

# Videreutvikling av VIS/NIR spektroskopi

## Bestemmelse av kvalitet

Karsten Heia, Svein K. Stormo, Stein H. Olsen, Bjørn Dissing, Jørn-Owe Johansen, Tone F. Aune og Agnar H. Sivertsen





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 400 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra, Averøy og Tromsø

**Hovedkontor Tromsø:**

Muninbakken 9–13  
Postboks 6122  
NO-9291 Tromsø

**Ås:**

Osloveien 1  
Postboks 210  
NO-1431 ÅS

**Stavanger:**

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4  
Postboks 8034  
NO-4068 Stavanger

**Bergen:**

Kjerreidviken 16  
NO-5141 Fyllingsdalen

**Sunnalsøra:**

Sjølseng  
NO-6600 Sunndalsøra

**Averøy:**

Ekkilsøy  
NO-6530 Averøy

**Felles kontaktinformasjon:**

Tlf: 02140  
Faks: 64 97 03 33  
E-post: [post@nofima.no](mailto:post@nofima.no)  
Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835 MVA**

# Rapport

	ISBN: 978-82-8296-122-6 (trykt) ISBN: 978-82-8296-123-3 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> <b>Videreutvikling av VIS/NIR spektroskopi – Bestemmelse av kvalitet</b>	<i>Rapportnr.:</i> 39/2013
	<i>Tilgjengelighet:</i> <b>Åpen</b>
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Karsten Heia, Svein K. Stormo, Stein H. Olsen, Bjørn Dissing, Jørn-Owe Johansen, Tone F. Aune & Agnar H. Sivertsen	<i>Dato:</i> 13 september 2013
<i>Avdeling:</i> Sjømatindustri	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 15
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 900749
<i>Stikkord:</i> Spektroskopi, kvalitet, restholdbarhet	<i>Prosjektnr.:</i> 10123
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i>	
<p>Objektiv kvalitetsvurdering av fisk er etterspurt både fra industri, kontrollmyndigheter og forbrukere. I dette arbeidet er en målemetode basert på spektroskopi videreutviklet for kvalitetsvurdering av torsk. Det er fokusert på to utfordringer i dette arbeidet, 1) varierende lagringstemperatur frem mot vurdering og 2) råstoff med ulik utblødning. To typer råstoff ble brukt i forsøk, linefanget og garnfanget torsk, for å fremprovosere ulik blodmengde i filetene. Det er ikke påvist forskjeller i mikrobiologisk vekst mellom disse gruppene, og det er heller ikke påvist noen korrelasjon mellom mengde restblod og mikrobiologisk vekst.</p> <p>Basert på spektroskopidata er det mulig å estimere lagringstid for en ukjent filet dersom lagringstemperaturen er kjent. Det vil si at for hver lagringstemperatur må du ha en modell for bestemmelse av lagringstid. Når lagringstemperaturen ikke er kjent eller har variert er dette en dårlig løsning. For å løse dette problemet ble restholdbarhet for alle fileter som inngikk i forsøket beregnet ut fra mikrobiologisk vekstrate på ulike temperaturer (lagret 3 dager rund på is, filetert og deretter lagret på 0, 4, eller 7 °C). På den måten kan alle filetene inngå i en felles modell uavhengig av lagringstemperatur, og det som estimeres er restholdbarhet i dager lagret på 0 °C. Med denne tilnærmingen til restholdbarhet ble det oppnådd svært gode modeller for restholdbarhet basert på VIS/NIR spektroskopi.</p>	
<i>English summary/recommendation:</i>	
<p>Objective quality assessment of fish and fish products are requested by producers, authorities as well as consumers. In this work an instrumental method for quality assessment of cod has been further developed. Two challenges have been addressed regarding freshness and quality changes; different storage temperatures and bleeding. Through this work a Partial Least Square (PLS) regression model for predicting remaining shelf life, as fillet on ice, was established and the optimal location for measuring freshness identified. The optimal location is in the loin area and the model is valid for storage temperatures between 0 and 7 °C.</p>	

# Innhold

<b>1</b>	<b>Innledning.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Problemstilling.....</b>	<b>2</b>
2.1	Målsetting.....	2
<b>3</b>	<b>Materiell og metode.....</b>	<b>3</b>
3.1	Hyperspektral avbildning.....	3
3.2	OIS-spektroskopi.....	3
3.3	Hemoglobin analyse .....	5
3.4	Mikrobiologi .....	5
3.5	Avsluttende forsøk .....	5
3.6	Analyse av spektroskopidata .....	6
<b>4</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>8</b>
4.1	Mikrobiologi og hemoglobinanalyse .....	8
4.2	Hyperspektral avbildning – Estimering av lagringstid som filet .....	9
4.3	Hyperspektral avbildning – Estimering av restholdbarhet.....	9
4.4	Implementering av OIS-spektroskopi for måling på fisk .....	10
4.5	Optimal målegeometri .....	12
<b>5</b>	<b>Konklusjon.....</b>	<b>13</b>
<b>6</b>	<b>Veien videre.....</b>	<b>14</b>
<b>7</b>	<b>Referanser .....</b>	<b>15</b>

# 1 Innledning

Under lagringsforløpet er det en rekke ulike forringelsesprosesser som endrer fiskemuskelen og som påvirker vår oppfatning av kvaliteten. Disse prosessene er sammensatte og avhenger både av råstoff, behandling og temperatur under lagring. For eksempel er trimetylamin (TMA) en kjemisk forbindelse som dannes av bakteriell aktivitet og representerer det vi normalt assosierer med fiskelukt. Kvalitet/ferskhet er derfor vanskelige begrep å definere rent teknisk, og det er vanlig å forenkle begrepene til å omfatte lagringstid på en gitt temperatur, bakterietall eller lignende.

Kvaliteten på sluttproduktet og restholdbarhet vil avhenge av ferskheten på råmaterialet, og det vil derfor være gunstig å kunne måle og dokumentere kvaliteten til produktet ved hjelp av en hurtig og ikke destruktiv metode. En rekke ulike metoder har vært evaluert for å kunne skille mellom ferske og tinte fiskeprodukter (Duflos *et al.*, 2002), samt for å evaluere ferskhet (Olafsdottir, 2004; Olafsdottir *et al.*, 1997). De fleste av disse metodene er destruktive, trege og ikke egnet for industriell anvendelse.

Bruk av synlig og nær-infrarød (VIS/NIR) spektroskopi til ferskhetsbestemmelse har vært foreslått ved flere anledninger (Nilsen *et al.*, 2002; Nilsen & Esaiassen, 2005; Sivertsen *et al.*, 2011). Det har vist seg å være en lovende metode, både med hensyn til hurtighet og at metoden er ikke-destruktiv, men det gjenstår en del arbeid før en kommersiell løsning er på plass. Usikkerheten til metoden er knyttet til i hvor stor grad sesongvariasjoner, råstoff og lagringsbetingelser påvirker analyseresultatene. Det har også vært vist at spektroskopi kan påvise om et råstoff tidligere har vært fryst (Sivertsen *et al.*, 2011).

Det har vært gjennomført et innledende arbeid for måling av forbrukerakseptans ved hjelp av VIS/NIR spektroskopi. I dette arbeidet ble to ulike lagringsbetingelser anvendt på hel fisk, islagring (0 °C) og lagring på 4°C. Det vist av VIS/NIR spektroskopi kunne anvendes for å forutsi hvorvidt en konsument ville akseptere produktet uten at lagringsbetingelsen var kjent før analysen. Omfanget av dette arbeidet var lite, og inkluderte ikke problemstillinger rundt forbrukerakseptans i etterkant av en slik analyse.

