

Rychlé a simultánní stanovení kvalitativních parametrů piva pomocí FT-NIR spektroskopie

Rapid and Simultaneous Analysis of Qualitative Parameters of Beer by FT-NIR Spectroscopy

Jana OLŠOVSKÁ¹, Pavel ČEJKA¹, Jiří ČULÍK¹, Karel ŠTĚRBA, Ladislav TENKL²

¹ Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Lípová 15, 120 44 Praha 2 / Research Institute of Brewing and Malting, plc., Lípová 15, CZ 120 44 Praha 2

² Nicolet CZ s.r.o., Křelovická 970, 104 00 Praha 10 / Nicolet CZ s.r.o., Křelovická 970, CZ 104 00 Praha 10

e-mail: olsovska@beerresearch.cz

Recenzovaný článek / Reviewed paper

Olšovská, J. – Čejka, P. – Čulík, J. – Štěřba, K. – Tenkl, L.: Rychlé a simultánní stanovení kvalitativních parametrů piva pomocí FT-NIR spektroskopie. Kvasny Prum. 61, 2015, č. 7–8, s. 212–220

V této studii byly vyvinuty kalibrační modely pro simultánní stanovení alkoholu, skutečného extraktu, energetické hodnoty, celkového obsahu sacharidů a dalších sloučenin v pivu za použití infračervené spektroskopie v blízké oblasti s Fourierovou transformací (FT-NIR). Korelace mezi získanými FT-NIR spektry a analytickými daty byla provedena pomocí multivariačního algoritmu metody parciálních nejmenších čtverců (PLS). Testovaná piva byla vyrobena z ječmene ze dvou po sobě jdoucích sklizní. Kalibrační model pro FT-NIR byl sestaven z dat naměřených referenčními metodami a byl ověřen pomocí průměrné kvadratické odchylky kalibrace (RMSEC), odchylky křížové validace (RMSECV) a chyby predikce (RMSEP). Získané kalibrační modely pro energetickou hodnotu, alkohol, skutečný extrakt a obsah sacharidů jsou stabilní a spolehlivé. Dlouhodobá platnost kalibrace byla ověřena srovnáním externích validačních parametrů, vyjádřených jako RMSEP_{ex}.

Olšovská, J. – Čejka, P. – Čulík, J. – Štěřba, K. – Tenkl, L.: Rapid and simultaneous analysis of qualitative parameters of beer by FT-NIR Spectroscopy. Kvasny Prum. 61, 2015, No. 7–8, pp. 212–220

Calibration models were developed for simultaneous analysis of alcohol, real extract, energy value, total saccharides and other features in beer using Fourier-transform near-infrared (FT-NIR) spectroscopy. The recorded FT-NIR spectra were correlated to the analytical data of reference methods by means of the multivariate PLS algorithm. Two groups of test beers were made from barley from two consecutive harvests. A calibration model for FT-NIR was set up using data from reference methods and was selected by means of the error of calibration (RMSEC), cross-validation (RMSECV), and the root-mean-square-error of prediction (RMSEP). It was found that calibration models for energy value, alcohol, real extract and the content of saccharides are stable and reliable. The long-term effect of calibration was evaluated by comparing external validation parameters, expressed as RMSEP_{ex}.

Olšovská, J. – Čejka, P. – Čulík, J. – Štěřba, K. – Tenkl, L.: Schnelle und simultane Bestimmung der qualitativen Parameter des Bieres mittels FT-NIR Spektroskopie. Kvasny Prum. 61, 2015, Nr. 7–8, S. 212–220

Im Artikel wird eine Entwicklung der für eine simultane Bestimmung des Alkohols, des wirklichen Extrakts, der energetischen Wertes, des gesamten Gehalts an Kohlenhydraten und weitere Verbindungen im Bier entwickelte Kalibrationsmodelle unter Anwendung der Infrarotspektroskopie im den näheren Bereich mit Fouriertransformation (FT-NIR) beschrieben. Die Korrelation zwischen FT-NIR Spektren und analytischen Dateien wurde durch MV Algorithmus der Methode der partiellen kleinsten Quadrate durchgeführt (PLS). Das getestete Bier wurde aus dem Gerstenmalz hergestellt, die angewandte Gerste zur Malzherstellung wurde in zwei folgenden Jahren geerntet. Für die FT-NIR wurde das Kalibrationsmodell aus den durch Referenzmethoden gemessenen Dateien zusammengefasst und mittels durchschnittlichen quadratischen Kalibrationsabweichungen (RMSEC), Kreuzvalidationsabweichungen (RMSECV) und Prediktionsfehler (RMSEP) geprüft. Für energetische Werte, wirklichen Extrakt Alkohol, und Gehalt an Sachariden sind die erworbene Kalibrationsmodelle stabil und zuverlässig. Die langjährige Gültigkeit der Kalibration wurde durch den Vergleich von, als RMSEP_{ext} ausgedrückten externen Validationsparametern bestätigt.

Klíčová slova: FT-NIR, pivo, alkohol, extrakt, energetická hodnota, sacharidy, hořké látky, proteiny, polyfenoly

Keywords: FT-NIR, beer, alcohol, extract, energy value, saccharides, bitter compounds, proteins, polyphenols

1 ÚVOD

Stanovení základních analytických parametrů piva je důležitou součástí posouzení jeho kvality. Podobně jako v jiných odvětvích, i v pivovarství se klade velký důraz nejen na přesnost výsledků, ale i na rychlost analýzy (high-throughput = vysoká průchodnost vzorku). Obvykle se pro stanovení běžných komponent piva používají jednoduché analyzátoři. Například pro stanovení obsahu alkoholu a relativní hustoty vzorku jsou běžně užívány referenční metody jako destilační metoda nebo pycnometrické stanovení. Pro stanovení hustoty lze také využít oscilační hustoměry nebo refraktometry. Kromě organoleptického posouzení a základního rozboru piva (extrakt, alkohol) jsou v rámci rozšířeného rozboru stanovovány také např. hořké látky, a to spektrofotometricky, a těkavé látky, pomocí plynové chromatografie. Příprava vzorku pro jednotlivé analýzy vyžaduje svůj čas, a to se samozřejmě promítá do celkové ceny analýzy. Z těchto

1 INTRODUCTION

Determination of basic analytical parameters of beer is an important part of the assessment of its quality. As in other fields, in the brewing industry the focus is currently not only on the accuracy of the results but also on the speed of analysis (high-throughput). Conventionally, a separate instrument is required for the analysis of each component in beer. For example, alcohol content and specific gravity are usually determined by reference methods like distillation and pycnometry or by analytical instruments which combine an oscillation-type densitometer and refractometry. In addition to organoleptic examination and a standard beer analysis, bitter substances are assessed for instance by spectrophotometry and volatile compounds using gas chromatography. As a result of sample preparation required for these methods, beer analysis is both time-consuming and expensive. Therefore, automated instruments are increasingly used

důvodů se v pivovarské analytice stále více používají automatické přístroje, které dokáží v krátkém čase stanovit celou řadu analytických parametrů, jako např. extrakt, alkohol, energetická hodnota, zákal, pH, obsah kyslíku a oxidu uhličitého. Tyto přístroje jsou vysoce specializované a jsou sestaveny výhradně pro analýzu sladiny a piva (Anonymus, 2015a; Anonymus, 2015b; Anonymus, 2015c; Anonymus, 2015d). Lze je charakterizovat vysokou přesností a jednoduchou obsluhou. Nevýhodou je omezená použitelnost pro pivovarské suroviny a meziproducty (ječmen, slad, chmel atd.), tj. pro pevné matrice, nebo pro jiné nápoje (víno, nealkoholické nápoje).

V roce 2009 Marte et al. publikoval studii, ve které byl stanoven obsah vody, celkového dusíku a celkových lipidů ve sladu a kukuřiči pomocí techniky FT-NIR (infračervená spektroskopie v blízké IČ oblasti s Fourierovou transformací) (Marte et al., 2009). O rok dříve byla publikována podobná práce kolektivem českých autorů, kteří demonstrovali použití NIR spektroskopie na stanovení extraktu sladu, bílkovin ve sladu, rozpustného dusíku v kongresní sladině, relativního extraktu při 45 °C a Kolbachova čísla (Brož et al., 2008). V roce 2013 byly publikovány nové validační postupy a ověřována dlouhodobá funkčnost kalibračních modelů (Sileoni et al., 2013). Autoři vyvinuli stabilní a spolehlivé kalibrační modely pro stanovení kvality ječmene a sladu. Stanovovanými parametry byly extrakt, prokvašení, pH, rozpustný dusík, viskozita, friabilita a volný aminodusík. To vedlo k myšlence použití této univerzální metody také v pivovarské analytice. Vzhledem k obecně nižší citlivosti IR metod a vyšším nárokům na kalibraci byly pro tuto pilotní studii vybrány takové analyty, jejichž koncentrace by mohla vyhovovat citlivosti použité FT-NIR techniky.

