

Rapport nr. Å0503

UTTESTING AV NIR-ON-LINE METODE FOR BLÅKVEITE

Delrapport 1 i prosjektet:

**Fangstbehandling og dokumentasjon av råstoffegenskaper til
dyphavsarter**



Rapport utarbeidet av
Jens Petter Wold og Bjørg Narum
MATFORSK AS

Møreforsking
Ålesund, februar 2005

OPPDRAGSRAPPORT

Matforsk AS - Norsk institutt for næringsmiddelforskning

Osloveien 1, 1430 Ås
Tlf. 64 97 01 00

Rapportnummer:

O-9009-1

Tilgjengelighet:
Fortrolig

Rapportens tittel: NIR-analyse av blåkkeitehoder, målt direkte på snittflate og på homogeniserte prøver	Dato: 08.04.2005
Prosjektleder/forfatter: Jens Petter Wold og Bjørg Narum	Prosjektleders signatur:
Avdelingsdirektør: Marit Risberg Ellekjær	Avd.dir.'s signatur:
Avdeling: Analysemetodikk	Prosjektnummer: O-9009
Oppdragsgiver: Møreforskning	Oppdragsgivers ref:

Sammendrag/ekstrakt:

Formålet med dette arbeidet var å undersøke om nær-infrarød (NIR) spektroskopi kan egne seg som metode for å måle vanninnhold i blåkkeite. En målsetting vil blant annet være å kunne påvise vasskvite.

Det ble målt NIR spektrere på både intakte og oppmalte prøver av blåkkeite som var sendt fra Møreforskning. Målingene ble gjort med et kommersielt relativt billig NIR-instrument (Control Development Inc). Fett, vann og protein ble målt våtkjemisk for alle prøvene.

Prediksjonsmodeller ble laget basert på Partial Least Squares (PLS) regresjon. For de oppmalte prøvene ble det oppnådd gode resultater for vann og fett med korrelasjoner rundt 0.96-0.98 og prediksjonsfeil på rundt 1.5 %-poeng. For de intakte prøvene fikk vi tilsvarende modeller men med vesentlig lavere korrelasjoner. Dette kom av at NIR målingene på de mest vannrike prøvene gikk tapt på grunn av datatekniske feil.

Det konkluderes med at NIR trolig vil være godt egnet for hurtig måling av vann og fett i blåkkeite om bord i båtene. Noen enkle råd om instrumentering og kalibrering følger med i rapporten.

Rapporten/resultatene skal ikke gjengis i utdrag, uten etter skriftlig godkjenning fra Matforsk AS. Det henvises for øvrig til spesielle krav for bruk av Matforsk AS sitt navn i markedsføring.

NIR-analyse av blåkveitehoder, målt direkte på snittflate og på homogeniserte prøver

Materialer

Kveitehodene kom fra Møreforskning til Matforsk som frosne blokker og ble her lagret videre på fryserom ved -20°C .

Opptining: Ettersom vi antok langsom tining ville være den beste måten å behandle blokkene ble disse lagt i et rom med 2°C . Denne formen for opptining viste seg å være lite effektiv, selv etter 4 dager var blokkene helt iset sammen. Vi forsøkte deretter å tine blokkene ved 8°C . Etter 4 dager var da blokkene slik at vi klarte å dra hodene fra hverandre. Hodene ble da lagt utover i plastkasser og fikk dermed såpass med luft rundt seg at de 2 dager senere var fri for iskrystaller og kunne bli analysert.

Prøvepreparering: På laben måtte hvert hode vaskes fritt for blodsøl (se bilder i vedlegg) samt at endel av innvollene, som leverslintrer, ble fjernet. For å få en frisk og fin snittflate for NIR analysen ble en ca 2 mm tykk skive skåret vekk og fjernet fra hodene. Fra hvert hode ble det skåret prøver som var 3 – 4 cm tykke.