## 2 Problemstilling

Det er ikke tidligere vist at måleoppsett og analysemodeller for måling av kvalitet ved hjelp av spektroskopi er robuste med tanke på ulike råstoffkvaliteter, lagringsbetingelser og sesongvariasjoner. For å etablere robuste modeller må et grunnleggende studium gjennomføres for å avdekke hvordan variasjonene påvirker de spektroskopiske registreringene, og hvordan denne påvirkningen kan fjernes eller utnyttes i modellene.

Før en fisk kommer til fiskebutikken og skal vurderes er det mange faktorer som kan variere. Disse faktorene vil kunne påvirke både den mikrobiologiske/enzymatiske forringelsen til produktet, forbrukerakseptans og de spektroskopiske målingene. De viktigste faktorene er: sesongvariasjoner, utblødning, fileteringstidspunkt, lagringsatmosfære og kjølekjede frem til fiskehandleren. I tillegg vil betingelsene i kjøledisken akselerere den videre forringelse av produktet da filetoverflaten vil oppleve en forhøyet temperatur, mens undersiden holdes kjølt på 0 °C.

Det var ikke mulig å studere alle disse faktorene innenfor rammene av dette prosjektet, men det ble gjort et utvalg av variasjoner som skulle undersøkes. Det ble valgt å fokusere på variasjoner knyttet til kjølekjede og utblødning for å fremskaffe resultater som bringer VIS/NIR spektroskopimetoden nærmere en kommersiell løsning.

De andre parameterne som kunne variert, ble holdt nærmest mulig hva som er dagens situasjon, i hvert fall ønsket situasjon; rund fisk ble landet, lagret hel på is i 3 dager og deretter filetert. Etter filetering ble fisken lagret videre som filet i pappesker på is, ved 4 °C og ved 7 °C. Det vil si at effekten av fileteringstidspunkt, lagringsatmosfære og sesongvariasjoner ikke ble studert i dette prosjektet. Opprinnelig var det planlagt å knytte aktivitetene i dette arbeidet opp mot et prosjekt som undersøker forbrukerakseptans, men dette prosjektet ble ikke igangsatt før etter at det praktiske arbeidet i spektroskopiprojektet var avsluttet.

### 2.1 Målsetting

Hovedmålet med prosjektet var å utvikle et robust måleoppsett og videreutvikle analysemodeller for måling av kvalitet/ferskhets og forbrukerakseptans. Resultatet av arbeidet vil være grunnlag for å utvikle et håndholdt VIS/NIR instrument for ferskhetsanalyse.

Delmål:

1. Bestemme optimal målegeometri.
2. Utvikle metoder for å skille sprednings- og absorpsjonsbidraget i VIS/NIR spektrumet.
3. Avdekke hvordan sprednings- og absorpsjonsbidraget avhenger av varierende utblødningsgrad og variasjon i kjølekjede etter filetering.
4. Utvikle analysemodeller for bestemmelse av kvalitet/ferskhets basert på VIS/NIR målinger som takler råstoffvariasjonene studert i punkt 3.

### 3 Materiell og metode

Under prosjektgjennomføringen ble både hyperspektral avbildning og «Oblique Incidence Scattering» (OIS) spektroskopi testet som metode for bestemmelse av restholdbarhet. Som referansemåling i dette arbeidet ble hemoglobinanalyser gjennomført, samt mikrobiologi både for totalkim og spesifikke forringelsesbakterier. OIS-spektroskopi har tidligere vært utviklet og testet for kjøtt (Lin *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 2007) og kunnskapen ble i dette prosjektet overført til måling på fisk.

#### 3.1 Hyperspektral avbildning

Ved hjelp av hyperspektral avbildning kan hele fileter avbildes spektralt på et transportband. Systemet ble kjørt i interaktansoppsett, det vil si at ikke bare overflaten til fileten blir inspisert, men at lyset tvinges til å bevege seg et stykke inne i fileten. Dette illustreres i Figur 1 som viser hvordan to lysstriper projiseres ned på en laksefilet mens den passerer på et transportband. Den avbildende spektrografen registrerer hvor mye lys som kommer ut av fileten midt mellom lysstriperne på ulike bølgelengder. Lyset er skjermet slik at det lyset som vises mellom lysstriperne kommer fra innsiden av fileten. Etter hvert som fileten passerer måleområdet (hastighet på 40 cm/sekund) bygges det opp et bilde av fileten med høy romlig oppløsning ( $0,5 \times 1,0 \text{ mm}^2$ ), hvor hver piksel består av et fullt spektrum som karakteriserer fileten i dette punktet. Basert på de målte spektrene kan det utvikles matematiske modeller for restholdbarhet. En nærmere beskrivelse av måleoppsettet er gitt i Sivertsen *et al.* (2011).

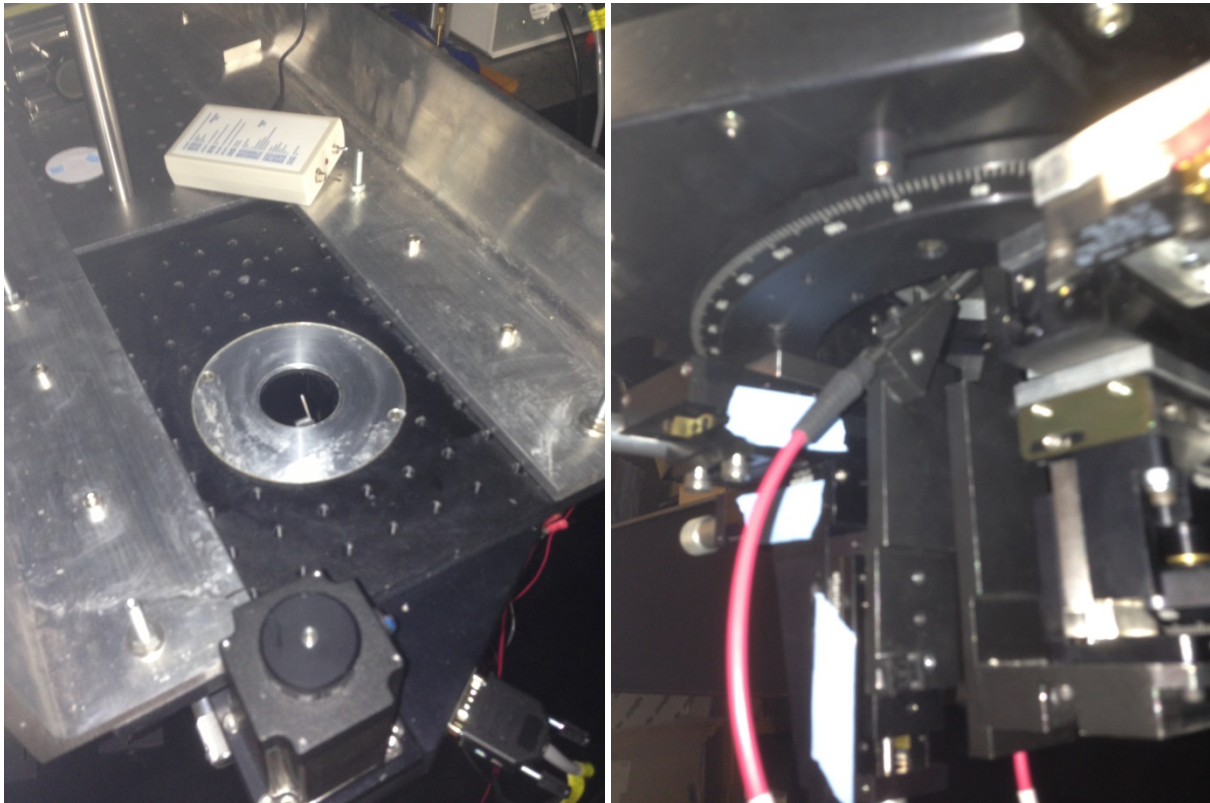


Figur 1 Interaktansoppsettet: Laksefilet med projiserte lyslinjer, der spektrografen registrerer hvor mye lys som kommer ut av fileten midt mellom lysstriperne.