Infračervená spektroskopie patří do skupiny metod molekulové spektroskopie. Během interakce elektromagnetického záření s měřeným vzorkem se excitují typické skupiny nebo vazby v molekulách, které absorbují záření s určitým množstvím energie. Tak vznikají charakteristická spektra složená z tzv. vibračních absorpčních pásů (Griffiths, de Haseth, 2007). V 80. letech 20. století prošla infračervená spektroskopie významnými změnami ve formě spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR). Ve srovnání s disperzní infračervenou spektroskopií dosahuje tato metoda vyšší citlivosti (množství energie dopadající na detektor je asi o dva řády vyšší (Jacquinotova energetická výhoda), téměř absolutní vlnočtová přesnost (tzv. Connesova výhoda) a nesrovnatelně vyšší poměr signálu vůči šumu. Infračervená spektroskopie v blízké oblasti je oborem vibrační spektroskopie využívající energii fotonů ($h\nu$) v rozsahu $2,65 \times 10^{-19}$ J až $7,96 \times 10^{-20}$ J, což odpovídá vlnové délce 750 – 2500 nm (vlnčet 13300 – 4000 cm^{-1}) (Angelino, 1996). FT-IR a FT-NIR spektrometry se vyznačují jednoduchostí mechanického designu a minimálním rozptylem světla na jednotlivých prvcích optické lavice. Univerzálnost FT-NIR techniky je dána možností využití korelace mezi spektrem a chemicko-fyzikálními parametry analytu za využití chemometrických metod.

Zatímco klasické filtrové nebo disperzní NIR spektrometry jsou již v pivovarském průmyslu používány k analytickému posouzení surovin, zejména sladu, pro stanovení vlhkosti, obsahu bílkovin (Pasquini, 2003) nebo alkoholu (Analytica EBC 9.26, 2009; Castritius et al., 2010), metody používající víceúčelové FT-NIR spektrometry (schéma znázorněné na obr. 1) pro tekuté matrice na bázi piva nebyly dosud publikovány. Nicméně pro jiné nápoje již byly metody používající tuto techniku popsány. Rodriguez-Saona et al. (2001) popsali me-

in brewing laboratory practice, which can in a short time determine a number of analytical parameters such as extract, alcohol, energy, haze, along with pH and also oxygen and carbon dioxide contents. These devices are highly specialized and are designed exclusively for wort and beer analysis (Anonymus, 2015a; Anonymus, 2015b; Anonymus, 2015c; Anonymus, 2015d). They are characterized by high precision of determination and their operation is relatively simple. The disadvantage is their minimal application to other brewing raw materials or intermediates (barley, malt, hops, etc.), i.e. for solid matrices, or for other beverages (wine, soft drinks).

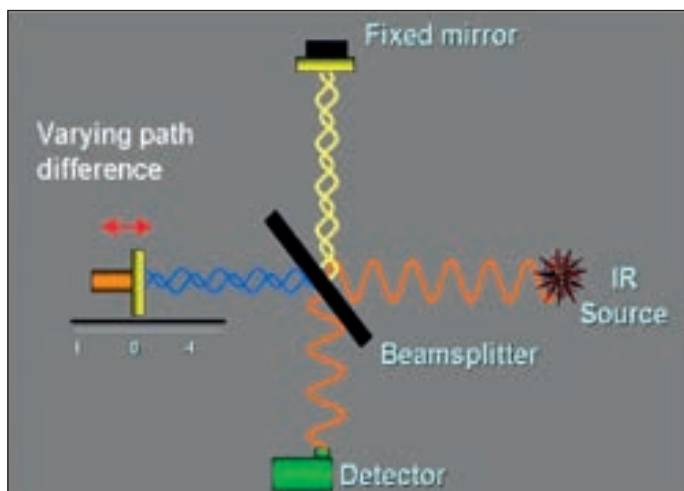
In 2009, Marte et al. published a study which used FT-NIR spectroscopy for the determination of moisture content, total nitrogen and total lipids in malt and maize (Marte et al., 2009). A year earlier, a team of Czech authors was published similar study which demonstrated the usage of NIR spectroscopy to determine the malt extract, malt protein, soluble nitrogen in congress sweet wort, relative extract at 45 °C and Kolbach number (Brož et al., 2008). An evaluation of different validation strategies and long-term effects in NIR calibration models was published in 2013 (Sileoni et al., 2013). The authors developed stable and reliable NIR calibration models for barley and malt quality assessment. The measured parameters are: fine extract, fermentability, pH, soluble nitrogen, viscosity, friability and free amino nitrogen. This led us to the idea to use this universal technique also for beer analysis. Given the lower sensitivity of IR methods in general and higher demands on the calibration, this pilot study used pre-selected chemical parameters that could be used for FT-NIR analysis of beer.

Infrared spectrometry belongs to the group of molecular spectroscopy methods. Interaction of electromagnetic radiation with the measured sample involves the excitation of typical groups or bonds in the molecules, which absorb radiation of a certain amount of energy. This produces a characteristic spectrum composed of so-called vibrational absorption bands (Griffiths, de Haseth, 2007). In the 80's of the 20th century infrared spectrometry underwent a significant change in the form of Fourier transform spectroscopy (FTIR). Compared with dispersive infrared spectrometry, this method exhibits a higher sensitivity, two orders of magnitude higher energy flow (called Jacquinot energy advantage), an almost absolute wave number accuracy (called Connes advantage) and incomparably higher signal to noise ratio. Near-infrared spectroscopy is a type of vibrational spectroscopy that employs photon energy ($h\nu$) in the energy range from 2.65×10^{-19} to 7.96×10^{-20} J, which corresponds to the wavelength range of 750-2500 nm (wavenumbers 13300–4000 cm^{-1}) (Angelino, 1996). FTIR and FT-NIR spectrometers feature simplicity of mechanical design and minimal light scattering on individual elements of the optical bench. Moreover, the universal capacity of the FT-NIR technique is based on chemometrics, and allows for a correlation between the spectra and chemical and physical parameters of the analyte.

While the classical filter and dispersive NIR spectrometers are used in the brewing industry for the analytical evaluation of raw materials, particularly malt, and for determining the moisture and protein (Pasquini, 2003) or alcohol (Analytica EBC 9.26, 2009; Castritius et al., 2010) content, methods using more versatile FT-NIR spectrometers (whose scheme is shown in Fig. 1) for liquid beer matrices have not yet been published. However, methods using this technique for the analysis of other beverages were described. Rodriguez-Saona et al. (2001) described a method for the determination of total sugars in fruit juices. They selectively determined glucose, fructose and sucrose with 0.10% error of prediction. For the actual measurement they used transmission technique and 0.5 mm cuvettes. Mehrotra et al. accomplished determination of alcohol, sugar and tartaric acid in alcoholic beverages and they proposed a device that monitors the concentration of these components during manufacture online (Mehrotra et al., 2005).

The aim of this study was to develop FT-NIR spectroscopic methodology for the rapid determination of some basic analytical parameters in samples of different types of beers. They include the content of alcohol and real extract, which is the sum of all extractive substances in beer. These basic parameters are defined in terms of type of beer legislation (such as non-alcoholic beer, draft beer, lager, strong special beer). Energy value (EV) of beer and total amount of carbohydrates in beer provide important information in terms of its nutritive value. Carbohydrates constitute the main part of real extract of beer and are contained in beer in the form of simple sugars (mono- and disaccharides), oligosaccharides and dextrins. The content of bitter substances, represented by isomers of bitter acid, is related to the bitterness of beer, diacetyl (2,3-butanedion) adversely affects the taste of the beer, and is considered an important technological pa-

Obr. 1 Schéma FT-NIR spektrometru / Fig. 1 The scheme of FT-NIR spectrometer



tođu pro stanovení celkových cukrů v ovocných džusech. Selektivně stanovili glukosu, fruktosu a sacharosu s chybou predikce 0,10 %. Pro vlastní měření byla použita transmisní technika a kyvety o optické dráze 0,5 mm. Mehrotra et al. provedl stanovení alkoholu, cukru a kyseliny vinné v alkoholických nápojích a navrhl zařízení k on-line sledování koncentrací těchto analytů během výroby (Mehrotra et al., 2005).

Cílem této studie bylo vyvinout FT-NIR spektroskopickou metodu pro rychlé stanovení vybraných parametrů ve vzorcích různých typů piv (nealkoholické pivo, výčepní pivo, ležák, tmavé pivo, beercooler). Proto byl vytvořen kalibrační model pro FT-NIR instrumentaci pomocí referenčních metod. Pro tento experiment byly vybrány základní parametry piva, tj. obsah alkoholu a skutečný extrakt, dále energetická hodnota (EV) a celkový obsah sacharidů v pivu, které poskytují důležitou informaci o nutriční hodnotě. Sacharidy představují největší část skutečného extraktu piva a vyskytují se ve formě jednoduchých cukrů (mono- a disacharidy), oligosacharidů a dextrinů. Dále byl kalibrační model vytvořen pro hořké látky ve formě izomerovaných hořkých kyselin, které jsou důležitým technologickým parametrem, a diacetyl (2,3-butandion), který nepříznivě působí na chuť piva. Byl rovněž ověřen kalibrační model obsahu celkových polyfenolů a bílkovin, které mají vliv na koloidní stabilitu piva.

