

JAK ZACHÁZET S NIR SPEKTROSKOPIÍ V PIVOVARSKÉ LABORATOŘI

HOW TO USE THE NIR SPECTROSCOPY IN A BREWERY LABORATORY

ADAM BROŽ^{1,2}, PETR KOŠIN^{1,2}, JAN ŠAVEL¹, JOSEF PROKEŠ³

¹Budějovický Budvar, n. p., České Budějovice; e-mail: adam.broz@budvar.cz

²Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství

³Výzkumný ústav pивоварský a sladařský, a. s., Sladařský ústav Brno; e-mail: prokes@brno.beerresearch.cz

Brož, A. – Košin, P. – Šavel, J. – Prokeš, J.: Jak zacházet s NIR spektroskopií v pivovarské laboratoři. Kvasny Prum. 54, č. 4, 2008, s. 108–114.

Infračervená spektroskopie v blízké oblasti spektra (NIR) patří do skupiny molekulové vibrační spektroskopie. Jde o rychlou instrumentální metodu, umožňující předpověď důležitých kvalitativních ukazatelů surovin a meziproduktů při výrobě piva. V článku byla pozornost zaměřena na extrakt sladu, bílkoviny sladu, rozpustný dusík v kongresní sladině, relativní extrakt při 45 °C a Kolbachovo číslo. Použité vzorky byly vyrobeny v mikroskladovně VÚPS. Spektra v NIR oblasti se měřila přístrojem MPA (Multi Purpose Analyzer) společnosti Bruker Optics, vybaveným chemometrickým softwarem OPUS 5.5, s jehož pomocí se sestavily matematické kalibrační modely. Modely byly ověřeny interní validací, byly sestaveny validační grafy a následně byla provedena externí validace nejprve vzorky z mikroskladovny, a poté slady z komerčních sladoven. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny.

Při zajištění kontroly modelů je NIR spektrometrie vhodnou metodou zvláště tam, kde je třeba provádět velký počet analýz v reálném čase bez velkého prodlení mezi odběrem vzorku a výsledkem analýzy. Z naměřeného spektra je možné předpovídat více znaků najednou. Horší přesnost je zde vyvážena rychlostí analýzy a absencí úpravy tuhého či kapalného vzorku.

Brož, A. – Košin, P. – Šavel, J. – Prokeš, J.: How to use the NIR spectroscopy in a brewery laboratory. Kvasny Prum. 54, No. 4, 2008, p. 108–114.

The Near Infrared Spectroscopy (NIR) belongs to the group of molecular vibration spectroscopy. It is a rapid instrumental method enabling the forecast of important qualitative indicators of raw materials as well as intermediate products during beer production. In the article, attention was aimed at malt extract, malt proteins, soluble nitrogen in congress wort, relative extract at 45 °C and Kolbach index. The samples used were produced at the micromalting plant of the Research Institute of Brewing and Malting, Plc. The spectra in the NIR range were measured by the MPA apparatus (Multi Purpose Analyzer) of the company Bruker Optics, with installed OPUS 5.5 chemometric software, by means of which mathematical calibration models were made. The models were verified by internal validation, validation graphs were made, all this was followed by external validation, first with the samples from the micromalting plant, then with the samples delivered by commercial malting plants. The results were assessed on a statistical basis. For ensuring the control of models, the NIR spectroscopy represents a suitable method especially in such cases where a high number of real-time analyses without a long delay between sampling and the result of the analysis are required. From the measured spectrum, it is possible to predict more characteristics at a time. A worse precision can be compensated here by the speed of the analysis and absence of treatment of solid or liquid samples.

Brož, A. – Košin, P. – Šavel, J. – Prokeš, J.: Wie behandelt man die NIR Spektroskopie im einen Bierbrauereilabor. Kvasny Prum. 54, Nr. 4, 2008, S. 108–114.

Die Infrarotspektroskopie im nahen Bereich des Spektrums gehört in die Gruppe von Molekülvibrationsspektroskopie. Es handelt sich um eine schnelle Instrumentalmethode, die bei der Bierherstellung eine Prognose von wichtigen Rohstoff- und Zwischenproduktqualitätsanzeigern ermöglicht. Im diesen Artikel wurde die Aufmerksamkeit auf den ursprünglichen Malzextrakt, Malzeiweißstoffen, löslichen Stickstoff in der Kongreßwürze, relativen Extrakt bei der Temperatur 45 °C und Kolbachzahl gezielt. Die angewandte Malzmuster wurden in einer Pilotmälzerei im Forschungsinstitut für Brauereien und Mälzereien (VÚPS) hergestellt. Die Spektren im NIR Bereich wurden mittels MPA (Multi Purpose Analyzer) Geräts mit einer chemometrischen Software OPUS 5.5 von der Gesellschaft Bruker Optics gemessen, diese Software wurde auch für eine Zusammensetzung von mathematischen Kalibrationsmodellen angewandt. Die Modelle wurden durch eine interne Validation geprüft, danach die Validationsgrafiken zusammengesetzt und schließlich die externe Validation zuerst mit den Malzmustern aus der Pilotmälzerei und dann mit dem Malz aus den kommerziellen Mälzereien. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet.

Die NIR Spektrometrie ist eine geeignete Methode zur Kontrolle von Modellen insbesondere im Falle einer Anforderung auf einen hohen Analysenzahl in einer Realzeit ohne einer grösseren Verzögerung zwischen der Musterabnahme und dem Analyseergebnis. Aus dem gemessenen Spektrum konnten mehrere Zeichen festgestellt werden. Die gesenkte Messgenauigkeit wird durch die Analysengeschwindigkeit und den Ausfall der Fest- oder Flüssigmusteranpassung ausgewogen.

Брож, А. – Кошин, П. – Шавел, Й. – Прокеш, Й.: Как обращаться с NIR спектроскопией в пивоваренной лаборатории. Kvasny Prum. 54, 2008, No. 4, стр. 108–114.

Инфракрасная спектроскопия в ближней зоне спектра (NIR) принадлежит в группу молекулярной вибрационной спектроскопии. Это быстрый инструментальный метод, позволяющий прогноз важных качественных показателей сырья и постепенных продуктов в производстве пива. В статье было обращено внимание к экстрактивности солода, белкам солода, растворимому азоту в конгрессной сусле, VZ 45 °C, и к числу кольбаха. Примененные пробы были изготовлены в научноисследовательском институте по производству пива и солода (VÚPS, а. с.). Спектра в области NIR были измерены аппаратом MPA компании Bruker Optics, благоустроенным хеометрическим софтвером OPUS 5.5, с помощью которого были образованы математические калибровочные образцы. Образцы были проверены внутренней валидацией, образованн диаграмми и впоследствии была произведена заочная сначала продами солода из VÚPS, и затем гродами из коммерческих солодовней. Результаты были статистически анализированы.

