počty provedených měření příslušného stanovení, \bar{x}_{NIR} a \bar{x}_{ref} jsou průměrné hodnoty pro stanovení pomocí NIR respektive referenční metody a s_{NIR} a s_{ref} jsou příslušné výběrové směrodatné odchylky těchto stanovení.

7 EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY

V rámci této práce bylo provedeno stanovení hodnot obsahu bílkovin, obsahu tuku a obsahu sušiny ve vzorcích bílých neochucených jogurtů a jogurtových mlék pomocí referenčních měření. Následně bylo provedeno měření NIR spekter daných vzorků, přičemž byla NIR spektra měřena ve dvou režimech – v režimu s integračním časem 7 x 12,5 ms a v režimu s integračním časem 8 x 12,5 ms. Hodnoty jednotlivých parametrů získaných pomocí připravených kalibračních modelů na základě NIR spekter byly vztaženy k hodnotám referenčním pro posouzení spolehlivosti vytvořeného kalibračního modelu.

Stanovené hodnoty titrační kyselosti a změřené hodnoty pH nebyly využity pro tvorbu kalibračního modelu vzhledem k úzkému rozmezí hodnot těchto parametrů pro jednotlivé vzorky. Tato stanovení tedy sloužila pouze pro charakterizaci chemických vlastností použitých vzorků jogurtů.

7.1 Referenční stanovení

Referenční stanovení přesného obsahu sušiny, obsahu tuku a obsahu bílkovin v jednotlivých vzorcích byly provedeny pomocí metod blíže popsanych v kapitole 6.3 a příslušných podkapitolách.

V tabulce č. 7.1 je uveden přehled stanovených obsahů bílkovin, tuku a sušiny ve vzorcích, které byly zakoupeny v tržní síti. Tyto hodnoty byly následně využity při tvorbě kalibračních modelů jako referenční hodnoty, ke kterým byly vztaženy hodnoty stanovené na základě změřených NIR spekter těchto výrobků.

Tabulka č. 7.1: Přehled obsahu bílkovin, tuku a sušiny ve vzorcích jogurtů z tržní sítě

Vzorek	Obsah bílkovin (%)	Obsah tuku (%)	Obsah sušiny (%)
A	10,83 ± 0,01	0,07 ± 0,01	14,62 ± 0,45
B	4,72 ± 0,17	3,92 ± 0,04	13,39 ± 0,18
C	4,24 ± 0,03	3,49 ± 0,12	13,84 ± 0,17
D	11,64 ± 0,08	0,21 ± 0,01	14,94 ± 0,28
E	9,55 ± 0,18	0,31 ± 0,05	15,15 ± 0,07
F	4,28 ± 0,10	1,70 ± 0,01	12,18 ± 0,03
G	4,77 ± 0,11	2,62 ± 0,03	13,17 ± 0,14
H	4,84 ± 0,04	3,07 ± 0,03	13,9 ± 0,28
I	5,48 ± 0,05	3,05 ± 0,10	13,63 ± 0,16
J	4,32 ± 0,08	2,85 ± 0,08	14,89 ± 0,03
K	4,14 ± 0,10	3,44 ± 0,12	13,27 ± 0,16
L	7,45 ± 0,08	4,85 ± 0,01	19,73 ± 0,20
M	3,77 ± 0,10	9,14 ± 0,47	18,61 ± 0,42
N	3,58 ± 0,03	10,34 ± 0,06	20,09 ± 0,51
O	3,53 ± 0,01	10,29 ± 0,04	18,57 ± 0,21

Porovnáním hodnot v tabulce č. 7.1 s hodnotami tuku a bílkovin deklarovaných jednotlivými výrobci přímo na obalech výrobků, které jsou uvedeny v tabulce č. 6.1 je patrné, že deklarované hodnoty obsahu tuku jsou poměrně v dobré shodě s hodnotami stanovenými pomocí referenčních metod. Největší rozdíl mezi deklarovanou a naměřenou hodnotou je u vzorku J a činí přibližně 0,5 %.

Hodnoty obsahu bílkovin již v tak dobré shodě s deklarovanými hodnotami nejsou u vzorků A, B a I činí rozdíl deklarované a stanovené hodnoty přibližně 1 %.

Obsah sušiny po přepočtení na tukuprostou sušinu ve všech případech odpovídá minimálním legislativním požadavkům na tento parametr uvedeným v kapitole 2.

Naměřené hodnoty obsahu bílkovin, tuku a sušiny pro vzorky vlastní výroby jsou uvedeny v tabulce č. 7.2. Tyto vzorky byly připraveny v širokém rozmezí tučnosti, tak aby byl změněnými vzorky pokryt celý předpokládaný rozsah kalibrace.

Tabulka č. 7.2: Přehled obsahu bílkovin, tuku a sušiny ve vzorcích jogurtů a jogurtových mlék vlastní výroby

Vzorek	Obsah bílkovin (%)	Obsah tuku (%)	Obsah sušiny (%)
1	3,48 ± 0,14	0,13 ± 0,01	9,43 ± 0,01
2	4,16 ± 0,12	0,75 ± 0,04	9,91 ± 0,06
3	3,45 ± 0,08	1,60 ± 0,03	10,92 ± 0,01
4	3,35 ± 0,07	2,24 ± 0,15	11,86 ± 0,12
5	3,41 ± 0,08	3,07 ± 0,07	12,75 ± 0,02
6	3,40 ± 0,01	4,45 ± 0,14	13,68 ± 0,09
7	3,30 ± 0,03	5,12 ± 0,08	14,60 ± 0,02
8	3,04 ± 0,14	5,97 ± 0,07	15,49 ± 0,05
9	3,22 ± 0,11	7,26 ± 0,10	16,43 ± 0,23
10	3,11 ± 0,05	8,37 ± 0,11	17,56 ± 0,31
11	2,99 ± 0,02	9,05 ± 0,29	18,31 ± 0,08

Hodnoty titrační kyselosti a hodnoty pH změřené pro jednotlivé vzorky jsou shrnuty v tabulce č. 7.3.

Tabulka č. 7.3: Přehled naměřených hodnot pH a titrační kyselosti (SH) ve vzorcích jogurtů a jogurtových mlék

Vzorek	pH	SH (°SH)	Vzorek	pH	SH (°SH)
A	4,41 ± 0,01	58,65 ± 0,07	1	4,22 ± 0,01	43,7 ± 0,14
B	4,56 ± 0,01	36,40 ± 0,01	2	4,20 ± 0,01	43,95 ± 0,07
C	4,46 ± 0,02	41,80 ± 0,01	3	4,20 ± 0,01	44,95 ± 0,07
D	4,41 ± 0,01	59,30 ± 0,14	4	4,27 ± 0,01	44,2 ± 0,14
E	4,55 ± 0,01	55,55 ± 0,21	5	4,23 ± 0,01	43,65 ± 0,07
F	4,70 ± 0,01	38,75 ± 0,35	6	4,24 ± 0,01	41,8 ± 0,01
G	4,65 ± 0,01	38,00 ± 0,42	7	4,26 ± 0,01	41,4 ± 0,01
H	4,37 ± 0,02	46,15 ± 0,07	8	4,24 ± 0,01	40,3 ± 0,01

Vzorek	pH	SH (°SH)	Vzorek	pH	SH (°SH)
I	4,33 ± 0,01	41,73 ± 1,71	9	4,23 ± 0,01	40,20 ± 0,01
J	4,64 ± 0,02	39,9 ± 1,20	10	4,21 ± 0,01	38,70 ± 0,28
K	4,57 ± 0,01	33,9 ± 0,14	11	4,24 ± 0,01	36,15 ± 0,07
L	4,55 ± 0,01	48,25 ± 1,06			
M	4,29 ± 0,01	34,75 ± 0,49			
N	4,28 ± 0,01	35,15 ± 0,21			
O	4,30 ± 0,01	32,55 ± 0,35			