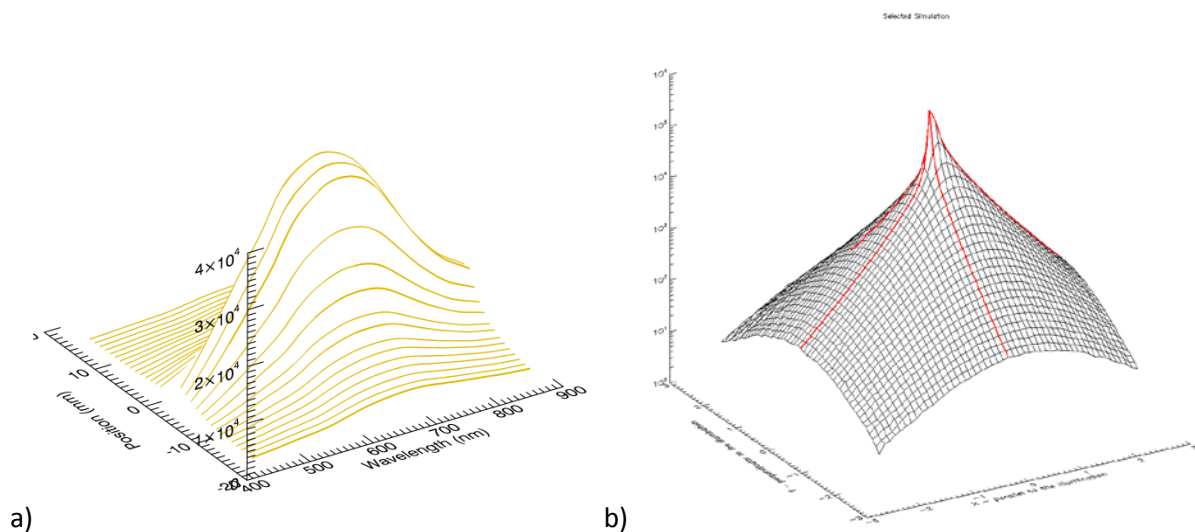
#### 3.2 OIS-spektroskopi

«Oblique Incidence Scattering» (OIS) spektroskopi er en metode for eksperimentelt å skille mellom spredning og absorpsjon i en prøve. Da tidligere arbeid har vist at oksidasjonstilstanden til heme proteiner i fiskemuskel er en viktig markør for ferskhet, vil det å kunne analysere direkte på absorpsjonsspekteret (kjemien) være gunstig. Basert på tidligere publiserte metodebeskrivelser og resultater (Lin *et al.*, 1997; Takagi *et al.*, 2000; Xia *et al.*, 2007) har vi designet og bygd et oppsett for å teste metoden på torskefileter. Som vist til venstre i Figur 2 presenteres prøven fra oversiden på et mikroskopiglass i åpningen over fibrene, plassert i åpningen. Belysningsfibren er fiksert i en vinkel på 45 grader i forhold til prøvens overflate, mens en mottaksfiber står montert på et translasjonsrack

vinkelrett på prøven. Mottaksfiberen kan beveges på en rett linje langs belyningsfiberen mens lyset som kommer fra prøven blir registrert. I tillegg kan hele oppsettet under bordet roteres slik at ulike retninger over prøven kan måles.



Figur 2 Oppsett for OIS-spektroskopi sett ovenfra (til venstre) og nedenfra (til høyre)



Figur 3 a) Rådata fra OIS-spektroskopi tatt opp på ulike avstander fra belyningsfiberen og b) Monte Carlo simulering av lysgjennomgang i en prøve med absorpsjonskoeffisient  $\mu_a = 0.7$  og redusert spredningskoeffisient  $\mu'_s = 1.5$ .

Mottaksfiberen flyttes i steg på 1 mm og i hver posisjon registreres hvor mye lys som kommer ut av prøven i det punktet (ett lysspektrum). Dette ble gjort i 30 ulike posisjoner, 15 på hver side av belyningsfiberen. Typiske spektra fra en OIS-måling er vist i Figur 3a. Som vist mottas mer lys foran



enn bak belyningsfiberen, og mengde mottatt lys avtar med avstand fra belyningsfiber. Hver prøve ble skannet i fire retninger ved at oppsettet under prøvebordet ble satt i posisjon 0, 45, 90 og 135 grader med full skanning i hver posisjon.

Basert på teori beskrevet i Takagi *et al.* (2000), målte spektre i ulike posisjoner og Monte Carlo simulering av lysgjennomgang i et spredende materiale, kan sprednings- og absorpsjonskoeffisienter til prøven estimeres.

### 3.3 Hemoglobin analyse

En metode for måling av hemoglobin som er rask og enkel er Hornsey's hemjernmetode (Hornsey, 1956), og modifisert av Carpenter og Clark (1995). Metoden går ut på å omdanne hemoglobinet til et stabilt fargepigment ved hjelp av kjemikalier (Aceton og saltsyre). Hemjernet i hemoglobinet blir omdannet til surt hematin ( $\text{Fe}^{2+}$  til  $\text{Fe}^{3+}$ ), som gir et stabilt fargepigment. Et fargepigment har sitt spesielle område hvor lys absorberes, og hemjernmetoden måler på vannløselige hematinkomponenter ved bølgelengdene 512 og 640 nm.

Framgangsmåte:

- Tre paralleller på 5.0 gram muskel veies inn i 50 ml sentrifugerør (En prøve med 4,5 ml destillert vann brukes som blankprøve)
- Prøvene frysetørkes til stabil vekt
- Tilsett deretter 10,25 ml surt aceton og 2,25 ml destillert vann til hver prøve
- Blandingen homogeniseres og settes i kjøleskap i en time for å sikre at hemoglobinet omdannes til surt hematin
- Blandingen filtreres deretter gjennom en Whatman filterpapir (No 1)
- Etter filtrering avleses absorbansen til filtratet ved 512 nm.
- Hemoglobinmengden i muskelprøven beregnes ved hjelp av standardkurven med kjent mengde hemoglobin

### 3.4 Mikrobiologi

Mikrobiologien ble gjennomført i henhold til beskrivelse i Gram & Huss (1996). Fra hver filet ble det skåret ut fem kubiske muskelbiter á 3,5–4 gram. Prøvene ble tatt fra punkter som ligger mellom brystfinnen og gattet på fileten, og vekselvis på høyre og venstre side av ryggspylen. Prøvene ble tatt ut ved hjelp av steril skalpell og pinsett og overført til Stomacherposer med filter. Posene med innhold ble oppbevart på is til videre bearbeiding av prøvene.

Samleprøven (~ 15–20 g) ble fortynnet 5x ved tilsetning av sterilt fysiologisk saltvann (0,9 % NaCl). Deretter ble prøven homogenisert 2 min i stomacher (Seward Medical). Prøven ble så fortynnet ytterligere (50, 500, 5000x og så videre), overført til Jernagarplater og dyrket på 12 °C i 5 døgn. Antall kolonier totalt (Totalkim) og antall sorte kolonier (sulfidproduserende bakterier) ble registrert.