Det bør nevnes at kvaliteten på fiskehodene var svært dårlig. I tillegg til at de var tilsølt av blod og innvoller var de utpreget harske med en intens tranlukt. Vi valgte likevel å utføre forsøket, for NIR er ikke sensitiv i forhold til oksidasjonsprodukter. Imidlertid kan oksidasjon føre til strukturelle endringer i muskelen.

Instrumentering:



Figur 1 Dette bildet viser NIR proben. Vi brukte en bærbar PC.

NIR-instrumentet var utlånt til Matforsk for dette kveiteforsøket. Det er av typen CDI (Control Development Inc.) med en egen probe som er koblet til instrumentet med en optisk kabel (se figur 1 + vedlegg for spesifikasjoner). Målingene kan gjøres svært hurtig ettersom det er basert på såkalt diode array teknologi, dvs at hele NIR spekteret blir målt i løpet av millisekunder. I dette forsøket ble det målt 100 spektra fra hver prøve, hvorpå det automatisk ble beregnet et gjennomsnitt. Analyseområdet er fra 923 til 1717 nanometer (nm), med 6.25 nm mellom hvert avlesning, dvs at det blir målt NIR spektra med 128 datapunkter.

Instrumentet er forholdsvis hendig, en liten boks som kan flyttes på. Selve proben var også grei å betjene. Den måler refleksjonsspektra fra et sirkulært område med diameter på ca 3 cm. Håndholdt og fleksibel.

Før en kan sette i gang å måle, må en som operatør av instrumentet kjøre gjennom en del tester for å sjekke at instrumentet virker som det skal. Dessverre fant vi ved flere anledninger at instrumentet var ustabil. To ulike fenomener eller "bugs" ble oppdaget. Det ene var at instrumentet plutselig genererte spektra som var svært støyfulle. Dette var lett å oppdage. Instrumentet måtte da slås av og på og kalibreres på nytt. Det andre var at det til tider "hengte seg opp" og flere prøver etter hverandre fikk identiske spektra til tross for at det var til dels svært ulike prøver. Dette var vanskelig å oppdage under arbeidet fordi NIR spektra er visuelt meget like. For noen prøver ble dette dessverre oppdaget etter at prøvene var sendt til analyse. Disse prøvene er fjernet fra datamodellene.

Modellene som er laget inneholder data fra 54 homogeniserte prøver og 35 hele prøver; skåret som skiver fra nakkekuttet.

NIR målingene

Helt fiskekjøtt:

Ved NIR målingene ble proben satt opp på fiskestykkene med 3 cm avstand mellom prøveoverflate og instrument. Det var viktig å sørge for at lysstrålen ikke lyste utenfor prøvene. Dette viste seg å være vanskelig på de minste prøvene, da disse av størrelse var svært små. En del brusk som kom innenfor måleområdet kan ha introdusert støy i NIR-målingene.

I tillegg til fiskehodene fikk vi også tilsendt 2 hele fisker som ble skåret i skiver og analysert. Disse var utvilsomt svært annerledes i kjemisk sammensetning enn fiskekjøttet fra hodene. De kjemiske analysene viste at kveitene inneholdt rundt 90% vann, og kun 0.5% med fett. Proteininnholdet var også vesentlig lavere enn i de andre prøvene. Konsistensen på muskelprøvene var vassen. NIR målinger ble gjort på utvalgte koteletter fra disse fiskene. Disse blåkveitene var trolig ekstreme varianter av vasskveite.

Homogeniserte prøver

Etter at prøvene var analysert i intakt tilstand ble fiskekjøttet fra hver enkelt prøve skåret ut (se bilde 3 i vedlegget), homogenisert i 5 sekunder i Moulinex homogenisator og lagt over i petriskåler av plast. Det var svært lite materiale fra noen

av prøvene, men det ble forsøkt å stryke massen utover i den diameteren som instrumentet analyserte (bilde 4 i vedlegget).