Kalibrační modely pro FT-NIR, které byly vytvořeny na základě dat z referenčních metod, byly ověřeny pomocí průměrné kvadratické odchylky kalibrace (*RMSEC* z ang. Root Mean Square Error of Calibration, dále jen odchylka kalibrace), průměrné kvadratické odchylky křížové validace (*RMSECV* z ang. Root Mean Square Error of Cross Validation, dále odchylka křížové validace) a stanovením průměrné kvadratické odchylky predikce (*RMSEP*, z angl. Root Mean Square Error of Prediction, dále jen odchylka predikce). Pomocí srovnání externích validačních parametrů, vyjádřených jako *RMSEP_{ex}*, s přesností referenčních metod byla ověřena platnost a reprodukovatelnost dlouhodobých kalibrací. V závěru experimentu byla srovnána skupina testovaných piv se skupinami vzorků vín a vod pomocí shlukové analýzy kalibračních standardů.

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Popis experimentu

Vzorky piv byly zakoupeny v české tržní síti a pochází z velkých českých pivovarů. Tato piva byla uvařena z ječmenů ze sklizni 2011 a 2012. Vzorky byly analyzovány ve dvou pokusných sériích. První série obsahovala 50 vzorků uvařených ze surovin (ječmen) z roku 2011 (10 světlých výčepních piv, 10 světlých ležáků, 10 tmavých piv, 10 nealkoholických piv a 10 beercoolerů). Referenčními metodami byl v kalibračních standardech stanoven obsah alkoholu, skutečný extrakt, obsah bílkovin, obsah celkových sacharidů a energetická hodnota (EV). Současně byla změřena transmisní a transreflektační spektra u všech vzorků. Naměřená spektra byla použita k sestavení kalibračních modelů, které byly hodnoceny pomocí hodnoty *RMSEC*. Validační parametry byly ověřeny křížovou validací *RMSECV* a hodnotami predikce *RMSEP* interní validace. Druhá série obsahovala stejné značky piv jako první série, piva byla uvařena ze surovin (ječmen) ze sklizně 2012 a byla analyzována na FT-NIR po 6 měsících od vytvoření kalibračního modelu (tj. 6 měsíců po měření první série). Byla tak změřena transmisní spektra 28 světlých ležáků pro parametry: hořké látky, diacetyl, celkové polyfenoly a srovnány s hodnotami referenčních metod. Pomocí druhé série vzorků byla dále provedena verifikace kalibračních modelů obsahu alkoholu, skutečného extraktu a energetické hodnoty, vytvořených pomocí vzorků z první série.

2.2 Příprava vzorku

Pro měření na FT-NIR spektrometru byla piva pouze odplyněna: 300 ml piva bylo šetrně třepáno ve vzorkovnicích o objemu 1000 ml po dobu 20 minut. Vzorkovnice byla uzavřena a v uzavěru byl proražen malý otvor pro únik CO₂.

2.3 Referenční metody

Obsah alkoholu a skutečný extrakt byly stanoveny podle Analytiky EBC pomocí automatického analyzátoru DMA 4500 (Anton Paar GmbH, Rakousko) (Analytika EBC 9.4, 2009; Analytika EBC 9.26, 2009), spojující NIR alkolyzer a denzitometr s oscilující U-trubicí. Celkový obsah sacharidů byl stanoven pomocí HPLC/RI jako množství glukosy obsažené ve vzorku po enzymatickém štěpení (Jurková et al., 2014). Obsah hořkých látek byl stanoven spektrofotometricky (Analytika EBC 9.8, 2009), diacetyl pomocí HS/GC/ECD (Analytika

parameter. Total polyphenols and proteins affect colloidal stability of beer.

Calibration model for FT-NIR was performed using data from reference methods and was selected by means of the error of calibration (*RMSEC*), cross-validation (*RMSECV*), and the root-mean-square-error of prediction (*RMSEP*). The long-term effect of calibration was evaluated via comparison of external validation parameters, expressed as *RMSEP_{ex}*, with the accuracy of reference methods. Cluster analysis of calibration standards for group of non-alcoholic beers, beer coolers, light lagers, light beers and dark beers was compared with a group of water and wine samples.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Experimental design

Beer samples were supplied from Czech market and came from large Czech breweries. These beers were made from barley originating from the harvest of 2011 and 2012. The samples were analyzed in two experiments. The first serie consisted of 50 beers and was produced from raw material (barley) from the 2011 harvest (10 light beers, 10 light lagers, 10 dark beers, 10 non-alcoholic beers, 10 beer coolers). Reference methods were used to determine the content of alcohol, real extract, protein, total carbohydrates and energy value (EV). Transmission spectra and transmittance spectra of these samples were collected at the same time. The measured spectra served us to develop calibration models which were evaluated using the *RMSEC* value. Further, validation parameters were evaluated by *RMSECV* cross-validation and the values of *RMSEP* prediction of internal validation. The second series comprised the same brands of beer as the first series and was analyzed after 6 months. Beers in the second series were produced from raw materials (barley) from the 2012 harvest. This method was used to collect transmission spectra of 28 light lagers and the content of bitter substances, diacetyl and total polyphenols was simultaneously determined by reference methods. Moreover, this measurement included the verification of the calibration model used in the first experiment using external validation parameters of alcohol, real extract and energy value.

2.2 Sample preparation

Beer samples were only degassed prior to FT-NIR measurement: 300 ml of beer was placed into a 1000 ml stoppered flask and gently shaken for 20 minutes.

2.3 Reference Methods

Alcohol and real extract were determined according to the method of Analytika EBC on a dedicated NIR alcolyzer and DMA 4500 densitometer, respectively (Anton Paar GmbH, Austria) (Analytika EBC 9.4, 2009; Analytika EBC 9.26, 2009). Total content of carbohydrates was determined as the content of glucose after enzymatic cleavage using high performance liquid chromatography with refractive index detector (Jurková et al., 2014). The content of bitter substances was determined spectrophotometrically (Analytika EBC 9.8, 2009), diacetyl by using gas chromatography with electron capture detector and headspace injection (Analytika EBC 9.24.2, 2009), total nitrogen content using the Kjeldahl method (Analytika EBC 9.9.1, 2009) and total polyphenols using spectrophotometry (Analytika EBC 9.11, 2009). Energy value of alcoholic beers could be determined by DMA 4500 densitometer (*EV_{air}*) and it was calculated directly using implemented software from real extract and alcohol content values according to the EBC method (Analytika EBC 9.45, 2009). Energy value of non-alcoholic beer and beer coolers (*EV_{calc}*) was determined using the formula

$$EV_{calc} (kJ/100 ml) = (A \times 29) + (C \times 17) + (P \times 17)$$

where *A*, *C*, and *P* are the contents of alcohol, carbohydrates and proteins, respectively, according to the study of Olšovská et al. (2015). The 29, 17, and 17 constants are factors prescribed in EC Directive (90/496/EEC) for alcohol, carbohydrates and proteins, respectively (Analytika EBC 9.45, 2009, European Communities, 2006). All reference methods we used are validated, accredited (according to EN ISO/IEC 17025:2005) and routinely used in our laboratory.

2.4 FT-NIR measurement

The FT-NIR spectra were recorded using the Antaris II spectrometer (Thermo Scientific, Madison, USA) equipped with Omnic software for Antaris. All the samples were measured without any preparation. Data collection time for quantitative predictions of a single

EBC 9.24.2, 2009), celkový obsah dusíku pomocí Kjeldahlovy metody (Analytica EBC 9.9.1, 2009) a celkové polyfenoly spektrofotometricky (Analytica EBC 9.11, 2009). Energetickou hodnotu alkoholických piv lze stanovit pomocí DMA 4500 denzitometru (EV_{dir}) a byla vyhodnocena přímo z hodnot skutečného extraktu a obsahu alkoholu podle metody EBC (Analytica EBC 9.45, 2009) pomocí vlastního softwaru přístroje. Energetická hodnota nealkoholických piv a nápojů na bázi piva (EV_{calc}) byla stanovena pomocí vzorce

$$EV_{calc} (kJ/100 ml) = (A \times 29) + (C \times 17) + (P \times 17)$$

kde A , C a P jsou obsahy alkoholu A (% hm.), sacharidů C (g/100 ml) a bílkovin P (mg/l) v souladu se studií Olšovská et al. (2015). Konstanty 29, 17 a 17 jsou korekční faktory pro alkohol, sacharidy a proteiny podle EC nařízení (90/496/EEC) (Analytica EBC 9.45, 2009; European Communities, 2006). Všechny použité referenční metody jsou validované, akreditované (podle EN ISO/IEC 17025:2005) a rutinně používané.