При обеспечении проверки моделей спектрометрия NIR является удобным методом особенно тогда, если нужно вести множество анализов в пекущем времени без большого промедления между отбором пробы и исходом анализа. Из определенного спектра возможно предсказывать более признаков вместе. Худшая поность анализа здесь сбалансирована скоростью и отсутствием обработки твёрдой или жидкой пробы.

Klíčová slova: spektroskopie, NIR, laboratoř, kvalita sladu, validace

Keywords: spectroscopy, NIR, laboratory, quality, malt, validation

1 ÚVOD

Infračervená spektroskopie v blízké oblasti spektra (NIR) patří do skupiny molekulové vibrační spektroskopie. Z hlediska energie záření, s kterým pracuje, se jedná o oblast o vlnových délkách od 780 do 2500 nm, tj. v rozsahu vlnočtů 12820 až 4000 cm^{-1} . V případě záření s vyšší energií tedy sousedí s viditelnou oblastí, na straně záření s nižší energií je to pak střední infračervená oblast (MIR). Ve spektru střední infračervené oblasti se projevují absorpce základních energetických přechodů vibrací a rotací atomových skupin v molekule. Ve spektru blízké infračervené oblasti se pak projevují kombinační přechody a první, druhé a třetí svrchní tóny („overtones“), které odpovídají stavům, při kterých se absorbuje záření vyšších energií a kvantové číslo popisující energetické hladiny se mění o více než 1. Zatímco absorpční pásy atomových skupin ve střední infračervené oblasti jsou poměrně dobře oddělené a lze ze spektra usuzovat i na strukturu molekul, spektrum v blízké infračervené oblasti vykazuje značný překryv absorpčních pásů. Není tedy možné jednoduše aplikovat Lambert-Beerův zákon, a pro získání informace ze spekter je zapotřebí vyspělý chemometrický software. Vzhledem k tomu, že se ve spektru objevují absorpce C-H, O-H, N-H a S-H skupin, existuje teoretický předpoklad pro aplikaci při předpovědi kvalitativních znaků souvisejících s látkami sacharidické a bílkovinné povahy.

V literatuře bylo popsáno mnoho zjištěných korelací NIR spekter s kvalitativními znaky surovin, meziproduktů i hotového piva. Dosaďadlné aplikace v pivovarství se soustřeďují především na monitoring průběhu sladovacího procesu, předpověď obsahu důležitých komponent sladu a stanovení složek piva.

Práce publikované v poslední době popisují stanovení β -glukanů ve sladovnickém ječmeni a ve sladu [1, 2] za současného použití analýzy jednotlivých zrn. NIR spektrometrie byla také použita pro předpověď klíčivosti ječmene [3, 4] a monitorování změn ve složení zrna v průběhu sladovacího procesu [5]. Mnoho prací se věnuje stanovení dusíkatých látek a vlhkosti v ječmeni a sladu [6, 7, 8, 9]. Popsána byla i korelace NIR spekter s některými dalšími znaky sladu jako jsou friabilita, homogenita, celkový dusík, rozpustný dusík, volný aminodusík, viskozita a barva sladiny [2, 10, 11]. Úspěšně lze ze spekter předpovídat zkvasitelnost a dosažitelné prokvašení sladin a mladín [12, 13, 14, 15]. Nejrozsáhlejší aplikací pro pivo je stanovení obsahu ethanolu a hustoty piva [16, 17, 18], případně i původního extraktu v mladině [19].

2 MATERIÁL A METODY

Pro referenční stanovení byly použity tyto metody:

Extrakt sladu v původním vzorku	EBC 4.5.1
Bílkoviny ve sladu	EBC 4.3.2
Rozpustný dusík v kongresní sladině	EBC 4.9.3
Relativní extrakt při 45 °C	MEBAK I 4.11
Kolbachovo číslo	MEBAK I 4.1.4.5.3



Obr. 1 / Fig. 1 Plně vybavený FT-NIR spektrometr MPA Bruker Optics
/ Fully equipped FT-NIR spectrometer MPA Bruker Optics

1 INTRODUCTION

The Near Infrared Spectroscopy (NIR) belongs to the group of molecular vibration spectroscopy. From the energetic point of radiation, the NIR spectroscopy uses wavelengths from 780 to 2500 nm, i.e. in the wave number range of 12820 to 4000 cm^{-1} . In case of radiation with a higher energy, it thus neighbours with the visible spectrum, in case of lower energy radiation, it neighbours with the middle infrared region (MIR). In the spectrum of the middle infrared region, absorptions of the basic energetic transitions of vibrations and rotations of the atomic groups in the molecule take place. In the spectrum of the near infrared region, combination transitions and first, second and third overtones take effect, corresponding to the states, during which the radiation of higher energy is absorbed and the quantum number describing the energy levels changes by more than one. While the absorption bands of the atomic groups in the middle infrared spectrum are relatively well separated and the structure of molecules can be concluded from the spectrum, the spectrum in the near infrared region shows significant overlapping of the absorption bands. Therefore, it is not possible to simply apply the Lambert-Beer law and advanced chemometric software is needed to get information from the spectra. Since absorptions of C-H, O-H, N-H and S-H groups appear, there is a theoretical assumption for the application at the forecast of the qualitative indicators related to the compound of saccharide and protein origin. There have been described many observed correlations of the NIR spectra with qualitative indicators of raw materials, intermediate products and finished beer in the literature. The existing applications used in the brewing industry concentrate on the monitoring of the course of the malting process, the forecast of the content of important malt components and determination of beer components.

The works published recently deal with the determination of β -glucans in brewing barley and malt [1, 2] using the single grain analysis at the same time. The NIR spectroscopy was also used for the forecast of barley germinating capacity [3, 4] and monitoring of changes in grain composition during the malting process [5].

Many works deal with the determination of nitrogen compounds and water content in barley and malt [6, 7, 8, 9]. The correlation of the NIR spectra with some other malt indicators such as friability, homogeneity, total nitrogen content, soluble nitrogen, free amino nitrogen, viscosity and colour of wort [2, 10, 11]. Fermentability as well as maximum degree of fermentation of worts and hopped worts can be successfully predicted from the spectra [12, 13, 14, 15]. The most used application for beer is the determination of ethanol content and beer gravity [16, 17, 18], possibly original wort extract, too [19].

2 MATERIAL AND METHODS

For reference determination, the following methods were used:

Malt extract in original sample	EBC 4.5.1
Malt proteins	EBC 4.3.2
Soluble nitrogen in congress wort	EBC 4.9.3
Relative extract at 45 °C	MEBAK I 4.11
Kolbach index	MEBAK I 4.1.4.5.3

Measurement of NIR spectra:

FT-NIR spectrometer MPA (Multi Purpose Analyzer), manufacturer Bruker Optics, Germany (Fig. 1).