Etter NIR analysene ble prøvene frosset ned og sendt til AnalyCen AS, Kambo, for kjemisk bestemmelse av fett, vann og protein.

Regresjonsanalyse

NIR målingene i seg selv gir ikke kvantitativ angivelse av fett vann og protein. Det må lages kalibreringer mot de kjemiske analysene. Dette er gjort med PLS regresjon (Partial Least Squares), en metode som er vanlig for dette formålet. Modellene er validert ved full kryssvalidering, det vil si: Man tar ut en prøve av datasettet, lager en modell basert på de gjenværende prøvene, og bruker så denne modellen til å prediktere/estimere kjemisk sammensetning på den som er tatt ut. Dette gjøres for alle prøvene, og man ender opp med estimerte verdier for alle prøver som gir grunnlag for beregning av korrelasjon og prediksjonsfeil.

Modeller for homogene og intakte prøver ble laget hver for seg. Det er rimelig å anta at målinger på homogene prøver vil gi de beste resultatene. Dessverre var det slik at målingene på de intakte ekstreme vasskveiteprøvene gikk tapt på grunn av en feil i software/hardware (som nevnt over). Det betyr at spennet i kjemiske verdier ble forskjellig for de to datasettene.

Kalibrering for homogenisert kveite:

Variabel	RMSEP	Korrelasjon	Antall PC	Slope	Variasjonsbredde
Fett	1,42	0,96	5	0,93	0.5 – 18.7
Vann	1,45	0,98	6	0,98	56.85 – 92.4
Protein	1,06	0,92	2	0,86	6.55 – 18.55

RMSEP: roten av den gjennomsnittlig kvadrerte feilen i prediksjonen

Korrelasjon: samvariasjon mellom kjemi og instrumentavlesning

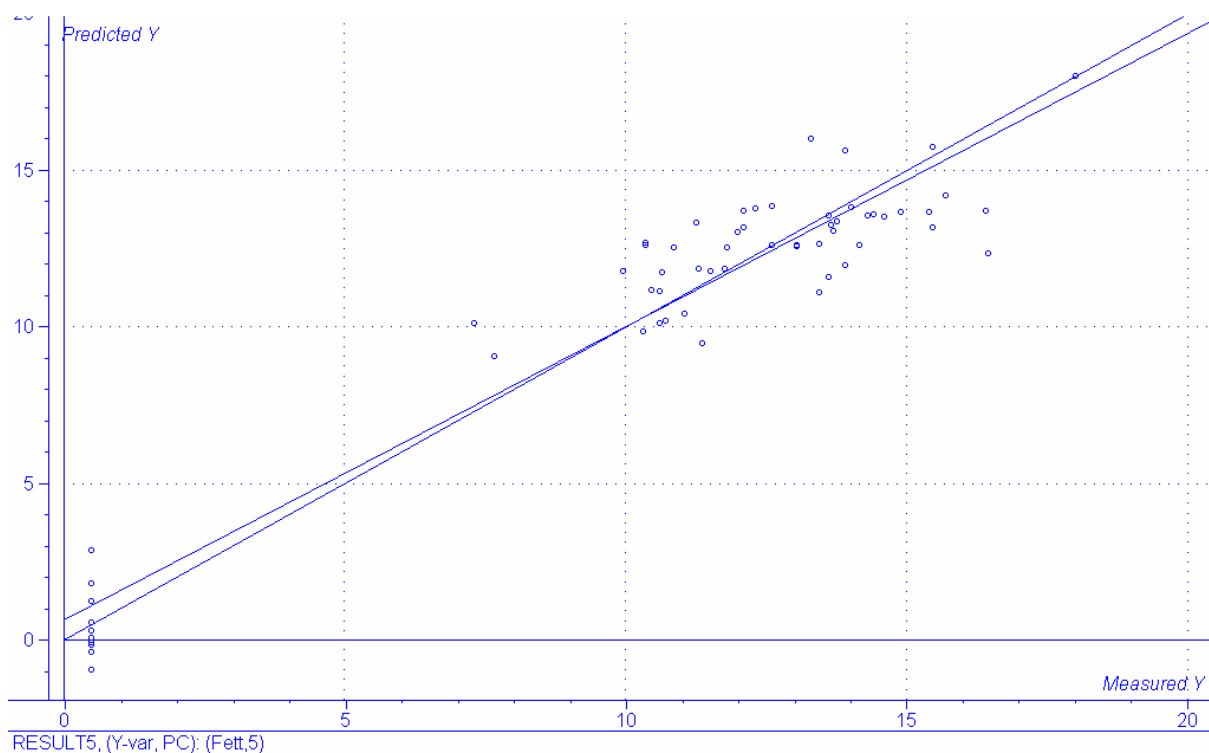
Antall PC: det antall prinsipale komponenter som trengs for en optimal modell