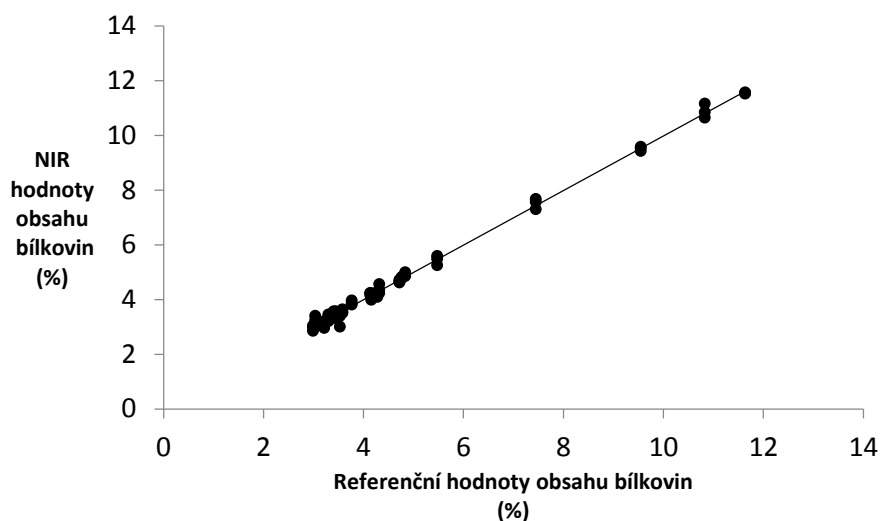
Jak již bylo zmíněno na začátku této kapitoly hodnoty pH a SH nebyly využity pro tvorbu kalibračního modelu. Hodnoty by bylo možné pro přípravu kalibračního modelu použít při zajištění širšího rozmezí hodnot těchto veličin, bohužel z časových důvodů vlivem poruchy měřicího přístroje nebylo možné tato měření realizovat v rámci této práce.

7.2 Kalibrační modely v módu s integračním časem 7x 12,5 ms

V rámci práce byly na základě změřených NIR spekter jednotlivých vzorků a jejich chemometrického zpracování vytvořeny kalibrační modely pro obsah tuku, sušiny a bílkovin. V této kapitole jsou uvedeny získané kalibračních modely pro jednotlivé veličiny založené na měřícím módu s integračním časem 7 x 12,5 ms.

7.2.1 Kalibrační model obsahu bílkovin

Kalibrační model obsahu bílkovin byl připraven na základě celkem 102 měření spekter vzorků jogurtů a jogurtových mlék z tržní sítě a vlastní výroby. Přičemž celkem 78 spektrálních měření bylo využito pro zhotovení vlastního kalibračního modelu a 24 měření bylo použito pro následnou validaci tohoto modelu. Získaná korelace mezi obsahem bílkovin stanoveným pomocí kalibračního modelu a hodnotami stanovenými referenčním měřením je uvedena v grafu 7.1. Získané parametry této závislosti jsou uvedeny v tabulce č. 7.4, počet PLS faktorů byl stanoven pomocí funkce PRESS.



Graf 7.1: Kalibrační křivka stanovení obsahu bílkovin u vzorků jogurtů

Graf korelace mezi obsahem bílkovin stanoveným pomocí NIR a obsahem stanoveným referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu vlastní kalibrační přímky je uveden v příloze P 1.

Většina hodnot obsahu bílkovin se pohybuje přibližně v rozmezí od 3 do 6 %. Toto je způsobeno tím, že převážná část vzorků z tržní sítě se pohybovala právě v tomto rozsahu hodnot obsahu bílkovin a připravené vzorky byly standardizovány na obsah tuku, nikoliv na obsah bílkovin.

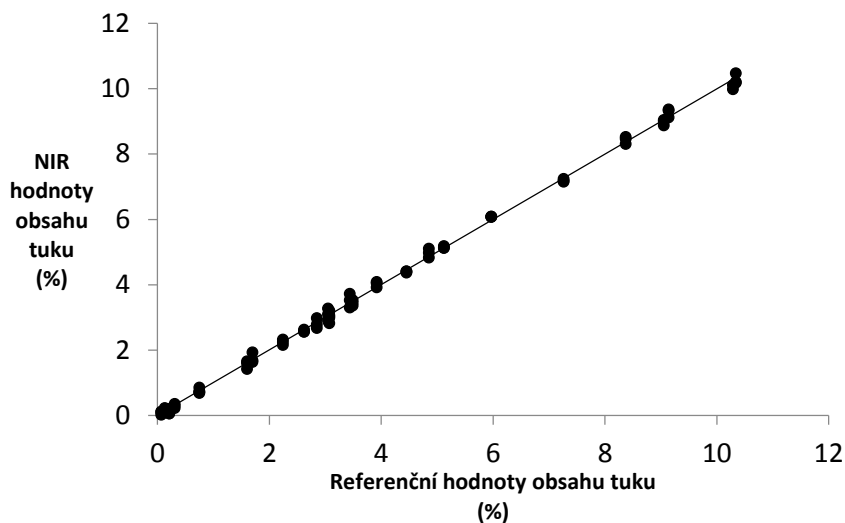
Tabulka č. 7.4: Parametry kalibračního modelu bílkovin (integrační čas 7 x 12,5 ms)

Rovnice kalibrační přímky	R ²	RMSEC (%)	RMSEV (%)	Počet PLS faktorů
$y = 0,9971x + 0,0144$	0,9969	0,1298	0,2317	12

7.2.2 Kalibrační model obsahu tuku

Pro přípravu kalibračního modelu bylo použito 102 naměřených spekter vzorků jogurtů a jogurtových mlék, z čehož 78 spekter bylo použito pro kalibraci a 24 spekter pro validaci.

Korelace mezi obsahem tuku stanoveným pomocí kalibračního modelu NIR a obsahem tuku stanoveným pomocí referenční metody je uvedena v grafu 7.2.



Graf 7.2: Kalibrační křivka stanovení obsahu tuku u vzorků jogurtů

Kalibrační model obsahu tuku byl stanoven v širokém rozmezí tučnosti, data jsou v porovnání s kalibrační závislostí bílkovin rovnoměrněji rozložena podél kalibrační přímky díky přípravě vzorků vlastní výroby, jež byly připraveny v jednocentním kroku v rozmezí tučnosti 1 – 10 %.

Získané charakteristiky kalibračního modelu a počet PLS faktorů jsou uvedeny v tabulce č. 7.5. Graf korelace mezi obsahem tuku stanoveným pomocí NIR a obsahem stanoveným referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu vlastní kalibrační přímky je uveden v příloze P 2.

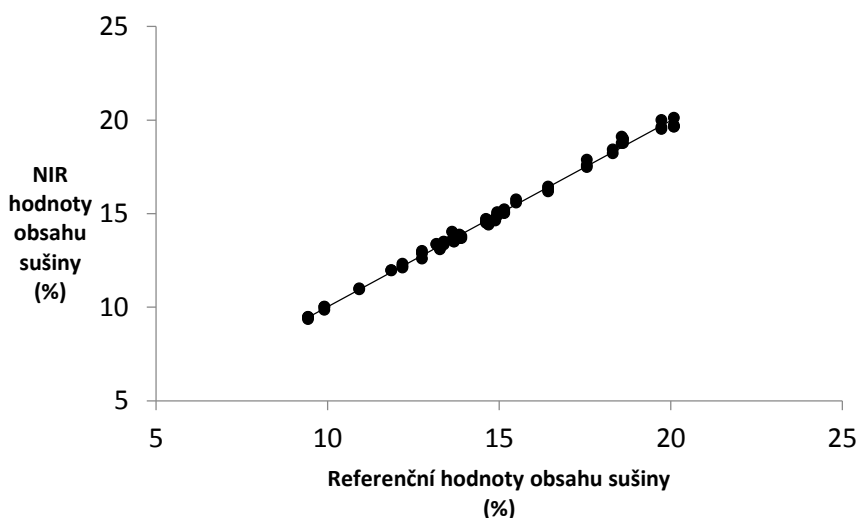
Tabulka č. 7.5: Parametry kalibračního modelu tuku (integrační čas 7 x 12,5 ms)

Rovnice kalibrační přímky	R ²	RMSEC (%)	RMSEV (%)	Počet PLS faktorů
$y = 0,9985x + 0,0065$	0,9985	0,1175	0,3128	12

7.2.3 Kalibrační model obsahu sušiny

Kalibrační model obsahu sušiny byl vytvořen s využitím 70 naměřených spekter, přičemž 32 spekter bylo využito pro validaci tohoto modelu.

