

Primjena spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u tehnologiji mlijeka

Bojan Matijević, Marijana Blažić

Pregledni rad - Review

UDK: 637.1

Sažetak

Upotreba i primjena spektroskopskih tehnika u prehrambenoj industriji sve više raste, a odgovori koje daju olakšavaju rješavanje problema u proizvodnji i distribuciji hrane. Primjena spektroskopskih tehnika u mljekarstvu omogućava brzu i jeftinu kvalitativnu i kvantitativnu analizu, ali ima i važnu ulogu u opisivanju strukture i teksture mliječnih proizvoda. Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinih sastojaka u složenim sustavima može biti problematična zbog preklapanja spektralnih odgovora, a kao idealan put za rješenje tog problema je kemometrija, disciplina koja koristi matematičke i statističke metode kako bi oblikovala ili odabrala optimalan mjeriteljski postupak ili eksperiment i omogućila dobivanje maksimalnog broja informacija analizom dobivenih podataka. Najčešća primjena kemometrije je u analizi skupa podataka i prepoznavanju matematičkih modela. Spektroskopske tehnike u kombinaciji s kemometrijskim metodama omogućavaju praćenje procesa i upravljanje kontrolom kvalitete.

Ključne riječi: spektroskopija, kemometrija, mlijeko, mliječni proizvodi

Uvod

Mlijeko i mliječni proizvodi su hrana složenog kemijskog sastava. U današnje vrijeme visokih zahtjeva potrošača i standarda kakvoće nameće se proizvođačima i prerađivačima mlijeka potreba za što učinkovitijom proizvodnjom i kontrolom proizvodnje. Proizvoditi i stavljati na tržište proizvode ujednačene kakvoće, higijenski besprijekorne, zdrave i održive, koji ne djeluju štetno na zdravlje potrošača, moguće je postići primjenom automatizacije u proizvodnji sustavnim i discipliniranim pristupkom u kontroli hrane, te prateći i primjenjujući najnovije znanstvene spoznaje. Za praćenje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda razvijene su različite analitičke metode

(gravimetrijske, volumetrijske i titrimetrijske). Neke od tih metoda su postale standardne, a neke se koriste za rutinsku analizu. Ove metode su se pokazale neprikladnima kod obrade velikog broja uzoraka: potrebno je određeno vrijeme za dobivanje rezultata i troškovi analize su visoki. Primjenom automatizacije na standardne metode dio nedostataka je ispravljen, ali najveći korak naprijed je načinjen razvojem mjernih instrumenata čiji rad se bazira na kemijskim i fizikalnim svojstvima sastojaka mlijeka, bez ili uz minimalnu obradu i manipulaciju uzorkom (Andersen i sur., 1986.). Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu sastojaka mlijeka i mliječnih proizvoda koriste se spektroskopske tehnike u kombinaciji s kemometrijskim metodama (Karoui i De Baerdemaeker, 2007.).

Spektroskopske tehnike koje se primjenjuju su brze, točne i što je najbitnije jeftine, a njima se može kontrolirati mlijeko, mliječni proizvodi i proces proizvodnje. Brza bliska infracrvena spektroskopija u rutinskoj analitici i procesnoj kontroli zamjenjuje uobičajene, skupe i zahtjevne klasične analitičke metode (Günzler i Gremlich, 2006.). Osim za kvalitativnu i kvantitativnu analizu sastojaka mlijeka i mliječnih proizvoda, spektroskopija se može upotrijebiti za utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku (Mikulec i sur., 2004.; Samaržija i sur., 2004.).

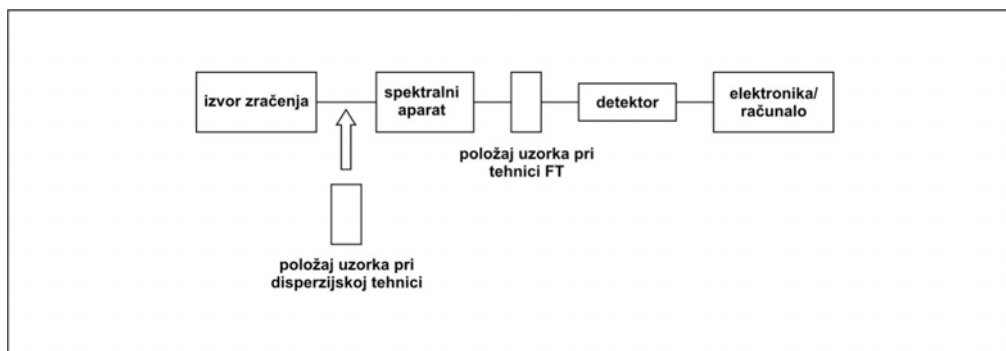
Kemometrija je nova disciplina, a nastala je upotrebom statističkih i matematičkih metoda u kemiji 1970. god. koje u današnje vrijeme opisujemo kao kemometrijske metode. Razvoj kemometrije kao discipline počinje 80-tih god. 20. stoljeća primjenom PC računala, koja predstavljaju novo doba u prikupljanju, obradi i tumačenju rezultata mjerenja u kemiji. Jedna od osnovnih uloga kemometrije je pojednostaviti složene matematičke modele i naći njihovu praktičnu primjenu. Razvoj statističkih i numeričkih softwera pojednostavljuje primjenu kemometrije. Odvojeno od statističkih i matematičkih metoda kemometrija se primjenjuje u automatizaciji laboratorija, na metode za upravljanje analitičkim i spektroskopskim bazama podataka i metodama umjetne inteligencije.

Mnoga istraživanja kvalitativnih i kvantitativnih parametara u procesu prerade hrane, ali i u mljekarstvu, koriste spektroskopske tehnike u kombinaciji s kemometrijskim metodama (Fagan i sur., 2007.; Karoui i De Baerdemaeker, 2007.; Karoui i sur., 2007.). Stoga je svrha ovoga rada dati prikaz upotrebe spektroskopskih tehnika i kemometrijskih metoda u mljekarstvu.

