



**Vývoj kalibračních rovnic k predikci parametrů
výživné hodnoty konzervované kukuřičné siláže
pomocí techniky NIRS**

Pavel Nerušil, Ladislav Menšík, Václav Jambor

Certifikovaná metodika pro praxi



Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

**Výzkumný tým obhospodařování a využívání trvalých travních
porostů**



**Vývoj kalibračních rovnic k predikci parametrů výživné hodnoty
konzervované kukuřičné siláže pomocí techniky NIRS**

**Ing. Pavel Nerušil, Ph.D.
Ing. Ladislav Menšík, Ph.D.
Ing. Václav Jambor, CSc.**

Certifikovaná metodika pro praxi

2018

Vývoj kalibračních rovnic k predikci parametrů výživné hodnoty konzervované kukuřičné siláže pomocí techniky NIRS

Metodika stanovuje progresivní postupy hodnocení vybraných parametrů nutriční hodnoty krmiva (obsah sušiny, N-látek, hrubé vlákniny, škrobu, neutrálně detergentní vlákniny, stravitelnost organické hmoty apod.), stanovovaných v usušených a semletých vzorcích konzervované kukuřičné siláže pomocí blízké infračervené spektroskopie (NIRS). Hodnota koeficientu determinace (R^2) validačního souboru ($n=20$) se pohybovala v rozmezí hodnot 0,58–0,97. Přínosem metody NIRS je podstatné zvýšení efektivnosti a rychlosti prováděných exaktních rozborů ve smyslu naplnění praktických potřeb široké obce uživatelů. Měření (stanovení) je pracovně bezpečné a nemá negativní vliv na životní prostředí. Metodika je primárně určena uživatelům v zemědělských podnicích s rozvinutou živočišnou (zemědělské provozy), v zemědělském výzkumu (včetně vysokých škol) a ve státních institucích.

***Klíčová slova:** blízká infračervená spektroskopie; výživná hodnota; siláž kukuřice; laboratorní kontrola.*

Development of calibration equations to predict parameters of nutritional value of conservation of maize silage using NIRS

The methodology specifies the progressive approaches to evaluation of selected nutrition values of forage (dry matter content, nitrogen substances, crude fibre, starch content, neutrally detergent fibre, digestibility of organic matter etc.) about near infrared spectroscopy (NIRS). Values for the validation file determination coefficients range from 0.58 to 0.97. The benefit of the methodology is a significant increase in the rate of exact analysis for a wide range of customers. The analysis is very safe and environmentally friendly. The methodology is primarily intended for users in agricultural enterprises with developed livestock, agricultural research (including universities) and state institutions.

***Keywords:** near infrared spectroscopy; nutrition value; maize silage; laboratory control.*

Certifikovaná metodika je výstupem řešení projektu č. MZE-RO0418 „VZ07: Pěstování pícnin na orné půdě a obhospodařování TTP pro udržení biodiverzity, půdní úrodnosti, kvality a bezpečnosti krmiv“ (75 %), projektu NAZV č. QJ1510179 (15 %) a projektu NAZV č. QJ1510391 (10 %).

Autorský kolektiv

Ing. Pavel Nerušil, Ph.D., podíl 35 % (VÚRV, v.v.i.), Ing. Ladislav Menšík, Ph.D., podíl 35 % (VÚRV, v.v.i.), Ing. Václav Jambor, CSc., podíl 30 % (NutriVet s.r.o.)

Oponenti:

Ing. David Čížmár, Ph.D., ÚKZÚZ Brno
prof. Ing. Jiří Skládanka, Ph.D., Mendelova univerzita v Brně

Foto na obálce: L. Menšík

Publikace neprošla jazykovou úpravou.

Metodika je určena pro zemědělskou praxi, pracovníky v zemědělském výzkumu, školství a poradce. K využití metodiky byla uzavřena smlouva s firmou AGROSPOL, agrární družstvo, se sídlem v Kninicích, která doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi. Metodika byla schválena orgánem státní správy (ÚKZÚZ Brno) pod č.j. UKZUZ 085037/2018. ÚKZÚZ Brno doporučuje tuto metodiku pro využití v praxi.

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha 6 – Ruzyně, VS Jevíčko, 2018
ISBN 978-80-7427-277-6

Obsah

1. Úvod	4
2. Cíl metodiky	4
3. Současný stav řešené problematiky	4
3.1. Predikce kvality konzervovaných kukuřičných siláží pomocí techniky NIRS.....	4
3.2. NIR spektroskopie	5
4. Experimentální část	10
4.1. Výběr kalibračních vzorků a použité referenční metody rozboru	10
4.2. Predikce výživné hodnoty konzervované silážní kukuřice.....	11
4.3. Potenciál NIR analýzy a výhled	15
5. Závěr	16
6. Srovnání novosti metodických postupů a další přínosy.....	16
7. Ekonomický přínos	17
8. Popis uplatnění metodiky	17
9. Seznam publikací, které předcházely metodice	17
Literatura	18
Seznam obrázků, tabulek a zkratk	21

1. Úvod

Zemědělská praxe v posledních letech klade vysoké nároky na kvalitu a jakost zemědělských plodin, surovin, ale i objemných krmiv, jako např. kukuřičných siláží.

Kukuřičná siláž je krmivo, které vzniká fermentací řezanky kukuřice za anaerobních podmínek. Výslednou výživnou hodnotu kukuřičné siláže v první řadě nejvíce ovlivňuje stav kukuřice před sklizní, doba sklizně a technologické podmínky uskladnění sklizené řezanky. Kukuřičná siláž je krmivo glycidového charakteru, hlavní živinou je tedy energie, která se vyskytuje ve třech formách. Jedná se o glycidy ve formě cukrů, škrobu a vlákniny. To znamená, že nejdůležitější při sklizni kukuřice je maximální výnos stravitelné energie a její uchování ve formě kukuřičné siláže. U vysokoprodukčních zvířat - dojnic velmi důležitou roli bude kromě výnosu stravitelné energie z jednotky plochy hrát velkou roli také koncentrace energie ve výsledném krmivu, resp. kukuřičné siláži. Kukuřičná siláž obsahuje 8 % N-látek, 3 % tuku, v průměru cca 30 % škrobu (20–35 % podle podílu palice kukuřice), ale obsah vlákniny ve formě NDF tvoří 40–50 %. Z toho vyplývá, že největší podíl tvoří vláknina.

Vysokoprodukční dojnice musí mít pro vysokou produkci mléka zajištěné v krmné dávce velké množství živin (energie), protože v případě nutričního stresu dojde k výrazné ztrátě na produktivitě a poklesu zdraví zvířat (Schwartzkopf-Genswein et al. 2004; Holtshausen et al. 2011).

Tyto náročné požadavky na kvalitu krmiv je však obtížné plnit pouze prostřednictvím klasických analytických (laboratorních) metod, které jsou sice přesné a dostatečně reprodukovatelné, ale zároveň velmi často náročné na personál pracující ve specializované laboratoři, dále na čas (relativně dlouhá doba stanovení výsledku), ale i na finanční prostředky (Mudřík et al. 2013; Berzaghi, Marchesini 2014).

V současné době již existuje řada chemických analytických metod, např. spektroskopie v blízké infračervené spektrální oblasti (NIR), které pro stanovení základních parametrů výživné hodnoty (např. u řezanky kukuřice v čerstvém stavu, ale i fermentované kukuřičné siláže) uplatňují jejich fyzikální a fyzikálně chemické vlastnosti (Lovett et al. 2004; Čížmár 2007; Muselík et al. 2012; Bien, Hrbáčková 2017 aj.).

2. Cíl metodiky

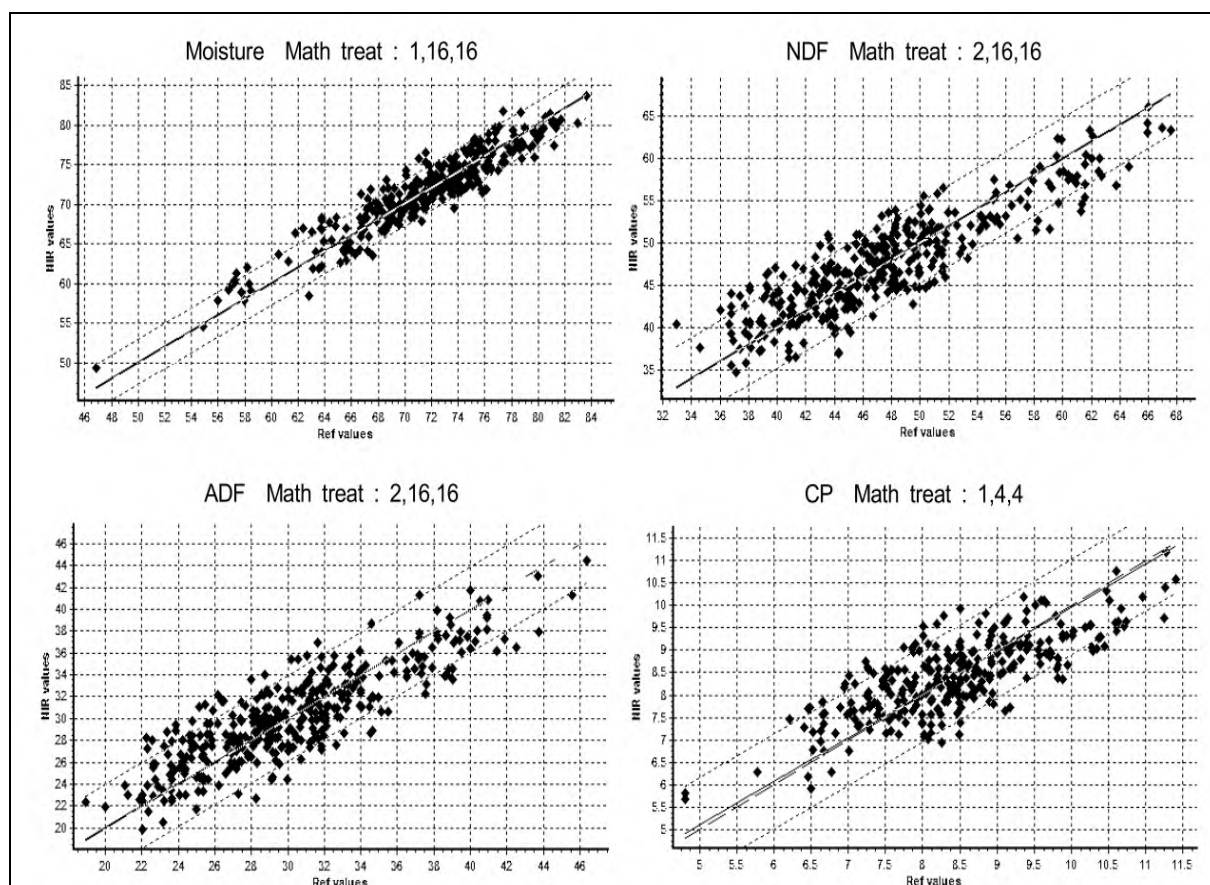
Metodika představuje na základě vývoje kalibračních rovnic progresivní postupy hodnocení vybraných parametrů nutriční hodnoty krmiva (obsah sušiny, N-látek, hrubé vlákniny, škrobu, neutrálně detergentní vlákniny, stravitelnost organické hmoty apod.), stanovovaných v usušených a semletých vzorcích konzervované kukuřičné siláže pomocí blízké infračervené spektroskopie (NIRS). Výsledky přesnosti predikce výživné hodnoty fermentované kukuřičné siláže byly ověřeny na nezávislém validačním souboru, který potvrdil shodnost obou souborů.