### 3.5 Avsluttende forsøk

Det ble gjennomført forsøk på torsk fanget med to forskjellige redskap (line og garn). Line ble satt på Tromsøflaket i midten av april 2013. På grunn av dårlig vær stod linen i havet i 2 døgn, før fisken ble

levert til Torsvågbruket AS, hvor den ble sløyd, hodekappet og sortert. Torsken (2–4 kg; n=35) ble pakket som blanktorsk (is i bunnen av kassene og over nakkene til fisken), før den ble sendt til Nofima samme dag. Fisken ble iset om ved ankomst og lagret på is i 3 døgn, før filetering post rigor. Filetene ble delt i 3 grupper og lagret ved 0 °C (n=30) 4 °C (n=20) og 7 °C (n=15).

Garnene ble satt på Malangsgrunnen i midten av april 2013. Garnene ble halt etter 12 timer og fangsten ble levert ved Ivan Lorentzen Fiskeforretning samme døgn. Fisken (2–4 kg; n=35) ble sløyd, hodekappet og sortert, før den ble videresendt til Nofima samme dag. Fisken ble lagret på is i 3 dager før filetering post rigor. Disse filetene ble også delt i 3 grupper og lagret ved 0 °C (n=30) 4 °C (n=20) og 7 °C (n=15).

Høyre og venstre filet ble fordelt mellom to ulike temperaturer/lagringstidgrupper (0 og 4 °C). Ved filetering ble vestrefiletene fra garn og line separert, pakket i plastfilm og lagret på is. Høyrefiletene fra garn og line ble pakket inn i plastfilm og disse ble lagret i kasser i klimaskap som holdt stabil temperatur på 4 °C. Når det gjaldt filet fra garn og linefisk som ble lagret ved 7 °C, ble det benyttet både høyre og venstre filet. Filetene ble fordelt over 3 lagringsdøgn (1, 3 og 4 døgn) på en slik måte at ikke høyre og venstre filet fra samme fisk ble målt på samme dag. Uttaksdagene i forsøket er oppsummert i Tabell 1.

*Tabell 1 Uttak av prøver etter filetering. Uttaksdagene i forsøket ble organisert likt for garnfanget og linefanget torsk. For hvert prøveuttak ble det tatt ut 5 filet fra line og 5 filet fra garn. Kryssene i tabellen markerer prøveuttak for de ulike lagringstemperaturene (0, 4 og 7 °C).*

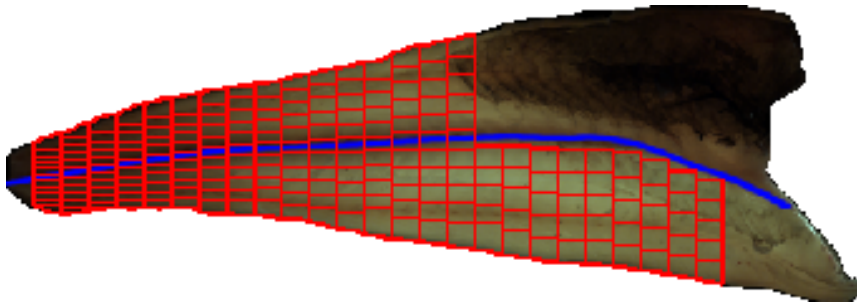
Temperatur	Dag 0	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 7	Dag 9	Dag 11
0 °C	X		X		X	X	X	X
4 °C			X		X	X	X	
7 °C		X		X	X			

Ved hvert uttak ble torskfiletene avbildet spektroskopisk i interaktansmodus og på hver filet ble 2 OIS-målinger utført, en på tykkfisken og en på sporden. Videre ble det tatt ut mikrobiologiprøver for analyse fra alle filetene. Av de totalt 260 fiskestykkene som ble OIS-målt ble det gjennomført hemoglobinanalyse på 90 prøver ved hjelp av Hornsey's hemjernmetode.

### 3.6 Analyse av spektroskopidata

I forbindelse med opptak av hyperspektral data ble også en referanse av teflonmateriale avbildet. Alle hyperspektrale bilder ble senere kalibrert opp mot denne referansen for å kompensere for ujevn belysning og lampekarakteristikk.

Fra avbildende spektroskopidata ble det hentet ut spektre fra ulike posisjoner på filetene for å studere hvorvidt det er noen områder som er bedre/dårligere egnet for kvalitetsmålinger. Bukklappen er ikke brukt i analysen siden tilstedeværelse av svarthinne vil påvirke analysen. De ulike områdene på fileten er vist i Figur 4.



Figur 4 Områder hvor spektre er hentet ut for analyse fra hyperspektrale bilder

De ekstraherte spektrene ble «Standard Normal Variate» (SNV) pre-prosessert (Barnes *et al.*, 1989) før «Partial Least Square Regression» (PLSR) modeller ble beregnet. PLSR-modellene ble validert med full kryssvalidering og antall komponenter i modellen ble satt til 3. Ved å sette antall komponenter så lavt unngås det å overtrene modellene når full kryssvalidering brukes.

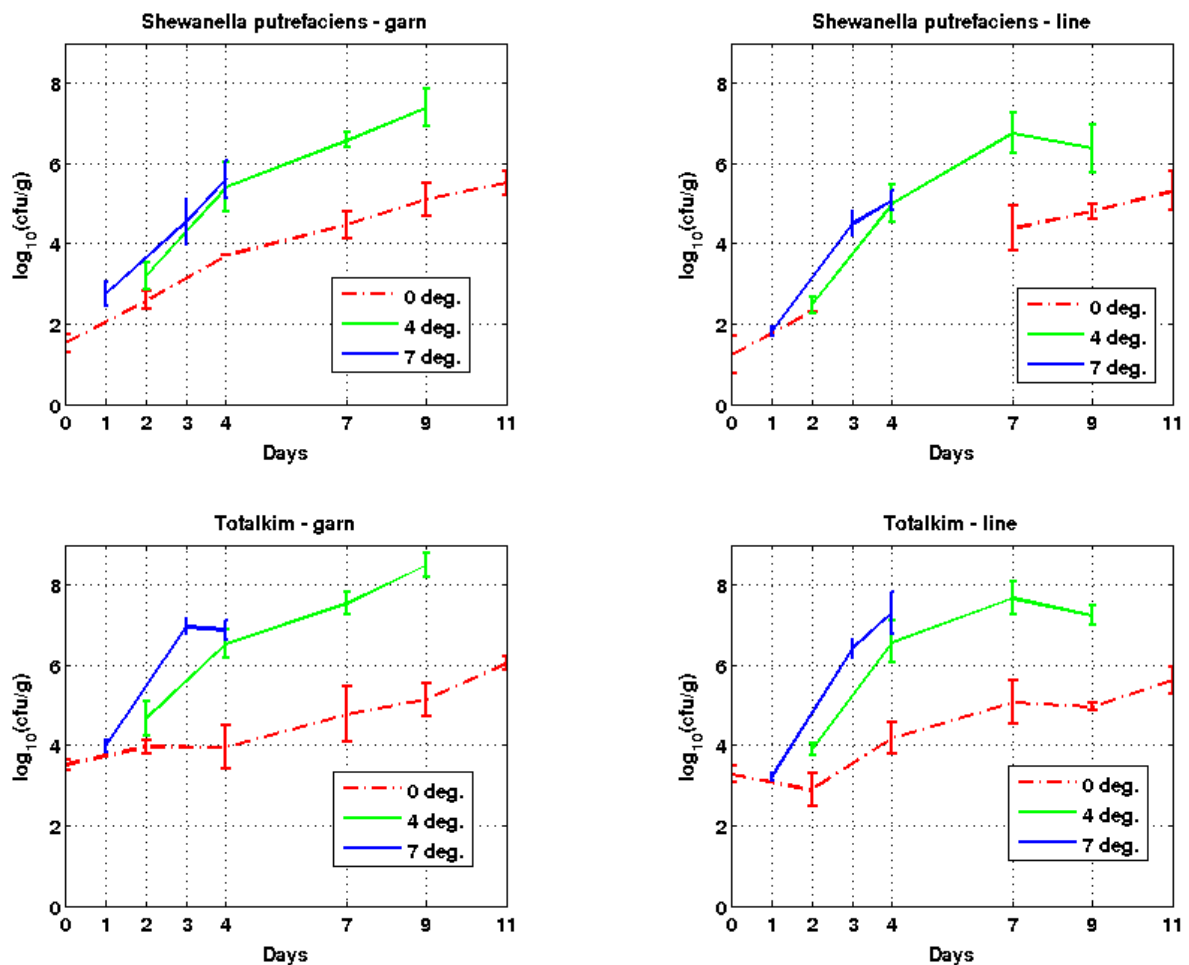
Som responsvariable i utvikling av PLSR-modeller ble det brukt lagringstid (en modell for hver lagringstemperatur) og forventet restholdbarhet (en felles modell for alle lagringstemperaturer). Når modellen estimerte lagringstid på en gitt temperatur kan resultatene sammenlignes med tidligere publiserte resultat (lagring på 0 °C) (Sivertsen *et al.*, 2011). Med utgangspunkt i Huss (1995) og Nixon (1971) ble lagringstid på ulike temperaturer omregnet til restholdbarhet (på 0 °C),  $Y_{0^{\circ}\text{C}}$ , etter følgende lineære formel:

$$Y_{0^{\circ}\text{C}} = 14 - (N_{is} + N_T S_T) \quad (1)$$

hvor det antas 14 dagers holdbarhet på islagret torsk,  $N_{is}$  er antall dager lagret hel på is,  $N_T$  er antall dager lagret som filet på temperatur  $T$ , og  $S_T$  er forringelseshastighet ved temperatur  $T$ . Forringelseshastighet ved de ulike temperaturer er satt til  $S_{0^{\circ}\text{C}} = 1.0$ ,  $S_{4^{\circ}\text{C}} = 2.3$  og  $S_{7^{\circ}\text{C}} = 4.7$ . Dette gir et grovt estimat av restholdbarheten til de filetene som inngikk i forsøket dersom de fra uttaksdagen hadde blitt lagret videre på is.

## 4 Resultater

### 4.1 Mikrobiologi og hemoglobinanalyse



Figur 5 Utvikling av totalkim og *Shewanella putrefaciens* ved ulike lagringstemperatur i de to gruppene med råstoff, garnfanget (til venstre) og linefanget (til høyre). Antall dager er etter filetering slik at reell lagringstid er 3 dager høyere enn angitt på akse

Under lagringsforsøk på ulike temperaturer ble både totalkim og *Shewanella putrefaciens* målt, se Figur 5. Ut fra figuren er det som forventet at effekt av temperatur under lagring er viktig for mikrobiologisk vekst. Basert på tidligere retningslinjer (grenseverdi på  $\log 6$  for totalkim) er filetene under grenseverdi helt frem til 11 dagers lagring som filet på  $0^\circ\text{C}$ . På forhøyet temperatur derimot er grensen overskredet allerede på dag 3 for lagring på  $7^\circ\text{C}$  og på dag 4 for lagring på  $4^\circ\text{C}$ . Sammenlignes linefanget og garnfanget råstoff er det ikke signifikante forskjeller i mikrobiologisk utvikling under lagring.

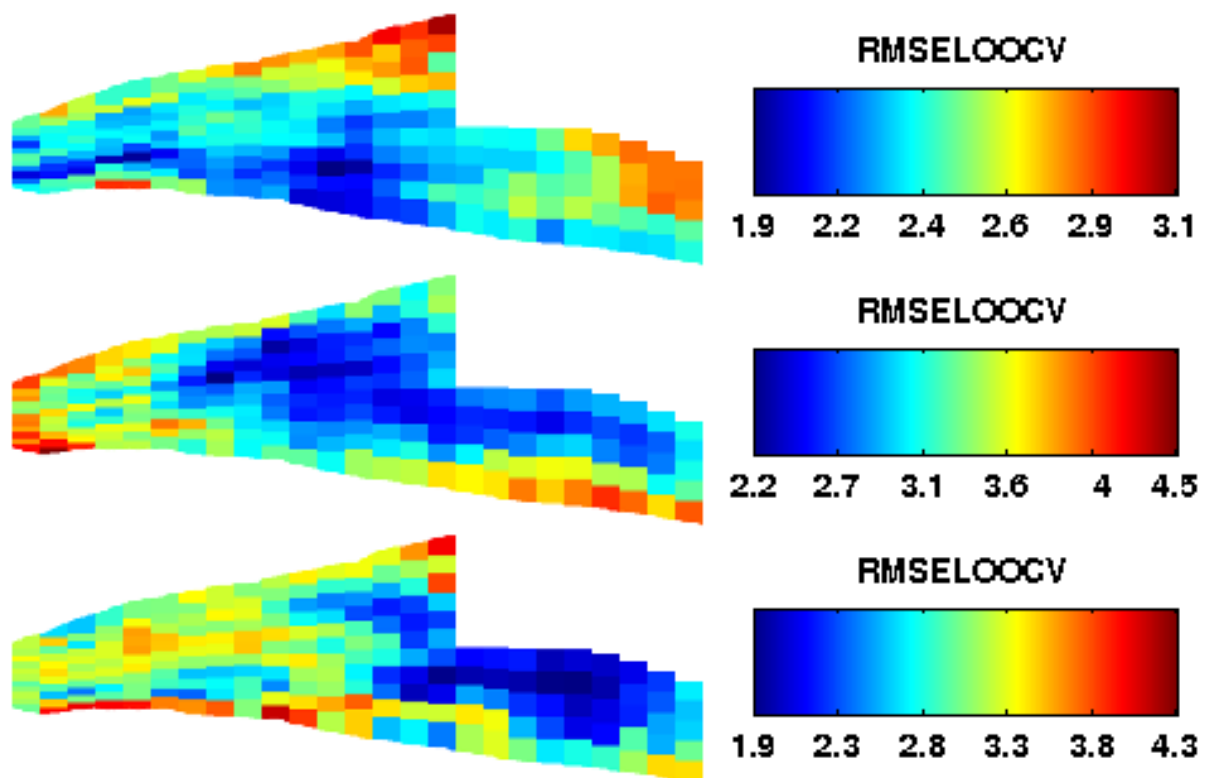
For *Shewanella putrefaciens*, øverste rad i Figur 5, er bildet det samme som for totalkim. Det er ingen signifikant forskjell mellom garn og linefanget råstoff og utviklingen er sterkt avhengig av lagringstemperatur som filet.

Tidligere resultater har vist at oksidasjonstilstanden til restblod i muskelen er en viktig markør i forbindelse med spektroskopisk bestemmelse av lagringstid på is (Sivertsen *et al.*, 2011). I det

avsluttende forsøket ble blodmengde i tykkfisk og spord målt kjemisk for et stort antall prøver. Når filetene var lagret lenge nok til at mikrobiologisk vekst var registrert, ble det kjørt statistiske tester på om det var en sammenheng mellom kjemisk målte hemoglobinverdier og totalkim og *Shewanella putrefaciens*. Det var ikke mulig å påvise statistisk sammenheng mellom blodmengde og veksthastighet på bakteriene.