Korelace mezi obsahem sušiny stanoveným pomocí NIR a obsahem stanoveným referenční metodou je uvedena v grafu 7.3.



Graf 7.3: Kalibrační křivka stanovení obsahu sušiny u vzorků jogurtů

Jak je zřejmé z grafu 7.3, vzorky použité pro sestavení kalibračního modelu byly rovnoměrně rozdělovány v rozsahu obsahu sušiny od přibližně 9 do 20 %. Získané charakteristiky kalibračního modelu a počet PLS faktorů jsou uvedeny v tabulce č. 7.6. Graf korelace mezi obsahem sušiny stanoveným pomocí NIR a obsahem sušiny stanoveným referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu vlastní kalibrační přímky je uveden v příloze P 3.

Tabulka č. 7.6: Parametry kalibračního modelu sušiny (integrační čas 7 x 12,5 ms)

Rovnice kalibrační přímky	R ²	RMSEC (%)	RMSEV (%)	Počet PLS faktorů
$y = 0,9954x + 0,0682$	0,9956	0,1909	0,3039	13

7.3 Kalibrační modely v módu s integračním časem 8 x 12,5 ms

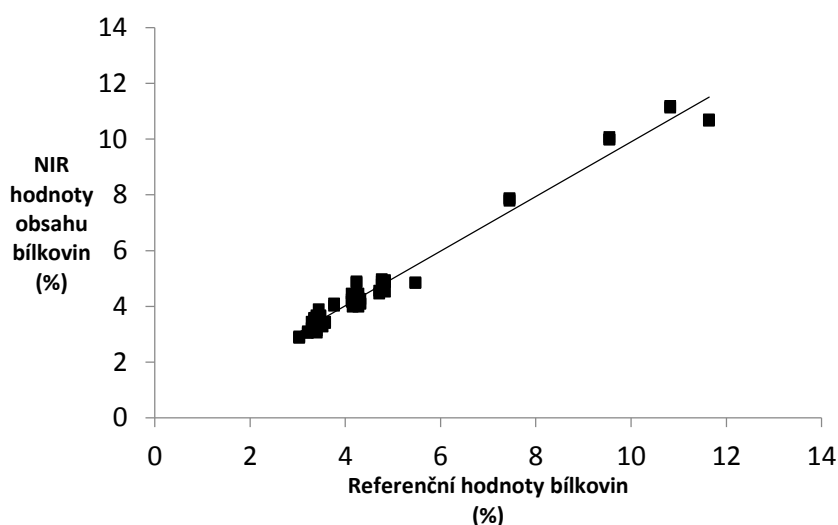
V této kapitole jsou uvedeny výsledné kalibrační modely pro parametry obsah bílkovin, obsah tuku a obsah sušiny získané v režimu měření s integračním časem 8 x 12,5 ms.

Počet spektrálních záznamů použitých pro zhotovení příslušných kalibračních modelů byl v tomto módu ponížěn o spektra připadající vzorkům vlastní výroby 10 a 11, která se

v tomto režimu měření dostala již na hranici maximální citlivosti přístroje. Proto tato spektra nebyla v následujících kalibračních modelech brána v potaz.

7.3.1 Kalibrační model obsahu bílkovin

Pro zhotovení kalibračního modelu bylo použito celkem 94 změřených spekter, z čehož celkem 63 spekter bylo použito pro vlastní kalibraci a 31 spekter pro následnou validaci. Získaná korelace mezi hodnotami stanovenými NIR a referenční metodou je uvedena v grafu 7.4.



Graf 7.4: Kalibrační křivka stanovení obsahu bílkovin u vzorků jogurtů

Kalibrační hodnoty jsou nahromaděny přibližně v rozmezí obsahu bílkovin 3 - 6 %, důvody jsou shodné jako již uvedené u kalibračního modelu bílkovin v módu měření s integračním časem 7 x 12,5 ms.

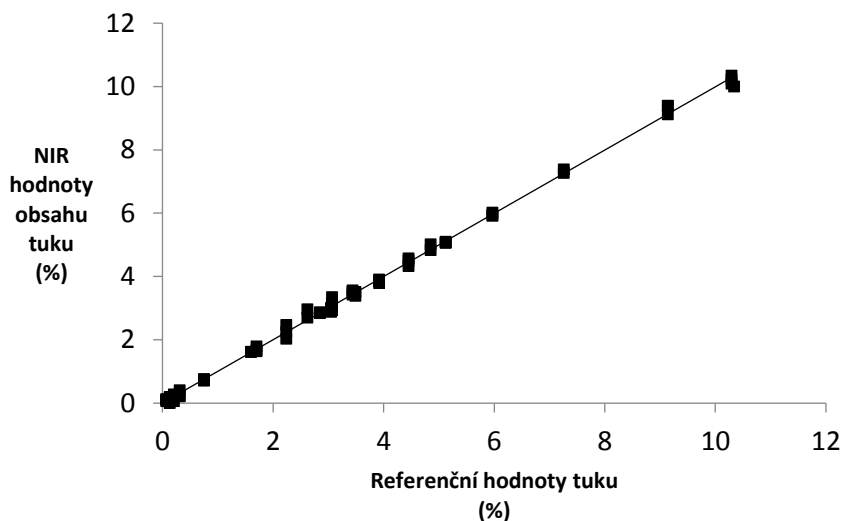
Charakteristiky tohoto kalibračního modelu a počet PLS faktorů jsou uvedeny v tabulce č. 7.7. Graf korelace mezi obsahem bílkovin stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu vlastní kalibrační přímky je uveden v příloze P 4.

Tabulka č. 7.7: Parametry kalibračního modelu bílkovin (integrační čas 8 x 12,5 ms)

Rovnice kalibrační přímky	R ²	RMSEC (%)	RMSEV (%)	Počet PLS faktorů
$y = 0,9793x + 0,1018$	0,9793	0,3455	0,3713	8

7.3.2 Kalibrační model obsahu tuku

Kalibrační model obsahu tuku byl zhotoven na základě 94 spekter, z čehož celkem 64 spekter bylo použito pro vlastní kalibraci a 30 spekter pro následnou validaci. Získaná korelace mezi hodnotami stanovenými pomocí NIR a referenčním měřením je uvedena v grafu 7.5.



Graf 7.5: Kalibrační křivka stanovení obsahu tuku u vzorků jogurtů

Charakteristiky kalibračního modelu tuků s počtem PLS faktorů jsou uvedeny v tabulce č. 7.8. Získané charakteristiky jsou velmi blízké charakteristikám modelu získaného v módu měření s integračním časem 7x 12,5 ms.

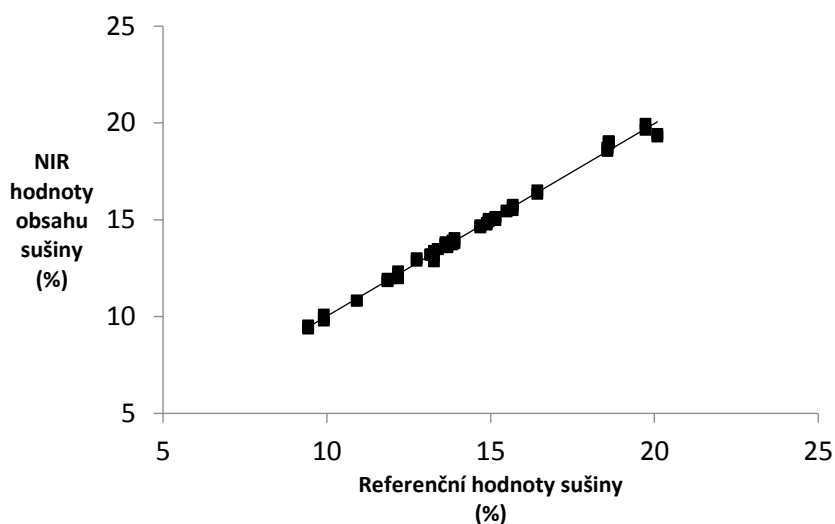
Graf korelace mezi obsahem tuku stanoveným pomocí NIR a obsahem tuku stanoveným pomocí referenční metody pro vzorky nepoužité pro tvorbu vlastního kalibračního modelu je uveden v příloze P 5.