The spectra of unmilled malt samples were measured in the reflection mode on the module of integrated sphere, with sample rotation in a sample cup with quartz bottom (sample cup as part of apparatus accessory) with a diameter of 97 mm. The spectral range was set from 12.500 to 3600 cm^{-1} , resolution 8 cm^{-1} , source – halogen lamp, beam splitter – quartz, detector – RT-PbS. For spectrum processing, software OPUS 5.5, Bruker Optics (Germany) was used.

3 RESULTS AND DISCUSSION

A majority of publications describe very good correlations of qualitative indicators of malt with NIR spectra; the calibration models are verified internally or externally on sets of unknown samples. But just a few studies deals with the long-term use of the method, especially at the change of nature – i.e. the matrix – of the measured material,

Měření NIR spekter:

FT-NIR spektrometr MPA (Multi Purpose Analyzer), výrobce Bruker Optics, Spolková republika Německo (obr. 1).

Měřila se spektra nemletých vzorků sladu v reflexním módu na modulu integrované sféry, s rotací vzorku v nádobce s křemenným dnem (sample cup – součástí příslušenství přístroje) o průměru 97 mm. Spektrální rozsah byl nastaven od 12.500 do 3600 cm^{-1} , rozlišení 8 cm^{-1} , zdroj – halogenová žárovka, beamsplitter – quartz, detektor – RT-PbS. Pro zpracování spekter byl použit software OPUS 5.5, Bruker Optics, Spolková republika Německo.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Většina publikací popisuje velmi dobré korelace kvalitativních ukazatelů sladu s NIR spektry, kalibrační modely jsou ověřovány interně či externě, na souborech neznámých vzorků. Jen málo prací se však zabývá dlouhodobým používáním metody, zvláště při změně povahy – tj. matrice – měřeného materiálu, která je v případě přírodní suroviny velmi obvyklá. Naše laboratoř testovala různé soubory kalibračních vzorků, první modely ověřovala interní, křížovou validací, poté následovalo ověření funkce modelu měřením neznámých vzorků. Na základě výsledků se optimalizovalo složení souboru kalibračních vzorků a funkčnost modelu se sledovala dlouhodobě paralelním měřením klasickou analýzou. Po vyhodnocení se stanovil režim udržování kalibračního modelu pro stálé zajištění nízké chyby předpovědi a dostatečné robustnosti modelu.

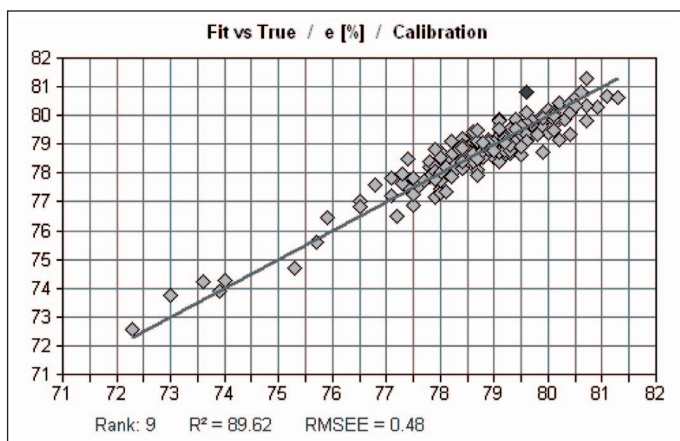
Ze zavádění a delšího používání NIR spektroskopie k rychlé kontrole kvality vstupujících surovin vyplynuly následující zásady, které je nezbytně nutné dodržet, aby model fungoval a předpovězené výsledky byly použitelné. Následující část popisuje chronologicky jednotlivé fáze zavádění a používání metody. Zobecněné zásady jsou doloženy praktickými výsledky naší laboratoře. Pro jednoduchost je následující část věnována pouze předpovědi analytických ukazatelů sladu z reflexních spekter nemletých tuhých vzorků sladu.

3.1 Kalibrace NIR systému

Pro sestavení kalibračního modelu je nutné shromáždit dostatečný počet vzorků, u kterých se stanoví analytické znaky referenčními metodami, v našem případě dle analytiky EBC a MEBAK. Výběr kalibračních vzorků je klíčový, záleží na něm úspěšnost sestaveného modelu. Sledovaný znak by v tomto souboru měl mít dostatečné rozpětí, které bezpodmínečně pokrývá oblast hodnot stanovovaných modelem v budoucnu, neboť chemometrický model nedovoluje extrapolovat. Četnost hodnot by měla být rovnoměrně rozložena, což je v případě biologického materiálu, jako je slad, velmi obtížné. Soubor by měl obsahovat i vzorky podobné matrice jako budou vzorky stanovované.

Pro zajištění co největší variability mezi vzorky a dostatečného rozpětí sledovaných znaků se pro první kalibrační modely vybraly vzorky vyrobené v mikroskladovně VÚPS Brno monitorující sklizeň sladovnického ječmene v České republice v roce 2006.

Spektra v NIR oblasti se měřila přístrojem MPA (Multi Purpose Analyzer) společnosti Bruker Optics. Přístroj byl vybaven chemometrickým softwarem OPUS 5.5, s jehož pomocí se sestavily matematické



Obr. 2 / Fig. 2 Extrakt sladu (% hm.) – model I – kalibrace (přímka je osou kvadrantu, nikoli regresní přímkou) / Malt extract (% by weight) – model I – calibration (the line is the axis of the quadrant, not the regression line)

which is quite usual in case of natural raw materials. Our laboratory tested various sets of calibration samples, the first models were verified by internal cross-validation, this was then followed by the verification of the function of the model by measuring unknown samples. Based on results gained, the composition of the calibration samples was optimised and model functionality was monitored on a long-term basis by parallel measurement using classical analysis. After assessment, a mode of the maintenance of the calibration model was determined to ensure a low forecast error and sufficient model robustness.

From the implementation and long-term use of the NIR spectroscopy for rapid quality control of the incoming raw materials, the following principles were determined that have to be necessarily followed to ensure good functioning of the model and suitability of the forecast results. The following part describes in chronological sequence the phases of the implementation and use of the method. Generalised principles are supported by practical results of our laboratory. To make it simpler, the following part describes only the forecasts of the analytical indicators of malt from the reflectance spectra of the unmilled solid malt samples.