## 4.2 Hyperspektral avbildning – Estimering av lagringstid som filet

Siden forsøket ble kjørt med tre ulike lagringstemperaturer ble det laget tre ulike modeller for estimering av lagringstid som filet, en for 0 °C, en for 4 °C og en for 7 °C. Dette er uhensiktsmessig når lagringstemperaturen ikke er kjent, men viktig med tanke på å avdekke hvordan spektroskopien takler ulike lagringstemperaturer i «rene» modeller.



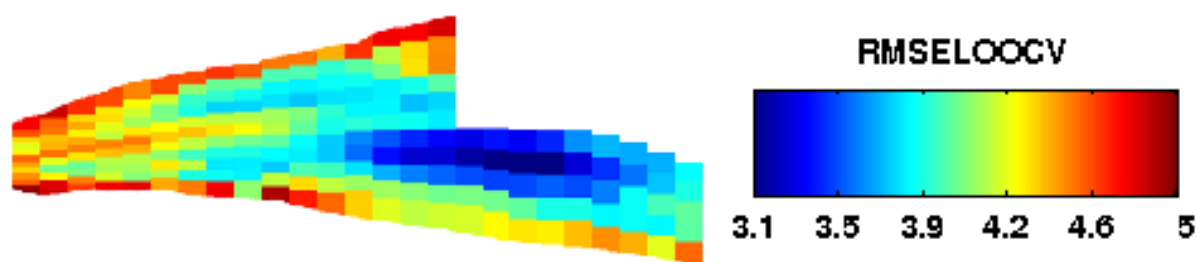
Figur 6 RMSEP-kart for prediksjonsmodeller med 3 komponenter for estimering av lagringstid som filet. Fra topp til bunn vises kart tilsvarende lagringstemperatur 0, 4 og 7 °C

Figur 6 viser RMSEP-kartene for de tre ulike lagringstemperaturene som ble brukt i det avsluttende forsøket. Det mest robuste estimatet av RMSEP-kart er for 0 grader hvor vi har flest prøver, men også de to andre kartene gir et godt bilde av situasjonen. Spesielt på forhøyet lagringstemperatur ser det ut som det beste området å måle er på tykkfisken, men det er mulig å måle stort sett over hele fileten. Det å ha en RMSEP-verdi rundt 2–3 dager er absolutt tilfredsstillende for en målemetode i denne sammenhengen.

## 4.3 Hyperspektral avbildning – Estimering av restholdbarhet

Normalt er ikke lagringshistorikken for en filet eller torskekotelett kjent, for eksempel med hensyn på lagringstemperatur. Derfor er det å måle hvor mange dager en filet eller en torskekotelett har vært

lagret på null grader ikke nødvendigvis fornuftig. Det som betyr noe er hvor lang restholdbarhet som kan forventes gitt at produktet blir lagret videre ved for eksempel 0 grader. For å fremskaffe denne informasjonen skulle man optimalt sett ha tilgang på forbrukerdata på prøvene, men det var ikke økonomisk ramme for dette i prosjektet. Derfor har analysen blitt basert på publiserte sammenhenger mellom lagringstid og temperatur for å beregne forventet restholdbarhet gitt kjent historikk. Dette vil si at for alle prøvene i forsøket ble lagringstid på gitt temperatur omregnet til forventet restholdbarhet ved bruk av formel (1). Deretter ble alle prøvene brukt til å lage en modell for estimering av restholdbarhet uavhengig av kjennskap til lagringstemperatur.

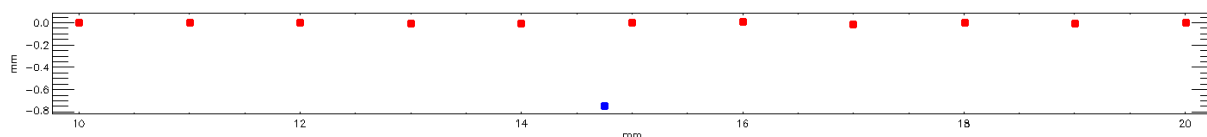


Figur 7 RMSEP-kart for prediksjonsmodell med 3 komponenter for restholdbarhet basert på torsk lagret på ulike temperaturer

RMSEP-kartet for denne modellen, vist i Figur 7, viser at det er mulig å estimere restholdbarhet basert på spektroskopi uavhengig av tidligere lagringstemperatur, men det hadde vært en stor fordel å få dette grundigere bekreftet gjennom forbrukerakseptansdata.

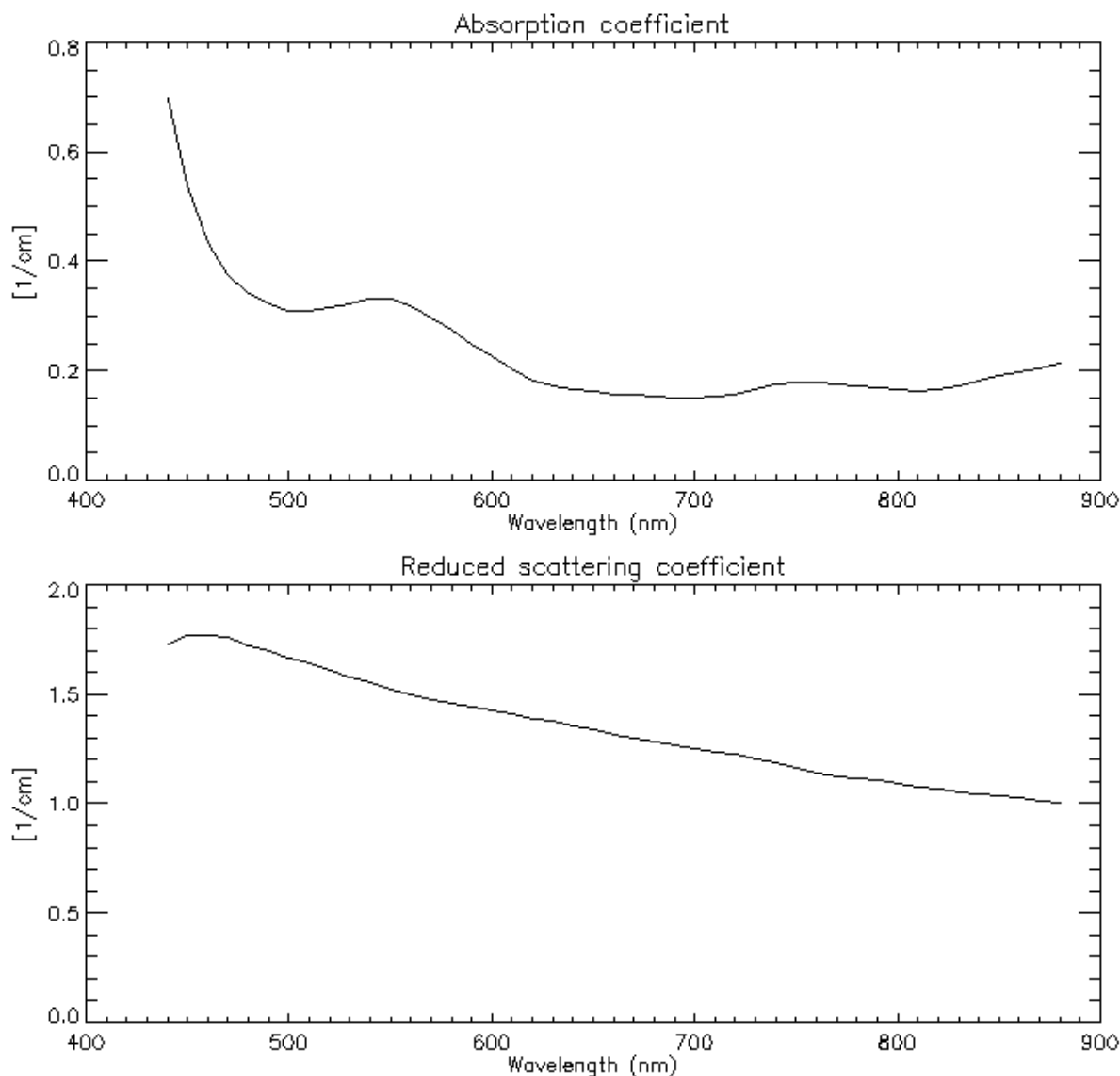
#### 4.4 Implementering av OIS-spektroskopi for måling på fisk