Tabulka č. 7.8: Parametry kalibračního modelu tuku (integrační čas 8 x 12,5 ms)

Rovnice kalibrační přímky	R ²	RMSEC (%)	RMSEV (%)	Počet PLS faktorů
$y = 0,9984x + 0,0059$	0,9982	0,1188	0,2514	14

7.3.3 Kalibrační model obsahu sušiny

Pro zhotovení kalibračního modelu sušiny bylo použito 94 zaznamenaných spekter, z čehož celkem 63 spekter bylo použito pro vlastní kalibraci a 31 spekter pro validaci kalibračního modelu. Získaná korelace mezi hodnotami stanovenými pomocí NIR a pomocí referenční metody je uvedena v grafu 7.6.



Graf 7.6: Kalibrační křivka stanovení obsahu sušiny u vzorků jogurtů

Charakteristiky kalibračního modelu tuků s počtem PLS faktorů jsou uvedeny v tabulce č. 7.9. Získané charakteristiky jsou velmi blízké charakteristikám modelu získaného v módu měření s integračním časem $7 \times 12,5$ ms.

Graf korelace mezi obsahem sušiny stanoveným pomocí NIR a obsahem sušiny stanoveným pomocí referenční metody pro vzorky nepoužité pro tvorbu vlastního kalibračního modelu je uveden v příloze P 6.

Tabulka č. 7.9: Parametry kalibračního modelu sušiny (integrační čas $8 \times 12,5$ ms)

Rovnice kalibrační přímky	R^2	RMSEC (%)	RMSEV (%)	Počet PLS faktorů
$y = 0,9947x + 0,0760$	0,9947	0,1969	0,2495	12

8 DISKUZE A VYHODNOCENÍ

Infračervená spektrometrie a obzvláště infračervené spektrometrie v blízké oblasti spektra je velmi perspektivní metoda, která nachází uplatnění v řadě oblastí, přičemž oblast potravinářského průmyslu v tomto ohledu není výjimkou. Jak bylo blíže popsáno v kapitole 4.3, využití NIR spektrometrie bylo zkoumáno v celé řadě potravinářských aplikací včetně mlékárenského průmyslu. Byly publikovány články zabývající se stanovením tuku, bílkovin a laktózy v sýrech, mléce a syrovátce. Celá řada publikovaných prací byla zaměřena na stanovení různých parametrů v mléce, doposud však nebylo ve větším rozsahu zkoumáno využití NIR spektrometrie v souvislosti s kysanými mléčnými výrobky, na které byla zaměřena tato práce.

V rámci této práce byly vytvořeny kalibrační modely pro stanovení obsahu tuku, sušiny a bílkovin v jogurtech a jogurtovém mléce. Dosažené statistické ukazatele vytvořených kalibračních modelů pro stanovení zmíněných třech parametrů jsou uvedeny v tabulce č. 8.1.

Tabulka č. 8.1 : Statistické ukazatele kalibračních modelů

Parametr	Integrační čas	R ²	RMSEC (%)	RMSEV (%)	Počet PLS faktorů
Bílkoviny	7 x 12,5 ms	0,9969	0,1298	0,2317	12
	8 x 12,5 ms	0,9793	0,3455	0,3713	8
Tuk	7 x 12,5 ms	0,9985	0,1175	0,3128	12
	8 x 12,5 ms	0,9982	0,1188	0,2514	14
Sušina	7 x 12,5 ms	0,9956	0,1909	0,3039	13
	8 x 12,5 ms	0,9947	0,1969	0,2495	12

Na základě uvedených statistických ukazatelů lze konstatovat, že byly ve všech případech získány velmi spolehlivé kalibrační modely pro stanovované parametry. Toto bylo dále potvrzeno pomocí otestování rozdílnosti středních hodnot, v tomto případě průměrů, obsahu bílkovin, tuku a sušiny stanovených pomocí referenční metody a pomocí NIR, přičemž nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi těmito hodnotami.

V obou zvolených integračních časech bylo dosaženo velmi dobré míry shody výsledků s hodnotami stanovenými pomocí referenčních metod. Významněji odlišný koeficient de-

terminace a střední kvadratická chyba kalibrace je pouze u kalibračního modelu pro bílkoviny, v tomto případě se ukazuje jako vhodnější model s integračním časem 7 x 12,5 ms.

Nicméně je nutné brát v potaz fakt kdy – jak již bylo zmíněno v kapitole 7.3 – s využitím integračního času 8 x 12,5 ms se již s vyššími hodnotami obsahu tuku v jednotlivých vzorcích, přibližně od hodnot 9 – 10 % a výše dostáváme již na hranici, kdy může docházet k zahlcení detektoru a metoda ztrácí svůj lineární dynamický rozsah. Z tohoto důvodu se jako vhodnější jeví kalibrační modely založené na integračním času 7 x 12,5 ms.

V oblasti mléka a mléčných výrobků byla NIR spektrometrie použita pro stanovení obsahu tuku v mléce, v této oblasti bylo publikováno vícero prací za využití různých metod měření, přičemž bylo dosaženo v průměru velmi dobrých výsledků. Při stanovení tuku v homogenizovaném mléce v módu reflektance bylo dosaženo kalibračního modelu s koeficientem determinace 0,997 se střední kvadratickou chybou kalibrace 0,05 %, v transmisním módu bylo dosaženo hodnot koeficientu determinace od 0,95 do 0,999 [66]. Laporte a Paquin dosáhli velmi dobrých výsledků i při stanovení bílkovin v kravském mléce kdy v nehomogenizovaném mléce byl koeficient determinace 0,98 v homogenizovaném pak 0,99 [67].

Melfsen et al. vytvořil kalibrační model pro stanovení tuku v syrovém mléce, přičemž parametry kalibrace byly $R^2 = 0,99$ a RMSEC = 0,16 – 0,20 % [57]. Při stanovení obsahu mastných kyselin v kozím mléce Núñez-Sánchez et al. dosáhl nejlepšího výsledku pro stanovení obsahu mastných kyselin s $R^2 = 0,78$ [60].

Použití metody NIR spektrometrie pro stanovení obsahu tuku v sýrech bylo rovněž zkoumáno v několika pracích, přičemž byl využíván mód reflektance. Dosažené výsledky se pohybovaly v rozmezí od $R^2 = 0,94$ po 0,99, přičemž RMSEC se pohybovalo v rozmezí 0,393 - 0,60 % [66].

Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.3, v kysaných mléčných výrobcích bylo zkoumáno využití NIR spektrometrie pro stanovení celkového obsahu rozpustných látek a hodnoty pH. Korelační koeficient kalibrace pro celkový obsah rozpustných látek byl 0,9427 a pro pH 0,9208 [62]. He at al. při stanovení pH obdobnou metodou dosáhl korelačního koeficientu 0,890 [63]. Shao et al. v další práci rovněž zkoumal využití NIR pro stanovení kyselosti a obsahu cukru v jogurtech, kdy dosáhl s využitím metody PLS korelačního koeficientu 0,91 pro obsah cukru a 0,90 pro kyselost jogurtů [64].

Porovnáním dosažených výsledků s výše uvedenými hodnotami publikovanými jinými autory pro stanovení stejných i odlišných parametrů je patrné, že byly v rámci práce navzdory poměrně nízkému počtu kalibračních vzorků sestrojeny velmi kvalitní kalibrační modely pro stanovení obsahu tuku, bílkovin i sušiny.