3. Současný stav řešené problematiky

3.1. Predikce kvality konzervovaných kukuřičných siláží pomocí techniky NIRS

V oblasti vývoje kalibračních rovnic pro predikci parametrů výživné hodnoty konzervované kukuřičné siláže pomocí NIR spektroskopie je ve světové literatuře v posledních 15-ti letech zaznamenáno velmi omezené množství studií, které se danou problematikou zabývají např. (Lovett et al. 2004; Sørensen 2004; Kaňski, Kowalski 2005; Park et al. 2005; Lomborg et al. 2009). V práci Park et al. (2016) bylo pro predikci

chemických parametrů (pH) a kvality nutričních hodnot (NL, ADF, NDF) fermentovaných kukuřičných siláží v letech 2014–2015 použito cca 407 vzorků. Kalibrační modely (rovnice) pro parametry fermentace měly nižší přesnost predikce než chemické složky. Pro sušinu se hodnoty kalibrace koeficientů determinace pohybovaly $R^2=0,86–0,92$; dusíkaté látky (NL): $R^2=0,72–0,87$; neutrodetergentní vlákninou (NDF): $R^2=0,81–0,88$ a acidodetergentní vlákninu (ADF): $R^2=0,77–0,85$ (viz obr. 1). Práce Restaino et al. (2009) uvádí příznivé hodnoty koeficientů determinace $R^2=0,75–0,81$ pro parametry sušina, NL, ADF, NDF u fermentovaných siláží z travních druhů a leguminóz. Obdobné hodnoty koeficientů determinace pro sušinu a NDF u fermentované kukuřice uvádí práce (Liu et al. 2008), dále pro parametr stravitelnost organické hmoty (OMD): $R^2=0,74$ (Lovett et al. 2005).



Obr. 1. Těsnost vztahu mezi laboratorními rozbory a NIRS predikcemi nutriční hodnoty kukuřičných siláží (vlhkost, NDF, ADF a NL) - Park et al. 2016.

Výsledky předchozích experimentů a studií potvrzují, že metodu NIRS lze využít k predikci chemického složení a kvality fermentovaných kukuřičných siláží jako rutinní způsob jejich analýzy a hodnocení.

3.2. NIR spektroskopie

Blízká infračervená spektroskopie je v současné době běžně používanou analytickou metodou v celé řadě výzkumných i kontrolních laboratořích (Muselík et al. 2012). Jejím principem je absorpce části infračerveného záření jednotlivými molekulami analyzovaného vzorku. Spektroskopie v NIR oblasti se v potravinářství a zemědělství uplatňuje již od 60. let minulého století /stanovení obsahu vody, proteinů, tuků, vlákniny, popela a sacharidů/ (Marten et al. 1989; Mlček et al. 2010). NIR analýza poskytuje výsledky v aktuálním čase, tzn. ještě ve výrobní technologii, před zabalením a expedicí současně během jednoho měření,

v čase od několika sekund do jedné minuty (Bien, Hrbáčková 2017).

NIR spektroskopii se v zemědělství se zabývají práce Williams, Norris (2001), De Boever et al. (2002), Robert et al. (2004), Burns, Ciurczak (2007), Jacobi et al. (2009, 2011), Decruyenaere et al. (2015) aj. Naproti tomu ucelených publikací v českém jazyce pojednávajících o využití NIR spektroskopie pro hodnocení zemědělských komodit je velmi málo např. Míka (1997), Pekárková et al. (2000), Míka et al. (2008), Dvořáček et al. (2014), Nerušil et al. (2016).

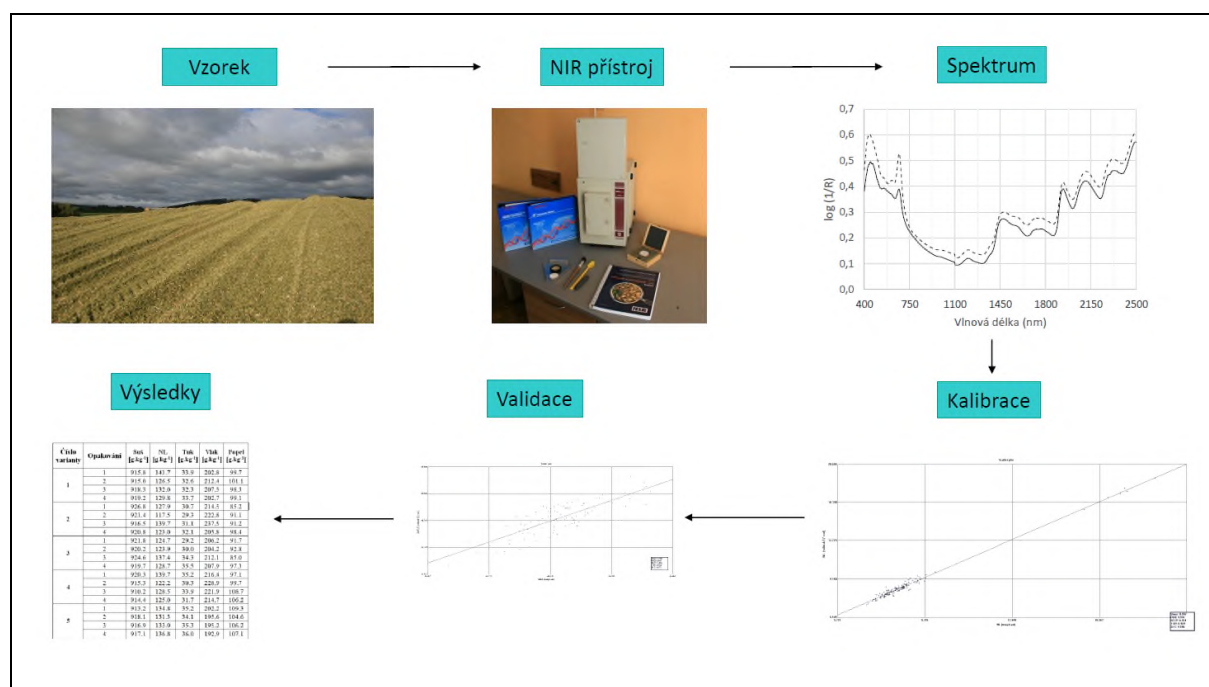
Principy

Infračervená spektroskopie je analytická metoda, určená zejména pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a také jako technika využitelná pro stanovení anorganických látek. Principem metody je pohlcování nebo reflexe různých vlnových délek dopadajícího záření, které závisí na chemickém složení analyzovaného vzorku.

Blízká infračervená spektroskopie (NIRS) je analytická technika, která využívá zdroj emitujícího záření známé vlnové délky (obvykle 800–2500 nm, tj. 12500–4000 cm^{-1}). Z praktických důvodů se podle vlnočtů rozlišuje oblast vzdálená (FIR, far infrared) vymezující vlnočty do 200 cm^{-1} , střední (MIR, middle infrared), které odpovídají vlnočty 4000–200 cm^{-1} a blízká (NIR, near infrared), které odpovídá rozmezí vlnočtů 12821–4000 cm^{-1} (Muselík et al. 2012). V ní se nalézá většina vibrací vazeb -CH, -OH, -SH a -NH. Všechny absorpční pásy jsou výsledkem svrchních tónů (angl. *overtones*) či kombinací přechodů do základních MIR pásů (Siesler et al. 2002).

Teorii NIR se zabývala řada odborníků a bylo vydáno mnoho příruček a vědeckých pojednání (Schneider, Štoka 1988; Siesler 2007; Griffiths, Dahm 2007; Vorlová et al. 2014). Pro většinu aplikací kvantitativní analýzy prováděných v režimu reflektance je využívána oblast 1200–2500 nm z důvodu obtížného měření absorpčních pásů mimo uvedené rozpětí.

Technika měření NIRS spekter včetně různých druhů přístrojů a zařízení je uvedena v metodice Nerušil et al. (2016) a schéma NIR analýzy uvádí obr. 2.



Obr. 2. Schéma NIR analýzy.

Chemometrické metody pro NIR spektroskopii

Analytická informace každého změřeného vzorku je zakódována do širokého NIR spektra s řadou překrývajících a interagujících zón. Je proto potřebné mít vhodné chemometrické (statistické) nástroje pro jejich rozklíčování. V praxi se NIR spektrometrie uplatňuje v kvantitativních, ale i kvalitativních analýzách. Zemědělská praxe upřednostňuje kvantitativní postupy. Potravinářská, farmaceutická a obecně technologická praxe využívá v hojné míře postupy kvalitativní (Dvořáček et al. 2014).

Používané chemometrické postupy vychází z klasických fyzikálně-chemických zákonů. Tím základním je Lambert-Bérův zákon, který zjednodušeně říká, že absorpce při libovolné vlnové délce je úměrná molární koncentraci sledované látky. Takto popsaná závislost však platí pouze pro opticky transparentní kapaliny, měřené v kyvetě s definovanou tloušťkou, při které je dráha průchodu paprsku konstantní.

Ve většině případů, kdy byla pro měření vzorků použita NIR spektrometrie však toto pravidlo dodrženo není a konstantní dráhu paprsku vzhledem k různým specifickým odrazům a interferencím kontrolovat nemůžeme. Proto je pro odhad sledovaných parametrů (analytických veličin) nutné vyvíjet kalibrační modely s využitím pokročilých chemometrických algoritmů. Tyto specifické statistické postupy obvykle vyžadují rozsáhlou sadu kalibračních standardů (běžně uváděnou v literatuře v počtu 30 a více).

Výběr standardů by proto měl být uvážení a měl by respektovat jistá specifika. Soubor kalibračních vzorků musí být dostatečně reprezentativní, měl by pokrývat celou očekávanou variabilitu sledovaných charakteristik, které pak budou kvantitativně analyzovány a měl by zohlednit i další fyzikální či chemickou proměnlivost u měřených vzorků.