Vrste i primjena spektroskopskih tehnika u mljekarstvu

Spektroskopija je grana analitičke kemije koja se bavi dobivanjem informacija o kemijskom sastavu i strukturi tvari na temelju separacije, detekcije i mjerenja energetske promjene koje se događaju u atomnim jezgrama, atomnom elektronskom omotaču ili u molekulama kao rezultat njihove interakcije s elektromagnetskim zračenjem sa česticama (Skoog i sur., 1999.; Maljković, 1992.).

Ona ima izvanrednu važnost u analizi i istraživanju tvari. Spektroskopske tehnike čine najvažniju skupinu tehnika u instrumentalnoj kemijskoj analizi. One omogućavaju dobivanje velikog broja kvalitativnih i kvantitativnih informacija. Već prema principu na kojem se osnivaju i izvedbi spektroskopske se tehnike mogu primjenjivati u laboratoriju, u industrijskom pogonu (analiza procesa), ili na terenu. Granica je identifikacije pojedinih spektroskopskih tehnika različita i kreće se u vrlo širokom rasponu, od nekoliko pikograma do nekoliko grama (Maljković, 1992.).



Slika 1: Konstrukcija IR spektrometra (shematski) (Günzler i Gremlich, 2006.)

Figure 1: Structure of IR spectrometer (scheme) (Günzler and Gremlich, 2006)

Upotreba i primjena spektroskopskih tehnika u prehrambenoj industriji sve više raste, a odgovore koje daju olakšavaju rješavanje problema u proizvodnji i distribuciji hrane. Primjena spektroskopskih tehnika u mljekarstvu omogućava brzu i jeftinu kvalitativnu i kvantitativnu analizu, koje imaju važnu ulogu u opisivanju strukture i teksture mliječnih proizvoda. Većina spektroskopskih tehnika, koje dopuštaju direktno proučavanje strukture i teksture tvari u višefaznim sustavima, još se uvijek razvija (Karoui i sur., 2003.). Za određivanje količine masti u mlijeku koristi se svjetlost valne

dužine 3,5 i 5,7 μm , a istraživanjima su dobiveni bolji rezultati pri valnoj dužini 3,5 μm . Mjerenje količine proteina se provodi na valnoj dužini 6,5 μm , a laktoze na 9,5 μm (Andersen i sur., 1986.). Spektroskopske tehnike koje se koriste su infracrvena i fluorescentna spektroskopija i nuklearna magnetska rezonancija (Karoui i De Baerdemaeker, 2007.; Karoui i sur., 2003.). Spektroskopska tehnika za utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku naziva se protočna citometrija (Mikulec i sur., 2004.; Samaržija i sur., 2004.). Ova tehnika se temelji na fluorescenciji deoksiribonukleinske kiseline obojenih bakterijskih stanica.

Tablica 1: Prednosti i nedostaci bliske infracrvene (NIR), Furierove transformacije infracrvenog spektra (FTIR), florescencije i nuklearne magnetske rezonancije (NMR) za mjerenje sastojaka mlijeka (Karoui i De Baerdemaeker, 2007.)

Table 1: Advantages and disadvantages of the near infrared (NIR), Fourier transform infrared (FT-IR) fluorescence and nuclear magnetic resonance (NMR) for milk components measurements (Karoui i De Baerdemaeker, 2007)

Spektroskopska tehnika Spectroscopic	Osjetljivost Sensitivity	Količina informacija Information content	Odsutnost smetnji Absence of interference	Ponovljivost Repeatability	Odsutnost rasipanja svjetlosti Absence of light scatter
NIR	**	**	*	**	**
FTIR	***	***	*	***	**
Florescencija Fluorescence	***	*	***	**	*
NMR	**	***	*	**	***

Oznake: osjetljivost i količina informacija: * - niska, *** - visoka; odsutnost smetnji: * - puno smetnji, *** - nekoliko smetnji; ponovljivost: * - loša, *** - dobra; odsutnost rasipanja svjetlosti: * - snažno rasipanje, ***- nema rasipanja

Symbols: sensitivity and information content: * - low, *** - high; absence of interferences: * - many interferences, *** - few interferences; repeatability: * - poor, *** - good; absence of light scatter: * - severe light scatter, *** - no light scatter

Infracrvena spektroskopija

Veliko značenje infracrvene spektroskopije temelji se na visokoj informacijskoj vrijednosti spektra i na raznovrsnim mogućnostima mjerenja

uzorka i pripravljanja spojeva (Günzler i Gremlich, 2006.). Ona se koristi za rješavanje problema strukture molekula i kemijske identifikacije. Primjenjuje se najčešće za analizu organskih spojeva, iako se može primijeniti i za analizu anorganskih spojeva koji sadrže višeatomne katione ili anione. Posljedica je apsorpcije infracrvenog zračenja promjena energija vibracije i rotacije molekula. Područje apsorpcije zračenja proteže se od 0,75 do 1000 μm i dijeli se na blisko infracrveno područje (0,75 do 2,5 μm), osnovno infracrveno područje (2,5 do 25 μm) i daleko infracrveno područje (25 do 1 000 μm) (Maljković, 1992.).

Ove tehnike imaju mnoge prednosti jer omogućavaju brzo mjerenje velikog broja veličina, a da se pri tome uzorak ne uništi. Također se mogu koristiti za at-line i on-line kontrolu procesa. Blisko infracrveno zračenje utječe na vibracije istezanja kovalentnih veza C–H, N–H i O–H u molekuli. Od tehnika bliske infracrvene spektroskopije koriste se tehnika bliske infracrvene refleksije (NIR) i bliske infracrvene emisije (NIT) (Karoui i sur., 2003.). Ove tehnike mogu se koristiti za analizu tekućina i krutina kao što je mlijeko, sirevi i mlijeko u prahu (Mills, 2005.a).

NIR spektroskopsku tehniku karakterizira dobra osjetljivost mjerenja, moguće je mjeriti nekoliko sastojaka istovremeno, a uzorak je potrebno pripremiti usitnjavanjem ili homogenizacijom (Rodriguez-Otero i sur., 1997.).