3.1 Calibration of the NIR system

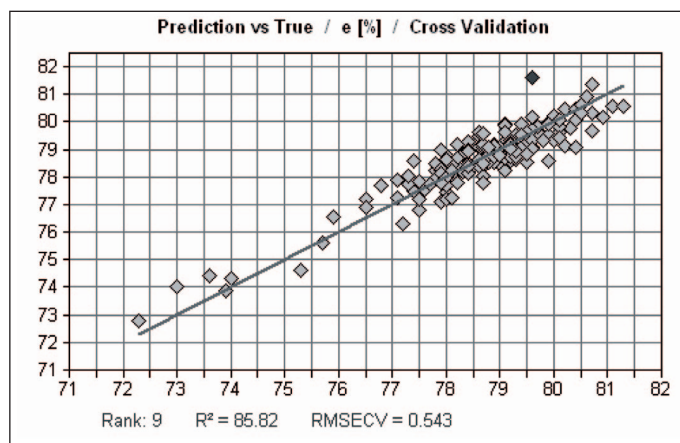
To set up a calibration model, it is necessary to collect a sufficient number of samples, for which analytical indicators are determined by reference methods, in our case, EBC and MEBAK analytics were applied. The selection of calibration samples is crucial, since the successfulness of the set-up model depends on it. The indicator in this set being monitored should have a sufficient range, which unconditionally covers the area of values determined by the model in the future, since a chemometric model does not allow extrapolation. The frequency of the values should be distributed evenly, which is very difficult for biological materials such as malt. The set of samples should contain also samples of a similar matrix as the samples that will be determined.

To ensure the highest variability between the samples and a sufficient range of the monitored indicators, samples produced in the micromalting plant of the Research Institute of Malting and Brewing Brno were selected for the first calibration models, monitoring the crop of brewing barley in the Czech Republic in 2006.

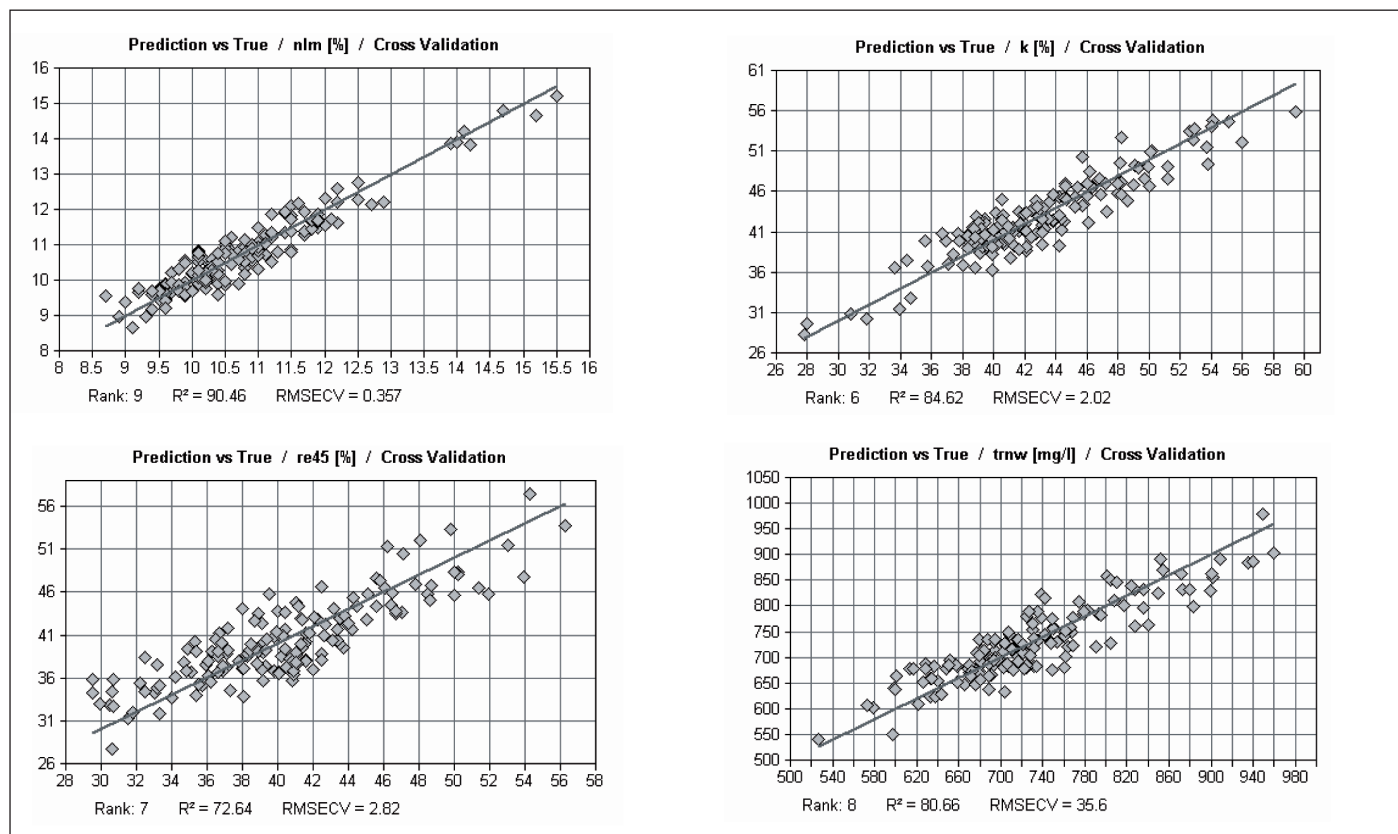
The spectra in the NIR area were measured by the MPA analyser made by Bruker Optics. The analyser was equipped with the OPUS 5.5 chemometric software, which was used for the preparation of mathematic calibration models. For calibration, the software employs the PLS method (Partial Least Squares). The calibration for the malt extract is shown in Fig. 2.

3.2 Internal validation of the model

The model can be verified by a cross-validation or test set validation. The cross-validation gradually excludes one sample (or more samples according to characteristics specified) from the sets of samples, which determines as unknown by means of the model calculated from the remaining samples. It thus allows working also with a smaller number of samples. When using test set validation, the set



Obr. 3 / Fig. 3 Extrakt sladu (hm.%) – model I – cross validace. Předpověď pomocí NIR modelu versus referenční metoda (přímka je osou kvadrantu, nikoli regresní přímkou) / Malt extract (% by weight) – model I – cross-validation. Forecast by means of NIR model vs. reference method (the line is the axis of the quadrant, not the regression line)



Obr. 4 / Fig. 4 Ostatní znaky – model I – cross validace. Bílkoviny v sušině sladu (% hm.), Kolbachovo číslo, relativní extrakt při 45 °C (%), rozpustný dusík v kongresní sladidě (mg.l⁻¹). Předpověď pomocí NIR modelu versus referenční metoda (přímka nezobrazuje regresi, je osou kvadrantu). / Other characteristics – model I – cross-validation. Proteins in malt dry matter (% by weight), Kolbach index, relative extract at 45 °C (%), soluble nitrogen in congress wort (mg.l⁻¹). Forecast by means of NIR model vs. reference method (the line does not show regression, it is the axis of the quadrant)

kalibrační modely. Software používá při kalibraci metodu PLS (Partial Least Squares). Kalibraci pro extrakt sladu ukazuje obr. 2.