Referenční metody

NIR spektrum je přesně určeno na základě X-H vazeb ve vzorku. Je to souhrn NIR absorpčních pásů funkčních skupin určujících hlavní chemické a fyzikální vlastnosti píce. Naproti tomu referenční metoda, na základě jejíchž výsledků se provádí zpracování kalibrační rovnice NIR, mnohdy není dobře definována chemicky, takže není vždy snadné k ní vztáhnout spektroskopická data s náležitou přesností. Např. obsah vody se běžně stanoví sušením vzorku při 105 °C do konstantní váhy nebo při 135 °C po dobu dvou hodin. Ve skutečnosti i po této proceduře rostlinný materiál obsahuje ještě zbytkovou vodu, zatímco jiné těkavé (bezvodné) látky nekontrolovaně unikají. Proto NIR měření obsahu vody poskytlo shodnější výsledky s alternativní metodou podle Karl Fishera (titračně) než s uzanční metodou sušením. Při stanovení dusíkatých látek (NL) se podle klasického postupu vychází z obsahu N vynásobeného faktorem 6,25 (s ohledem na průměrný obsah N v "rostlinné" bílkovině). NIR je schopna měřit N-H molekulární vazby, zastoupené v molekule bílkoviny. Nepřekvapuje, že shoda NIR měření je lepší s obsahem N ve vzorku než s obsahem NL. Dalším zdrojem disproporcí se může stát vzorkování (odběr průměrného vzorku a následná homogenizace), sušení (ke kalibraci celého souboru vzorků se doporučuje používat pouze jednu metodu sušení), mletí (vzorek se při něm nesmí zahřívat), a velikost síta (měla by být normalizována, např. ≤ 1 mm), promíchání vzorku a plnění do kyvet (Míka 1997). Dříve se prezentace vzorku omezovala na suché semleté seno či semleté zrniny. Dnešní přístroje a software dovolují prezentaci píce v jejich přirozené podobě (sena, siláží, čerstvé píce, napěchovaných ručně do kyvet většího objemu). Na základě praktických zkušeností a ověřování měření vzorků přístrojovou technikou NIR ve VÚRV, v.v.i., VS Jevíčko, se osvědčilo měřit referenční vzorky vícekrát a z dílčích výsledků vypočítat medián. Průměr je méně vhodný.

Kalibrace

Pojem kalibrace je používán k popsání postupu konverze informací o NIR absorpci do hodnot laboratorní referenční metody. Přesnost této konverze se posuzuje na základě směrodatné odchylky kalibrace (SEC) a směrodatné odchylky predikce (*standard error of performance*, SEP). SEP při úspěšné NIR kalibraci bývá asi dvojnásobně veliká ve srovnání se směrodatnou odchylkou při laboratorním stanovení. Vlastní postup NIR kalibrace uvádí např. Míka et al. (2008) v rámcovém schématu.

Vzorky ke kalibraci by měly být odebrány z podobných souborů, které by se měly měřit v budoucnosti. Rovněž i příprava (sušení, mletí, skladování atd.) by měla být podobná přípravě vzorků, které se budou sériově měřit. Je třeba získat co nejširší škálu vzorků s různým chemickým složením, nejen úzkou zájmovou oblast pro momentální měření. Získání dostatku vzorků s širokým variačním rozpětím hodnot však neznamená zařazení vzorků, které do zájmového souboru evidentně nepatří! Naše zkušenosti ukazují, že kalibrace postavená na méně než 100 vzorcích bývá málokdy dostatečně robustní, s výjimkou stanovení např. obsahu vody nebo N (obecně vysoká korelace s laboratorní metodou) u relativně homogenních materiálů (např. jednotlivé druhy obilovin). Referenční hodnoty by měly vycházet ze zaručených (přesných) rozborů, provedených duplicitně a zprůměrovaných (pokud vyhovují toleranci). Při dodatečné kontrole vzorků, které vybočují z běžného okruhu měření (*outliers*), se ve 45 % případů ukazuje, že se jedná o vzorky nepřesně analyzované klasickými postupy "mokré chemie", a zbytek jsou vzorky spektrálně zvláštní (Míka et al. 2008). Obecně je také doporučováno provádět rozborů klasickými uznanými metodami pokud možno v jedné laboratoři, neboť jakákoliv odchylka od přesně určeného postupu vnáší do kalibračního modelu možné zdroje chyb. Důležitá je pečlivá kontrola identifikace vzorků (dbát, aby se nepomíchalo pořadí apod.), neboť neuvěřitelně mnoho chyb měření (včetně kalibrace) jde na vrub "lidského" faktoru. Vzorky je třeba chránit před extrémní světla, tepla a vlhkosti. Pokud se v obsluze střídají dvě osoby, obě by měly pracovat stejně pečlivě. Měření NIR spekter musí předcházet každodenní kontrola monochromátoru (diagnostika), abychom si byli jisti, že přesnost nastavení vlnových délek ($\pm 0,3$ nm), opakovatelnosti ($\pm 0,2$ nm) a charakteristiky pozadí (20 μ OD, RSM) odpovídá specifikacím od výrobce. Laboratorní teplota a vlhkost by během měření neměla podstatně kolísat, naprosto nevhodný je průvan. Rovněž zacházení se vzorky a postup vlastního měření by měl být metodicky spíše pomalejší, aby se tím zajistilo, že hodnoty nebudou kvůli tomu vybočovat z řady. Duplicitní (paralelní) plnění materiálu do kyvet a jedno měření je rozhodně vhodnější než dvojí měření jedné naplněné kyvety. Duplicitní snímání spekter (měření) je sice instruktivní, ale ne striktně nezbytné. Na konci měření je vhodné zopakovat "diagnostiku", abychom se přesvědčili o stabilitě přístroje. Dále je možno naměřená spektra zálohovat na externí úložiště dat z důvodu neočekávané poruchy PC. Při monitoringu spekter v prohlížeči je třeba kriticky posoudit každou abnormitu a případně provést opakované proměření.

Regresní modelování

Vlastnímu zpracování kalibrační rovnice předchází několik dílčích kroků. Nejdříve se provede vložení referenčních hodnot do souboru spekter (*spectra file*) a vyvolá se graf korelace vlnové délky oproti korelačnímu koeficientu za použití log 1/R (1. či 2. derivace log 1/R). Jestliže je korelační graf nevyvážený, se "šumy" či nestrukturovaný, je málo pravděpodobné, že mnohonásobné modelování bude úspěšné. Pomocí SMLR (postupná mnohonásobná lineární regrese) na log 1/R a její 1. či 2. derivace je nejdříve nutno zjistit tzv. "outliery" (odlehle hodnoty). Ty mohou být dvojí: Jednak tzv. t-outliery (zjištěné pomocí t-statistik), u nichž jsou referenční hodnoty (z laboratoře) podezřelé, a H-outliery (zjištěné pomocí H-statistiky), u nichž se spektrum vzorku odlišuje od jiných v kalibračním souboru. V prvním případě je kritická úroveň 2,5, ve druhém 3,0. Rozdělení H-hodnot je rovněž

důležité při rozhodování o případné eliminaci outlierů. Rovněž je třeba ověřit, zda by technika rozkladu spekter za použití PCA (analýza hlavních komponent) zlepšila přesnost predikce. Aplikací PCA analýzy lze snížit chybu predikce o pětinu ve srovnání s SMLR a obecně ji považujeme za velice spolehlivou. Je třeba se vyhnout tzv. *overfitting* (přílišné precizování spektrálních dat různými derivacemi, až tyto ztratí výpovědní sílu informací). Dále je nutno mít na zřeteli skutečnost, že korelace může vzejít z *overfitting* příliš velkého počtu vlnových délek a příliš malého počtu vzorků. Kritériem pro výběr kalibrační rovnice je SEC a R^2 (koeficient determinace). Zadááním dalších vlnových délek se vždycky snižuje SEC a zvyšuje R^2 . Vybraná kalibrační rovnice by měla mít co nejmenší SEC při malém počtu vlnových délek, z nichž žádná by měla mít dílčí statistiku $F < 10$. Regresní koeficienty v rovnici by neměly přesáhnout 10, jestliže analytická data jsou vyjádřena v %. Většina druhů software obsahuje postup zvaný vnitřní křížová validace (*internal cross-validation*), jímž se kalibrační soubor opakovaně segmentuje na skupiny. Jedna skupina se ponechává pro validaci, zbylá (zbylé) pro kalibraci. Tento postup se opakuje, dokud všechny skupiny nebudou pro validaci použity alespoň jednou. Posouzení vhodnosti predikčního modelu pro jeho praktické využití je obvykle prováděno podle koeficientu determinace R^2 (tab. 1).

Tab. 1: Kategorizace získaných kalibračních modelů podle koeficientu determinace (Dvořáček et al. 2014).

Kategorie použitelnosti modelu	Rozsah koeficientu determinace R^2
excelentní	$> 0,90$
použitelný pro běžnou zemědělskou praxi	$0,82-0,90$
pouze orientační odhad sledovaného znaku	$< 0,82$

Externí validace

Vybraná část souboru vzorků s referenčními hodnotami, ponechaná mimo kalibrační soubor, se označuje jako validační soubor a slouží k ověření kalibračních rovnic. "Nejlepší" rovnice se vybírá na základě SEP a R^2 . Zatímco SEC se vždycky snižuje (tj. zlepšuje) s přidáváním vlnovými délkami, SEP nikoli. Ve skutečnosti SEP většinou dosáhne minima, pak má s přidáváním vlnovými délkami tendenci se znovu zvyšovat tak, jak stoupá nebezpečí *overfitting*. Směrnice přímky mezi "aktuálními" vs. "predikovanými" hodnotami by měla být blízká hodnotě 1,0, což udává, že přímka je postavena k osám x, y pod úhlem 45° . Pro dosažení takové hodnoty by měl být průměr a směrodatná odchylka validačního souboru velice podobné kalibračního souboru. Při výběru "nejlepší" kalibrační rovnice se používají všechna tato kritéria, přičemž snaha je dodržet co nejmenší počet *terms* (jako vysvětlitelných proměnných). Jestliže má obsluha přístroje dostatečné zkušenosti s chemickou interpretací NIR spekter, je také vhodné zjistit, které vlnové délky byly vybrány pro rovnice. V okamžiku, kdy opakovaná zpracování kalibračních rovnic nepřinášejí zlepšení statistických ukazatelů, má teprve smysl provést tzv. křížovou validaci (*cross-validation*) souboru. Cílem je zvýšení počtu vzorků, vylepšení údajů při stejných segmentech vlnových délek a zlepšení dílčích regresních koeficientů (hodnoty B_0) v kalibrační rovnici. Pro vylepšení kalibrační rovnice je k dispozici řada postupů, které však mají jistá omezení. Např. postupná mnohonásobná lineární regrese (*stepwise multiple linear regression*) je vystavena řadě nepříznivých efektů, jako je kolinearita, špatná podmíněnost a *overfitting*, a stává se vážně nespolehlivou, jestliže údaje referenční metody jsou nepřesné nebo pocházejí z různých laboratorů s různými analytickými finesami. Většinou úspěšnější bývá zavedení regrese dílčích nejmenších čtverců (PLS). Algoritmus PLS redukuje spektrální data do několika málo proměnných (Wold et al. 1983). U kalibračního souboru vzorků je možno provést předselekci (předvýběr) na základě samotných NIR spekter, umožňující analyzovat referenčními metodami dostatečně širokou kolekci vzorků, aniž by zde byly obsaženy vzorky, které nepřinášejí další informace. Vzorky