2.4 Měření FT-NIR

FT-NIR spektra byla naměřena pomocí spektrometru Antaris II (Thermo Scientific, Madison, USA) vybaveného softwarem Omnic for Antaris. Kromě vytřepání CO_2 nebyly vzorky před analýzou nijak upravovány. Při použití transmisní techniky byla doba měření jednoho vzorku 20 s, při použití transflektanční techniky byla 25 s. Objem vzorku pro měření transmisní technikou byl 0,5 ml, pro měření transflektanční byl objem vzorku 2,0 ml. Při měření transmisního spektra byl vzorek v kyvetě temperován na 30 °C.

Kalibrační model pro příslušné analyty byl sestaven pomocí chemometrického programu Thermo Scientific TQ Analyst pro kvantitativní analýzu. Následně byla získána spektra kvantitativně analyzována na obsah alkoholu, skutečného extraktu, EV_{dir} , EV_{calc} , obsahu sacharidů, hořkosti, diacetylu, celkového dusíku a na obsah celkových polyfenolů. Tyto parametry byly predikovány pomocí FT-NIR spektra pro každý kalibrační standard. Spektra byla měřena v oblasti 10000 – 4000 cm^{-1} ; výsledné spektrum bylo získáno zprůměrováním z 50 scanů s rozlišením 8 cm^{-1} . Všechny modely PLS algoritmu byly zpracovány bez derivace, pouze pro model proteinů za použití transflektanční techniky byla spektra upravena 1. derivací. Pro všechny modely byla při výpočtu použita konstantní optická dráha. PLS modely (Gregoria, 2011) byly vytvořeny pro každou kvantitativní analýzu zvlášť. K vývoji kalibračních modelů pro jednotlivé analyty byly využity rozdílné oblasti spektra.

Vzorky, které vykazovaly velkou odchylku mezi naměřenými a predikovanými hodnotami, byly ze souboru vyloučeny.

Přesnost a robustnost kalibračního modelu byla ověřena pomocí vyjádření odchylky kalibrace ($RMSEC$), odchylky křížové validace ($RMSECV$) a odchylky predikce ($RMSEP$). Dobrý model by měl mít hodnoty těchto chyb nízké a rozdíly mezi nimi by měly být minimální. Navíc by tyto chyby měly být srovnatelné s hodnotami směrodatné odchylky referenční metody SD_R . Hodnoty odchylky kalibrace ($RMSEC$) byly vypočteny ze vzorků použitých v chemometrickém modelu podle vzorce

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum (c_{ie} - c_{ir})^2}{m_c}}$$

kde c_{ie} je vypočtená koncentrace i -tého kalibračního standardu, c_{ir} je zadaná hodnota i -tého kalibračního standardu a m_c je počet použitých kalibračních standardů.

Hodnoty odchylky křížové validace ($RMSECV$) byly stanoveny tak, že se postupně odstraní vždy jeden vzorek z chemometrického modelu a vytvoří se kalibrační model z ($i-1$) zbylých vzorků. Odstraněný vzorek se jako vzorek neznámý vloží do tohoto kalibračního modelu a vypočítají se příslušné statistické parametry. Takto se dále postupuje pro všechny vzorky modelu. Nakonec se vypočte hodnota $RMSECV$ z odchylek jednotlivých vzorků, která je dána vztahem

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum (c_{iecv} - c_{ircv})^2}{m_{cv}}}$$

kde c_{iecv} je vypočtená koncentrace i -tého standardu křížové validace, c_{ircv} zadaná hodnota i -tého standardu křížové validace a m_{cv} počet použitých standardů křížové validace.

Hodnota odchylky predikce ($RMSEP$) je kvalitativní parametr predikční schopnosti vytvořeného kalibračního modelu a byla stanovena použitím nezávislých validačních vzorků (interních nebo externích), které nebyly použity při tvorbě modelu.

standard sample for transmittance and transreflectance was approximately 20 and 25 seconds, respectively. Sample volume of 0.5 ml and 2 ml was used for transmittance and transreflectance sampling, respectively. When measuring by the transmission technique, the samples in the measurement cuvette were kept at 30 °C.

A calibration model was developed using the Thermo Scientific TQ Analyst software package for quantitative analysis. In this application, the spectra were then analyzed quantitatively for alcohol content, real extract, EV_{dir} , EV_{calc} , carbohydrates, bitterness, diacetyl, total nitrogen and polyphenol content. These parameters were predicted using a single FT-NIR spectrum for each of the sample standards. Spectra were collected between 10,000 and 4000 cm^{-1} ; the spectra were averaged from 50 scans with a resolution of 8 cm^{-1} . All models of the PLS algorithm were processed without derivation, only the transreflectance measurements for model of proteins were made with the 1st derivative. All spectra were mean-centered and the path length was constant. Partial Least Squares (PLS) (Gregoria, 2011) calibration models were developed for all quantitative analyses. Each component of this quantitative method was analyzed using different regions of the spectra.

The samples with a large difference between the true and predicted data and high spectral residuum were ignored as outliers.

The calibration model quality was quantified by the root mean square error of calibration ($RMSEC$), the root mean square error of cross-validation ($RMSECV$) and the root mean square error of prediction ($RMSEP$). A good model should have a low $RMSEC$, $RMSECV$ and $RMSEP$ with a small difference between each other. These errors should be similar to the standard deviation of the reference method SD_R . The root mean square error of calibration ($RMSEC$) values were calculated from the samples used in the chemometric model according to the formula

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum (c_{ie} - c_{ir})^2}{m_c}}$$

where c_{ie} is the calculated concentration of i -th calibration standard, c_{ir} is the entered value of the i -th calibration standard and m_c is the number of the reference standards.

The root mean square error of cross-validation ($RMSECV$) values were determined by removing one sample from the chemometric model, calculating the error of those samples from the model, and then repeating the calculation for the new sets of samples until all of the standards measured had been measured. $RMSECV$ is given by

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum (c_{iecv} - c_{ircv})^2}{m_{cv}}}$$

where c_{iecv} is the calculated concentration of i -th cross-validation standard, c_{ircv} is the value of the entered i -th cross-validation standard and m_{cv} is the number of cross-validation standards used.

The root mean square error of prediction ($RMSEP$) value is the quality parameter of the predictive ability of the calibration model so created and was determined by using independent validation samples (internal or external) not used in the building of the model.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum (c_{iecv} - c_{ircv})^2}{m_v}}$$

where c_{iecv} is the calculated concentration in the i -th validation standard, c_{ircv} is the set value of the i -th validation standard, and m_v is the number of validation standards.

Two types of standard deviations of the reference methods, SD_R , were used for evaluation of the agreement between the calibration model and reference methods. Standard deviations $SD_{r(REF)}$ were calculated from the repeatability of reference methods routinely used in our laboratory. The standard deviation $SD_{r(EBC)}$ was taken from Analytica EBC and was derived from repeatabilities determined in a collaborative trial. Standard deviations were calculated according to the equations:

$$SD_{r(REF)} = r_{95}/2.8$$

$$SD_{r(EBC)} = r_{95}/2.8, \text{ where}$$

r_{95} = repeatability

2.8 = conversion coefficient of repeatability to standard deviation ($1.96 \times \sqrt{2}$).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum (c_{iev} - c_{iv})^2}{m_v}}$$

kde c_{iev} je vypočtená koncentrace i-tého validačního standardu, c_{iv} zadaná hodnota i-tého validačního standardu a m_v počet použitých validačních standardů.

Pro zhodnocení shody mezi kalibračním modelem a referenčními metodami byly použity dva typy směrodatných odchylek referenčních metod SD_r . Směrodatné odchylky $SD_{r(REF)}$ byly vypočteny z opakovatelnosti referenčních metod rutinně používaných v naší laboratoři. Směrodatné odchylky $SD_{r(EBC)}$ byly převzaty z Analytiky EBC a byly získány z opakovatelnosti stanovené v rámci mezilaboratorních testů. Směrodatné odchylky byly stanoveny podle vztahů

$$SD_{r(REF)} = r_{95}/2,8$$

$$SD_{r(EBC)} = r_{95}/2,8$$

kde r_{95} je opakovatelnost a 2,8 je konverzní koeficient ($1,96 \times \sqrt{2}$).