3.2 Interní validace modelu

Model je možné ověřit cross či test set validací. Cross validace vyčlení postupně vždy jeden vzorek (či více vzorků, dle zadaných parametrů) ze souboru, který stanovuje jako neznámý pomocí modelu spočítaného ze zbylých vzorků. Umožňuje tak pracovat i s menším počtem vzorků. Při test set validaci se soubor rozdělí na vzorky kalibrační a validační (podíl opět dle zadaných parametrů validace), validační vzorky se stanovují pomocí modelu ze vzorků kalibračních. Je vhodná v případě většího počtu vzorků. Z validace pak vychází matematická optimalizace modelu, při které se pomocí chemometrického software hledají optimální podmínky, kdy model vykazuje vysoký koeficient determinace a nízkou chybu validace. Jedná se o matematické předúpravy spektrálních dat, potlačení vlivu šumu, výběr regionů spektra s největší korelací s analyzovaným znakem.

Validační graf prvního modelu – č. I – pro předpověď obsahu extraktu sladu sestavený ze vzorků z mikroskladovny je na obr. 3, modely ze stejného souboru vzorků pro předpověď bílkovin v sušině sladu, rozpustného dusíku v kongresní sladidě, Kolbachova čísla a relativního extraktu při 45 °C zobrazují grafy na obr. 4. Grafy ukazují výsledky cross validace. Patrná je velmi dobrá korelace NIR spekter s analytickými znaky, což dokládá poměrně vysoká hodnota koeficientu determinace (R^2). Odmocnina ze střední kvadratické chyby cross validace (RMSECV) je u modelů akceptovatelná.

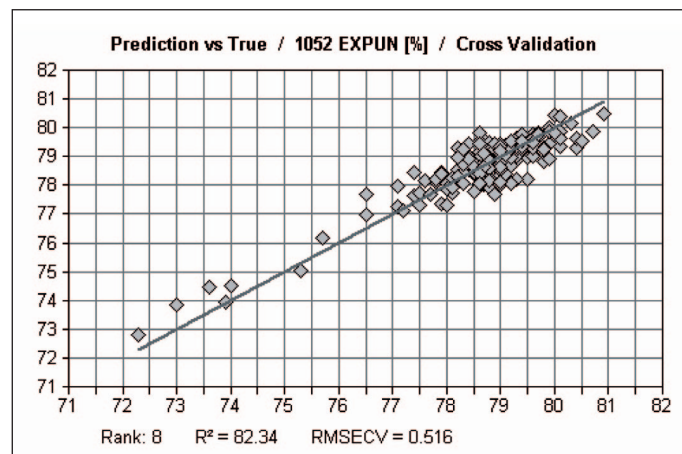
3.3 Externí validace, testování modelu

Pokud modely ukazují po interní validaci na velmi dobrou korelaci spekter a analytických ukazatelů vzorků kalibračního souboru, je nutné přikročit k otestování modelu na souboru neznámých vzorků, které paralelně stanovíme referenčními metodami.

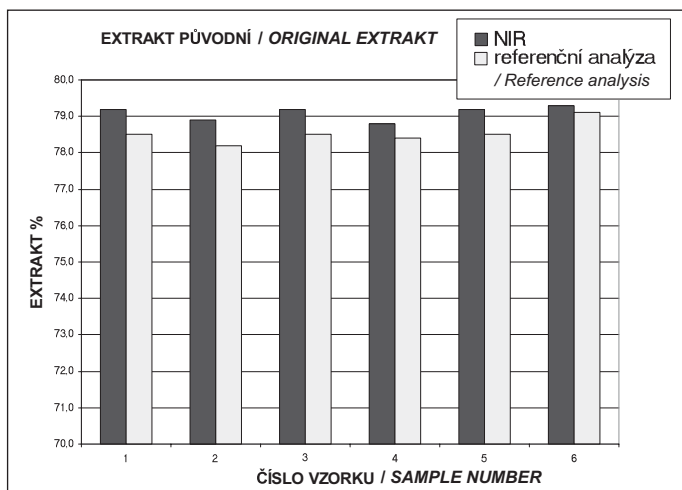
V našem případě to byly vzorky sladu nakupovaného průmyslovým pivovarem z komerčních sladoven. Ukázalo se, že model sestavený ze vzorků z mikroskladovny pro tyto vzorky nefunguje tak, jak by se dalo očekávat z parametrů modelu po interní validaci. Chyba předpovědi byla větší a vysoký podíl vzorků byl modelem označen jako „outliers“, neboli odlehlé vzorky. V takovém případě není možné s výsledkem předpovědi počítat a je nutná klasická analýza. První model

of samples is divided into calibration samples and validation samples (with a proportion according to the specified validation parameters), the validation samples are determined by means of the model from the calibration samples. This method is suitable for a larger number of samples. On validation is based the mathematical optimisation of the model, during which optimum conditions are searched by chemometric software, when the model shows a high determination coefficient and a low validation error, namely mathematical pre-treatment of the spectral data, disturbance suppression, selection of spectrum regions with the highest correlation with the characteristics being analysed.

The validation diagram of the first model – No. I – for the forecast of malt extract content made from the samples delivered by the micromalting plant is shown in Fig. 3, the models from the same sample



Obr. 5 / Fig. 5 Extrakt sladu (% hm.) – model II – cross validace. Předpověď pomocí NIR modelu versus referenční metoda (přímka je osou kvadrantu, nikoli regresní přímkou) / Malt extract (% by weight) – model II – cross-validation. Forecast by means of NIR model vs. reference method (the line is the axis of the quadrant, not the regression line).



Obr. 6 / Fig. 6 Extrakt sladu (hm.%) – předpověď neznámých vzorků pomocí modelu II a analýza referenční metodou / Malt extract (% by weight) – forecast of unknown samples by means of model II and reference method analysis

neprokázal dostatečnou robustnost pro analýzu vzorků z komerčních sladoven.

Kalibrační soubor byl proto doplněn o dvě další skupiny vzorků sladu vyrobeného v komerčních sladovnách. Jejich rozpětí hodnot sledovaných znaků nebylo však tak široké, jak by vyžadoval model. Extrémní vzorky z komerčních sladoven jsou vzhledem k požadavkům jejich zákazníků a velmi dobrému řízení jakosti prakticky nedostupné.

Výsledky zjištěné pomocí těchto modelů č. II byly mnohem lepší, protože jen minimum vzorků bylo označeno jako „outliers“ a rozdíl předpovězené hodnoty znaku od hodnoty zjištěné klasickou analýzou se zmenšil, přestože se některé parametry modelů zhoršily. Hodnota rozdílu se pohybovala v relaci, na kterou šlo usuzovat z parametrů modelu. Jev lze vysvětlit vyšší robustností modelů. Graf cross validace pro extrakt sladu modelu č. II je na obr. 5. Rozdíly šesti neznámých vzorků měřených referenčními metodami ukazuje pro případ extraktu sladu obr. 6, pro ostatní znaky pak obr. 7.

set for the forecast of protein content in malt dry matter, soluble nitrogen in congress wort, Kolbach index and relative extract at 45 °C are shown on the diagrams in Fig. 4. The diagrams show the results of cross-validation. A very good correlation of the NIR spectra with analytical characteristics can be observed, which is substantiated by a relatively high value of the determination coefficient (R^2). The root-mean-square error of cross-validation is acceptable for the models.