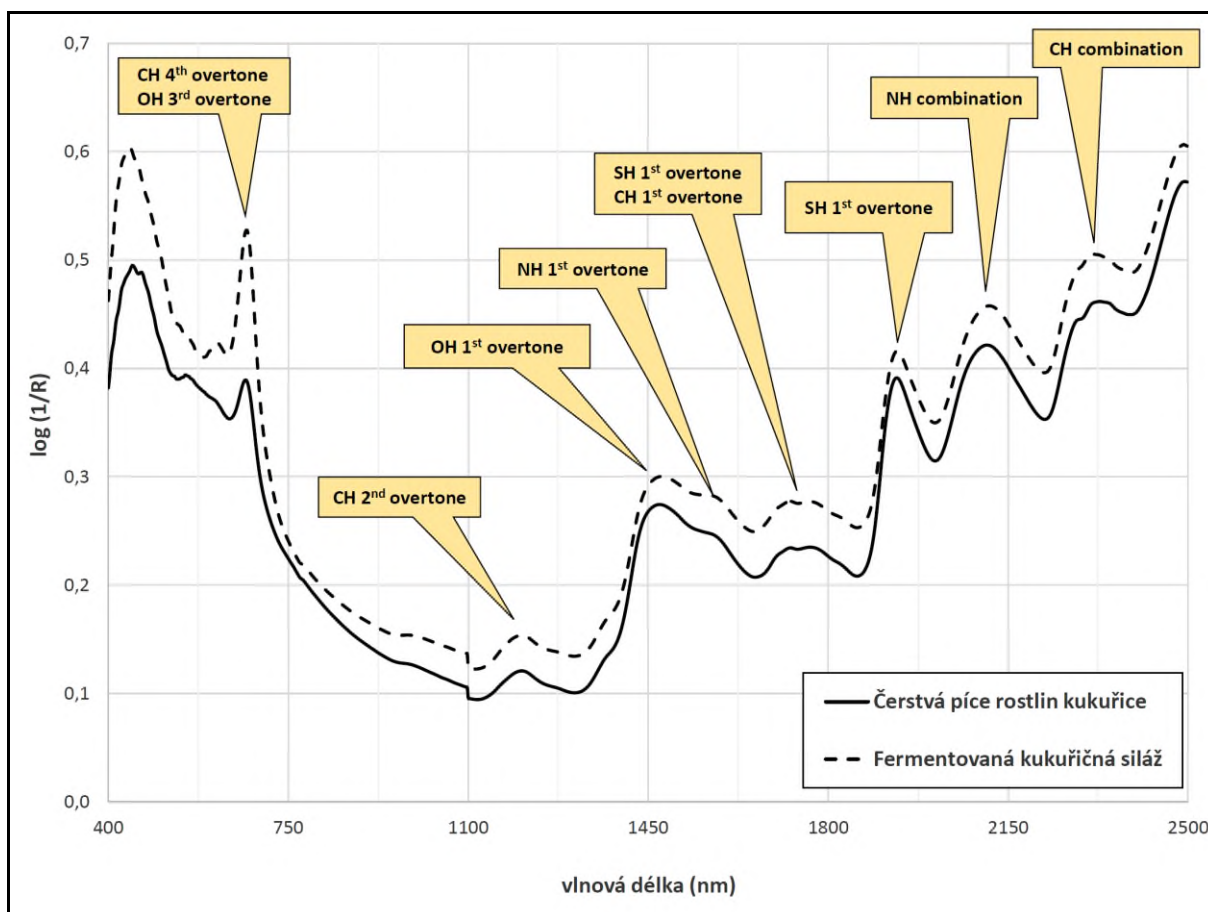
pro testování se mohou také vybírat cíleně podle samotných spekter, aby se definoval rozsah a nejzazší hranice populace (např. software ISI poskytuje několik nabídek pro vlastní provedení), Infrasoftware International (2000).

4. Experimentální část

4.1. Výběr kalibračních vzorků a použité referenční metody rozboru

Podkladem pro zpracování kalibračních a validačních rovnic ke stanovení výživné hodnoty fermentované kukuřičné siláže byly usušené a na laboratorním mlýnku standardně pomleté (velikost částic <1 mm) vzorky siláže ze sklizňových let 2015 až 2016. Vzorky siláže pro hodnocení byly odebrány v řadě zemědělských podniků ČR (jižní Morava, severní Morava, Vysočina, apod.), charakteristických odlišnými agroekologickými pěstebními podmínkami. To umožnilo shromáždit obsáhlou kolekci vzorků s vysokou variabilitou hodnot ukazatelů parametrů nutriční hodnoty krmiva kukuřičné siláže. Pro zpracování kalibračních rovnic bylo použito celkem 176 vzorků a jejich následnou validaci dalších 20 vzorků.

Při odběru vzorků byl dodržen metodický postup v souladu s nařízením komise ES č. 152/2009. Odebrané vzorky kukuřičné siláže byly usušeny při teplotě $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ za intenzivního větrání po dobu 24 hod. Takto připravené vzorky byly použity k chemické analýze, resp. paralelnímu proměření na přístrojové technice NIR.



Obr. 3: Absorpční pásy NIR spektroskopie dle (NIR Absorption Chart, NDC, 2013) na příkladu kukuřice seté (čerstvá píce a fermentovaná kukuřičná siláž).

U vzorků byla laboratorně stanovena sušina fermentované řezanky při $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ (průměrná hodnota dvou paralelních stanovení jednoho vzorku). Chemické analýzy vzorků v rozsahu

stanovení obsahu organických živin (dusíkatých látek, vlákniny, škrobu) byly provedeny referenčními metodami podle vyhlášky č. 415/2009 Sb. o stanovení požadavků na odběr vzorků a způsobu zveřejnění metod laboratorního zkoušení produktů ke krmení. Dále podle Mertense (2002) a v souladu s ČSN EN ISO 16472, byla stanovena NDF (NDF s amylázou). Stravitelnost organické hmoty (SOH) byla stanovena podle Ørskova, McDonalda (1979), metodou *in situ* (*in sacco*) v sáčcích ponořených 24 hodin do bacheru nelaktujících dojníc s bacherovou kanylou při zachovné krmné dávce.

Identické vzorky byly proměřeny na disperzním spektrometru FOSS NIRSystems 6500 instrument (Company NIRSystems, Inc., Silver Spring, USA), umístěné na pracovišti VÚRV, v.v.i., Praha, VS Jevíčko. Měření vzorků bylo provedeno v malých kruhových kyvetách (*small ring cups*) ve dvou paralelních opakováních. Skenování vzorku bylo nastaveno v režimu reflektance pro oblast 400–2500 nm, tj. ve viditelné a blízké infračervené oblasti spektra, krok snímání 2 nm. Na obr. 3 jsou uvedena charakteristická spektra fermentované kukuřičné siláže a čerstvé celé rostliny kukuřice s vyznačením maxima absorpčních pásů molekulárních vazeb. Pro vývoj kalibračních rovnic a ověření validačních rovnic včetně grafických výstupů byl využit software WinISI II (Infrasoft International, Inc., USA), verze 1.50. Byla použita metoda částečných nejmenších čtverců PLS (*angl. Partial Least Squares*), nejlepší a nejstarší metoda používaná pro spektrální kalibraci a predikci mezi více lineárními kalibračními algoritmy (Næsset et al. 2005, Wang et al. 2006). Dále byla použita modifikovaná PLS (Martens, Naes 1992; Cheng, Wu 2006; González-Martín et al. 2015).

4.2. Predikce výživné hodnoty konzervované silážní kukuřice

Výživná hodnota píce je sice významným faktorem, určujícím živočišnou produkci, není však jediným (Míka et al. 1997). Proto se u jednotlivých parametrů výživné hodnoty připojuje přívlastek "potenciální" (stravitelnost, degradovatelnost v bacheru) a v případě měření NIR, že se jedná o predikci (odhad). To nezmenšuje skutečné problémy standardizace krmivářských pokusů u zvířat a přínos metod *in vitro* k měření těchto důležitých atributů. Při využití NIR spektroskopie je obecně známo, že predikce obsahu sušiny a NL je jednou z nejlepších aplikací NIR u krmiv. Stanovení obsahu vody bylo jednou z prvních praktických aplikací NIR v analýze zemědělských produktů a potravinářských surovin. NIR absorpční spektrum čisté vody má pět absorpčních pásů (s maximy při 1940, 1450, 1190, 970 a 760 nm při teplotě 20 °C), čisté NL mají vzhledem k absorpci amidických skupin zřetelné dva absorpční pásy (2050 a 2180 nm), viz obr. 3.

Tab. 2: Predikce výživné hodnoty fermentované kukuřičné siláže pomocí techniky NIRS.

Parametr	Kalibrace				Predikce	
	n	Průměr	SEC	R ²	SEP	R ²
NL	168	8,537	0,226	0,98	0,316	0,97
Sušina	153	36,694	1,421	0,90	2,079	0,81
NDF	140	42,576	1,663	0,76	2,194	0,68
Škrob	150	32,010	1,339	0,91	2,229	0,79
Vláknina	150	19,597	1,224	0,76	1,305	0,73
Popel	161	3,638	0,304	0,89	0,334	0,87
SOH	151	69,240	2,429	0,75	3,196	0,62
ADF	175	23,609	1,817	0,63	1,930	0,58

Pozn.: n - počet vzorků kalibrace; Průměr - průměrná hodnota; SEC - směrodatná odchylka kalibrace; SEP - směrodatná odchylka predikce; R² - koeficient determinace; NL - dusíkaté látky; ADF - acidodetergentní vláknina; NDF - neutrodetergentní vláknina; SOH - stravitelné organické látky.

Dosažené výsledky přesnosti predikce výživné hodnoty fermentované kukuřičné siláže ověřené na nezávislém validačním souboru o počtu 20 vzorků shodného charakteru tento předpoklad potvrzují (tab. 2 a 3). Nejvyšších hodnot přesnosti predikce, vyjádřených

koeficientem determinace bylo dosaženo u obsahu NL ($R^2=0,97$) a sušiny ($R^2=0,86$), čím se potvrdily dosavadní poznatky a zkušenosti s přesností predikce těchto parametrů u organických materiálů podobného charakteru.

Tab. 3: Validace výživné hodnoty fermentované kukuřičné siláže pomocí techniky NIRS.