OIS-spektroskopi (Oblique Incidence Scattering) har ikke tidligere vært anvendt på fisk, slik at her startet arbeidet med å implementere måleoppsett og utvikle programvare for styring av instrumentering, opptak av data og analysing av data. Basert på måleoppsettet presentert i *Lin et al.* (1997) ble instrumentering satt opp på laboratoriet bestående av en belsningsfiber og en mottaksfiber. Kalibrering av fibrenes innbyrdes posisjon ble gjort ved å montere et kamera over fibrene og fotografere belsningsfiber og mottaksfiber i ulike posisjoner.



Figur 8 Målte fiberposisjoner basert på fotografier. Blått punkt er belsningsfiber og de røde punktene er mottaksfiber i ulike posisjoner (1 mm mellom hver posisjon)

En karakterisering av fiberposisjonene er vist i Figur 8. Karakteriseringen viste at mottaksfibren kunne posisjoneres med en nøyaktighet på 0,003 mm, og at den beveger seg på en linje som er forskjøvet i forhold til mottaksfiber med 0,75 mm. Dette er svært nøyaktig og viser at oppsettet fungerer mekanisk.



Figur 9 Absorpsjons- og redusert spredningskoeffisient målt på tykkfisken til en filet fra en garnfanget torsk som ble lagret 3 dager som hel fisk på is og to dager som filet på  $0^{\circ}C$

Basert på målte spektrere i ulike posisjoner ble det beregnet sprednings- og absorpsjonsspektrere for de ulike filetene. Figur 9 illustrerer hvordan absorpsjon og redusert spredning kan se ut. For fiskemuskel er nivået på spredningskoeffisientene og avtagende spredning med økende bølgelengde helt i samsvar med tidligere arbeid. Absorpsjonsspekteret samsvarer også med hva som kan forventes av torskemuskel med en del restblod. Økning i absorpsjon for lave bølgelengder og absorpsjonstoppen rundt 550 nm samsvarer med blodabsorpsjon, mens absorpsjonstoppen rundt 750 nm og økningen på høye bølgelengder samsvarer med vannabsorpsjon.

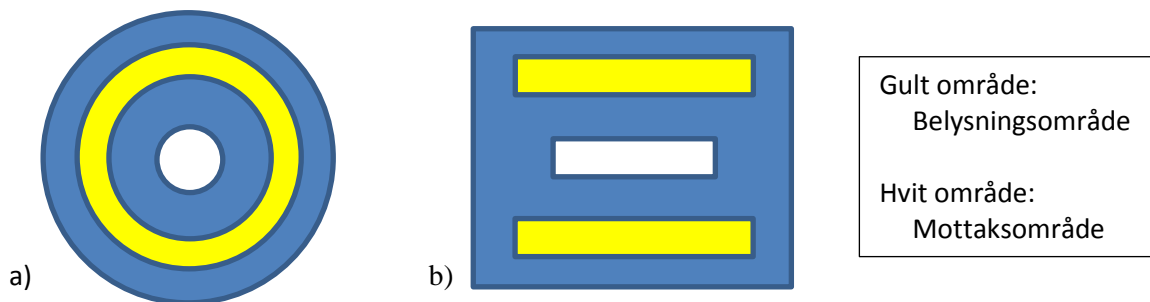
På grunn av fiberstrukturer i fiskemuskel observeres det at når det måles i ulike retninger over samme området på prøven så estimeres det ulike sprednings- og absorpsjonsspektrere. Derfor er det hensiktsmessig å bruke midlere spektrere slik som vist i Figur 9. Spektrere vist i Figur 9 er midlet over de fire retningene som ble målt på tykkfisken.

Hvordan prøven presenteres for måleoppsettet i OIS-spektroskopien er av stor betydning. Dersom måling blir foretatt over en spalte i muskelen eller at det er urenheter på fileten i måleområdet vil

det påvirke målingen og i verste fall blir det umulig å estimere absorpsjons og spredningskoeffisienter. Dette ble observert i et stort antall av prøvene i det avsluttende forsøket og viser at det er behov for å jobbe videre med å optimalisere hvordan prøven bør presenteres for OIS-måling.

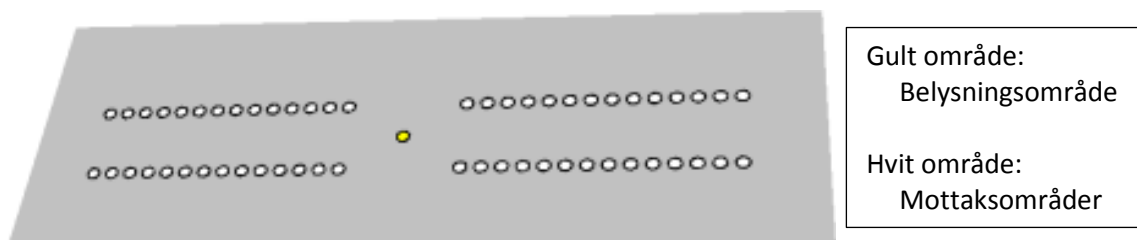
#### 4.5 Optimal målegeometri

Basert på hyperspektral avbildning er det vist at lagringstid/restholdbarhet kan måles med rimelig stor nøyaktighet på store deler av fileten. Dette er ikke et håndholdt instrument, men som vist av Sivertsen *et al.* (2011) kan et håndholdt instrument oppnå samme resultat på ferskhetsmåling som det hyperspektrale instrumentet. Ut fra oppsettet til det hyperspektrale systemet kan det konkluderes med at et håndholdt instrument som baserer seg på å sende inn lys i fileten et stykke unna der hvor lyset registreres vil være optimalt. Mulige utforminger av belynings- og mottaksområde for et slikt instrument er skissert i Figur 10. Avstand mellom belynings- og mottaksområde bør være fra 8 til 15 mm, bredden på belyningsområdet bør være 3 til 6 mm og bredde/radius på mottaksområdet bør være 2 til 5 mm. For den kvadratiske fronten bør lengden på belyningsstripene være ca. 15 til 25 mm, mens mottaksstripen kan være litt kortere.



Figur 10 To mulige utforminger av fronten på et håndholdt instrument for kvalitetsmåling

En av de store utfordringene ved OIS-spektroskopi har vist seg å være presentasjon av prøvemateriale. Resultatene så langt viser at det ikke er behov for å ta opp veldig tett med spektre langs det planet som belyningsfiberen spenner ut normalt på prøven. En sampling med avstand 1 mm i området fra 3 til 16 mm fra belyningsfiberen (foran og bak) vil være tilstrekkelig. For å øke sensitiviteten på systemet kan det være en ide å ha to rekker med mottaksfibre, en på hver side, som skissert i Figur 11.