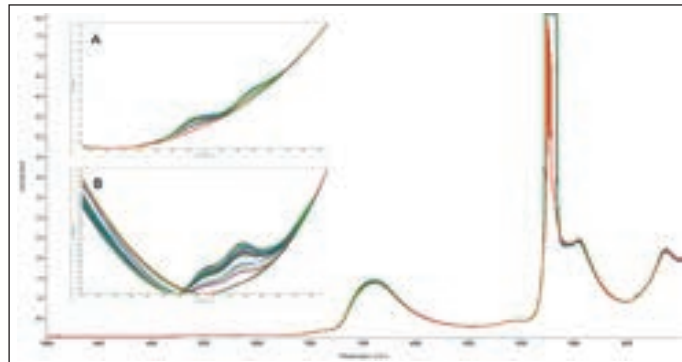
3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Ačkoliv byla měřena jak transmisní, tak i transreflektanční spektra, v následujícím textu jsou uvedeny výsledky získané ze spekter transmisních, jelikož transreflektanční kalibrační křivky nebyly dostatečně lineární a hodnoty rozdílu mezi $RMSEC$ a $RMSECV$ byly větší ve srovnání s transmisními daty. Transmisní FT-NIR spektra analyzovaných složek piva jsou znázorněna na obr. 2. Pík celkové absorpce mezi 5100 a 5300 cm^{-1} a pík s maximem při 6900 cm^{-1} patří vibracím -OH skupin v molekulách vody. Zvětšené detaily znázorňují drobné pásy ostatních analytů v oblastech 4500 – 4300 cm^{-1} (A) a 6000 – 5840 cm^{-1} (B).

3.1 Výsledky kalibrace

Kalibrační model byl vytvořen pomocí PLS algoritmu k predikci EV, obsahu alkoholu, skutečného extraktu, obsahu celkových sacharidů, proteinů, hořkosti, celkových polyfenolů a diacetylu. Kalibrační křivky byly vyhodnoceny pro každý analytický parametr, pro EV byly vytvořeny dva modely, a to pro EV_{dir} a EV_{calc} zvlášť. Hodnoty $RMSEC$ byly vypočteny ze vzorků použitých v kalibračních modelech a jsou uvedeny v tab. 1. Průměrné hodnoty z každé sady dat byly srovnány s daty ze standardních metod k ověření správnosti předpovědi jednotlivých kalibrací.

Obr. 2 Charakteristické FT-NIR absorpční spektrum piva měřené transmisní technikou / Fig. 2 Characteristic FT-NIR absorbance spectra of beer measured by transmittance
Spektra byla měřena v oblasti 10000 – 4000 cm^{-1} , spektra byla zprůměrována z 50 měření s rozlišením 8 cm^{-1} , zvětšená spektra v intervalu 4500 – 4300 cm^{-1} (A) a 6000 – 5840 cm^{-1} (B).
The spectra were collected between 10,000 and 4000 cm^{-1} ; the spectra were averaged from 50 scans with a resolution of 8 cm^{-1} ; a zoom of the spectrum at 4500 – 4300 cm^{-1} (A) and 6000 – 5840 cm^{-1} (B).



3 RESULTS AND DISCUSSION

Although both transmission and transmittance spectra were measured, only the results from transmission measurements are given in the following text, because the calibration curves obtained from transmittance were not linear enough and higher differences between $RMSEC$ and $RMSECV$ were obtained in comparison with transmission data. The FT-NIR spectra of analyzed beer components obtained by transmittance are presented in Fig. 2. The peak of total absorption ranging between 5100 and 5300 cm^{-1} and the peak with a maximum of 6900 cm^{-1} belong to vibration of -OH groups in water molecules. Zoomed images represent small bands of other analytes in the areas of 4500 – 4300 cm^{-1} (A) and 6000 – 5840 cm^{-1} (B).

3.1 Results of calibration

The calibration model was performed using a PLS method to predict the content of EV, alcohol, real extract, total saccharides, proteins, bitterness, total polyphenols and diacetyl. The calibration

Tab. 1 Výsledky FT-NIR kalibrace v pivu / Table 1 Results of FT-NIR calibration for beer

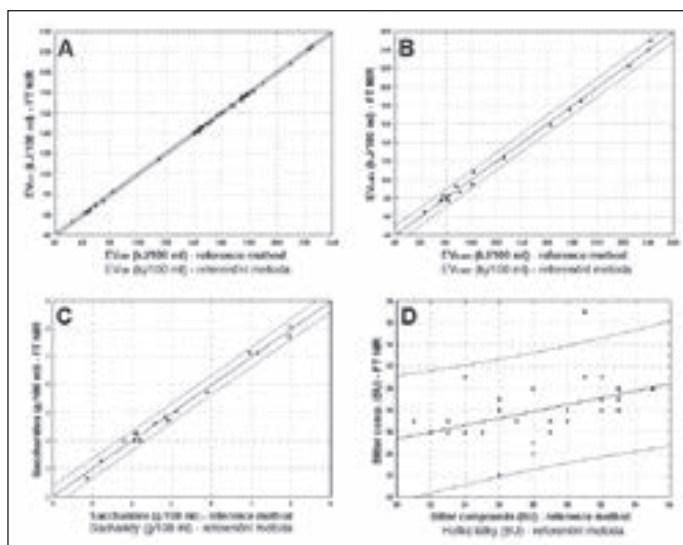
Srovnání opakovatelnosti FT-NIR metody a referenčních metod pomocí odchylky kalibrace kvadratických průměrů ($RMSEC$), odchylky křížové validace ($RMSECV$), predikce interní validace ($RMSEP$) a směrodatné odchylky referenčních metod stanovených laboratorně $SD_{r(REF)}$ a podle Analytiky EBC $SD_{r(EBC)}$.

Comparison between the repeatability of FT-NIR method and reference methods using errors of calibration ($RMSEC$), cross-validation ($RMSECV$), prediction of internal validation ($RMSEP$) and standard deviation of our own reference methods $SD_{r(REF)}$ and standard deviation of reference methods $SD_{r(EBC)}$ according to Analytica EBC.

Parametr	n^a	Počet vyloučených n number of ignored n	Počet faktorů number of factors	Jednotky units	Min hodnota min value	Max hodnota max value	Derivate derivation	$RMSEC$	$RMSECV$	$RMSEP$	$SD_{r(REF)}$	$SD_{r(EBC)}$
EV_{dir}	49	1	9	kJ/100 ml	52	225	spectrum / spectrum	0.77	1.05	1.85	2	4
EV_{calc}	17	2	3	kJ/100 ml	63	242	spectrum / spectrum	2.96	4.07	4.39	5	ND
Alkohol / Alcohol	49	1	8	% hm. / % (w/w)	0.10	4.00	spectrum / spectrum	0.02	0.03	0.03	0.015	0.012
Skutečný extract / Real extract	50	1	9	% hm. / % (w/w)	2.73	7.98	spectrum / spectrum	0.05	0.06	0.06	0.008	0.007
Sacharidy ^b / Saccharides	16	3	7	g/100 ml	2.86	7.97	spectrum / spectrum	0.07	0.14	0.32	0.15	ND
Bílkoviny / Proteins	8	–	4	mg/l	160	250	spectrum / spectrum	4	10	16	6	7
Hořké látky / Bitter substances	28	–	4	EBC JH	21	35	spectrum / spectrum	2.9	3.7	4.0	0.30	0.31
Celkové polyfenoly / Total polyphenols	28	–	3	mg/l	103	214	spectrum / spectrum	24	30	34	2	1.5
Diacetyl	28	–	11	mg/l	0.015	0.107	1 st	0.001	0.020	0.030	0.003	0.004

^a počet měření, ^b bez polyolů / ^a number of measurements, ^b without polyols

Obr. 3 Křížová validace vybraných parametrů: EV_{dir} (A), EV_{calc} (B), obsahu sacharidů (C) a obsahu hořkých látek (D) / Fig. 3 The cross-validation graphs of selected parameters: EV_{dir} (A), EV_{calc} (B), saccharide content (C), and bitter compounds (D)



Jak již bylo zmíněno, malý rozdíl mezi $RMSEC$ a $RMSEC_{CV}$ ukazuje na vysoce kvalitní a robustní chemometrický kalibrační model. Navíc, aby byla metoda opravdu přesná, měly by být tyto hodnoty blízké k hodnotám SD_n , v našem případě $SD_{r(REF)}$ a $SD_{r(EBC)}$. Všechny tyto hodnoty včetně $RMSEP$ (interní validace hodnot, které byly určeny pomocí nezávislých validačních vzorků nepoužitých pro tvorbu modelu), jsou uvedeny v tab. 1. V tabulce jsou uvedeny všechny stanovené parametry piva včetně těch, pro které byl pouze malý počet kalibračních standardů. Příklady grafů křížové validace pro EV_{dir} (A), EV_{calc} (B), obsah sacharidů (C) a hořké látky (D) jsou znázorněny na obr. 3.

Jak vyplývá z tab. 1, porovnání $RMSEC$, $RMSEC_{CV}$ a $RMSEP$, získané chemometrické modely jsou pro některé parametry správné a funkční, pro jiné však méně.

Energetická hodnota

Pro EV_{dir} jsou hodnoty SD_r a $RMSEC$ velmi blízké, pro EV_{calc} jsou hodnoty také podobné, ale vyšší, což je pravděpodobně způsobeno menším počtem kalibračních standardů. Stejný závěr vyplývá i z obrázků 3A a 3B. Je evidentní, že z praktického hlediska NIR metoda poskytuje spolehlivé výsledky energetické hodnoty.