Získané hodnoty koeficientu determinace, směrnice kalibračních přímk a stejně tak i poměrně nízké a vzájemně blízké hodnoty středních kvadratických chyb kalibrace a validace ukazují na velmi dobrou spolehlivost vytvořených kalibračních modelů. Které jsou v tomto ohledu zcela srovnatelné s hodnotami publikovanými jinými autory.

9 ZÁVĚR

V rámci práce byla vytvořena databáze NIR spekter vzorků kysaných mléčných výrobků z tržní sítě a vlastní výroby. Na základě těchto spekter a provedených chemických rozborů těchto vzorků byly sestrojeny kalibrační modely pro obsah tuku, bílkovin a sušiny.

Původně zamýšlené sestrojení kalibračních modelů i pro hodnotu pH a titrační kyselost nebyly sestrojeny z důvodu nedostatečné variability dat v jednotlivých vzorcích. Plánovanou přípravu vzorků o různé kyselosti a změření jejich NIR spekter, tak aby bylo dosaženo širšího rozmezí hodnot v těchto parametrech nebylo možné zrealizovat z důvodu poruchy měřicího přístroje.

Získané kalibrační modely je možné dále rozšiřovat pomocí rozšiřování škály použitých vzorků, především přípravou vzorků se standardizovaným obsahem bílkovin, tak aby byla jejich distribuce v kalibračním modelu rovnoměrněji rozprostřena.

Sestrojené kalibrační modely nicméně navzdory nižšímu počtu vzorků vykazují, především v módu měření 7 x 12,5 ms, velmi dobrou spolehlivost, která by mohla být využita i praxi, kde by se mohly uplatnit výhody infračervené spektrometrie. Která umožňuje stanovení několika analytů v rámci jednoho měření, je nedestruktivní, a především velmi rychlou metodou – záznam spektra vyžaduje pouze 30 sekund – což vyniká zvláště v porovnání s konvenčními metodami stanovení tuku, bílkovin a sušiny.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HEISE, H., H. SIESLER, ed. a Y. OZAKI, ed., S. KAWATA, ed. *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*. 1. Weinheim (Německo): WILEY-VCH Verlag GmbH, 2002. ISBN 3-527-30149-6.
- [2] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [3] NĚMCOVÁ, I., P. RYCHLOVSKÝ a L. ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0776-X.
- [4] ATKINS, P. a J. DE PAULA. *Atkins' Physical chemistry*. 8th ed. New York: Oxford University Press, 2006. ISBN 01-987-0072-5.
- [5] JENSEN, P. An introduction to the theory of local mode vibrations. *Molecular Physics* [online]. 2000, **98**(17), 1253-1285 [cit. 2019-04-28]. ISSN 0026-8976. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/002689700413532>
- [6] *Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013 ze dne 17. prosince 2013, kterým se stanoví společná organizace trhů se zemědělskými produkty a zrušují nařízení Rady (EHS) č. 922/72, (EHS) č. 234/79, (ES) č. 1037/2001 a (ES) č. 1234/2007.* Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R1308&from=CS>
- [7] *Vyhláška č. 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.* Dostupné také z: <https://zakonyprolidi.cz/cs/2016-397>
- [8] CORRIEU, G., ed. a C. BÉAL, ed. *Yogurt: The Products and its Manufacture*. CABALLERO, B, P FINGLAS a F TOLDRÁ. *The Encyclopedia of Food and Health*. 5th Edition. Oxford: Academic Press, 2016, s. 617-624. ISBN 9780123849533.
- [9] TAMINE, A., M. HICKEY a D. MUIR. Strained fermented milks—A review of existing legislative provisions, survey of nutritional labelling of commercial products in selected markets and terminology of products in some selected countries. *International Journal of Dairy Technology*. 2014, **67**(3), 305-333.

- [10] JANŠTOVÁ, B., L. VORLOVÁ, P. NAVRÁTILOVÁ, M. KRÁLOVÁ, L. NECIDOVÁ a E. MAŘICOVÁ. *TECHNOLOGIE MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ*. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-637-7.
- [11] BÉAL, C., ed. a S. HELINCK, ed. Yogurt and Other Fermented Milks. RAY, Ramesh a Didier MONTET. *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods*. 1 st. Boca Raton: CRC Press, 2014, s. 141-188. ISBN 9781482223088.
- [12] MARTIN, F., N. CAYOT, C. VERGOIGNAN, L. VERGOIGNAN, P. GERVAIS a R. CACHON. Impact of oxidoreduction potential and of gas bubbling on rheological properties of non-fat yoghurt. *Food Research International*. 2010, **43**(1), 218-223. ISSN 09639969.
- [13] PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2003, **14**(2), 198-219. ISSN 0103-5053.
- [14] FT-IR vs. Dispersive Infrared: Theory of Infrared Spectroscopy Instrumentation. In: [Http://www.thermo.com.cn/](http://www.thermo.com.cn/) [online]. b.r. [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: http://www.thermo.com.cn/Resources/200802/productPDF_21615.pdf
- [15] POREP, J., D. KAMMERER a R. CARLE. On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2015, **46**(2), 211-230 [cit. 2019-04-28]. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415002174>
- [16] CIURCZAK, E., ed. Chapter 6 Near-infrared spectroscopy. In: AHUJA, S. a N. JESPERSEN,. *Comprehensive Analytical Chemistry* [online]. 47. Amsterdam: Elsevier, 2006, **47**, s. 157-176 [cit. 2019-04-28]. *Comprehensive Analytical Chemistry*. ISBN 9780444522597. ISSN 0166-526X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166526X06470069>
- [17] OPEKAR, F., I. JELÍNEK, P. RYCHLOVSKÝ a Z. PLZÁK. *Základní analytická chemie*. 1. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8.

- [18] CHIA, K. a Y. TAN. Design and Development of a Shortwave near Infrared Spectroscopy using NIR LEDs and Regression Model. *International Journal of Electrical and Computer Engineering (IJECE)*. 2017, 7(6), 3070-3075. ISSN 2088-8708. Dostupné také z: <http://www.iaescore.com/journals/index.php/IJECE/article/view/8676>
- [19] Introduction to Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: [Http://www.nicoletcz.cz](http://www.nicoletcz.cz) [online]. Madison, USA: Thermo Electron Scientific Instruments LLC, 2005 [cit. 2019-03-10]. Dostupné z: Thermo Electron Corporation
- [20] *Advantages of Fourier-Transform Near-Infrared Spectroscopy* [online]. In: www.nicoletcz.cz. 2006 [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: http://www.nicoletcz.cz/upload/kc/files/nir_spektrometry/FourierTransformNIR.pdf
- [21] KHOSHHEBAB, Z. Reflectance IR Spectroscopy. THEOPHILE, Theophanides. *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology* [online]. 1. Rijeka: InTech, 2012, s. 233 - 244 [cit. 2019-03-16]. ISBN 978-953-51-0537-4.
- [22] MCMURRY, J. *Organic chemistry*. Ninth edition. Boston, MA, USA: Cengage Learning, 2016. ISBN 978-1305080485.
- [23] Vícerozměrná kalibrace. In: [Https://meloun.upce.cz/](https://meloun.upce.cz/) [online]. b.r. [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: <https://meloun.upce.cz/docs/research/chemometrics/methodology/4imetody.pdf>
- [24] MILITKÝ, J. a M. MELOUN. *Metoda hlavních komponent a exploratorní analýza vícerozměrných dat: Sborník přednášek z konference - Zajištění kvality analytických výsledků* [online]. Český Těšín: 2 THETA, 2003 [cit. 2019-04-28]. Analytical standards and equipment. ISBN 80-863-8014-9. Dostupné z: <https://meloun.upce.cz/docs/publication/140.pdf>
- [25] HAALAND, D. a E. THOMAS. Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Analytical Chemistry*. 2002, 60(11), 1193-1202. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00162a020>
- [26] ČURDA, L., O. KUKAČKOVÁ a M. NOVOTNÁ. NIR spektroskopie a její využití