U rutinskoj analitici za određivanje ukupne suhe tvari, suhe tvari bez masti, masti, proteina i laktoze u mljekarama se koriste uređaji koji se temelje na NIR tehnologiji (MilkoScan) za analizu mlijeka i vrhnja (Mills, 2005.b). Prvi takvi uređaji su se temeljili na standardnim spektroskopima s dvostrukim snopom infracrvenog svjetla valne dužine svojstvene sastojcima mlijeka i prilagođenim za automatizaciju. Pojednostavljenje optičkog sustava ovih uređaja je predstavljeno 1979. god., a temeljeno je na dvostrukoj valnoj dužini jedne zrake svjetlosti (Andersen i sur., 1986.). Ovi uređaji imaju mogućnost analize preko 300 uzoraka u satu. Ova tehnika je korištena za praćenje koagulacije kravljeg mlijeka sirilom (O'Callaghana i sur., 2001.) i rekonstituiranog obranog mlijeka (Giardna i sur., 2004.). Također se učinkovito koristi za utvrđivanje fizikalno-kemijskih svojstava sireva (Adamopoulos i sur., 2001.) i maslaca (Hermida i sur., 2001.). Kod određivanja masti u fermentiranom mlijeku NIR spektroskopskom tehnikom izbjegnuta je priprema uzorka (Rodriguez-Otero i Hermida, 1996.). Bliska infracrvena spektrometrija (NIR) je korištena za brzo određivanje udjela masti,

proteina, laktoze, vlage i pepela u mješavinama prahova dobivenih iz svježeg mlijeka, obranog mlijeka, sirutke i proteinskih koncentrata (Barabássy, 2001.). Ovo istraživanje je obuhvatilo više od 150 uzoraka, a priređeno je mjerenje u dva laboratorija. Svrha istraživanja je bila brzo kvalitativno i kvantitativno određivanje produkata mlijeka u prahu i usporedba rezultata dobivenih u dva različita laboratorija.

Za određivanje strukture sastojaka mlijeka i mliječnih proizvoda koristi se srednja infracrvena spektroskopija (MIR) i spektroskopija s Furierovom transformacijom infracrvenog spektra (FTIR). Sve kemijske veze apsorbiraju zračenje valnog broja u području od 4 000 do 400 cm^{-1} što odgovara srednjem infracrvenom području. Tako acilne grupe apsorbiraju zračenje valnog broja 3 000 do 2 800 cm^{-1} , peptidna veza 1 700 do 1 500 cm^{-1} , a esterska veza u triacilgliceridima oko 1 175 cm^{-1} . Srednje infracrveno područje valnog broja 3 000 do 2 800 cm^{-1} koristi se u određivanju građe i položaja fosfolipidnih veza (Casal i Mantsch, 1984.).

Srednja infracrvena spektroskopija (MIR) je tehnika današnjice kojoj se daje prednost u analizi mlijeka i mliječnih proizvoda. Svaki spoj, bilo organski ili anorganski, ima svoj karakterističan spektar, a jedino kod ove tehnike teškoće zadaje određivanje spojeva veoma niskih koncentracija (Karoui i De Baerdemaeker, 2007.). Ova spektroskopska tehnika je korištena za praćenje zrenja nekih polutvrdih sireva tijekom 1., 21., 51. i 81. dana (Mazerolles i sur., 2002.), ali se koristi i za utvrđivanje autentičnosti tvrdih sireva (Karoui i De Baerdemaeker, 2007.) Prednost ove spektroskopske tehnike je visoka ponovljivost rezultata i jednostavno uzorkovanje, a nedostatak je otežana obrada rezultata mjerenja.

Kod spektroskopije s Furierovom transformacijom infracrvenog spektra (FTIR) sve frekvencije koje dolaze iz infracrvenog izvora padaju istovremeno na detektor i tijekom mjerenja cijelo spektralno područje pridonosi signalu. Ova tehnika ima izuzetnu točnost valnih brojeva od 0,01 cm^{-1} , što ima za posljedicu utvrđivanje niskih koncentracija (Günzler i Gremlich, 2006.). Prednost primjene ove tehnike je u utvrđivanju strukture proteina, interakcije protein-protein i protein-lipid (Casal i Mantsch, 1984.). Peptidna veza omogućava proteinima apsorpciju infracrvenog zračenja valnog broja od 1 700 do 1 500 cm^{-1} (Karoui i sur., 2003.). Voda veoma dobro apsorbira zračenje infracrvenog spektra, pa može utjecati na interpretaciju rezultata. Točnost spektroskopske tehnike s Furierovom transformacijom (FTIR) omogućava određivanje količine proteina u vodenoj otopini zato što je moguće oduzeti utjecaj molekula vode na rezultate mjerenja (Karoui i sur., 2003.).



Slika 2: FTIR analizator mlijeka i mliječnih proizvoda (MilkoScanTM FT 120) (FOSS, 2007.)

Figure 2: FTIR dairy product analyser (MilkoScanTM FT 120) (FOSS, 2007)

Nova generacija spektroskopskih uređaja za analizu mlijeka (MilkoScan) koristi Furierovu transformaciju infracrvenog spektra (Kittvachra i sur., 2006.). FTIR tehnologija omogućuje mjerenje u čitavom infracrvenom spektru i određivanje velikog broja parametara (masti, proteina, ugljikohidrata, suhe tvari, suhe tvar bez masti, ukupnih šećera, glukoze, fruktoze, saharoze, laktoze, limunske kiseline, uree i količine dodane vode). Analiza uzorka može trajati od 30 do 45 sekundi, što ovisi o viskoznosti uzorka, a mogu obraditi i do 500 uzoraka na sat (FOSS, 2007.).