Skutečný extrakt, obsah alkoholu a sacharidů

Hodnoty $RMSEC_{CV}$ a $RMSEP$ jsou identické, pro alkohol pouze dvakrát vyšší než referenční hodnoty $SD_{r(REF)}$ a $SD_{r(EBC)}$, pro extrakt je $RMSEC$ asi šestkrát vyšší než referenční hodnoty (tab. 1). Z hlediska potřeby přesnosti zjištění obsahu alkoholu je tato odchylka pro praktické měření pomocí NIR přípustná. Z obr. 3A, 3B a 3C vyplývá také dobrá shoda u křížové validace pro všechny tři analyzované parametry. Vytvořené chemometrické modely jsou tedy dostatečně přesné a vhodné pro praktické použití pro stanovení uvedených parametrů.

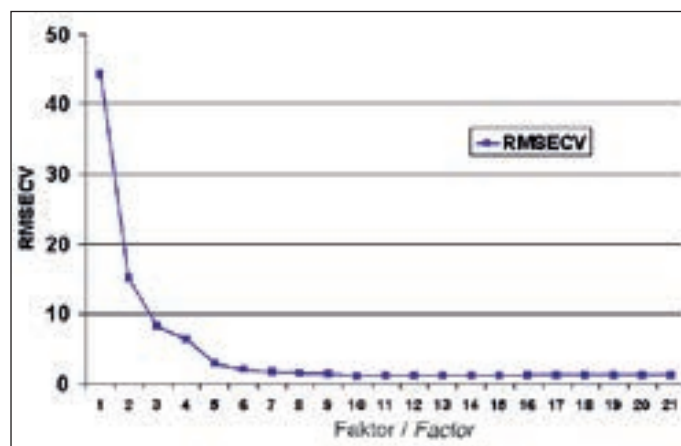
Bílkoviny

Výsledky jsou méně uspokojivé (byla zjištěna vyšší hodnota $RMSEP$ oproti $SD_{r(REF)}$ a $SD_{r(EBC)}$). Důvodem může být malý počet standardů nebo nízký rozsah hodnot obsahů, protože ze sady by bylo nutno vyloučit větší počet vzorků.

Obsah hořkých látek, celkových polyfenolů, diacetylů

Poměr $RMSEP$ vůči $SD_{r(REF)}$ a $SD_{r(EBC)}$ je pro tyto analyty velmi vysoký, obr. 3D také demonstruje nevyhovující výsledek křížové validace. Neshoda validačních odchylek s odchylkou referenční metody může být způsobena malým počtem kalibračních standardů, nicméně pravděpodobnější příčinou je nízká koncentrace stanovených parametrů, která nevyhovuje citlivosti FT-NIR metody. Přesnost metody pro tyto analyty je nedostačující.

Obr. 4 PRESS diagnostika kalibračního modelu pro EV_{dir} / Fig. 4 PRESS diagnostic of calibration model of EV_{dir}



curves were evaluated for each parameter; in case of EV two models were performed, where data from both EV_{dir} and calculated EV_{calc} methods were used. The values of $RMSEC$ were calculated from the samples used in the calibration model and are presented in Table 1. The average values from each data set were compared with those from standard methods to verify the predictivity of the calibrations.

As already mentioned, the high-quality, robust chemometric calibration model used to calculate the small number of factors shows a small difference between $RMSEC$ and $RMSEC_{CV}$. Furthermore, due to the accuracy of the methods these values should be close to the values of SD_n , in our case $SD_{r(REF)}$ and $SD_{r(EBC)}$. All these values, together with $RMSEP$ (internal validation of the values which were determined using independent validation samples not used in building the model) are given in Table 1. The table lists all determined parameters of the beers, including those for which the number of calibration standards is low. Examples of cross-validation graphs for EV_{dir} (A), EV_{calc} (B), saccharide content (C) and bitter compounds (D) are also presented in Fig. 3.

As follows from Table 1, when $RMSEC$, $RMSEC_{CV}$ and $RMSEP$ are compared, the chemometric models so obtained are correct and functional for some parameters and less so for others.

Energy value

The values SD_r and $RMSEC$ are very close for model EV_{dir} ; for the EV_{calc} model both values are also similar but higher (Table 1), which is probably due to the lower number of the calibration standards. The same conclusion follows from Figures 3A and 3B. It is evident that from a practical standpoint the NIR method provides satisfactory results for the energy value.

Alcohol, real extract and saccharides

The values of $RMSEC_{CV}$ and $RMSEP$ are identical and only about 2-fold higher for alcohol than the reference values of $SD_{r(REF)}$ and $SD_{r(EBC)}$. In case of extract, $RMSEC$ is 6-fold higher comparing reference methods, however, this error is acceptable for practical usage of NIR method. (Table 1). Good agreement exists in the case of cross-validation for carbohydrates (Fig. 3C). The developed chemometric models are therefore sufficiently accurate and suitable for practical use in determining these parameters.

Proteins

The results are less satisfactory (a higher value of $RMSEP$ against the $SD_{r(REF)}$ and $SD_{r(EBC)}$). The cause may be a low number of standards or low diversibility of the contents; a higher number of samples had to be excluded from the set.

Content of bitter substances, total polyphenols and diacetyl

The content of the analytes is low, the ratio of $RMSEP$ relative to $SD_{r(REF)}$ and $SD_{r(EBC)}$ is very high (see also unfavorable cross-validation for bitter substances (Figure 4D)). Disagreements of validation deviations with the deviation of the reference method can be caused by a low number of calibration standards; however, a more likely explanation is in this case the lack of FT-NIR sensitivity. The accuracy of the method for these analytes is unsatisfactory.

Tab. 2 Výsledky externí validace FT-NIR metody (predikce externí validace (RMSEP_{ex}) / Table 2 Results of prediction of external validation of the FT-NIR method

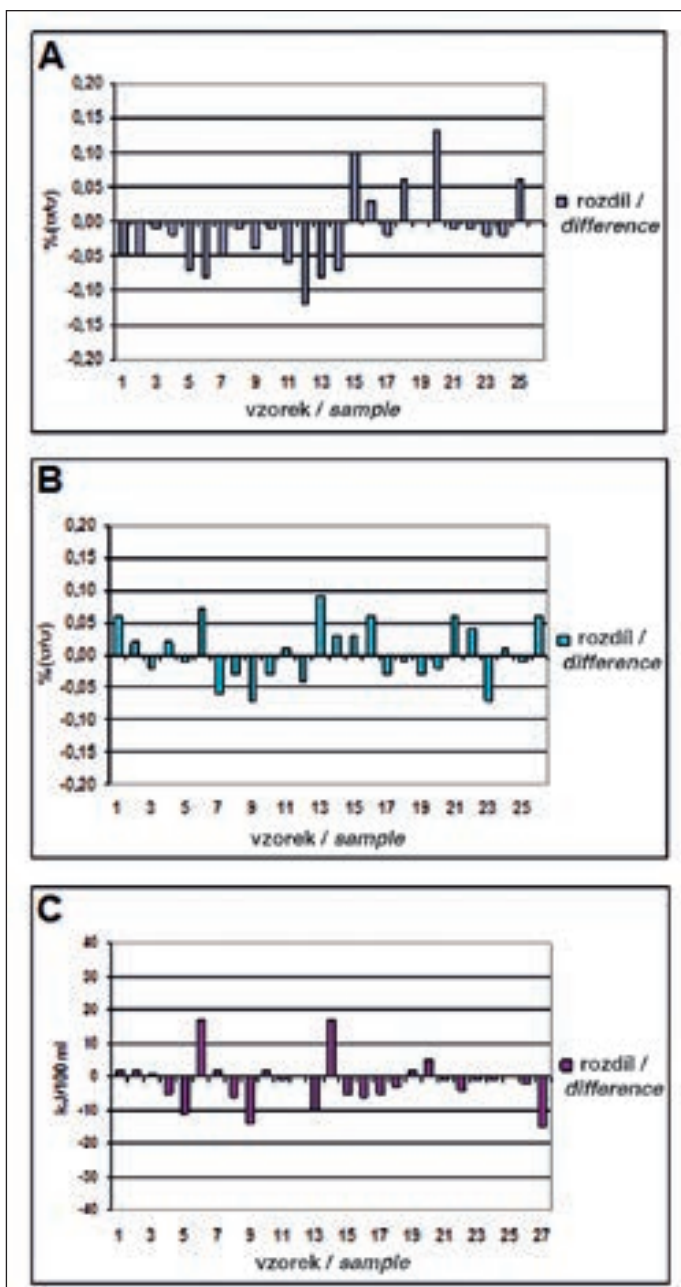
Parametr / Parameter	n ^a	Počet vyloučených n number of ignored n	Počet faktorů number of factors	Jednotky units	Min hodnota min value	Max hodnota max value	Derivace derivation	RMSEP _{ex}
EV _{dir}	28	1	9	kJ/100 ml	165	202	spektrum spectrum	5
alkohol / alcohol	28	2	8	% hm./ % (w/w)	3.51	3.95	spektrum spectrum	0.03
skutečný extrakt / real extract	28	2	9	% hm./ % (w/w)	3.74	5.06	spektrum spectrum	0.04

^a počet měření / ^a number of measurements

Obr. 5 Verifikace FT-NIR kalibrace / Fig. 5 Verification of the FT-NIR calibration

Ilustrace rozdílů hodnot stanovených referenční metodou a FT-NIR během druhého experimentu za použití kalibrace vytvořené během prvního experimentu pro: obsah alkoholu (A), skutečný extrakt (B) a energetickou hodnotu (C).