- při analýze mléka a mléčných výrobků. *Chemické Listy*. 2002, (96), 305-310.
- [27] DAVIES, A. a A. GRANT. Review: Near infra- red analysis of food. *International Journal of Food Science and Technology*. 1987, **22**(3), 191-207.
- [28] TAJAMMAL MUNIR, M., W. YU, B. YOUNG a D. WILSON. *The current status of process analytical technologies in the dairy industry*. 2015, **43**(2), 205-218. ISSN 09242244. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415000527>
- [29] HUANG, H., H. YU, H. XU a Y. YING. Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering*. 2008, **87**(3), 303-313. ISSN 02608774. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877408000071>
- [30] CLARK, C.J., V.A. MCGLONE a R.B. JORDAN. Detection of Brownheart in 'Braeburn' apple by transmission NIR spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*. 2003, **28**(1), 87-96. ISSN 09255214. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925521402001229>
- [31] SHENDEREY, C., I. SHMULEVICH, V. ALCHANATIS et al. NIRS Detection of Moldy Core in Apples. *Food and Bioprocess Technology*. 2010, **3**(1), 79-86. ISSN 1935-5130. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-009-0256-1>
- [32] GOLIC, M. a K.B. WALSH. Robustness of calibration models based on near infrared spectroscopy for the in-line grading of stonefruit for total soluble solids content. *Analytica Chimica Acta*. 2006, **555**(2), 286-291. ISSN 00032670. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267005015485>
- [33] PRIETO, N., R. ROEHE, P. LAVÍN, G. BATTEN a S. ANDRÉS. Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*. 2009, **83**(2), 175-186. ISSN 03091740. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174009001235>
- [34] SAVENIJE, B., G.H. GEESINK, J.G.P. VAN DER PALEN a G. HEMKE. Prediction of pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science*. 2006, **73**(1), 181-184. ISSN 03091740. Dostupné také z:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174005004018>
- [35] MLČEK, J. a J. SIMEONOVÁ. Application of FT NIR spectroscopy in the determination of basic chemical composition of pork and beef. *Czech Journal of Animal Science*. 2006, **51**(8), 361-368.
- [36] PREVOLNIK, M., M. ČANDEK-POTOKAR, D. ŠKORJANC, Š. VELIKONJA-BOLTA, M. ŠKRLEP, T. ŽNIDARŠIČ a D. BABNIK. Predicting Intramuscular Fat Content in Pork and Beef by near Infrared Spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 2017, **13**(2), 77-85. ISSN 0967-0335. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1255/jnirs.460>
- [37] WINDHAM, W., K. LAWRENCE a P. FELDNER. Prediction of Fat Content in Poultry Meat by Near-Infrared Transmission Analysis1. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2003, **12**(1), 69-73. ISSN 1056-6171. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/japr/article-lookup/doi/10.1093/japr/12.1.69>
- [38] BERZAGHI, P., A. DALLE ZOTTE, L. JANSSON a I. ANDRIGHETTO. Near-infrared reflectance spectroscopy as a method to predict chemical composition of breast meat and discriminate between different n-3 feeding sources. *Poultry Science*. 2005, **84**(1), 128-136. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ps/article-lookup/doi/10.1093/ps/84.1.128>
- [39] GEESINK, G.H, F.H SCHREUTELKAMP, R FRANKHUIZEN, H.W VEDDER, N.M FABER, R.W KRANEN a M.A GERRITZEN. Prediction of pork quality attributes from near infrared reflectance spectra. *Meat Science*. 2003, **65**(1), 661-668. ISSN 03091740. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174002002693>
- [40] GARCÍA-REY, R.M., J. GARCÍA-OLMO, E. DE PEDRO, R. QUILES-ZAFRA a M.D. LUQUE DE CASTRO. Prediction of texture and colour of dry-cured ham by visible and near infrared spectroscopy using a fiber optic probe. *Meat Science*. 2005, **70**(2), 357-363. ISSN 03091740. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174005000744>
- [41] MEULLENET, J., E. JONVILLE, D. GREZES a C. OWENS. Predictio of the texture of cooked poultry pectoralis major muscles by near-infrared reflectance analysis of

- raw meat. *Journal of Texture Studies*. 2004, **35**(6), 573-585. ISSN 00224901. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1538-7836.2004.01165.x-i1>
- [42] LIU, Y., B. LYON, W. WINDHAM, C. LYON a E. SAVAGE. Prediction of physical, color, and sensory characteristics of broiler breasts by visible/near infrared reflectance spectroscopy. *Poultry Science*. 2004, **83**(8), 1467-1474. ISSN 0032-5791. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/ps/article-lookup/doi/10.1093/ps/83.8.1467>
- [43] WU, D. a D. SUN. Application of visible and near infrared hyperspectral imaging for non-invasively measuring distribution of water-holding capacity in salmon flesh. *Talanta*. 2013, **116**, 266-276. ISSN 00399140. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914013004530>
- [44] ELMASRY, G., D. SUN a P. ALLEN. Non-destructive determination of water-holding capacity in fresh beef by using NIR hyperspectral imaging. *Food Research International*. 2011, **44**(9), 2624-2633. ISSN 09639969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911002870>
- [45] TALENS, P., L. MORA, N. MORSY, D. BARBIN, G. ELMASRY a D. SUN. Prediction of water and protein contents and quality classification of Spanish cooked ham using NIR hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering*. 2013, **117**(3), 272-280. ISSN 02608774. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877413001271>
- [46] QINGYUN, L., C. YEMING, M. TAKASHI a K. MOTONOBU. Adaptability of four-samples sensory tests and prediction of visual and near-infrared reflectance spectroscopy for Chinese indica rice. *Journal of Food Engineering*. 2007, **79**(4).
- [47] COCCHI, M., C. DURANTE, G. FOCA, A. MARCHETTI, L. TASSI a A. ULRICI. Durum wheat adulteration detection by NIR spectroscopy multivariate calibration. *Talanta*. 2006, **68**(5), 1505-1511.
- [48] CHEN, D., J. HUANG a T. JACKSON. Vegetation water content estimation for corn and soybeans using spectral indices derived from MODIS near- and short-wave infrared bands. *Remote Sensing of Environment*. 2005, **98**(2-3), 225-236.
- [49] CARLOMAGNO, G., L. CAPOZZO, G. ATTOLICO a A. DISTANTE. Non-

- destructive grading of peaches by near-infrared spectrometry. *Infrared Physics & Technology*. 2004, **46**(1-2), 23-29.
- [50] SIRISOMBOON, P., M. TANAKA, S. FUJITA a T. KOJIMA. Evaluation of pectin constituents of Japanese pear by near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*. 2007, **78**(2), 701-707.
- [51] LAMMERTYN, J., B. NICOLAI, K. OOMS, V. DE SMEDT a J. DE BAERDEMAEKER. Non-destructive measurement of acidity, soluble solids, and firmness of jongold apples using NIR-spectroscopy. *Transactions of the ASAE*. 1998, **41**(4), 1089-1094.
- [52] SORENSEN, L. a R. JEPSEN. Assessment of sensory properties of cheese by near-infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*. 1998, **8**(10-11), 863-871.
- [53] SASIC, S. a Y. OZAKI. Short-wave near-infrared spectroscopy of biological fluids. I 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.
- [54] NORGAARD, L., M. HAHN, L. KNUDSEN, I. FARHATC a S. ENGELSEN. Multivariate near-infrared and Raman spectroscopic quantifications of the crystallinity of lactose in whey permeate powder. *International Dairy Journal*. 2005, **15**(12), 1261-1270.
- [55] FAGAN, C., M. CASTILLO, D. O'CALLAGHAN, F. PAYNE a C. O'DONNELL. Visible-near infrared spectroscopy sensor for predicting curd and whey composition during cheese processing. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*. 2009, **3**(1), 62-69. ISSN 1932-7587. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11694-009-9073-5>
- [56] KAWASAKI, M., S. KAWAMURA, M. TSUKAHARA, S. MORITA, M. KOMIYA a M. NATSUGA. Near-infrared spectroscopic sensing system for on-line milk quality assessment in a milking robot. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2008, **63**(1), 22-27. ISSN 01681699. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168169908000100>
- [57] MELFSEN, A., E. HARTUNG a A. HAEUSSERMANN. Robustness of near-infrared