Potreba za što boljom kontrolom kritičnih točaka i učinkovitijom automatizacijom procesa dovela je do razvoja FTIR spektroskopa koji imaju mogućnost ugradnje u tehnološke linije (slika 3). Ovi uređaji provode mjerenje na valnoj dužini infracrvenog spektra od 0,4 do 1,1 μm , a analiza traje oko 30 sekundi. Mogu se koristiti za praćenje standardizacije mlijeka, ali i proizvodnje maslaca (učestalo mjerenje i optimizaciju soli i vode u maslacu), sira (Kuhlman, 2004.) i obrade sirutke (Hofmann, 2004.).

Osim za utvrđivanje sastava mlijeka spektroskopska tehnika s Furierovom transformacijom (FTIR) se koristi za brzo određivanje kazeina u mlijeku (Hewavitharana i van Brakel, 1997.), strukture proteina sirutke, ali i utjecaja različitih čimbenika na strukturu (Fagan i Dalgleish, 1998.; Lefèvre i Subirade, 2000.). Ova spektroskopska metoda ima primjenu u



Slika 3: In-line FTIR spektroskop (ProcesScan™ FT) (FOSS, 2007.)

Figure 3: In-line FTIR spectrop (ProcesScan™ FT) (FOSS, 2007)

mjerenju organskog fosfora i kalcijevih veza (Upreti i Metzger, 2006.) i formiranje teksture tijekom zrenja sira (Irudayara, 1999.). Primjena FTIR spektroskopske tehnike se pokazala učinkovitom u utvrđivanju razlika između sireva (Picque i sur., 2002.), ali i razlika tijekom čuvanja sira (Cataneo i sur., 2005.).

Fluorescentna spektrometrija

Apsorbirana svjetlost u atomima i molekulama uzrokuje prelazak elektrona u pobuđeno stanje. Pobuđeni atomi ili molekule žive relativno kratko (oko 10^{-8} s) i teže se vratiti u osnovno stanje. Energija oslobođena u tom procesu najčešće se očituje kao reemitirano zračenje (fluorescencija) (Maljković, 1992.).

Fluorescentna spektroskopija temelji se na mjerenju snage fluorescentnog zračenja i omogućava kvantitativno određivanje tragova anorganskih i organskih tvari. Za ovu spektroskopsku tehniku svojstvena je velika osjetljivost (od 100 do 1 000 puta je osjetljivija od ostalih spektroskopskih tehnika), uz jednaku selektivnost, često i bolju. Primjena je, međutim, ograničena samo na one kemijske sustave koji mogu fluorescetiirati.

Uzorci za analizu mogu se podijeliti u uzorke bez primjesa i uzorke s primjesama. Uzorci bez primjesa su oni koji se koriste u prirodnom stanju, a to su aromatske aminokiseline (triptofan, tirozin i fenilalanin) u proteinima, vitamini (A i B₂), NADH i derivati, piridoksal i ostali spojevi koje je moguće pronaći u hrani u niskim koncentracijama. Svojstvo fluoresciranja aromatskih aminokiselina se koristi za proučavanje strukture proteina ili hidrofobnih interakcija među njima (Dufour i sur., 1994.).

Šest osnovnih proteina mlijeka: α s1-, α s2-, β -, κ - kazein, β -laktoglobulin i α -laktalbumin u svojoj strukturi sadrže barem jednu molekulu triptofana (Fox, 1989.), čija fluorescencija dopušta praćenje promjena strukture proteina.

Uzorcima se dodaju primjese kako bi omogućili fluorescenciju ili promijenili spektralna svojstva. Postoje mnogi primjeri kad molekule ne fluoresciraju ili dobivena fluorescencija nije prikladna pa se ovim načinom to rješava.

Ova metoda se može koristiti za utvrđivanje razlika između sirovog, toplinski obrađenog i homogeniziranog mlijeka (Dufour i Riaublanc, 1997.), a istražena je i primjena za praćenje Maillardovih reakcija posmeđivanja mlijeka tijekom toplinske obrade (Schamberger i Labuza, 2006.). Fluorescentna spektroskopija se primjenjuje i u praćenju procesa koagulacije mlijeka u proizvodnji sira uz glukono- δ -laktan, sirilo i kombinaciju glukono- δ -laktana i sirila (Karoui i sur., 2007.).



Slika 4: FOSS Bactoscan™ FC (Mills, 2006.)

Figure 4: FOSS BactoScan™ FC (Mills, 2006)

Fluorescentna spektroskopija ima primjenu i u određivanju broja bakterija u sirovom mlijeku. Prve generacije uređaja za rutinsku analizu ukupnog broja bakterija u mlijeku primjenjuju se od 1980. (Andersen i sur., 1986.; Mills, 2006.), a treća od 2000. godine (Samaržija i sur., 2004.). Prije same analize potrebno je uzorak mlijeka filtrirati, dodati specifične reagense (pufer, enzim i boju) kojima će se iz mlijeka izdvojiti svi sastojci osim bakterija. Obasjavanjem uzorka laserskom zrakom dolazi do fluorescencije deoksiribonukleinske kiseline (DNK) obojenih bakterijskih stanica, a detektor očitava fluorescentni svjetlosni impuls. Obrada i analiza uzorka je automatizirana, pa se u jednom satu može analizirati 150 uzoraka (Bolzoni i sur., 2001.).

Nuklearna magnetska rezonancija

Ova spektroskopska tehnika još se naziva i spektroskopija magnetske rezonancije jezgre, a veoma je rasprostranjena za ispitivanje strukture organskih spojeva (Pine, 1994.). Temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja jezgri atoma analiziranog uzorka smještenih u snažnom magnetskom polju. U prisutnosti snažnog magnetskog polja energija spinskih stanja magnetskih jezgri se cijepa, pa elektromagnetsko zračenje primjerene frekvencije može uzrokovati prijelaz između spinskih stanja, tj. može biti apsorbirano. Promjena energije, koja se pri takvoj apsorpciji zbiva, odgovara radiovalnom zračenju (Maljković, 1992.).