Slope: stigningskoeffisienten (bør være så nær 1 som mulig)

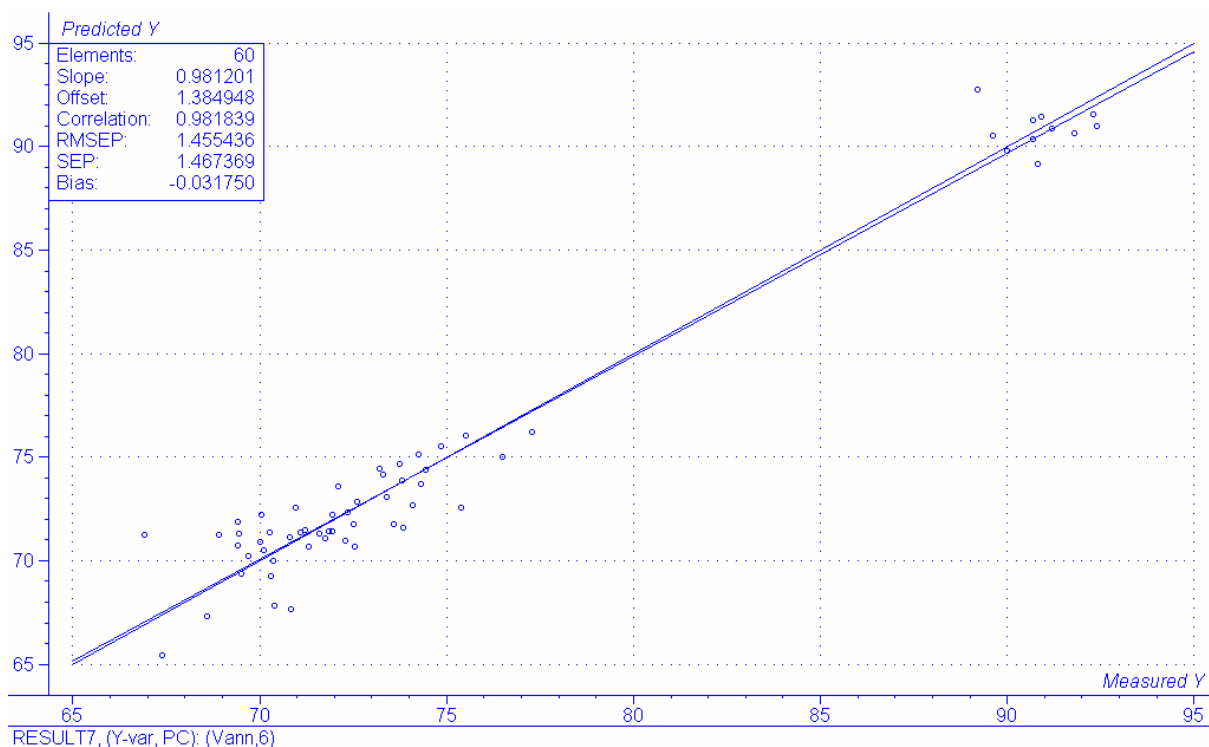
Range: laveste og høyeste kjemiske verdi for hver enkelt variabel