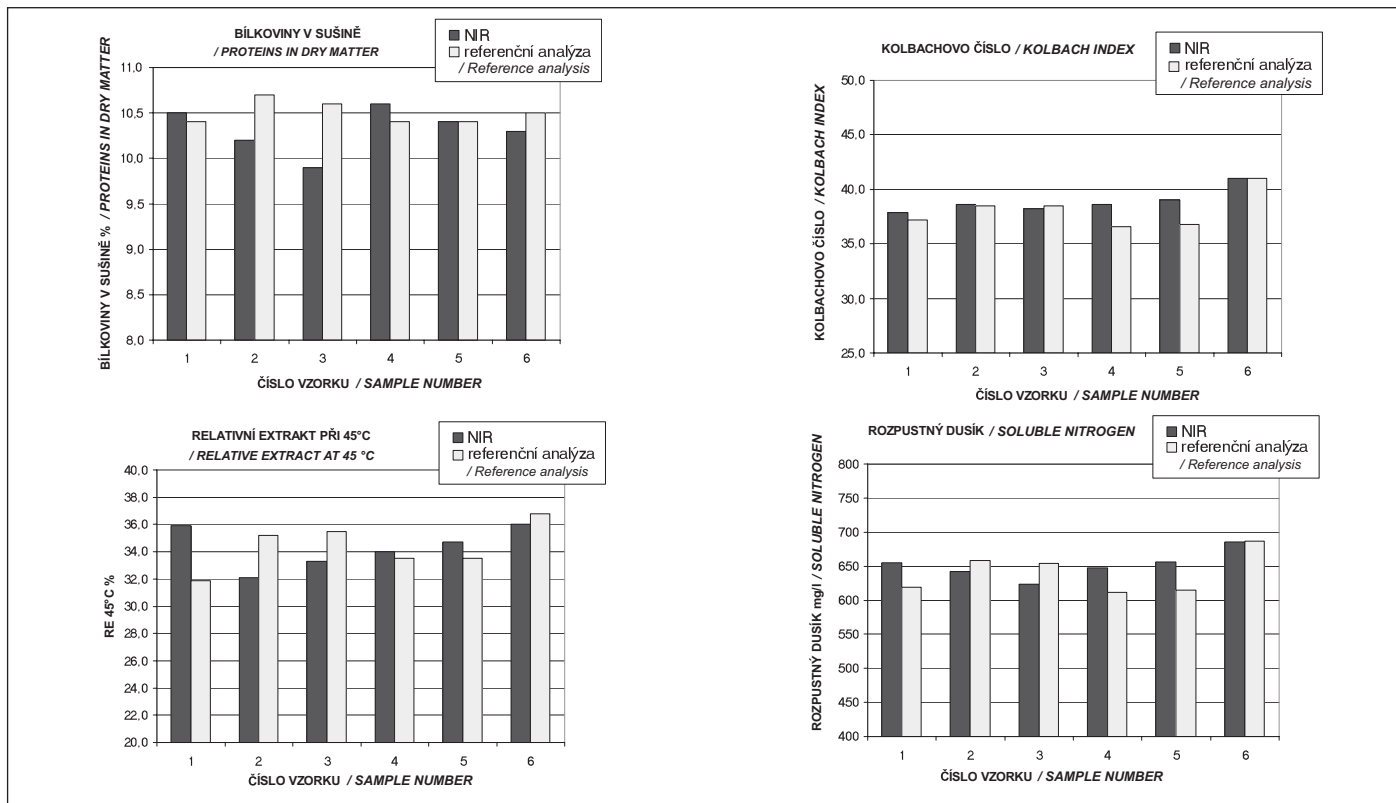
3.3 External validation, model testing

If the models after internal validation show a very good correlation of the spectra and analytical characteristics of the samples of the calibration set, it is then necessary to test the model on the set of unknown samples, which are concurrently determined by reference methods.

In our case, the malt samples purchased by an industrial brewery from commercial malting plants were used. It was proved that the model made up of the samples from the micromalting plant does not work for the samples as it could be expected from the model parameters after internal validation. The error of forecast was higher and a high ratio of samples was marked by the model as “outliers”. In such case, it is not possible to take the result of the forecast into account and a classical analysis has to be used. The first model did not prove a robustness extended by for the analysis of the samples from commercial malting plants.

The calibration set was therefore two more sample groups of the malt produced in commercial malt plants. The range of the values of new samples was not that wide as it was required by the model. With respect to the requirements of the customer of the commercial malting plants and a very good quality control, extreme samples are practically unavailable.

The results determined by means of these models No. II were much more better, since just a very small number of samples was marked as “outliers” and the difference of the forecast value of the characteristics from the value determined by a classical analysis was smaller, even though some model parameters worsened. The difference value was in the relation, which could be concluded from the model parameters. The effect can be explained by higher model robustness. The diagram of the cross-validation for the malt extract of model No. II is shown in Fig. 5. The differences of six unknown samples measured by reference methods for malt extract are shown in Fig. 6 and for other characteristics in Fig. 7.



Obr. 7 / Fig. 7 Ostatní znaky – předpověď neznámých vzorků pomocí modelu II a analýza referenční metodou. Bílkoviny (% hm.), Kolbachovo číslo, relativní extrakt při 45 °C (%), rozpustný dusík v kongresní sladině (mg.l⁻¹). Předpověď pomocí NIR modelu versus referenční metoda. / Other characteristics – forecast of unknown samples by means of model II and reference method analysis. Proteins (% by weight), Kolbach index, relative extract at 45 °C (%), soluble nitrogen in congress wort (mg.l⁻¹). Forecast by means of NIR model vs. reference method.

3.4 Doplnění a aktualizace modelu

Dalšího zpřesnění modelu se dosáhlo zařazením výše uvedených šesti testovacích vzorků do kalibračního souboru. Sestavené modely č. III vykazovaly nižší nebo srovnatelnou chybu (RMSECV) a srovnatelný koeficient determinace (R^2) oproti modelům č. II. Porovnání parametrů modelů zachycuje *tab. 1*.

Dlouhodobé sledování shody NIR metody s provozní laboratoří pivovaru (tato laboratoř nebyla referenční laboratoří při sestavování kalibračních modelů) ve znaku extrakt sladu na velkém množství provozních vzorků sladu je na *obr. 8*. Lze pozorovat přiblížení hodnot předpovězených NIR metodou hodnotám stanoveným klasickou analýzou. Rozptýl hodnot zůstal srovnatelný.

Tímto se ukázalo, že průběžná aktualizace je nutná pro zajištění dostatečné robustnosti modelů i při změně matrice vzorků, způsobené variabilitou přírodních surovin či rozdíly při výrobě sladu v průběhu používání modelu.