Nuklearnu magnetsku rezonanciju je moguće koristiti za mjerenje masti ili topljivih sastojaka mliječnih proizvoda. Zbog osjetljivosti mjerenja na mehaničke manipulacije strukture, ova je tehnika dala vrlo dobre rezultate kod ispitivanja mikrostrukture gruša (Karoui i sur., 2007.). Tijekom cijedenja sira praćena je količina vode u sirutki, ali i u grušu ovom tehnikom kao informacija interakcije vode i gruša (Chaland i sur., 2000.). Nuklearna magnetska rezonancija je primijenjena za proučavanje promjena u strukturi β -laktoglobulina kad je zagrijan kod pH 2 i 7,4 jedinice pri 55 °C (Belloque i Smith, 1998.), ali i formiranja strukture sladoleda (Lucas i sur., 2005.).

Ova spektroskopska tehnika je osjetljiva na promjene u molekuli i pruža mnoštvo informacija. Može biti bolji izbor od spomenutih spektroskopskih tehnika za ispitivanje heterogenih sustava i velikog broja uzoraka. Glavni nedostatak je složenost opreme. Korištenje odgovarajućeg pulsa je bitno za dobivanje vrijednih rezultata. Korištenje krivog pulsa ili krivih parametara može dati negativne rezultate (Karoui i sur., 2003.).

Kemometrija u analizi spektroskopskih podataka i primjena u analizi mlijeka i mliječnih proizvoda

Kemometrija se definira kao «kemijska disciplina koja koristi matematičke i statističke metode da oblikuje ili odabere optimalan mjeriteljski postupak ili eksperiment i omogući dobivanje maksimalnog broja informacija analizom dobivenih podataka» (Mathias, 2007.; Petersen, 2007.). Cilj svakog istraživača je dobiti valjane podatke. Valjani podaci su oni podaci koje dobijemo mjerenjem. Oni pokazuju pravu sliku, a značajni su za kemometrijsku obradu. Uzevši u obzir eksperiment, istraživači žele nešto naučiti i dobiti informacije u što kraćem vremenu. U tim nastojanjima kemometrija je od dragocjene pomoći (Miller i Miller, 2000.).

Najčešća primjena kemometrije je u analizi skupa podataka i prepoznavanju matematičkih modela. Područja primjene mogu se podijeliti u četiri grupe s podgrupama. Jedna od grupa metoda je postupak koji omogućava prikupljanje valjanih podataka. Drugu grupu čine metode odabira vrijednih informacija iz valjanih podataka. Treću grupu metoda čine metode analize spektroskopskih podataka i metode usporedbe, čiji značaj postupno raste i četvrtu grupu čine metode umjetne inteligencije (Wold i Sjöström, 1998.).

Postoje brojni razlozi upotrebe spektroskopskih tehnika u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi složenih sustava kao što je hrana, odnosno mlijeko i mliječni proizvodi. Rezultati spektroskopskih mjerenja kod takvih sustava često puta nisu jasni. Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinih sastojaka u složenim sustavima može biti problematična zbog preklapanja spektralnih odgovora, a rješenje je prethodna separacija sastojaka ili povećanje razlučivosti spektra. Kako bi se to izbjeglo, kao idealan put u kvalitativnoj, kvantitativnoj i strukturalnoj analizi spektralnih podataka pokazala se kemometrija. Osim u laboratoriju, značajna je i u industriji. Kemometrijske metode, kao što je umjeravanje velikog broja slučajnih varijabli, svakodnevno se koriste u praćenju procesa proizvodnje ili kontroli kvalitete (Wold i Sjöström, 1998.).

Statističke metode koje se koriste u analizi podataka istraživanja su analiza glavnih komponenata (principal components analysis; PCA), kanonička korelacijska analiza (canonical correlation analysis; CCA), analiza zajedničkih komponenata i određene težine (common components and specific weight analysis; CCSWA), faktorska diskriminativna analiza (factorial discriminant analysis; FDA), regresija glavnih komponenata (principal component regression; PCR) i metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (partial least squares; PLS) (Karoui i sur., 2003; Petersen, 2007.).

Analiza glavnih komponenata (PCA)

Ova statistička metoda najviše se koristi kod obrade podataka s više varijabli. Svrha ove metode je analiza korelacija unutar jednog skupa varijabli i posljedične redukcije dimenzionalnosti prostora, kako bi se što veći broj varijabli objasnio pomoću što manjeg broja varijabli. PCA metoda se ne koristi ukoliko varijable nisu u korelaciji. Kod složenosti istraživanja PCA metoda se koristi da bi se pojednostavili signali i «pripremili» za obradu, a temelji se na statistici drugog reda (Miller i Miller, 2000.).

Utjecaj toplinske obrade na mlijeko praćen je emisijom spektra triptofana u različitim vrstama mlijeka, a dobiveni podaci su analizirani PCA metodom. Ova metoda je omogućila izdvajanje informacija koje su posljedica utjecaja temperature na strukturne promjene sastojaka mlijeka. (Dufour i Riaublanc, 1997.).

PCA metoda je korištena kod analize spektra fluorescentne spektroskopije korištene za praćenje oksidativnih promjena u siru tijekom dozrijevanja 12 polutvrđih sireva, a analizirani su uzorci 2., 30. i 60. dana zrenja (Karoui i sur., 2007.). Dobiveno je ukupno 108 vrsta spektara (12 sireva × 3 vremena zrenja × 3 ponavljanja) koji su analizirani. Rezultati analiza pokazuju da je fluorescentna spektroskopija kod 400 - 640 nm, u kombinaciji s PCA metodom, vrijedna i jeftina metoda praćenja procesa oksidacije tijekom zrenja polutvrđog sira.

Kanonička korelacijska analiza (CCA)

Odnosi između dva niza varijabli ispituju se CCA metodom. Jedan niz mogu sačinjavati nezavisne varijable, a drugi zavisne. CCA metoda omogućava analizu rezultata istraživanja u kojima se neka veličina mjeri na dva niza varijabli, a informacija koja se želi dobiti je odnos ta dva niza. Kod ovakve multivarijantne analize postoji više nizova nezavisnih i zavisnih varijabli koji su međusobno povezani sustavom strukturnih jednadžbi. Kombinacija varijabli, s jedne strane jednadžbe, u najvećoj je mogućoj korelaciji s drugom stranom i to preko tzv. latentnih dimenzija ili kanoničkih varijanta. Kanoničke varijante su linearne kombinacije nezavisne varijable s jedne strane niza, dok su s druge strane linearne kombinacije zavisnih varijabli. U takvom sustavu mora postojati najmanje jedan par kanoničkih varijanti koji je u najvećoj mogućoj korelaciji, a naziva se kanonička korelacija.