Kalibreringene for de homogene prøvene viste gode sammenhenger mellom NIR spektra og kjemiske analyser. De høye korrelasjonene for fett og vann er positive men kommer også av at spennet i fett og vann her er meget stort. Slope er i nærheten av 1 og det tyder på at kalibreringene trolig vil være robust. Det er selvsagt interessant å se på prediksjonsfeilen (RMSEP). Vi sier gjerne at nøyaktigheten ligger på ± 1 RMSEP. Altså hvis man måler med NIR og får ut verdien 10% fett, kan man anslå det som $10 \pm 1.42\%$ i dette tilfellet. I forhold til å påvise vasskveite er dette trolig en tilfredsstillende nøyaktighet. Av Figur 2 ser vi også at de ekstreme vasskveitene skiller seg godt ut fra de andre. Dersom dette er representativt for vasskveite kontra vanlig blåkveite, vurderer vi NIR som en god metode for å skille det ene fra det andre.

Resultatene på homogene prøver viser at NIR instrumentet måler den variasjonen vi er ute etter å registrere.



Figur 2 Prediksjonsplott/regresjonsplott for fett i homogene prøver.



Figur 3 Prediksjonsplott/regresjonsplott for vann i homogene prøver.

Kalibrering for intakte kveiteprøver:

Variabel	RMSEP	Korrelasjon	Antall PC	Slope	Variasjonsbredde
Fett	1.51	0.72	8	0.65	10.35 – 18.7
Vann	1.50	0.75	9	0.65	62.4 – 75.5
Protein	- modell	-modell			

Disse modellene ble noe dårligere. Spesielt er det korrelasjonene som er redusert som et resultat av at de mest vannrike prøvene gikk tapt. RMSEP er imidlertid omtrent den samme. På bakgrunn av resultatene på de homogene prøvene er det imidlertid rimelig å anta at metoden absolutt vil kunne brukes til å skille vasskveite fra vanlig blåkveite. For protein ble det for intakte prøver ikke oppnådd noen modell, dvs. en svak sammenheng mellom NIR og kjemi.

Det kan også hende at snittflaten som ble målt ikke var representativ for fettinnholdet i prøvene, selv om man skulle anta det fordi prøvene i seg selv var så små. De to største usikkerhetene med målinger på intakte prøver var

1. at noen prøver var svært små og at spektrene derfor kan ha blitt målt delvis utenfor prøven
2. at en del av den eksponerte prøven var bein/brusk.

Dersom man kan finne et annet, helst noe større område av rent kjøtt der man vet at kjemien korrelerer med det gjennomsnittlige, så vil det trolig forbedre resultatene.

Evaluering av instrumentering

Resultatene viser at instrumentet gir rimelig gode kalibreringer på homogene prøver. Dvs at det registrerer den relevante informasjonen vi er ute etter. De store svakhetene er:

1. Ustabilitet i forhold til støy
2. Ustabilitet i forhold til at det henger seg opp

Disse kan trolig utbedres av instrumentleverandør. Vår erfaring med den tyske agentene var ikke tilfredsstillende. Vi fikk lite informasjon og hjelp i forhold til de problemene som oppsto. Det kan hende at vi har vært uheldige med akkurat dette instrumentet. TINE, som eier instrumentet, har hatt nøyaktig de samme problemer som oss. Men vi vet av andres erfaringer at instrumentet virker bra. To andre brukere vi har vært i kontakt med har ikke hatt de samme problemene og de er imponert over dette instrumentet. Dette er erfaringer fra miljøer som har meget god innsikt i optisk instrumentering og bruk av det.

Dersom det skulle bli snakk om å investere i et NIR-instrument for målinger om bord, så vil vi når alt kommer til alt anbefale CDI sitt instrument.