Při posuzování odchylek předpovězených hodnot a výsledků stanovených klasickou analýzou je nutné brát zřetel na nejistotu referenčního stanovení. V grafu na *obr. 8* jsou znázorněny meze opakovatelnosti a reprodukovatelnosti stanovení referenční metodou dle analytiky EBC. Jen minimum z velkého počtu vzorků je mimo meze opakovatelnosti.

Tab. 2 ukazuje porovnání opakovatelnosti referenční laboratoře, provozní laboratoře a opakovatelnost metod dle analytiky EBC.

4 ZÁVĚR

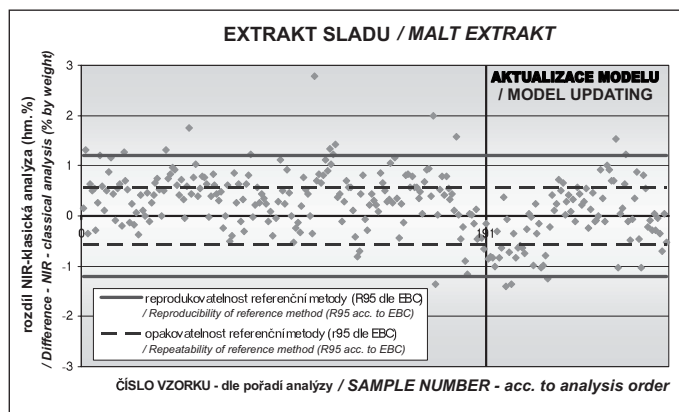
NIR spektrometrie je vhodný nástroj pro kontrolu vstupujících pivovarských surovin tam, kde je potřeba rychlého jednoduchého stanovení velkého počtu vzorků. Vzhledem k tomu, že se jedná o sekundární instrumentální metodu, je rychlost a jednoduchost vykoupena nižší přesností ve srovnání s klasickou referenční analýzou. Při dodržení hlavních zásad při práci s NIR modely lze však dosáhnout velmi dobrých výsledků, které jsou použitelné pro denní rutinní kon-

Tab. 1 Parametry modelů. Koeficient determinace (R^2), odmocnina ze střední chyby cross validace (RMSECV) / *Model parameters. Determination coefficient (R^2), root-mean-square error of cross-validation (RMSECV).*

Znak / Characteristics	Model I		Model II		Model III	
	R^2	RMSECV	R^2	RMSECV	R^2	RMSECV
Extrakt sladu (% hm.) / Malt extract (% by weight)	86	0,54	82	0,52	82	0,51
Bílkoviny v sušině (% hm.) / Proteins in dry matter (% by weight)	90	0,36	73	0,40	72	0,40
Kolbachovo číslo / Kolbach index	85	2,02	82	1,75	83	1,70
Relativní extrakt při 45 °C / Relative extract at 45 °C	73	2,82	71	2,61	70	2,60
Rozpuštěný dusík (mg.l ⁻¹) / Soluble nitrogen (mg.l ⁻¹)	81	35,6	82	28,6	81	29,0

Tab. 2 Opakovatelnost měření zúčastněných laboratoří / *Repeatability of measurement of participating laboratories*

Znak / Characteristics	Rozsah hodnot / Range of values	Opakovatelnost (interval +/-) / Repeatability		
		Laboratoř / Laboratories	Laboratoř / Laboratories	EBC analytika / Analytica EBC
		1	2	
Extrakt sladu (% hm.) / Malt extract (% by weight)	72,3 – 80,7	0,31	0,44	0,58
Bílkoviny v sušině (% hm.) / Proteins in dry matter (% by weight)	8,7 – 15,5	0,14	–	0,31
Kolbachovo číslo / Kolbach index	32,5 – 41,0	0,83	–	–
Relativní extrakt při 45 °C / Relative extract at 45 °C	30,7 – 38,8	0,34	–	–
Rozpuštěný dusík (mg.l ⁻¹) / Soluble nitrogen (mg.l ⁻¹)	528 – 687	11	–	47



Obr. 8 / Fig. 8 Extrakt sladu (% hm.) – rozdíl předpovědi NIR od klasické analýzy provozní laboratoře před (model II) a po (model III) aktualizaci modelu (zobrazení není regulačním diagramem) / *Malt extract (% by weight) – difference of NIR forecast and classical analysis of brewery laboratory before model update (model II) and after model update (model III) (the representation is no control chart)*

3.4 Model complementation and updating

A further precision of the model was achieved by the implementation of the above mentioned test samples into the calibration set. In comparison to models No. II, set up models No. III showed a lower or comparable error (RMSECV) and a comparable determination coefficient (R^2). The comparison of model parameters is in *Tab. 1*.

Long-term monitoring of the accordance of the NIR method with the brewery laboratory (this laboratory was not the reference laboratory when setting up the calibration models) in the malt extract characteristics for a large number of industrial malt samples is shown in *Fig. 8*. Here, we can observe approximating of the values forecast by the NIR method to the values determined by the classical analysis. The value dispersion remained comparable.

By doing this it emerged that continuous updating is necessary for ensuring of a sufficient robustness of the models also when the sample matrix is changed, caused by the variability of the natural raw materials or differences in malt production during the use of the model.

When evaluating the deviations between the forecast values and the results determined by the classical analysis, it is necessary to consider the uncertainty of the reference determination. In the diagram in *Fig. 8*, the repeatability and reproducibility limits of the determinations by the reference method according to the EBC analytics are presented. Just a minimum from a large number of samples is out of the repeatability limits.

Tab. 2 shows the comparison of the repeatability of the reference laboratory, brewery laboratory and the repeatability of the methods according to the EBC analytics.

4 CONCLUSION

The NIR spectroscopy is a suitable tool for the control on the incoming brewery raw materials, where a rapid and easy determination of a large number of samples is required. Since it is a secondary instrumental method, the speed and simplicity of the method is negatively compensated by a lower precision in comparison to the classical reference analysis.

Nevertheless, if the main principles for the use of the NIR models are observed, it is possible to achieve very good results, which are applicable for daily routine control of raw materials purchased by the industrial brewery. In any case, the NIR model recognises different

trolu surovin nakupovaných průmyslovým pivovarem. V každém případě NIR model ze spektra pozná odlišný slad, který může být podroben dalšímu testování klasickou analýzou.

Velkou pozornost je třeba věnovat hned na počátku při zavádění metody výběru souboru kalibračních vzorků, které pokrývají očekávané rozpětí hodnot znaku u vzorků měřených v budoucnu. K sestavení modelů je nutné použít chemometrický software, stejně tak k jejich interní validaci a optimalizaci. Dalšími nezbytnými kroky jsou externí validace modelů a jejich průběžná aktualizace doplněním nejen o vzorky s málo četnou hodnotou znaku, ale i pravidelným doplňováním běžnými vzorky. Model zůstane robustní a částečně se eliminuje vliv proměnlivé matrice přírodního materiálu.