CCA metoda se pokazala kao bolji alat u analizi podataka fluorescentnog i infracrvenog spektra (Karoui i sur., 2003.). Korištena je u praćenju zrenja

polutvrđih sireva pri različitim stadijima zrenja. Na osnovu rezultata analize za 4 grupe uzoraka i korištenja CCA metode zaključeno je da se za praćenje zrenja sira može koristiti fluorescentna i infracrvena spektroskopija (Mazerolles i sur., 2001.).

Analiza zajedničkih komponentata i određene težine (CCSWA)

Kod CCSWA metode svrha je opisati nekoliko grupa podataka promatranih na istim n uzorcima uzimajući u obzir maksimalnu inerciju svakog od njih. Svrha je obuhvatiti otkrivanje reprezentativnog prostora za sve grupe podataka. Svaka grupa podataka ima svoju određenu težinu povezanu s prostorom. Na ovaj način omogućena je cjelokupna povezanost između različitih grupa podataka (Karoui i sur., 2003.).

Eksperimentalni podaci pokazali su da fluorescentna spektroskopija u kombinaciji s CCSWA kemometrijskom metodom dopušta proučavanje sira na molekularnoj razini (Karoui i sur., 2006.). Fluorescentna spektroskopija omogućava proučavanje organizacije proteinske mreže i veze između strukture i teksture, a za praćenje i analizu podataka utjecaja na proteine, masti i interakcije u matriksu sira tijekom zrenja CCAWA metoda se pokazala kao najprikladnija kemometrijska metoda.

Faktorska diskriminativna analiza (FDA)

FDA metoda je utemeljena na ideji utvrđivanja varijabli koje uzrokuju najveću razliku između uspoređenih grupa entiteta. Obuhvaća grupu od nekoliko entiteta opisanih nizom varijabli, a zatim te varijable konstruiraju nove varijable (njih treba biti manje nego polaznih) koje opisuju razlike među grupama. Te nove varijable nazivaju se *diskriminativnim varijablama (ili funkcijama)*. Dobivaju se kao linearne kombinacije izvornih varijabli (Miller i Miller, 2000.). Glavni zadaci FDA su:

- određivanje diskriminativnih varijabli, tj. varijabli na kojima se grupe međusobno što je moguće više razlikuju;
- redukcija broja diskriminativnih varijabli, tj. zadržavanje samo onih varijabli na kojima se centriodi pojedinih grupa značajno razlikuju;
- interpretacija diskriminativnih varijabli pomoću originalnih.

Postoji više različitih algoritama za diskriminativnu analizu. Neki od tih algoritama na temelju diskriminativnih varijabli prognoziraju pripadnost pojedinih entiteta pojedinim grupama (Karoui i sur., 2003.).

Svježi sir je analiziran korištenjem dva fluorescentna spektra za vitamin A i triptofan, a rezultati analize su obrađeni FDA metodom. Ovo istraživanje potvrdilo je da spektar vitamina A daje bolje rezultate od spektra triptofana u analizi svježeg sira (Herbert i sur., 2000.).

Regresija glavnih komponenata (PCR)

Primjenom PCR metode rješava se problem višestruke regresije. Problem višestruke regresije je to što korelacije između nezavisnih varijabli mogu dovesti do matematičkih problema i nerealne procjene zavisne varijable. PCR metoda je korisna samo ukoliko broj osnovnih komponenata prelazi broj kalibracijskih pokazatelja. Broj osnovnih komponenata se može reducirati koristeći nekolicinu, u odnosu na redukciju, nezavisnih varijabli. Ova metoda daje zadovoljavajući rezultat što omogućava uzimanje u obzir većine varijacija između glavnih komponenata i predviđanje zavisne varijable. Kod više varijabilnih kalibracija često se koristi ova tehnika (Miller i Miller, 2000.).

PCR metoda je korištena za povezivanje senzorskih svojstava svježeg sira s rezultatima fluorescentne spektroskopske analize (Dufour i sur., 2001.). Rezultati pokazuju visoku povezanost mreže proteina i teksturalnih svojstava sira.

Parcijalna metoda najmanjih kvadrata (PLS)

Ova metoda traži linearnu kombinaciju zavisnih varijabli, a onim varijablama koje pokazuju visoku korelaciju daje posebnu težinu. To znači da će ova metoda biti najdjelotvornija kod predviđanja. Ovim načinom ostvaruje se visoka korelacija između nezavisnih i zavisnih varijabli. Razlika ovisi o situacijama kad odgovor ovisi o pojedinačnim varijablama (PLS1) i kad odgovor ima više varijabli (PLS2) (Miller i Miller, 2000.).

PLS metoda se obično koristi kod kalibracije kad je spektar linearno proporcionalan koncentraciji ispitivane tvari (Petersen, 2007.).

Zaključak

Spektroskopske tehnike čine najvažniju skupinu instrumentalnih tehnika u analizi mlijeka i mliječnih proizvoda. One omogućavaju dobivanje velikog broja kvalitativnih i kvantitativnih informacija, bez obzira prati li se tehnološki proces ili gotovi proizvod. Ovisno o principu na kojem se zasnivaju te izvedbe, spektroskopske se tehnike mogu primjenjivati u laboratoriju i industrijskom pogonu. Danas postoji veliki broj spektroskopa koji se primjenjuju u svakodnevnoj rutinskoj analitici za analizu mlijeka i mliječnih

proizvoda. Spektroskopi se koriste i za analizu ukupnog broja mikroorganizama u mlijeku, a rade na principu FTIR tehnologije.