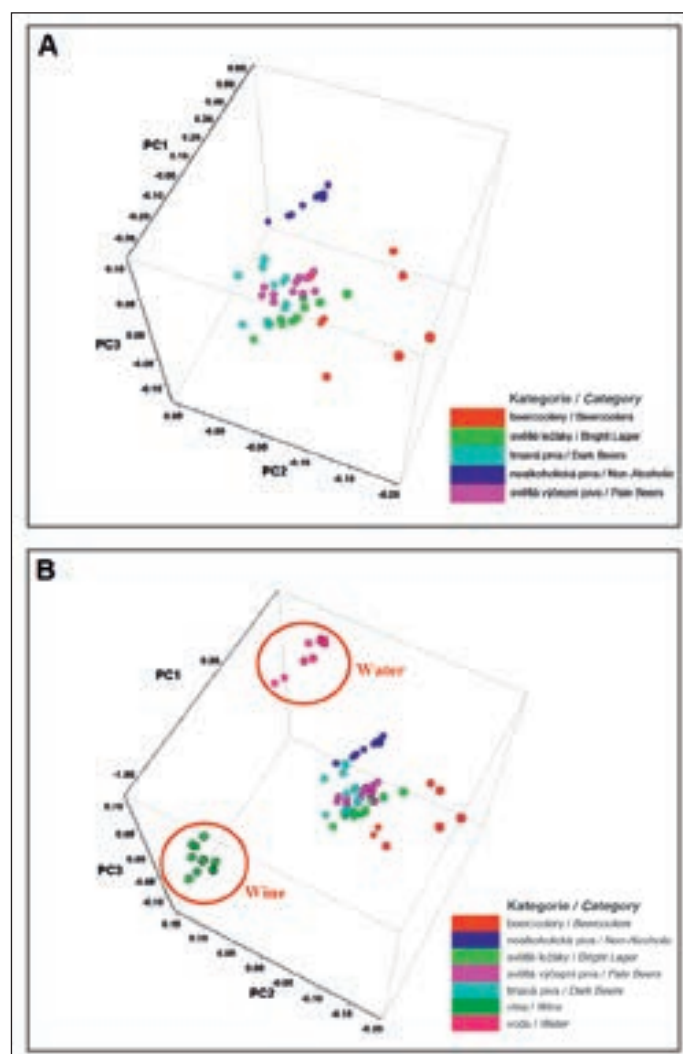
Illustration of the difference of values determined by the reference method and by the FT-NIR in a second experiment using the calibration of the first experiment for alcohol (A), real extract (B) and energy value (C).



Obr. 6 Diagnostika základních komponent / Fig. 6 Diagnostics of Principal Component

3D graf kalibračních standardů (A) a graf s přidanými spektry vody a vína (B).

Scores 3D display of calibration standards (A) and with added spectra of water and wine (B).



3.2 PRESS diagnostics

Finally, the diagnostics of the PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares) model shows a decrease in the error of determination with increasing number of factors used in the calculation. Ideally, the graph of PRESS diagnosis gives a curve dropping sharply downward to the first local minimum of the estimation error. Figure 4 shows the PRESS curve of the chemometric model EV_{dir} , which shows the downward course with a local minimum for the number of factors equal to nine. Other curves of determined parameters, with the exception of polyphenols and bitter substances, had also a similar course (data not shown). The number of factors used for calculating the individual values is shown in Table 1.

3.2 PRESS diagnostika

Diagnostika PRESS (Predicted Residual Error Sum of Squares) modelu ukazuje pokles chyby stanovení se vzrůstajícím počtem faktorů použitých při výpočtu. Graf PRESS diagnostiky vypadá ideálně tak, že křivka strmě klesá k prvnímu lokálnímu minimu chyby stanovení. Takové křivky se podařilo reálně dosáhnout např. pro EV_{dir} , jak je demonstrováno na obr. 4, PRESS křivka klesá k lokálnímu minimu pro počet faktorů roven 9. Křivky ostatních parametrů, s výjimkou polyfenolů a hořkých látek, měly podobný průběh (data nejsou uvedena). Počet faktorů použitý pro výpočet jednotlivých hodnot je uveden v tab. 1.

3.3 Externí validace, verifikace metody

Druhá série vzorků obsahovala 28 vzorků (měřená po šestiměsíčním intervalu) a byla použita pro externí validaci chemometrických modelů. Ta byla provedena tak, že byl změřen obsah alkoholu, skutečný extrakt a energetická hodnota pomocí kalibrace vytvořené v prvním experimentu a výsledné hodnoty byly porovnány s hodnotami z referenčních metod.

Rozdíl mezi hodnotami referenčních metod a FT-NIR byl vyjádřen jako $RMSEP_{ex}$ odpovídajícím způsobem jako $RMSEP$ s tím rozdílem, že validační vzorky byly měřeny 6 měsíců po vytvoření kalibračního modelu (tab. 2). Při srovnání hodnot $RMSEP$ a $RMSEP_{ex}$ pro alkohol a skutečný extrakt z tab. 1 a tab. 2 je zřejmé, že tyto hodnoty jsou velmi podobné. $RMSEP_{ex}$ pro EV_{dir} (5 kJ/100 ml) je vyšší než $SD_{r(REF)}$ pro referenční metodu (2 kJ/100 ml) i lehce vyšší než $SD_{r(EBC)}$ pro EBC metodu (4 kJ/100 ml), ale tato přesnost je z praktického hlediska naprosto dostačující. Pro lepší názornost jsou rozdíly v hodnotách pro obsah alkoholu, skutečný extrakt a EV_{dir} graficky znázorněny na obr. 5. Tím je potvrzeno, že pro stanovení obsahu alkoholu (obr. 5A), skutečného extraktu (obr. 5B) a EV_{dir} (obr. 5C) je možné použít původní kalibrační vzorky, to znamená, že kalibrační model je dlouhodobě stabilní.

Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že FT-NIR metoda může v pivovarství najít univerzální uplatnění, neboť kromě analýzy pevných vzorků (např. sladu) ji lze využít také pro stanovení nejdůležitějších parametrů v kapalně matrici, např. pivu. Určitou nevýhodou je tvorba kalibračního modelu, ale tento laboratorně i časově náročný proces se vyplatí, neboť výsledné měření vzorku, kterým lze získat všechny požadované výsledky, zabere pouze několik málo minut. Navíc bylo potvrzeno, že takto sestavený model je plně funkční a stabilní a stačí ho vytvořit pouze jednou. K podobným závěrům dospěli Sileoni et al., kteří demonstrovali stabilitu vytvořených kalibračních modelů pomocí externí validace. Ověřili časovou stabilitu kalibračních modelů kontrolou rozdílu mezi vzorky ječmene a sladu v různých letech (Sileoni et al., 2013). Vzhledem k technickým specifikacím FT-NIR přístrojů garantují někteří výrobci přenositelnost kalibračních modelů mezi jednotlivými přístroji stejného typu. Stejně tak je přenositelnost garantována i při výměně jakékoliv součástky při servisním zásahu (Anonymus 2015e; Anonymus 2015f).

3.4 Shluková analýza kalibračních standardů

Spektra všech měřených piv, tj. nealkoholických piv, beercoolerů, světlých ležáků, světlých výčepních piv a tmavých piv, byla použita ke tvorbě kalibračních modelů. Oprávněnost tohoto postupu je znázorněna v 3D grafu diagnostiky základních komponent (viz obr. 6A), který umožňuje vidět kalibrační standardy po roztržení do tříd jako barevné shluky. Výrazný rozdíl je vidět v projekci spekter nealkoholických piv a tří vzorků tmavých piv. Tento rozptyl je však ve srovnání s výsledky diagnostiky pro skupiny matric pivo, voda a víno pouze minimální. Pro lepší představu o semknutosti kalibračních bodů byla do projekce pro ilustraci přidána spektra vody a vína (obr. 6B).

4 ZÁVĚR

V článku je diskutována možnost použití FT-NIR instrumentace ke stanovení vybraných analytů v pivu. Transmisní a transflektanční spektra byla naměřena pro 78 vzorků různých piv pomocí FT-NIR spektrometru Nicolet Antaris II. Současně byly tyto vzorky analyzovány pomocí tradičních pivovarských analytických metod pro získání referenčních hodnot pro stanovení alkoholu, skutečného extraktu, celkových sacharidů, bílkovin, energetické hodnoty, hořkých látek, polyfenolů a diacetylů. Získaná spektra byla použita k sestavení kalibračních modelů.