- calibration models for the prediction of milk constituents during the milking process. *Journal of Dairy Research*. 2013, **80**(01), 103-112. ISSN 0022-0299. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0022029912000672
- [58] BRENNAN, D., J. ALDERMAN, L. SATTLER, B. O'CONNOR a C. O'MATHUNA. Issues in development of NIR micro spectrometer system for on-line process monitoring of milk product. *Measurement*. 2003, **33**(1), 67-74. ISSN 02632241. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263224102000192>
- [59] HOLROYD, S., B. PRESCOTT a A. MCLEAN. The Use of in- and on-line near Infrared Spectroscopy for Milk Powder Measurement. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 2013, **21**(5), 441-443. ISSN 0967-0335. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1255/jnirs.1073>
- [60] NÚÑEZ-SÁNCHEZ, N., A.L. MARTÍNEZ-MARÍN, O. POLVILLO, V.M. FERNÁNDEZ-CABANÁS, J. CARRIZOSA, B. URRUTIA a J.M. SERRADILLA. Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for the determination of the milk fat fatty acid profile of goats. *Food Chemistry*. 2016, **190**, 244-252. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615008183>
- [61] PĂUCEAN, A., D.C. VODNAR, V. MUREȘAN, F. FETEA, F. RANGA, S.M. MAN, S. MUSTE a C. SOCACIU. Monitoring lactic acid concentrations by infrared spectroscopy: A new developed method for Lactobacillus fermenting media with potential food applications. *Acta Alimentaria*. 2017, **46**(4), 420-427. ISSN 0139-3006. Dostupné také z: <http://www.akademai.com/doi/abs/10.1556/066.2017.0003>
- [62] SHAO, Y. a Y. HE. Measurement of Soluble Solids Content and pH of Yogurt Using Visible/Near Infrared Spectroscopy and Chemometrics. *Food and Bioprocess Technology*. 2009, **2**(2), 229-233. ISSN 1935-5130. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11947-008-0180-9>
- [63] HE, Y., K. XU, Q. LUO et al. Study of Vis/NIR spectroscopy measurement on acidity of yogurt. *FOURTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON PHOTONICS AND IMAGING IN BIOLOGY AND MEDICINE*. 2006, **6047**(12), 604722. Dostupné také z: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.710919>

- [64] SHAO, Y., Y. HE a S. FENG. Measurement of yogurt internal quality through using Vis/NIR spectroscopy. *Food Research International*. 2007, **40**(7), 835-841. ISSN 09639969. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996907000294>
- [65] *Milk and milk products - Determination of nitrogen content: Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation*. 2. Ženeva, Švýcarsko: ISO copyright office, 2014.
- [66] TAO, F. a M. NGADI. Applications of spectroscopic techniques for fat and fatty acids analysis of dairy foods. *Current Opinion in Food Science*. 2017, **17**, 100-112. ISSN 22147993. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799317301790>
- [67] LAPORTE, M.F. a P. PAQUIN. Near-Infrared Analysis of Fat, Protein, and Casein in Cow's Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, **47**(7), 2600-2605. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf980929r>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

NIR	near infrared – blízká infračervená oblast
MIR	mid infrared – střední infračervená oblast
FIR	far infrared – vzdálená infračervená oblast
IR	Infračervená
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
PCR	principal component regression - metoda regrese hlavních komponent
PLS	partial least squares - metoda částečných nejmenších čtverců
KTJ	kolonii tvořící jednotka
DTGS	deuterovaný triglycinsulfát
TGS	triglycinsulfát
RMSEC	root mean square error of calibration – střední kvadratická chyba kalibrace
RMSEV	root mean square error of validation – střední kvadratická chyba validace
SH	titrační kyselost
DLU	digital light units
R ²	koeficient determinace

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1: Energetické hladiny a vibrační přechody harmonického oscilátoru	13
Obr. č. 2: Příklady možných vibračních módů molekul	15
Obr. č. 3: Vibračně rotační přechody	16
Obr. č. 4: Orientační schéma základních typů jogurtů	20
Obr. č. 5: Schematické uspořádání spektrometru FTIR	27
Obr. č. 6: Záznam NIR spekter vzorků jogurtů z tržní sítě	42
Obr. č. 7: Standardizovaný záznam naměřených NIR spekter	43
Obr. č. 8: Závislost hodnoty funkce PRESS na počtu PLS faktorů pro kalibrační model tuku s integračním časem 8 x 12,5 ms	44

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 2.1: Legislativní dělení kysaných mléčných výrobků	18
Tabulka č. 4.1: Charakteristické infračervené absorpční pásy vybraných funkč. skupin	30
Tabulka č. 6.1: Přehled použitých vzorků bílých jogurtů z tržní sítě	37
Tabulka č. 7.1: Přehled obsahu bílkovin, tuku a sušiny ve vzorcích jogurtů z tržní sítě	47
Tabulka č. 7.2: Přehled obsahu bílkovin, tuku a sušiny ve vzorcích jogurtů a jogurtových mlék vlastní výroby	48
Tabulka č. 7.3: Přehled naměřených hodnot pH a titrační kyselosti (SH) ve vzorcích jogurtů a jogurtových mlék	48
Tabulka č. 7.4: Parametry kalibračního modelu bílkovin (integrační čas 7 x 12,5 ms)	50
Tabulka č. 7.5: Parametry kalibračního modelu tuku (integrační čas 7 x 12,5 ms)	51
Tabulka č. 7.6: Parametry kalibračního modelu sušiny (integrační čas 7 x 12,5 ms)	52
Tabulka č. 7.7: Parametry kalibračního modelu bílkovin (integrační čas 8 x 12,5 ms)	53
Tabulka č. 7.8: Parametry kalibračního modelu tuku (integrační čas 8 x 12,5 ms)	54
Tabulka č. 7.9: Parametry kalibračního modelu sušiny (integrační čas 8 x 12,5 ms)	55
Tabulka č. 8.1 : Statistické ukazatele kalibračních modelů	56

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P1: Korelace mezi obsahem bílkovin stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu kalibrační přímky. Integrační čas 7 x 12,5 ms.

Příloha P2: Korelace mezi obsahem tuku stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu kalibrační přímky. Integrační čas 7 x 12,5 ms.

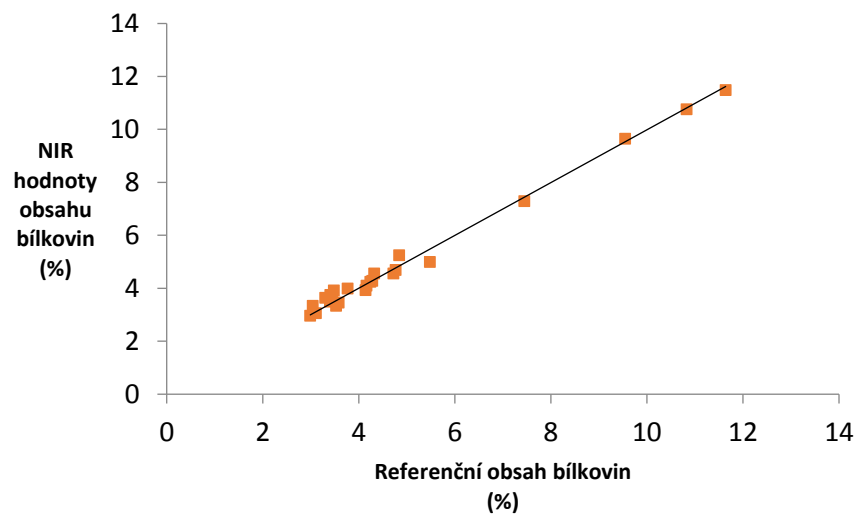
Příloha P3: Korelace mezi obsahem sušiny stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu kalibrační přímky. Integrační čas 7 x 12,5 ms.

Příloha P4: Korelace mezi obsahem bílkovin stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu kalibrační přímky. Integrační čas 8 x 12,5 ms.