Figur 11 Utforming av fronten på et håndholdt instrument basert på OIS-spektroskopi

Diameteren på de fibre som har vært testet ut er 0,2 mm, men det kan være fornuftig å teste ut hvordan systemet vil fungere med litt større fibre. Det har vært publisert et arbeid der fiber med en diameter på 0,4 mm har vært brukt (Xia *et al.*, 2007).



## 5 Konklusjon

Målsettingen i dette prosjektet var å videreføre det arbeidet som har vært gjort tidligere på å bruke spektroskopi for å bestemme kvaliteten på ukjente fiskeprodukter. Tidligere var det vist at spektroskopi kunne brukes til å bestemme lagringstid på is og derved si noe om restholdbarhet. Resultatene fra prosjektet viser at det er mulig å bestemme restholdbarhet til en torskeprøve, ved videre lagring på 0 °C, uten kjennskap til tidligere lagringsbetingelser. Dette har blitt testet for tre ulike lagringstemperaturer (0 °C, 4 °C og 7 °C) og for råstoff med stor variasjon i blodinnhold. Dette er nye funn sammenlignet med tidligere forskning, og viser at spektroskopi kan være en robust målemetode for ferskhetsbestemmelse med tanke på variasjon i lagringstemperatur.

Ut fra resultatene i dette prosjektet er tre mulige utforminger på et håndholdt instrument presentert. Det er foreslått to mulige måleflater for tradisjonell spektroskopi og en for OIS-spektroskopi. Utformingen av instrumentets mulige måleflater for tradisjonell spektroskopi vil sikre god kontakt med prøven og tilstrekkelig areal for belysning og mottak av lys. Derimot er det behov for å teste OIS-oppsettet med større fibrer for å se om det kan gjøre oppsettet mer robust med tanke på belysning av prøven og måling av returnert lys.

## 6 Veien videre

I FHF-prosjekt # 900875, «Verktøy for å måle fiskekvalitet basert på forbrukernes oppfatning (Fase 1)», er det lagt inn aktiviteter på spektroskopi som måleverktøy for å kunne bidra i forbrukerundersøkelsene som er planlagt i fase 2 av dette arbeidet. Prosjektet på kvalitet og forbrukerakseptans dekker imidlertid ikke videre forskning og utvikling for å ta våre resultater frem til en kommersiell instrumentering.

I et videre arbeid må variasjoner som skyldes sesong, fileteringstidspunkt, lagringsatmosfære og sammenheng mellom VIS/NIR spektroskopi og forbrukerakseptans studeres. Deretter må utstyrslleverandør involveres med tanke på å ferdigstille en prototype på et håndholdt instrument. Det er også viktig å jobbe mer med OIS-spektroskopi for å løse utfordringene med hvordan prøven skal presenteres for instrumentet. Antageligvis blir det enklere dersom måleproben blir designet og bygd slik at man har bedre kontroll med hvor den plasseres på fisken. Veien videre kan punktvist oppsummeres som følger:

- Involvere utstyrslleverandør. Viktig i denne fasen å få forankret problemstillingen hos en utstyrsp produsent, og få ivare tatt deres ønsker og behov i det videre utviklingsarbeidet.
- Studere hvordan fileteringstidspunkt påvirker målt restholdbarhet.
- Bygge inn effekt av ulike lagringsatmosfærer i modell for påvisning av restholdbarhet. Viktig å studere hvordan oksidering av heme-proteiner, som er en viktig ferskhetsindikator, påvirkes av lagringsatmosfære.
- Samordnet forsøk hvor spektroskopi modelleres mot forbrukerakseptans og restholdbarhet. Restholdbarhet bestemmes ut fra mikrobiologisk forringelse ved optimale lagringsbetingelser etter at spektroskopimåling er utført. Dette for å slippe å bruke modeller for mikrobiologisk vekst i referansen for spektroskopimålingene.
- Validering av utviklet metode for måling av restholdbarhet/forbrukeraksept.
- Tilpasse til andre fiskeslag, for eksempel laks.
- Kommersialisering av produkt.

## 7 Referanser

- Barnes, R.J., M.S. Dhanoa & S.J. Lister (1989). Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Appl. Spectrosc.*, **43**:5, pp. 772–777. Retrieved from <http://as.osa.org/abstract.cfm?URI=as-43-5-772>
- Carpenter, C.E. & E. Clark (1995). Evaluation of Methods Used in Meat Iron Analysis and Iron Content of Raw and Cooked Meats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**:7, pp. 1824–1827. doi:10.1021/jf00055a014
- Duflos, G., B. Le Fur, V. Mulak, P. Becel & P. Malle (2002). Comparison of methods of differentiating between fresh and frozen-thawed fish or fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**:12, pp. 1341–1345. doi:10.1002/jsfa.1195
- Gram, L. & H.H. Huss (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, **33**:1, pp. 121–137. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01134-8](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(96)01134-8).
- Hornsey, H.C. (1956). The colour of cooked cured pork. I.—Estimation of the Nitric oxide-Haem Pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **7**:8, pp. 534–540. doi:10.1002/jsfa.2740070804
- Huss, H.H. (1995). Quality and quality changes in fresh fish. FAO.
- Lin, S.-P., L. Wang, S.L. Jacques & F.K. Tittel (1997). Measurement of tissue optical properties by the use of oblique-incidence optical fiber reflectometry. *Appl. Opt.*, **36**:1, pp. 136–143. doi:10.1364/AO.36.000136
- Nilsen, H. & M. Esaiassen (2005). Predicting sensory score of cod (*Gadus morhua*) from visible spectroscopy. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **38**:1, pp. 95–99. doi:10.1016/j.lwt.2004.05.001
- Nilsen, H., M. Esaiassen, K. Heia & F. Sigernes (2002). Visible/Near-Infrared Spectroscopy: A New Tool for the Evaluation of Fish Freshness? *Journal of Food Science*, **67**:5, pp. 1821–1826. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08729.x
- Nixon, P.A. (1971). Temperature integration as a means of assessing storage conditions. Report on *Quality in Fish Products*, **3**, pp. 34–44). Seminar No. 3 Wellington, New Zealand.
- Olafsdottir, G. (2004). Multisensor for fish quality determination. *Trends in Food Science and Technology*, **15**:2, pp. 86–93. doi:10.1016/j.tifs.2003.08.006
- Olafsdottir, G., E. Martinsdottir, J. Oehlenschlager, P. Dalgaard, B. Jensen, I. Undeland, I. Mackie *et al.* (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, **8**:8, pp. 258–265. doi:10.1016/S0924-2244(97)01049-2
- Sivertsen, A.H., T. Kimiya & K. Heia (2011). Automatic freshness assessment of cod (*Gadus morhua*) fillets by Vis/Nir spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, **103**:3, pp. 317–323. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.10.030
- Takagi, K., H. Haneishi, N. Tsumura & Y. Miyake (2000). Alternative Oblique-Incidence Reflectometry for Measuring Tissue. *Optical Review*, **7**:2, pp. 164–169.
- Xia, J.J., E.P. Berg, J.W. Lee & G. Yao (2007). Characterizing beef muscles with optical scattering and absorption coefficients in VIS-NIR region. *Meat Science*, **75**:1, pp. 78–83. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.07.002>