Prokázalo se, že pomocí FT-NIR spektroskopie lze s dostatečnou přesností stanovit obsah alkoholu, celkových sacharidů, skutečný extrakt a energetickou hodnotu. Odchytky kalibračních modelů pro

3.3 External validation, verification of the method

A second series of samples (measured after a six-month interval) was used for external validation of the chemometric models for alcohol content, real extract and EV obtained in the first experiment. The experiment involved a total of 28 samples of spectra measured in the second series with the help of originally developed calibration models.

The difference between the values of the reference methods and FT-NIR was expressed by the $RMSEP_{ex}$ value corresponding to the $RMSEP$ value except that the validation samples were used 6 months after the preparation of the calibration model (Table 2). As is apparent from the comparison between the respective values of Tables 1 and 2, the values of $RMSEP$ and $RMSEP_{ex}$ for alcohol and real extract are very similar. The $RMSEP_{ex}$ for the EV_{dir} , 5 kJ/100 ml, is higher than $SD_{r(REF)}$ for the reference method (2 kJ/100 ml) and slightly higher than the $SD_{r(EBC)}$ for the EBC method (4 kJ/100 ml), but this precision is entirely satisfactory for practical purposes. The differences between the values obtained by the two methods for the parameters alcohol, real extract and EV_{dir} are graphically illustrated in Fig. 5 for the sake of clarity. This verified that for the determination of alcohol (Fig. 5A), real extract (Fig. 5B) and EV_{dir} (Fig. 5C) it is possible to use the original calibration samples of beer made from barley originating from another vintage year, i.e. the calibration model exhibits a long-term stability.

The overall conclusion is that the FT-NIR method can find universal application in brewing because, in addition to analysis of solid samples (e.g. malt), it can be used to determine the most important parameters in a liquid matrix, i.e. beer. A certain disadvantage is the development of a calibration model; this somewhat time- and labor-intensive process is however worth the effort, since the measurement of a sample providing all desired results takes a few minutes. Furthermore, it was verified that the calibration model so developed is fully functional for a long time. Similar conclusion was reached by Sileoni et al. (Sileoni et al., 2013), who demonstrated the stability of the developed calibration models through an external validation. They verified the long-term effects in NIR calibration models by checking the variation between samples of barley and malt collected in different years. According to the technical specifications of FT-NIR instruments some manufacturers actually guarantee the transferability of calibration models between different pieces of the same device. Similarly, this property is also guaranteed when replacing any component when servicing the spectrometer (Anonymus 2015e; Anonymus 2015f).

3.4 Cluster analysis of calibration standards

The spectra of all measured beers, i.e. non-alcoholic beers, beer coolers, light lagers, light beers and dark beers were used for these calibration models. The legitimacy of this procedure is illustrated in the chart of the Principal Component Scores 3D display diagnostics (see Figure 6A), which allows the user, after the inclusion of calibration standards into classes; to view them in color-coded clusters. A substantial difference in the projection of the spectra is observed only in non-alcoholic beers and three samples of dark beers. This variance is absolutely minor compared with the diagnostic results for a group of the matrices including water, wine and beer. To get a better idea of the minute spread of the points of the calibration set we added the spectrum of water and wine to illustrate the projections (Fig. 6B).

4 CONCLUSION

To sum up, our article discusses the application of FT-NIR methods in the determination of selected analytes in beer. A total of 78 samples of different beers were used to collect transmission and transmittance spectra by the FT-NIR technology using the Nicolet Antaris II spectrometer. At the same time, traditional brewing analytical methods were used to obtain the reference values for the determination of alcohol, real extract, total carbohydrates, protein, energy, bitter substances, polyphenols and diacetyl. The spectra were then used to construct the calibration models.

We showed that alcohol, real extract, total carbohydrates and energy value can be sufficiently accurately determined using NIR spectroscopy. Errors of the calibration models set up for determining these parameters are consistent with the precision of conventional methods used for obtaining the input data. A real chance for the determination of minor components of beer (total polyphenols, bitter substances, proteins, diacetyl) can be seen in the completion of calibration for the determination of diacetyl and protein while the possi-

stanovení uvedených parametrů jsou srovnatelné s odchylkami referenčních metod použitých k získání vstupních dat. Při zpřesnění kalibračních modelů (pomocí většího počtu kalibračních vzorků) pro stanovení minoritních látek v pivu (celkové polyfenoly, hořké látky, bílkoviny, diacetyl) existuje reálná možnost získání kalibračního modelu pro diacetyl a celkové bílkoviny. Sestavení funkčního kalibračního modelu pro hořké látky a polyfenoly je však problematické.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla vypracována za podpory MZE-RO1014-Výzkum kvality a zpracování sladařských a pivovarských surovin.

LITERATURA / REFERENCES

- Analytica EBC, Chapter 9.4 Original, real and apparent extract and original gravity of beer, 2009: EBC Analysis Committee, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
- Analytica EBC, Chapter 9.8 Bitterness of beer (IM), 2009: EBC Analysis Committee, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
- Analytica EBC, Chapter 9.9.1 Total nitrogen in beer: Kjeldahl method, 2009: EBC Analysis Committee, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
- Analytica EBC, Chapter 9.11 Total polyphenols in beer by spectrophotometry, 2009: EBC Analysis Committee, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
- Analytica EBC, Chapter 9.24.2 Vicinal diketones in beer: Gas chromatographic method, 2009: EBC Analysis Committee, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
- Analytica EBC, Chapter 9.26 Total carbohydrate in beer by spectrophotometry, 2009: EBC Analysis Committee, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
- Analytica EBC, Chapter 9.45 Energy value of beer by calculation, 2009: EBC Analysis Committee, Fachverlag Hans Carl, Nürnberg.
- Angelino, A. G. F., 1996: Determination of moisture and nitrogen contents of barley and malt by near-infrared spectroscopy (NIRS). *Journal of the Institute of Brewing* 102: 73–74.
- Anonymus, 2015a: www.anton-paar.com
- Anonymus, 2015b: www.scalar.com
- Anonymus, 2015c: www.centec.cz
- Anonymus, 2015d: www.foss.dk
- Anonymus, 2015e: www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CAD/CAD%20Documents/Catalogs%20%20Brochures/Molecular%20Spectroscopy/NIR/FTNIR%20Instruments/D10949~.pdf
- Anonymus 2015f: www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CAD/CAD%20Documents/Application%20%20Technical%20Notes/Molecular%20Spectroscopy/NIR/FTNIR%20Instruments/D14179~.pdf
- Brož, A., Košin, P., Šavel, J., Prokeš, J., 2008: Jak zacházet s NIR spektroskopii v pivovarské laboratoři. *Kvasny Prum.*, 54(4): 108–114.
- Castritius, S., Kron, A., Schäfer, T., Rädle, M., Harms, D., 2010: Determination of alcohol and extract concentration in beer samples using a combined method of near-infrared (NIR) spectroscopy and refractometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 12634–12641.
- European Communities, 2006: Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for foodstuffs: Discussion paper on revision of technical issues.
- Gregoria, M.-A., 2011: Partial least squares (PLS) methods: origins, evolution and application to social sciences. *Communications in Statistics – Theory and Methods*, 40: 2305–2317.
- Griffiths, P. R., de Haseth, J. A., 2007: *Fourier transform infrared spectrometry*, 2nd ed. Wiley, Hoboken, New Jersey. ISBN 978-0-471-19404-0.
- Jurková, M., Čejka, P., Štěrba, K., Olšovská, J., 2014: Determination of total carbohydrate content in beer using its pre-column enzymatic cleavage and HPLC-RI. *Food Analytical Methods*, 7: 1677–1686.
- Marte, L., Belloni, P., Genorini, E., Sileoni, V., Perretti, G., Montanari, L., Marconi, O., 2009: Near infrared reflectance models for the rapid prediction of quality of brewing raw materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 326–333.
- Mehrotra, R., Gupta, A., Nagarajan, R., 2005: NIR spectroscopy and fiber optic probe for determination of alcohol, sugar and tartaric acid in alcoholic beverages. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64: 134–137.
- Olšovská, J., Štěrba, K., Pavlovič, M., Čejka, P., 2015: Determination of the energy value of beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 72(2): 165–169.
- Pasquini, C., 2003: Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14: 198–219.
- Rodriguez-Saona, L. E., Fry, F. S., McLaughlin, M. A., Calvey, E. M., 2001: Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 336: 63–74.
- Sileoni, V., Marconi, O., Perretti, G., Fantozzi, P., 2013: Evaluation of different validation strategies and long term effects in NIR calibration models. *Food Chemistry*, 141: 2639–2648.

*Do redakce došlo / Manuscript received: 1. 4. 2015
Přijato k publikování / Accepted for publication: 4. 5. 2015*