For å få gode og representative NIR-målinger på hele muskel vil vi anbefale å bruke en probe som måler i transflekstans modus. Det vil si at lyset sendes inn i muselen i ett område og måles i et annet. Det betyr at lyset tvinges til å vandre et stykke inn i prøven før det måles. På denne måten måler man dypt inn i prøven i stedet for bare på overflata. Det finnes ikke mange egnede prober på markedet. De er gjerne for

små for denne applikasjonen. Et god alternativ vil være å designe en egen probe. Dette kan for eksempel Sintef IKT være behjelpelige med.

Dersom det investeres i utstyr vil det være hensiktsmessig å kjøpe et system som er kjølt. Det vil sørge for god instrumentell stabilitet og bedre langsiktig sikkerhet i prediksjonene.

Kalibrering og bruk av NIR instrument

Det er ikke trivielt å tilpasse et NIR instrument til rutineanalyser. Det er primært kalibreringsarbeidet som tar tid. Trolig må man for hvert fiskeslag (med mindre fiskekjøttets beskaffenhet er meget lik) lage en egen kalibrering. En kalibrering lages ved å måle NIR spektra på en rekke prøver (gjerne 50 stk.) som spenner ut den relevante variasjonen i kjemisk sammensetning, men også annen type variasjon som kan påvirke spektrene så som temperatur, årstidsvariasjon (som kan slå inn på muskelens struktur). Kjemisk sammensetning måles våtkjemisk, og NIR spektrene kalibreres mot disse ved bruk av multivariat regresjon (for eksempel PLS eller PCR).

Det er også nødvendig å oppdatere kalibreringene over tid. Dette kan gjøres ved at man jevnlig (for eksempel to ganger i året) sender inn noen prøver til kjemisk analyse og legger disse inn i kalibreringen.

Det finnes gode rutiner for både kalibrering og oppdatering av modeller, samt gode råd i forhold til rutinemessig bruk av NIR. Matforsk er gjerne behjelpelige dersom Møreforskning ønsker å sette i gang denne type aktivitet.

Vedlegg 1:**Spesifikasjon for: SentroProc NIR
NIR-Spectrometer for quality control**

SentroProc NIR QC was developed for routine analysis in the industrial quality laboratory. Due to its considerable lower price in relation to the already well known NIR-Systems, established NIR-analysis can be made less cost intensive and new kinds of applications can be started. The robust system uses a NIR diode array spectrometer with 256 or 512 elements. The system can be expanded to the visible region. Probe heads in different versions for measurement in transmission and / or reflection complete the system. Two different measurement heads can be installed in simultaneously, switching the measurement between them is simple.

An additional PC is not necessary. All essential software packages are installed on the integrated embedded PC running with Win2000 ready for operation. USB- and Ethernet-Interfaces make it possible to connect external devices and transmitting data in a network.

By using chemometric models, calibrations for chemical and physical parameters can be applied. SentroProc NIR QC is been used for qualitative measurements and identification of materials.

Applications of the SentroProc NIR QC

- Measurement of the OH- and Acid-number
- Identification of materials
- Quality control
- Constituents of minerals and soil
- Identification of paper and pulp
- Detection and measuring of thin films

	Specification
Spectral range	900 – 1680nm,
Measurement principle	Diffuse Reflection (measurement heads for different types of samples)
Spectral resolution	ca. 8nm FWHM (256 Pixel, 3.2nm/Pixel)
Measuring time	Reflection: < 30 – 60s (150 – 300 means)
Photometric stability	Reflection: < 1mAU (spectral range 1000 – 1650nm)
Reference intervall	ca. 1 hour
Interfaces	USB and Ethernet
Light source	Tungsten-Halogene-Lightsource with 10000h liftime 2850 K color temperature, Power: 5 W, Warm up timet: 1h
Options	Turn table for petri dishes up to 100mm diameter (50 mm distance of the sample) System with temperature regulates sample holder

Vedlegg 2



Bilde 1.



Bilde 2.



Bilde 3.



Bilde 4.