Kvalitativna i kvantitativna analiza pojedinih sastojaka u složenim sustavima može biti problematična zbog preklapanja spektralnih odgovora, a kao idealan put za rješenje tog problema je kemometrija. Kemometrija, osim što se koristi u laboratoriju, ima velik značaj i u industrijskoj primjeni. Kod umjeravanja velikog broja slučajnih varijabli svakodnevno se koriste kemometrijske metode u praćenju procesa proizvodnje ili kontroli kvalitete. Najčešća primjena kemometrije je u analizi skupa podataka dobivenih mjerenjima i utvrđivanje njihove međusobne funkcionalne zavisnosti.

Spektroskopske tehnike u kombinaciji sa kemometrijskim metodama čine vrijedan alat za praćenje procesa i u upravljanju kontrolom kvalitete.

THE USE OF SPECTROSCOPIC TECHNIQUES AND CHEMOMETRIC METHODS IN MILK TECHNOLOGY

Summary

The use of spectroscopic techniques is on the rise in food industry, and the answers they provide facilitate problem solving in food production and distribution. The application of spectroscopic techniques in dairy technology allows quick and cheap qualitative and quantitative analyses, and is essential in describing the structure and texture properties of dairy products. The qualitative and quantitative analyses of individual components in composite systems may be problematic due to overlaps in spectral responses. An ideal tool to solve this problem is chemometry, a discipline using mathematical and statistical methods to design or choose an optimum measuring procedure or experiment, and to facilitate obtaining the maximum number of information by analysing the data provided. Chemometry is most frequently used in the analysis of data groups and recognition of mathematic models. Spectroscopic techniques combined with chemometric methods make a valuable tool for process monitoring and quality control management.

Key words: spectroscopy, chemometry, milk, milk produc

Literatura

ADAMOPOULUS, K.G., GOULA, A.M., PETROPAKIS, H.J. (2001): Quality control during processing of Feta cheese – NIR Application, *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 431- 440.

ANDERSEN, T., BREMS, N., BØRGLUM, M.M., KOLD-CHRISTENSEN, S., HANSEN, E., JØRGENSEN, J.H., NYGAARD, L. (1986): Modern Laboratory Practice-1: Chemical Analyses, *Modern Dairy Technology: Advance in Milk Products*, volumen 2, (Robinson, R.K.), Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, 307-343.

BARABÁSSY, S. (2001): The application of near infrared spectroscopy (NIR) technique for non-destructive investigation of mixed milk powder products, *Mljekarstvo*, 51 (3), 263-272.

BELLOQUE, J., SMITH, G.M. (1998): Thermal denaturation of lactoglobulin A ¹H-FT-NMR study, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1805-1813.

BOLZONI, G., MARCOLLINI, A., VARISCO, G. (2001): Evaluation of Bactoscan FC 2 stability, repetability, carry-over and linearity, *Milchwissenschaft*, 56 (6), 318-321.

CASAL, H.L., MANTSCH, H.H. (1984): Polymorphic phase behavior of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 72 (7), 382-401.

CATTANEO, T.M.P., GIARDINA, C., SINELLI, N., RIVA, M., GIANGIACOMO, R. (2005): Application of FT-NIR and FT-IR spectroscopy to study the shelf-life of Crescenza cheese, *International Dairy Journal*, 15, 693-700.

CHALAND, B., MARIETTE, F., MARCHAL, P., CERTAINES, J. (2000): Nuclear magnetic resonance relaxometric characterization of fat and water states in soft and hard cheese, *Journal of Dairy Research*, 67 (4), 609-618.

DUFOUR, E., DEVAUX, M.F., FORTIER, P., HERBERT, S. (2001): Delineation of structure of soft cheese at molecular level by fluorescence spectroscopy-relationship with texture, *International Dairy Journal*, 11 (4-7), 465-473.

DUFOUR, E., GENOT, C., HAERTLÉ, T. (1994): β -lactoglobulin binding properties during its folding changes by fluorescence spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205 (1), 105-112.

DUFOUR, E., RIAUBLANC, A. (1997): Potentiality of spectroscopic methods for the characterisation of dairy products, I-Front-face fluorescence study of raw, heated and homogenised milks, *Le Lait*, 77 (6), 657-670.

FAGAN, C.C., EVERARD, C., O'DONNELL, C.P., DOWNEY, G., SHEEHAN, E.M., DELAHUNTY, C.M., O'CALLAGHAN, D.J., HOWARD, V. (2007): Prediction of processed cheese instrumental texture and meltability by mid-infrared spectroscopy coupled with chemometric tools, *Journal of Food Engineering*, 80, 1068-1077.

FAGAN, Y., DALGLEISH, D.G. (1998.): The conformation of α -lactalbumin as a function of pH, heat treatment and adsorption at hydrophobic surface studied by FTIR, *Food Hydrocolloids*, 12, 121-126.

FOSS Analytical (2007): www.foss.dk, 05.10.2007.

FOX, P.F. (1989): The milk protein system, *Developments in dairy chemistry*, (urednik Fox, P.F.), Elsevier Applied Science, New York, 1-54.

GIARDNA, C., SINELLI, N., CATTANEO, T.M.P., GIANGIACOMO, R. (2004): 2D-IR-COSS as a tool in understanding milk rennet coagulation processes, *Proceeding 11th international conference on near infrared spectroscopy*, 187-190.

GÜNZLER, H., GREMLICH, H.U. (2006): *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, (preveli Meić, Z., Baranović, G.), Školska knjiga, Zagreb.

HERMIDA, M., GONZALES, J.M., SANCHEZ, M., RODRIGUEZ-OTEROB, J.L. (2001): Moisture, solid-non fat and fat analysis in butter by near infrared spectroscopy, *International Dairy Journal*, 11, 93-98.

HEWAVITHARANA, A.K., VAN BRAKEL, B. (1997): Fourier transformation infrared spectrometric method for rapid determination of casein in raw milk, *The Analyst*, 122, 701-704.

HOFMANN, M. (2004): Whey protein production control goes on-line for optimum yield, *In Focus*, 28 (2), 15.