Příloha P5: Korelace mezi obsahem tuku stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu kalibrační přímky. Integrační čas 8 x 12,5 ms.

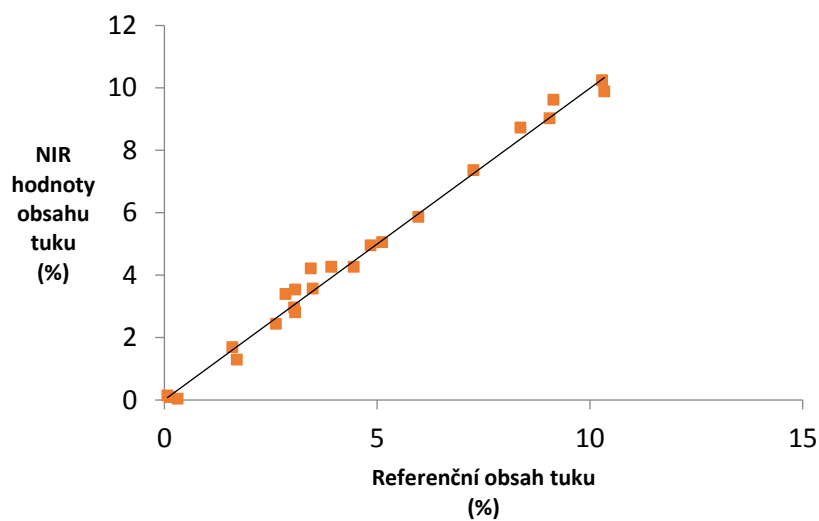
Příloha P6: Korelace mezi obsahem sušiny stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu kalibrační přímky. Integrační čas 8 x 12,5 ms.

PŘÍLOHA P 1:



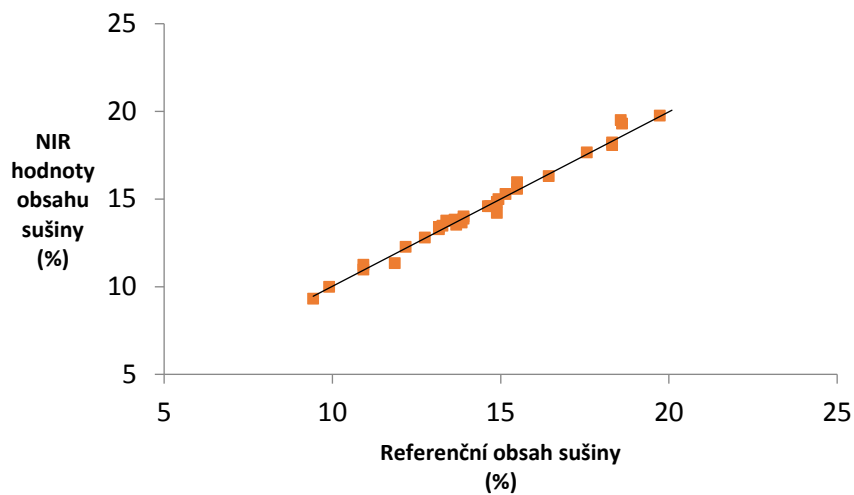
Korelace mezi obsahem bílkovin stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu kalibrační přímky. Integrační čas 7 x 12,5 ms.

PŘÍLOHA P 2:



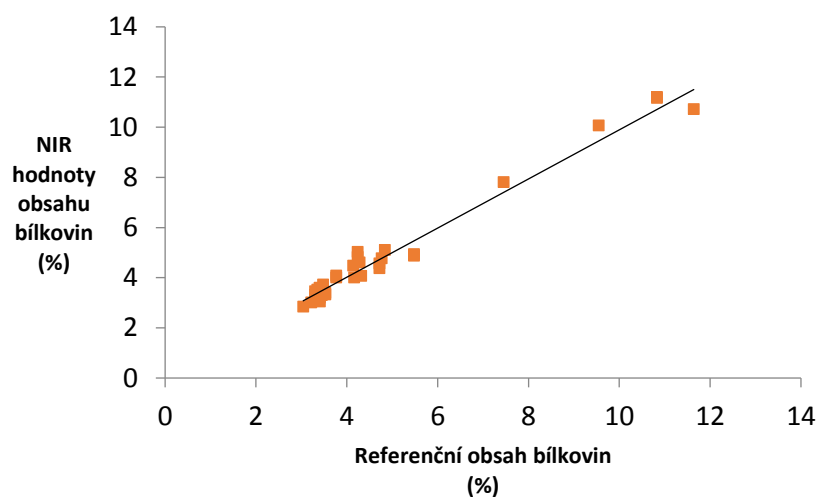
Korelace mezi obsahem tuku stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu kalibrační přímky. Integrační čas 7 x 12,5 ms.

PŘÍLOHA P 3:



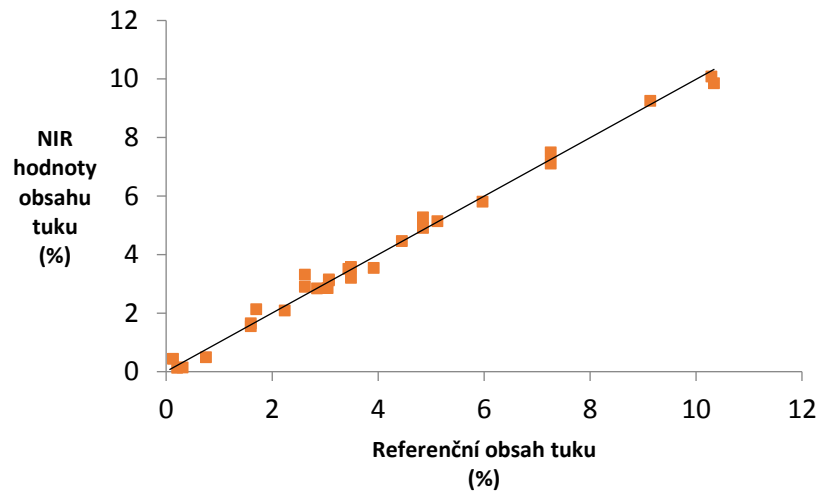
Korelace mezi obsahem sušiny stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu kalibrační přímky. Integrační čas 7 x 12,5 ms.

PŘÍLOHA P 4:



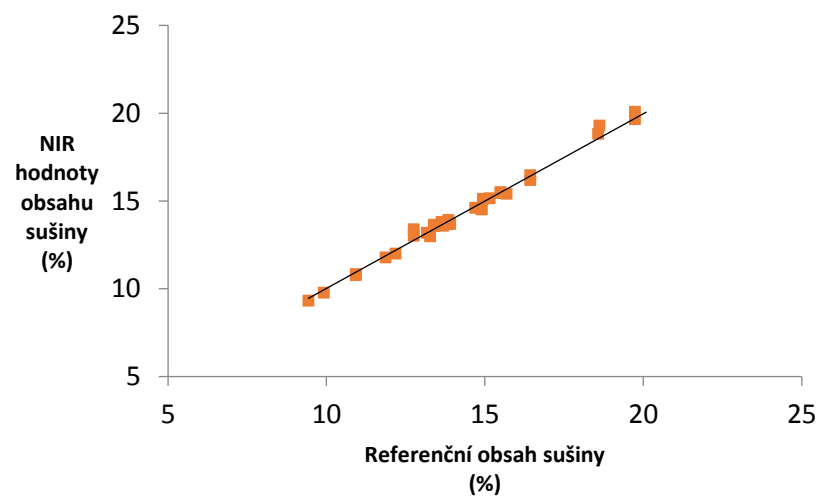
Korelace mezi obsahem bílkovin stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu kalibrační přímky. Integrační čas 8 x 12,5 ms.

PŘÍLOHA P 5:



Korelace mezi obsahem tuku stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu kalibrační přímky. Integrační čas 8 x 12,5 ms.

PŘÍLOHA P 6:



Korelace mezi obsahem sušiny stanoveným pomocí NIR a referenční metodou pro spektra nepoužitá pro tvorbu kalibrační přímky. Integrační čas 8 x 12,5 ms.