Literatura / Literature

1. de Sá, R., M., Palmer, G., H.: Analysis of β -Glucan in Single Grains of Barley and Malt Using NIR-Spectroscopy. *J. Inst. Brew.* **112**, 2006, 9–16.
2. Rath, F., Erdmann, B.: NIR-spectroscopy for single kernel analysis – a novel tool for the evaluation of homogeneity in barley and malt. *Proc. EBC Congr.* 2003, 79–90.
3. Möller, B.: Near Infrared Transmission Spectra of Barley of Malting Grade Represent a Physical-Chemical Fingerprint of the Sample That Is Able to Predict Germinative Vigour in a Multivariate Data Evaluation Model. *J. Inst. Brew.* **110**, 2004, 18–33.
4. Munck, L., Möller, B.: A New Germinative Classification Model of Barley for Prediction of Malt Quality Amplified by a Near Infrared Transmission Spectroscopy Calibration for Vigour „On Line“ Both Implemented by Multivariate Data Analysis. *J. Inst. Brew.* **110**, 2004, 3–17.
5. Allosio-Ouarnier, N., Robert, P., Bertrand, D., Boivin, P.: A new industrial tool for monitoring the malting process. *Proc. EBC Congr.* 2001, 191–199.
6. Fox, G., P., Onley-Watson, K., Osman, A.: Multiple Linear Regression Calibrations for Barley and Malt Protein Based on the Spectra of Hordein. *J. Inst. Brew.* **108**, 2002, 155–159.
7. Stephan, A., Weber, T., Sieren, B., Methner, F.-J.: NIR-Spektrometrie Anwendungen und Perspektiven in der Brauereianalytik. *Brauwelt* **141**, 2001, 1863–1867.
8. Angelino, S., A., G., F.: Determination of the moisture and nitrogen contents of barley and malt by near infrared spectroscopy (NIRS). *Msch. Brauwiss.* **49**, 1996, 246–248.
9. Angelino, S., A., G., F.: Determination of Moisture and Nitrogen Contents of Barley and Malt by Near Infrared Spectroscopy (NIRS). *Tech. Q. Master. Brew. Assoc. An. MBAA* **33**, 1996, 170–172.
10. Stempf, W., Briem, F., Nast, D., Birk, W., Tavera, M.: Gersten- und Malzanalyse mit der Nahinfrarot-Transmissionsspektroskopie (NIT). *Brauwelt* **136**, 1996, 807–810.
11. Halsey, S., A.: Rapid analysis of whole malt using near infrared reflectance spectroscopy. *J. Inst. Brew.* **93**, 1987, 407–412.
12. Samp, E., J., Sedin, D., Foster, A.: Enhanced NIR Calibration for Wort Fermentability Using Orthogonal Signal Correction. *J. Inst. Brew.* **109**, 2003, 16–26.
13. Sjöholm, K., Tenhunen, J., Tammisola, J., Pietilä, K., Home, S.: Determination of the Fermentability and Extract Content of Industrial Worts by NIR. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **54**, 1996, 135–140.
14. Tenhunen, J., Sjöholm, K., Pietilä, K., Home, S.: Determination of fermentable sugars and nitrogenous compounds in wort by near- and mid-infrared spectroscopy. *J. Inst. Brew.* **100**, 1994, 11–15.
15. Brož, A.: Ověření metody pro předpověď zkvasitelnosti mladiny a rychlosti hlavního kvašení. Diplomová práce VŠCHT Praha 1999. [Verification of method for the forecasts of hopped wort fermentability and rate of primary fermentation. Thesis ICT, Prague 1999]
16. Zanker, G., Beneš, R.: Analytical device for measuring the ethanol concentration in beer based on NIR absorption. *Proc. EBC Congr.* 2001, 750–755.
17. Teass, H., A., Byrnes, J., Valentine, A.: NIR-Analysator zur Ethanol-Bestimmung. *Brauwelt* **135**, 1995, 391–393.
18. Halsey, S., A.: The use of transmission and transreflectance near infrared spectroscopy for the analysis of beer. *J. Inst. Brew.* **91**, 1985, 306–312.
19. Čejka, P., Čulík, J., Kellner, V., Tenkl, L.: Využití infračervené spektrometrie ke stanovení extraktu v původní mladině. *Kvasny Prum.* **43**, 1997, 202–205.

Pivovary patří k nejobdivovanějším firmám ve svých regionech

Sdružení CZECH TOP 100 zveřejnilo v půlce dubna žebříček **100 obdivovaných firem ČR** za rok 2007. Pivovary **Budějovický Budvar, n. p., Plzeňský Prazdroj, a. s. a Rodinný pivovar Bernard a. s.** se staly nejobdivovanějšími firmami ve svých krajích, tedy v Jihočeském, Plzeňském a kraji Vysočina. Dalšími nápojářskými firmami, které zvítězily ve svých krajích, byly Karlovarské minerální vody, a. s. v Karlovarském a Kofola a. s. v Moravskoslezském kraji. Výrobci nápojů tak patří k nejobdivovanějším firmám na více než třetině území naší republiky.

Plzeňský Prazdroj, a. s. a Kofola a. s. se kromě toho umístily i v tzv. All Stars – tedy mezi deseti nejobdivovanějšími firmami v ČR bez ohledu na obory.

Podobných vynikajících výsledků dosahují pivovary a výrobci nealkoholických nápojů opakovaně v celé téměř desetileté historii vyhlašování žebříčku.

Žebříček 100 obdivovaných firem ČR publikuje Sdružení CZECH TOP 100 od roku 1999. Pro účely žebříčku jsou firmy rozděleny do 25 oborů podle metodiky OKEČ (číselník odvětvové klasifikace ekonomických činností). Stovku nejobdivovanějších firem pak tvoří ty, které se umístily na prvních čtyřech místech v každém oboru. Společnosti, které obdržely nejvíce hlasů, jsou zařazeny do desítky nejobdivovanějších firem ČR – ALL STARS, která vzniká bez ohledu na obory. Struktura získaných dat umožňuje rovněž sestavit pořadí nejobdivovaněj-

ších firem v jednotlivých krajích. Žebříček 100 obdivovaných firem ČR sestavuje CZECH TOP 100 na základě hlasování manažerů významných společností, ekonomických a finančních analytiků, zástupců oborových sdružení, svazů a profesních asociací. V rámci hlasování oslovení odborníci hodnotí řadu kritérií, od základních ukazatelů firmy (inovační schopnost a kvalita výrobků a služeb, dlouhodobá hodnota firmy) přes její vztah k lidem ve firmě (kvalita managementu, schopnost přilákat a udržet talentované zaměstnance) po vztah firmy ke společnosti (odpovědnost k životnímu prostředí a vztah ke společnosti, podpora regionu, charitativní a obecně prospěšné projekty, otevřenost a komunikativnost apod.).

več