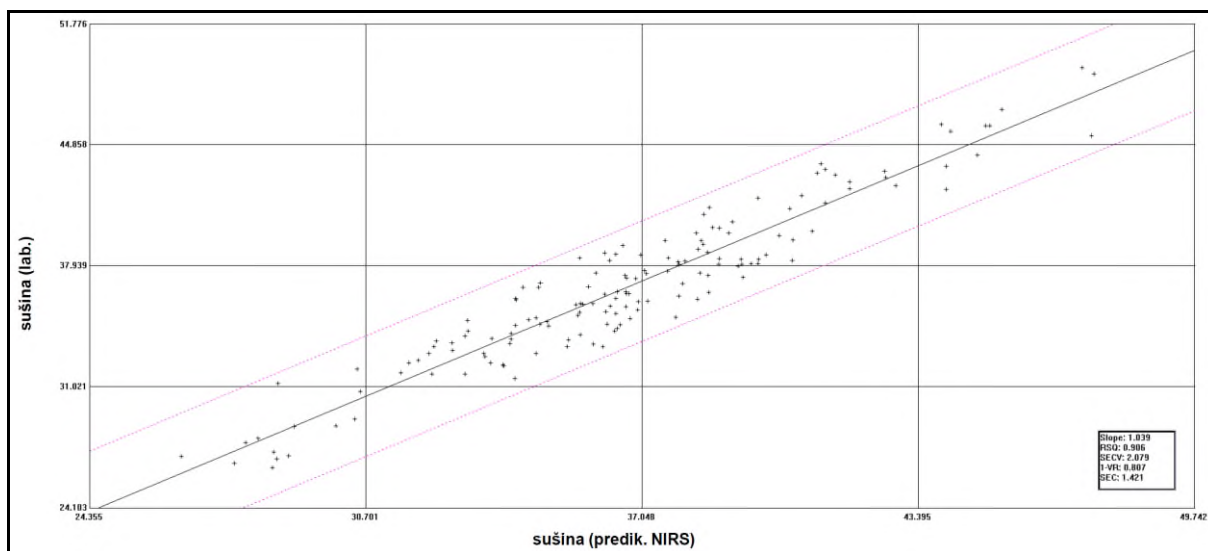
Parametr	Validace					
	n	SEP	SEP (C)	BIAS	SLOPE	R ²
NL	20	0,021	0,024	0,036	0,972	0,97
Sušina		1,896	1,944	0,081	1,232	0,86
NDF		1,262	1,149	0,583	1,174	0,83
Škrob		1,463	1,500	-0,038	0,881	0,73
Vláknina		1,345	1,342	0,314	1,121	0,72
Popel		0,322	0,319	-0,084	1,224	0,62
SOH		3,452	3,538	-0,170	1,005	0,62
ADF		1,761	1,586	0,843	1,249	0,59

Pozn.: n - počet vzorků kalibrace; SEP - směrodatná odchylka predikce; SEP (C) - směrodatná odchylka predikce korigovaná konstantou kalibrační křivky (BIAS); BIAS - konstanta kalibrační křivky; SLOPE - směrnice kalibrační křivky; R² - koeficient determinace; NL - dusíkaté látky; NDF - neutrodetergentní vláknina; SOH - stravitelné organické látky; ADF - acidodetergentní vláknina.

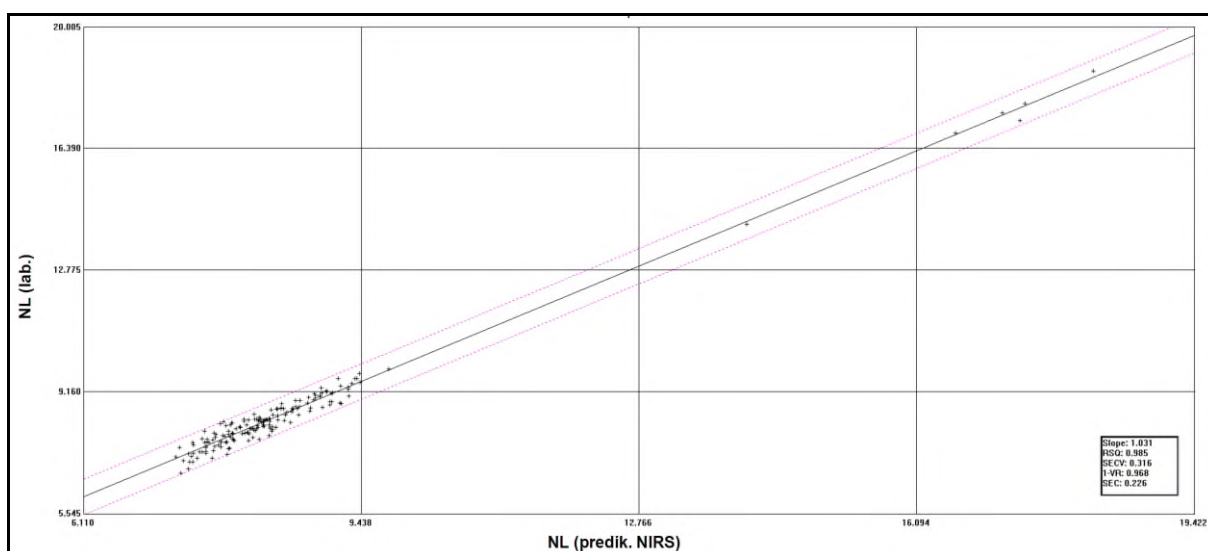
Při stanovení obsahu vlákniny a její frakcí (NDF, resp. ADF) bylo u prezentovaného kalibračního modelu dosaženo vyšší shody s referenčními hodnotami u parametru NDF a to na úrovni $R^2=0,83$; u obsahu vlákniny, resp. ADF pak hodnota byla nižší a činila $R^2=0,72$, resp. $R^2=0,59$. Maxima absorpčních pásů celulózy se nacházejí na vlnových délkách 1544 a 2336 nm. Pokud se týká stanovení obsahu škrobu jako jednoho z nejdůležitějších parametrů výživné hodnoty kukuřičné siláže, maximum hlavního absorpčního pásu se nachází na úrovni 2100 nm, přičemž přesnost predikce činila $R^2=0,73$. Z celkového výčtu predikovaných parametrů byla zjištěna nižší shoda s referenčními hodnotami u obsahu popelovin ($R^2=0,62$).

V současné době v praxi velmi požadovanou a rozšířenou aplikací je měření stravitelnosti, kterou využívají jak tvůrci krmných dávek a výživoví poradci, tak i pracovníci výzkumu v oblasti výživy a krmení hospodářských zvířat. Předpokladem pro vytvoření robustního a spolehlivého kalibračního modelu je dostatečně vysoký počet kalibračních vzorků ($n>300$) a současně dostatečně široké variační rozpětí hodnot, spolehlivě pokrývající testované vzorky při budoucí predikci. Z řady obsáhlých studií vyplývá, že při NIR predikci *in vitro* - charakteristik (např. stravitelnost organické hmoty) se musí brát v úvahu více než jedna referenční metoda (Shenk et al. 2007), neboť každá v sobě nese určitou chybu. Jak je patrné ze statistických charakteristik regrese predikovaných stravitelností, hodnota koeficientu determinace dosažená u stravitelnosti organické hmoty činila $R^2=0,62$. Dosažené výsledky přesnosti predikce parametru stravitelnosti NDF, jehož model byl v rámci experimentálních prací rovněž ověřován, byly vzhledem k nízkému počtu kalibračních vzorků neuspokojivé ($R^2<0,50$) a bude nutno dále pracovat na jeho podstatném zvýšení.

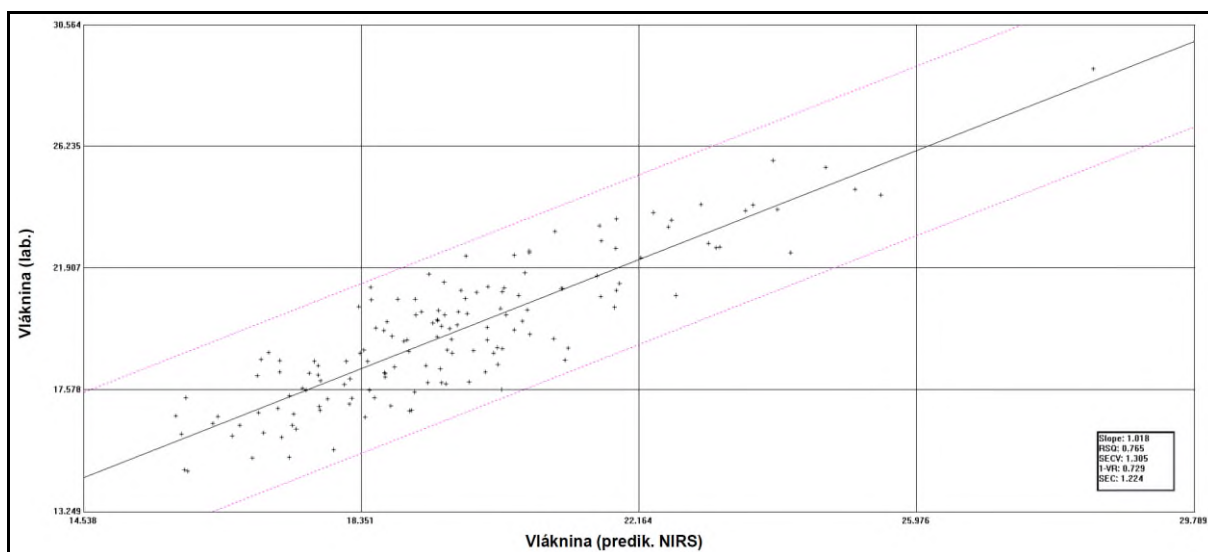
Chyby predikce živočišné odezvy (užitkovosti) bývají obecně větší než chyby predikce chemického složení. Může se na tom podílet už samotné shromažďování dat použitých pro kalibraci i možným výskytem několika outlierů. Při využití NIR spektroskopie je nutno mít na zřeteli, že kalibrace je prostý matematický postup, jehož úspěšnost je založená na těsnosti vztahu mezi NIR spektry a chemickým složením. Proto nelze očekávat, že NIR bude přesně predikovat parametry kvality píce jakéhokoliv vzorku či populace vzorků, jejichž charakteristiky nebyly zařazeny do kalibrace. U predikovaných parametrů zpracovaných kalibračních rovnic bylo dosaženo statisticky průkazné závislosti kalibračního modelu na referenčních hodnotách, grafické zpracování je uvedeno na obr. 4–10.



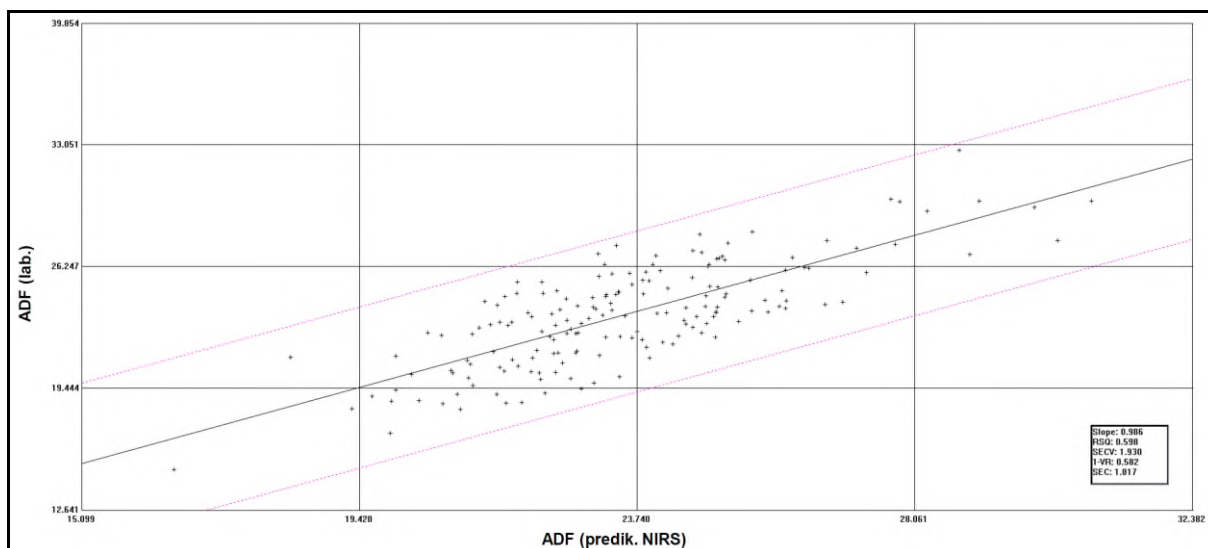
Obr. 4: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu Sušina ve fermentované kukuřičné siláži.