IRUDAYARA, J. (1999): Texture development in cheddar cheese during ripening, *Canadian Biosystems Engineering*, 41 (4), 253-258.

KAROUI, R., DE BAERDEMAEKER, J. (2007): A review of analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of quality and identity of dairy products, *Food Chemistry*, 102, 621-640.

KAROUI, R., DUFOUR, É., DE BAERDEMAEKER, J. (2006): Common components and specific weights analysis: A tool for monitoring the molecular structure of semi-hard cheese throughout ripening, *Analytica Chimica Acta*, 572, 125-133.

KAROUI, R., DUFOUR, É., DE BAERDEMAEKER, J. (2007): Front face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric tools for monitoring the oxidation of semi-hard cheeses throughout ripening, *Food Chemistry*, 101, 1305-1314.

KAROUI, R., MAZEROLLES, G., DUFOUR, É. (2003): Spectroscopic techniques coupled with chemometric tools for structure and texture determinations in dairy products, *International Dairy Journal*, 13, 607-620.

KITTIVACHRA, R., SANGUANDEEKUL, R., SAKULBUMRUNGSIL, R., PHONGPHANPHANEE, P., SRISOMBOON, J. (2006): Determination of essential nutrients in raw milk, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 28 (1), 115-120.

KUHLMAN, E. (2004): Inline analysis solutions for the dairy and meat industries ensure new levels of product quality, *In Focus*, 28 (2), 8-10.

LEFÉVRE, SUBIRADE, M. (2000): Interaction of β -lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy, *International Journal of Biological Macromolecules*, 28, 59-67.

- LUCAS, T., LE RAY, D., BAREY, P., MARIETTE, F. (2005): NMR assessment of ice cream: effect of formulation on liquid and solid fat, *International Dairy Journal*, 15, 1225-1223.
- MALJKOVIĆ, D. (1992): Spektrometrija, *Tehnička enciklopedija*, Sv. 12, Leksikografski Zavod "Miroslav Krleža", Zagreb, 150-178.
- MATHIAS, O. (2007): *Chemometrics*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- MAZEROLLES, DEVAUX, M.F., DUFOUR, E., QANNARI, E.M., COURCOUX, P. (2002): Chemometric methods for the coupling of spectroscopic techniques and for the extraction of relevant information contained in the spectral data tables, *Chemometric and Intelligent Laboratory Systems*, 63, 57-68.
- MAZEROLLES, G., DEVAUX, M.F., DUBOZ, G., DUPLOYER, M.H., MOUHOURIOU, N., DUFOUR, E. (2001): Infrared and fluorescence spectroscopy for monitoring protein structure and interaction changes during cheese ripening, *Le Lait*, 81 (4), 509-527.
- MIKULEC, N., SAMARŽIJA, D., ANTUNAC, N., ZAMBERLIN, Š., KULIŠ, Z., HORVAT, I. (2004): Parametri validacije instrumentalne metode za utvrđivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku, *Mljekarstvo*, 54 (4), 299-314.
- MILLER, J.N., MILLER, J.C. (2000): *Statistic and chemometric for analytical chemistry*, fourth edition, Pearson Education Limited.
- MILLS, R. (2005a): Near infrared analysis: NIR to go, *In Focus*, 29 (2), 19-20.
- MILLS, R. (2005b): Tradition and technology - the components of success for Mullins Cheese, *In Focus*, 29 (1), 14-15.
- MILLS, R. (2006): BactoScan™ FC: Beating bacteria in milk, *In Focus*, 30 (2), 8-9.
- O'CALLAGHANA, D.J., O'DONNELL, C.P., PAYNEC, F.A. (2000): On-line sensing technique for coagulum setting in renneted milks, *Journal of Food Engineering*, 43, 155-165.
- PETERSEN, P.E. (2007): All you ever wanted to know about chemometrics – but didn't like to ask, *In Focus*, 31 (1), 22-23.
- PICQUE, D., CATTENOZ, T., CORRIEU, G. (2002): Discrimination of Emmental cheeses by infrared spectroscopy, *Milchwissenschaft*, 57 (4), 202-204.
- PINE, S.H. (1994): *Organska kemija*, 3. promijenjeno izdanje, (preveli Bregovec, I., Rapić, V.), Školska knjiga, Zagreb.
- RODRIGUEZ-OTERO, J.L., HERMIDA, M. (1996): Analysis of fermented milk products by near infrared reflectance spectroscopy, *International Journal of AOAC*, 79 (3), 817-821.
- RODRIGUEZ-OTERO, J.L., HERMIDA, M., CENTENO, J. (1997): Analysis of dairy product by near infrared spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (8), 2815-2819.
- SAMARŽIJA, D., ANTUNAC, N., POGAČIĆ, T., SIKORA, S. (2004): Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku metodom protočne citometrije, *Mljekarstvo*, 54 (1), 39-51.

SCHAMBERGER, G.P., LABUZA, T.P. (2006): Evaluation of front-face fluorescence for assessing thermal processing of milk, *Journal of Food Science*, 71, 69-74.

SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J. (1999): *Osnove analitičke kemije*, (preveli Kujundžić, N., Živčić-Alegretti, V., Živković, A.), Školska knjiga, Zagreb.

UPRETI, P., METZGER, L.E. (2006): Utilization of Fourier transform infrared spectroscopy for measurement of organic phosphorus and bound calcium in cheddar cheese, *Journal of Dairy Science*, 89 (6), 1926-1937.

WOLD, S., SJÖSTRÖM, M. (1998): Chemometric, present and future success, *Chemometric and Intelligent Laboratory Systems*, 44, 3-14.

Adrese autora - Autor's addresses:

Mr. sc. Bojan Matijević
Marijana Blažić, dipl. ing.
Veleučilište u Karlovcu
Odjel prehrambene tehnologije
Trg J.J. Strossmayera 9, Karlovac

Prispjelo - Received: 22.12.2007.

Prihvaćeno - Accepted: 11.04.2008.