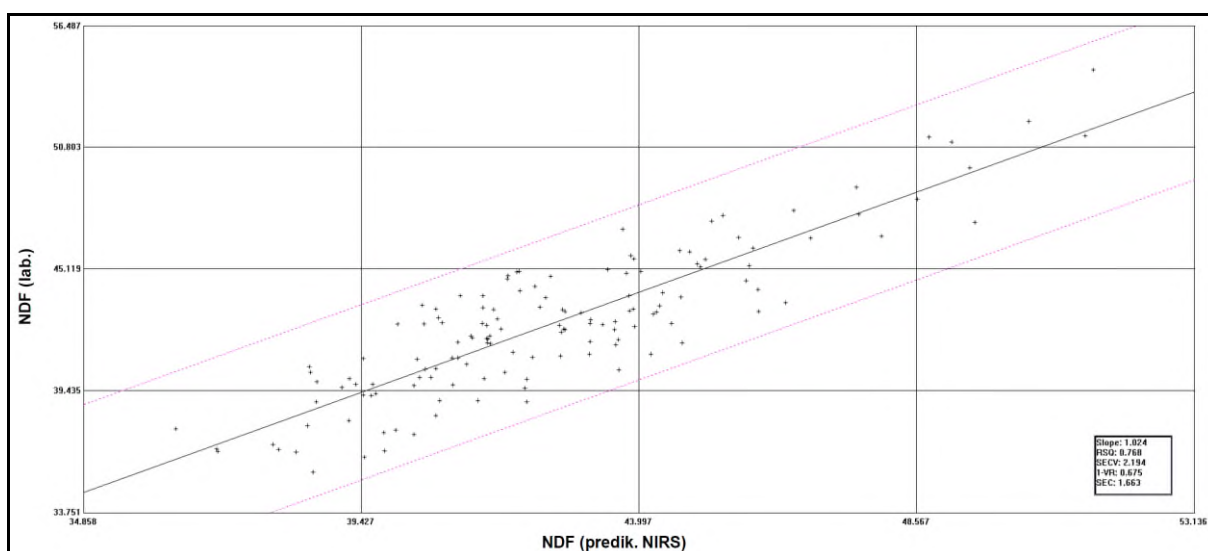
Obr. 5: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu NL (dusíkaté látky) ve fermentované kukuřičné siláži.



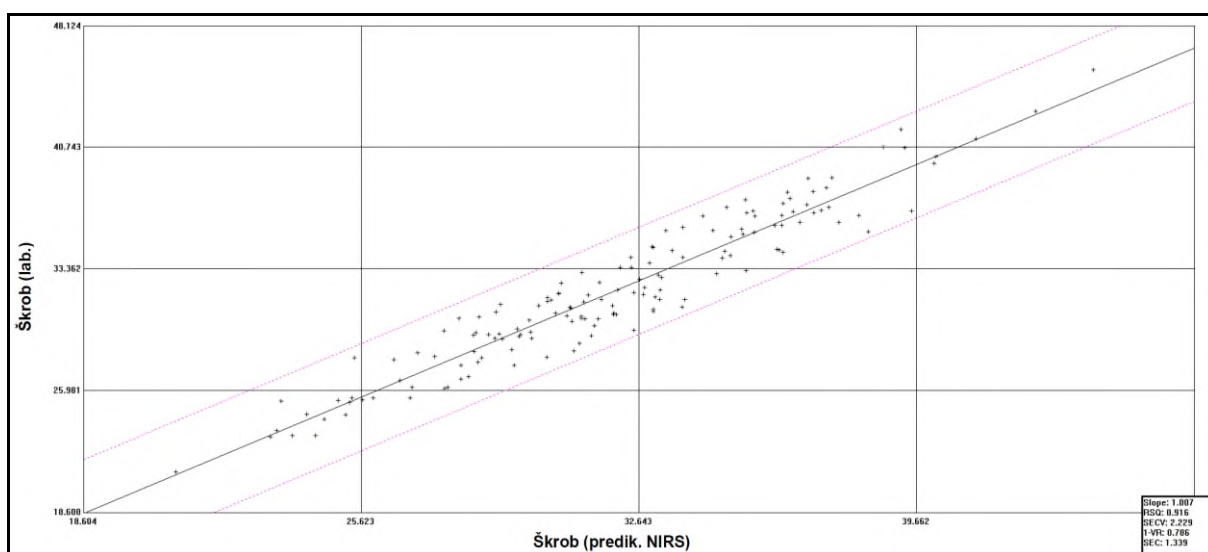
Obr. 6: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu Vlákna ve fermentované kukuřičné siláži.



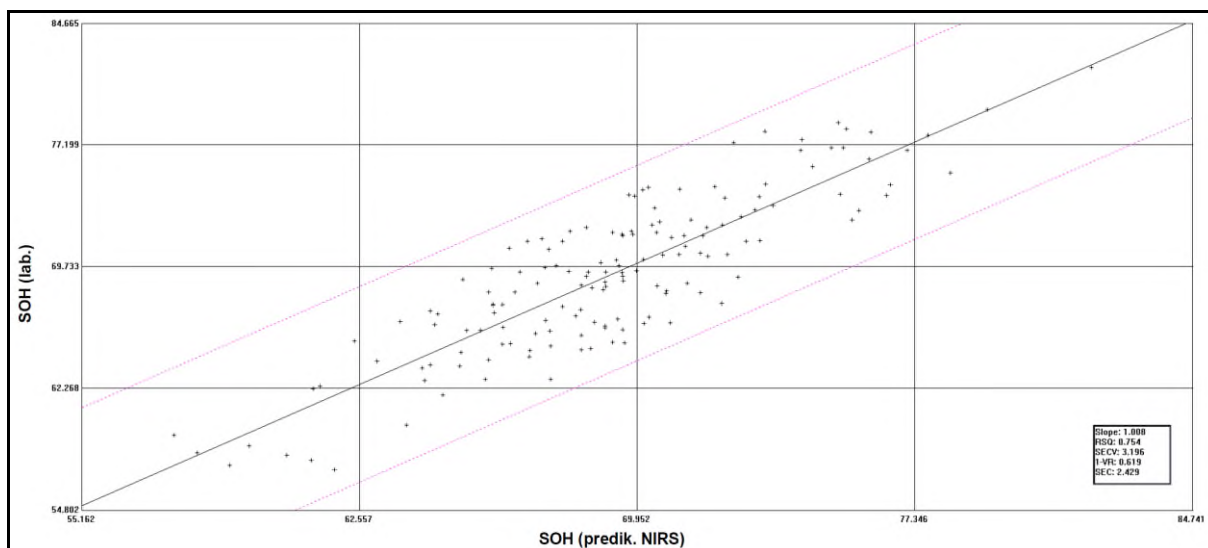
Obr. 7: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu ADF ve fermentované kukuřičné siláži.



Obr. 8: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu NDF ve fermentované kukuřičné siláži.



Obr. 9: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu Škrob ve fermentované kukuřičné siláži.



Obr. 10: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu SOH ve fermentované kukuřičné siláži.

4.3. Potenciál NIR analýzy a výhled

Využití metody NIR při hodnocení kvality krmiv se bude patrně přesouvat z oblasti suchých semletých materiálů k měření krmiv *in situ* (čerstvé píče, mokrých intaktních siláží). Sušením totiž dochází k nekontrolovatelným ztrátám na těkavých látkách (alkoholy, estery, kyseliny, čpavek aj.), přičemž na druhé straně je vysušená hmota silně hygroskopická a rychle přijímá z prostředí vodu (Berzaghi et al. 1997). Jako příklad aplikací lze uvést vývoj kalibračního modelu pro podmínky on-line hodnocení čerstvé hmoty rostlinného materiálu v zařízení na výrobu bioplynu (Přitzner et al. 2010) nebo predikci výživné hodnoty čerstvé hmoty kukuřičné siláže pomocí přístrojové techniky AgriNIR (Loučka et al. 2014).

Pokud jde o frakce dusíkatých látek, je snaha lépe postihnout jejich přeměny v bachoru (bachorová rozpustnost NL) a využití v tenkém střevě. Rovněž bude pravděpodobně lépe sledovat pomocí NIR kinetiku trávení ve vztahu ke stravitelnosti organické hmoty, stravitelnosti vlákniny a jejich frakcí ADF, resp. NDF a dobrovolnému příjmu píče zvířetem (VI). S ohledem na časovou náročnost a jiná omezení laboratorních metod stanovení stravitelnosti a dobrovolnému příjmu píče zvířetem, se do techniky NIR vkládají velké naděje.

Předpokládá se, že budou rozvíjeny sítě "klonovaných" přístrojů, přesahující hranice států zemí EU, využívající společných kalibrací. To otvírá cestu k mezinárodní "harmonizaci" analýz NIR. Kalibrace, které byly vždy největší překážkou pro NIR, zřejmě budou nahrazovány novými přístupy, jako využívání samotných spekter ke klasifikaci, klastrování nebo diskriminačnímu postupu u populací rostlinného materiálu za použití PCA analýzy. Přetrvávající nevýhodou NIR je, že se stále považuje za sekundární metodu, poplatnou metodám "mokrý chemie". Tyto referenční metody bývají (pokud se jedná o rozbor krmiv) mnohdy kritizovány, ale postihnout lépe komponenty určující užitkovost zvířat, se přes veškeré úsilí daří jen velmi pozvolna, a budou zřejmě ještě dlouho v této oblasti používány.

Další určitou nevýhodou, představující umístění stacionárních přístrojů v laboratoři, se daří překonávat díky mobilní technice se speciálním snímáním, která umožní přímé vpichy sondy do materiálu bez potřeby jeho plnění do kyvet. Pokud dojde k nahrazení monochromátoru laserovým zdrojem světla, je tímto krokem umožněna nejen miniaturizace přístrojů, ale současně se zvýší jejich mobilita (možnost analýzy vzorků u zákazníka) a také se podstatně sníží jejich cena. Praktické využití nachází např. při analýze siláží v zemědělských podnicích, jako prostředek ke zpřesnění výpočtu krmných dávek a zlepšení řízení užitkovosti chovu (Berzaghi 2014).

Potenciál a budoucnost techniky NIR spočívá v rukách výrobců přístrojů, akademické obce výzkumníků, které by měly pomoci mnoha lidem, včetně zemědělské praxe. Přednosti této metody včetně šetrného vztahu k životním prostředím (ve srovnání s chemickými rozborů) její nevýhody daleko převyšují. Ačkoliv větší praktické využití spektroskopie v blízké infračervené oblasti začalo v zemědělských laboratořích před téměř padesáti lety, stále představuje perspektivní trend v hodnocení zemědělských produktů a má všechny předpoklady významně se dále profilovat (Nerušil et al. 2016).

5. Závěr

NIR spektrometrie se ukazuje jako vhodný nástroj pro velké série měření, protože se jedná o rychlou techniku se schopností stanovit nejvýznamnější složky analyzovaného materiálu z jednoho měření vzorku. Vzhledem k tomu, že se jedná o sekundární instrumentální metodu, je rychlost a jednoduchost vykoupena o něco nižší přesností ve srovnání s klasickou referenční analýzou. Při dodržení hlavních zásad při práci s NIR modely, lze však dosáhnout velmi dobrých výsledků, viz Kap. 4.2. Další předností je, že pro analýzu stačí pouze malé množství vzorku, bezpečnost práce a ekologická nezávadnost (není spotřebováván žádný materiál a nevznikají chemické odpady). Významnou výhodou, pokud nejsou brány v úvahu náklady na pořízení techniky NIR a chemometrického software, však představuje v porovnání s metodami „mokrý chemie“ nízká cena za provedený rozbor. Při hodnocení vzorků silážní kukuřice (fermentované) klasickými užitnými metodami nejsou pro koncového uživatele výsledky dostupné v dostatečně krátké době (chemická analýza jednoho vzorku trvá v závislosti na počtu stanovených parametrů průměrně 10 dní). Naopak metoda NIR má vysokou průchodnost (rychlost stanovení jednoho vzorku cca 2 minuty), poskytuje dostatečně přesné informace o výživné hodnotě a má vysoký potenciál pro řízení kvality on-line. Statisticky robustní kalibrační modely predikce nutriční hodnoty krmiva představují do budoucna v odvětví živočišné výroby vysoký potenciál v řízení a kontrole složení krmné dávky a tím i užitkovosti hospodářských zvířat.

6. Srovnání novosti metodických postupů a další přínosy

Předložená metodika navazuje na certifikované metodiky zaměřené na praktické aplikace NIR spektroskopie v zemědělské praxi od autorů Míka et al. (2008), Dvořáček et al. (2014), Nerušil et al. (2016) apod. Ve srovnání s uvedenými publikacemi je tato práce orientována na aplikace NIRS v oblasti hodnocení výživné hodnoty fermentované silážní kukuřice se snahou objektivního vyhodnocení potenciálu této metody.

Zemědělské praxi (prvovýrobě) jsou prostřednictvím této metodiky předkládány nejnovější poznatky, zkušenosti a perspektivy využití přístrojové techniky NIRS při stanovení parametrů výživné hodnoty objemné píce (fermentované řezanky silážní kukuřice). Jedná se o metodu na výrazném vzestupu, která má reálné předpoklady se prosadit v precizním zemědělství zejména s ohledem na rychlost stanovení, přesnost, ekologickou nezávadnost a nízkou cenou rozboru. Chovatel si na základě dosažených výsledků rozboru kukuřičné siláže může operativně (ve velmi krátkém čase, resp. on-line) upravit krmnou dávku pro výživu skotu (dojnice, výkrm), v návaznosti na aktuální dojivost, denní přírůstek apod.

Přínosem je podstatné zvýšení efektivnosti (lze stanovovat více obsahových látek současně) a rychlosti (velmi rychlé stanovení < 2 minuty) prováděných exaktních rozborů ve smyslu naplnění praktických potřeb široké obce uživatelů (velice vhodné pro automatizaci - nepřetržitý provoz rozborů po dobu 24 hod denně). Měření (stanovení) je pracovně bezpečné (žádné nebezpečí vážných úrazů, intoxikace apod.) a metoda je příznivá k životnímu prostředí (nevznikají a nevypouštějí se žádné chemické látky, apod.).

7. Ekonomický přínos

Z ekonomického pohledu je přínosem NIR spektroskopie v porovnání s referenčními metodami podstatné zvýšení efektivnosti a rychlosti prováděných exaktních rozborů a současně výrazné snížení ceny analýzy jednoho vzorku (není potřeba téměř žádného spotřebního materiálu, stanovení je levné a dostatečně přesné). Míra rentability metody NIRS je pak tím vyšší, čím náročnější a dražší je referenční metoda laboratorní stanovení a současně pokud budou měřeny větší série vzorků.

Pro porovnání celkové ceny rozboru vzorků fermentované silážní kukuřice pomocí referenčních metod v rozsahu výše uvedených parametrů (viz. Kap. 4.2.), byly použity údaje z ceníku rozborů v laboratořích Nutriet, s.r.o. platné v roce 2018. Cena jednoho takového stanovení v rozsahu šesti parametrů výživné hodnoty píce (obsah sušiny, NL, vlákniny, škrobu, popel, ADF, NDF a SOH) včetně přípravy vzorku mletím činí s DPH (21 %) přibližně 2,8–3,2 tis. Kč. Při kalkulaci ceny stanovení shodného počtu parametrů metodou NIRS, provedeného ve VÚRV, v.v.i., VS Jevíčko, zahrnující rovněž úpravu dodaného vzorku mletím, byla zjištěna cena s DPH cca 0,3–0,4 tis. To v porovnání s referenční laboratorní metodou představuje výrazné snížení nákladů na provedení rozboru ve výši cca 80–90 %.

8. Popis uplatnění metodiky

Předložená metodika přináší pro zemědělkou praxi nejnovější informace o stanovení výživné hodnoty konzervované kukuřičné siláže pomocí blízké infračervené spektroskopie. Metodika stanovuje progresivní postupy hodnocení vybraných parametrů nutriční hodnoty krmiva (obsah sušiny, N-látek, hrubé vlákniny, škrobu, neutrálně detergentní vlákniny, stravitelnost organické hmoty apod.), stanovovaných v usušených a semletých vzorcích konzervované (fermentované) kukuřičné siláže. Chovatel si na základě rychle provedeného rozboru kukuřičné siláže může operativně upravit krmnou dávku pro výživu skotu, v návaznosti na aktuální doživost, denní přírůstek apod. Metodika je primárně určena uživatelům v zemědělských podnicích s rozvinutou živočišnou (zemědělské provozy), v zemědělském výzkumu (včetně vysokých škol) a ve státních institucích.

9. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Loučka, R., Jambor, V., Tyrolová, Y. (2014): The variability of the results of the nutritional value of maize silage obtained by the apparatus AgriNIR. In: Jambor, V. et al. (eds.). *Forage Conservation*. Proc. of the 16th Int. Symp., Brno, pp. 157–158.
- Míka, V., Nerušil, P., Kohoutek, A. (2008): Spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR) Výběr praktických aplikací v zemědělství. Metodika pro praxi, VÚRV, v.v.i., 44 s.
- Míka, V., Pozdíšek, J., Tillmann, P., Nerušil, P., Buchgraber, K., Gruber, L. (2003): Development of NIR calibration valid for two different grass sample collections. *Czech Journal of Animal Science*, 48 (10): 419–424.
- Nerušil, P., Menšík, L., Jambor, V. (2016): Využití blízké infračervené spektroskopie ke stanovení výživné hodnoty hybridů kukuřice, určených k výrobě kukuřičné siláže. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 28 s.
- Nerušil, P., Míka, V., Kohoutek, A., Odrščilová, V., Komárek, P. (2010): Stanovení obsahu tuku v celých semenech řepky olejky ve šlechtitelském materiálu technikou infračervené spektroskopie (NIRS) s použitím ověřené kalibrační rovnice. Ověřená technologie, VÚRV-OT-5/2010.

Literatura

- Berzaghi, P., Cozzi, G., Andrighetto, I. (1997): The use of near infrared analysis for in situ studies. *Journal of Dairy Science*, 80: 3263–3270.
- Berzaghi, P., Marchesini, G. (2014): Rapid methods of analysis of silages to improve feeding management in Dairy Farms. In: Jambor, V. et al. (eds.). *Forage Conservation. Proc. of the 16th Int. Symp.*, Brno, 3–6th June 2014, pp. 65–70.
- Bien R., Hrbáčková B. (2017): NIR analýza - spolehlivá kontrola jakostních parametrů v krmivářském průmyslu a dalších odvětvích. *Krmivářství*, 2: 27–28.
- Burns, D.A., Ciurczak, E.W. (eds) (2007): *Handbook of Near-Infrared Analysis*. 3rd Edition (Pract. Spektr.). CRC Press, 826 p.
- Čižmár, D. (2006): *Aplikace NIRS v zemědělské analytice*. PhD Diss. Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 132 s.
- ČSN EN ISO 16472 Krmiva - Stanovení obsahu neutrálně detergentní vlákniny po úpravě vzorku amylázou (aNDF) - 2012.
- ČSN EN ISO/IEC 17025 Posuzování shody - Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří (2005).
- De Boever, J.L., Vanacker, J.M., De Brabander D.L. (2002): Rumen degradation characteristics of nutrients in maize silages and evaluation of laboratory measurements and NIRS as predictors. *Animal Feed Science and Technology*, 101: 73–86.
- Decruyenaere, V., Planchonb V., Dardenned P., Stilmantca Walloon D. (2015): Prediction error and repeatability of near infrared reflectancespectroscopy applied to faeces samples in order to predictvoluntary intake and digestibility of forages by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 205: 49–59.
- Dvořáček, V., Prohasková, A., Štočková L. (2014): Efektivní využití blízké infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací pro hodnocení technologických vlastností pšenice. *Metodika pro praxi. VÚRV, v.v.i.*, 38 s.
- González-Martín, M.I.; Escuredo, O.; Revilla, I.; Vivar-Quintana, A.M.; Coello, M.C.; Riocerezo, C.P.; Moncada, G.W. (2015): Determination of the Mineral Composition and Toxic Element Contents of Propolis by Near Infrared Spectroscopy. *Sensors*, 15: 27854–27868.
- Griffiths, P.R., Dahm, D.J. (2007): Continuum and Discontinuum Theorie of Diffuse Reflection. In: D. A. Burns, E.W. Ciurczak (eds.): *Handbook of Near-Infrared Analysis*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL (USA): 21–64.
- Holtshausen, L., Beauchemin, K.A., Schwartzkopf-Genswein, K.S.G., González, L.A., McAllister, T.A., and Gibb, D.J. (2011). "Performance, feeding behaviour and rumen pH profile of beef cattle fed corn silage in combination with barley grain, corn or wheat distillers' grain or wheat middlings.", *Canadian Journal of Animal Science*, 91(4), pp. 703-710. doi : 10.4141/CJAS2011-037
- Cheng, B., Wu, X. (2006): An Modified PLSR Method in Prediction. *Journal of Data Science*, 4: 257–274.
- Infrasoft International (2000): *ISI Windows Near Infrared Software, WinISI II*.
- Jacobi, H.F., Moschner, C.R., Hartung, E. (2009): Use of near infrared spectroscopy in monitoring of volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 60: 339–346.
- Jacobi, H.F., Moschner, C.R., Hartung, E. (2011): Use of near infrared spectroscopy in online-monitoring of feeding substrate quality in anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 102: 4688–4698.
- Kański, J., Kowalski, Z. (2005): Protein degradability of silages in the rumen estimated by NIRS. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 14: 567–570.

- Liu, X., Han, L., Yang, Z., Xu, C. (2008): Prediction of silage digestibility by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 17: 631–639.
- Lomborg, C.J., Holm-Nielsen, J.B., Oleskowicz-Popiel, P., Esbensen, K.H. (2009): Near infrared and acoustic chemometrics monitoring of volatile fatty acids and dry matter during co-digestion of manure and maize silage. *Bioresource Technology*, 100: 1711–1719.
- Loučka, R., Jambor, V., Tyrolová, Y. (2014): The variability of the results of the nutritional value of maize silage obtained by the apparatus AgriNIR. In: Jambor, V. et al. (eds.). *Forage Conservation. Proc. of the 16th Int. Symp.*, Brno, pp. 157–158.
- Lovett D.K., Deaville E.R., Moulda, F., Givens D.I., Owena E. (2004): Using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict the biological parameters of maize silage. *Animal Feed Science and Technology*, 115: 179–187.
- Lovett, D.K., Deaville, E.R., Givens, D.I., et al. (2005): Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict biological parameters of maize silage: Effects of particle comminution, oven drying temperature and the presence of residual moisture. *Animal Feed Science and Technology*, 120: 323–332.
- Marten, G.C, Shenk J.S., Barton F.E. /eds./ (1989): *Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality*. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook No. 643 (revised with supplements), 110 p.
- Martens, H., Naes, T. (1992): *Multivariate Calibration*; Wiley, Chichester: Oslo, Norway: 438 p. ISBN: 978-0-471-93047-1.
- Mertens, D.R. (2002): Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 85 (6): 1217–1240.
- Míka V. (1997): Využití infračervené spektrometrie (NIRS) pro hodnocení kvality rostlinných výrobků. *ÚZPI Praha*, 28 s.
- Míka, V., Harazim, J., Kalač, P., Komárek, P., Pavlů, V., Pozdíšek, J. (1997): *Kvalita píce*. ÚZPI Praha, 227 s.
- Míka, V., Nerušil, P., Kohoutek, A. (2008): *Spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR) Výběr praktických aplikací v zemědělství. Metodika pro praxi, VÚRV, v.v.i., 44 s.*
- Mlček, J., Rop, O., Šustová, K., Simeonovová, J., Gál, R. (2010): Možnosti využití spektroskopie NIR v masném průmyslu. *Chemické listy*, 104: 855–860.
- Mudřík, Z., Čížmár, D., Hučko, B., Kodeš, A. (2013): Využití metod NIR při hodnocení krmiv. In *Třináctý, J. Hodnocení krmiv pro dojnice. AgroDigest s.r.o., s. 122–126.*
- Muselík, J. (2012): Aplikace blízké infračervené spektroskopie ve farmaceutické analýze. *Chemické listy*, 106: 10–15.
- Næsset, E., Bollandsas, O.M., Gobakken, T. (2005): Comparing regression methods in estimation of biophysical properties of forest stands from two different inventories using laser scanner data. *Remote Sensing of Environment*, 94: 541–553.
- Nařízení Komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27. ledna 2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv. In: *Úřední věstník Evropské unie*. Dostupné také z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32009R0152>.
- Nerušil, P., Menšík, L., Jambor, V. (2016): Využití blízké infračervené spektroskopie ke stanovení výživné hodnoty hybridů kukuřice, určených k výrobě kukuřičné siláže. *Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha, 28 s. ISBN 978-80-7427-201-1.*
- Ørskov, E. R., McDonald, I. (1979): The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92 (2): 499–503.

- Park, H., Kim, J., Choi, K. et al (2016): Mathematical Transformation Influencing Accuracy of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) Calibrations for the Prediction of Chemical Composition and Fermentation Parameters in Corn Silage. *Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science*, 36: 50–57.
- Park, H.S., Lee, J.K., Fike, J.H. et al (2005): Effect of sample preparation on prediction of fermentation quality of maize silages by near infrared reflectance spectroscopy. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18: 643–648.
- Pekárková, J., Hrušková, M., Novotný, F., Jurečka, D., Morávková, E. (2000): Použití analyzátoru NIRS 6500 pro sledování vybraných jakostních ukazatelů pšeničné mouky. *Czech Journal of Food Sciences*, 18 (6): 235–238.
- Pfützner, C., Höppner, F., Greef, J.M. (2010): Bewertung des Gasbildungspotentials von nachwachsenden Rohstoffen (Nawaros) mit der Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS). *Journal für Kulturpflanzen*, 62 (12): 451–460.
- Restaino, E.A., Fernández, E.G., La Manna, A., Cozzolino, D. (2009): Prediction of the Nutritive Value of Pasture Silage by Near Infrared Spectroscopy (NIRS). *Chilean journal of agricultural research*, 69: 560–566.
- Roberts, C.A., Workman, J.W., Reeves, J.B. (eds.) (2004): Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture. ASA Monogr. 44, ASA, Madison, 822 p.
- Shenk, J.S., Workman, J.J., Westerhouse, M.O. (2007): Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products. In: D.A. Burns, E.W. Ciurczak (eds.): *Handbook of Near-Infrared Analysis*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL (USA): 347–386.
- Schneider, B., Štoka, J. (1988): *Infračervená a Ramanova Spektroskopie*. Analytická příručka II. SNTL, ALFA.
- Schwartzkopf-Genswein, K.S., Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., et al. (2004): Effect of feed delivery fluctuations and feeding time on ruminal acidosis, growth performance, and feeding behavior of feedlot cattle, *Journal of Animal Science*, 82, 3357–3365.
- Siesler, H.W. (2007): Basic Principles of Near-Infrared Spectroscopy. In: D. A. Burns, E. W. Ciurczak (eds.). *Handbook of Near-Infrared Analysis*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, FL (USA): 7–20.
- Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H.M. (2002): *Near-Infrared Spectroscopy Principles Instruments Application*, Wiley-VCH, Weinheim, pp. 636–638.
- Sørensen, L.K. (2004): Prediction of Fermentation Parameters in Grass and Corn Silage by Near Infrared Spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 87: 3826–3835.
- Vorlová, L., Králová, M., Borkovcová, I., Kostrhounová, R. (2014): *Chemie potravin a chemické laboratorní metody*. Obecné kapitoly. 1. vyd., VFU Brno, 57 s.
- Vyhláška č. 415/2009 Sb., o stanovení požadavků na odběr vzorků a způsobu zveřejnění metod laboratorního zkoušení produktů ke krmení. In: *Sbírka zákonů*. 134/2009. Dostupné také z: http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/legislativa/legislativa-cr/krmiva/_obsah_cz_mze_ministerstvo-zemedelstvi_legislativa_Legislativa-MZe_uplnazneni_vyhlaska-2009-415-odber-vzorku-krmiv.html.
- Wang, H.W., Wu, Z.B., Meng, J. (2006): *Partial Least Squares Regression: Linear and Nonlinear Methods*. National Defence Industry Press, Beijing.
- Williams, P.C. (2001): Implementation of near-infrared technology. In: P. Williams & K. Norris (eds.) *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. 2nd ed., American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 145–169.
- Wold, S., Martens, H., Wold, H. (1983): The multivariate calibration problem in chemistry solved by the PLS method. *Lecture Notes in Mathematics*, 973: 286–293.

Seznam obrázků, tabulek a zkratk

Seznam obrázků

Obr. 1: Těsnost vztahu mezi laboratorními rozbory a NIRS predikcemi nutriční hodnoty kukuřičných siláží (vlhkost, NDF, ADF a NL) - Park et al. 2016.

Obr. 2: Schéma NIR analýzy.

Obr. 3: Absorpční pásy NIR spektroskopie dle (NIR Absorption Chart, NDC, 2013) na příkladu kukuřice seté (čerstvá píce a fermentovaná kukuřičná siláž).

Obr. 4: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu Sušina ve fermentované kukuřičné siláži.

Obr. 5: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu NL (dusíkaté látky) ve fermentované kukuřičné siláži.

Obr. 6: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu Vláknina ve fermentované kukuřičné siláži.

Obr. 7: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu ADF ve fermentované kukuřičné siláži.

Obr. 8: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu NDF ve fermentované kukuřičné siláži.

Obr. 9: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu Škrob ve fermentované kukuřičné siláži.

Obr. 10: Statisticky průkazná závislost kalibračního modelu SOH ve fermentované kukuřičné siláži.

Seznam tabulek

Tab. 1: Kategorizace získaných kalibračních modelů podle koeficientu determinace (Dvořáček et al. 2014).

Tab. 2: Predikce výživné hodnoty fermentované kukuřičné siláže pomocí techniky NIRS.

Tab. 3: Validace výživné hodnoty fermentované kukuřičné siláže pomocí techniky NIRS.

Seznam zkratk

ADF - acidodetergentní vláknina

AIC - Akaikeho informační kritérium

AOTF - přístroj NIR vybavený akusticko-optickými filtry

ČSÚ - Český statistický úřad

FAO - číslo ranosti

FIR - vzdálená infračervená oblast

F-S test - test významnosti regresního modelu

FT-NIR - přístroje NIR s Fourierovou transformací

ISI - software Infracsoft International

MEP - střední kvadratická chyba predikce

MIR - střední infračervená oblast

NDF - neutrálně detergentní vláknina

NEL - netto energie laktace

NEV - netto energie výkrmu

NIR - blízká infračervená oblast

NIRS - blízká infračervená spektroskopie

NL - dusíkaté látky

PCA - analýza hlavních komponent

PLS - regrese dílčích nejmenších čtverců

R - vícenásobný korelační koeficient

R² - koeficient determinace

RSC - reziduální součet čtverců

s(e) - reziduální směrodatná odchylka

SEC - směrodatná odchylka kalibrace

SEP - směrodatná odchylka predikce

SMLR - postupná mnohonásobná lineární regrese

SNDF - stravitelnost neutr. deterg. vlákniny

SOH - stravitelnost organické hmoty

SOH24 - stravitelnost organické hmoty *in situ* (inkubace v batoru po dobu 24 h)

TMR - směsná krmná dávka

ÚKZÚZ - Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský

VS - Výzkumná stanice

VÚRV, v.v.i. - Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.

Název: Vývoj kalibračních rovnic k predikci parametrů výživné hodnoty konzervované kukuřičné siláže pomocí techniky NIRS

Autoři: Ladislav Menšík, Pavel Nerušil, Václav Jambor

Vydal: Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha - Ruzyně

Tisk: Vydavatelství Mendelovy univerzity v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Vydání: rok 2018

Počet stran: 21

Náklad: 100 ks

ISBN 978-80-7427-277-6