

Applicazione della Spettroscopia NIR nella determinazione della composizione chimica di filetti di tonno precotti decongelati

Ernestina Casiraghi, Marilisa Varani

DiSTAM, Sezione Tecnologie Alimentari, Università degli Studi di Milano, Via Celoria, 2 – 20133 Milano

Riassunto

La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) trova applicazione nell'analisi quantitativa e qualitativa di prodotti alimentari, consentendo un rapido controllo delle materie prime, indispensabile per garantire prodotti finiti di adeguata qualità.

Mediante uno spettrometro FT-NIR (NIRLab 200, BUCHI Labortecnick AG CH-9230 Flawil, Svizzera) sono stati determinati il contenuto in lipidi, proteine, residuo secco e ceneri in *loins* precotti decongelati di tonno (*Thunnus albacares* e *Euthynnus pelamis*), che costituiscono la materia prima per la produzione di conserve di tonno. Le analisi sono state condotte in riflettanza, in un intervallo compreso tra 4000 e 10000 cm^{-1} , e gli spettri acquisiti sono stati elaborati mediante software NIRCal 4.21. I 126 campioni analizzati, per un totale di 252 spettri, sono stati preparati macinando il materiale con un *mixer* di tipo domestico.

I campioni presentavano un contenuto di proteine del 25.8-30.6% (media=28.2%; ds=0.9), di lipidi del 0.2-13.4% (media=2.0%; ds=2.5), di residuo secco del 27.8-42.2% (media=31.7%; ds=2.5) e di ceneri del 0.8-1.9% (media=1.3%; ds=0.2). Le controanalisi sono state effettuate utilizzando metodi ufficiali.

La correlazione tra i dati chimici e gli spettri NIR è stata calcolata applicando il metodo PLS (Partial Least Square regression). I modelli ottenuti sono stati validati utilizzando un *set* indipendente di circa 40 campioni (un terzo del totale) e sono stati valutati attraverso i valori dell'errore standard della predizione (SEP) e del coefficiente di regressione lineare della calibrazione (r). SEP ed r sono risultati rispettivamente 0.19 e 0.998 per i lipidi, 0.40 e 0.886 per le proteine, 0.25 e 0.994 per il residuo secco e 0.10 e 0.952 per le ceneri. Per le stesse variabili, i coefficienti di variazione percentuale (SEP*100/media) risultano 9.4, 1.4, 0.8 e 7.7. La spettroscopia NIR può quindi essere utilizzata per una semplice e rapida determinazione delle caratteristiche compositive dei filetti di tonno decongelato.

Abstract

Near Infrared Spectroscopy finds application in quantitative and qualitative analysis of food products, allowing a rapid control of raw materials, a critical point in assuring product quality. An FT-NIR spectrometer (NIRLab 200, BUCHI Labortecnick AG CH-9230 Flawil, Switzerland) has been used to evaluate fat, protein, dry matter and ash content in thawed precooked tuna fish (*Thunnus albacares* and *Euthynnus pelamis*) loins, which are the raw materials for the production of canned tuna fish. NIR spectra were recorded in reflectance mode from 4000 to 10000 cm^{-1} interval and the chemiometric interpretation were performed using NIRCal 4.21 software.

126 samples were prepared grinding the material with a home mixer. Two spectra were recorded for each samples. The samples presented a protein content of 25.8-30.6 g/100g (mean = 28.2; standard deviation = 0.9), a fat content of 0.2-13.4 g/100g (mean= 2.0; sd = 2.5), a dry matter of 27.8-42.2 g/100g (mean = 31.7; sd = 2.5) and an ash content of 0.8-1.9

g/100g (mean= 1.3; sd = 0.2). Chemical composition was determined using official methods. The correlation between chemical data and NIR spectra was calculated using the PLS method (Partial Least Square regression). The chemiometric models were validated using an independent set of about 40 samples (a third of the total) and were evaluated using the standard error of prediction value (SEP) and the linear regression coefficient of the calibration (r). SEP and r were respectively 0.19 and 0.998 for fat, 0.40 and 0.886 for protein, 0.25 and 0.994 for dry matter and 0.10 and 0.952 for ashes. For the same variables, the variation coefficients (SEP*100/media) were 9.4, 1.4, 0.8 and 7.7. In conclusion, NIR spectroscopy can be used for a simple and rapid determination of chemical composition of thawed precooked tuna fillets.

Introduzione

Negli ultimi anni si è assistito alla diffusione dell'utilizzo della spettroscopia NIR, che trova applicazione in campo alimentare sia nella caratterizzazione delle materie prime da avviare alla trasformazione, sia nel monitoraggio del processo di produzione. In particolare, la spettroscopia NIR viene impiegata come tecnica rapida e non distruttiva nella determinazione quantitativa dei costituenti organici di molti alimenti.

Alcuni studi hanno avuto come oggetto la valutazione delle caratteristiche compositive di prodotti ittici di interesse commerciale quali salmone, aringhe, trote e halibut. In questi lavori i pesci sono stati analizzati sia interi, che in filetti, che macinati, sia allo stato fresco che decongelati (Lee et al., 1992; Nortvedt et al., 1998; Cozzolino et al., 2002; Solberg e Fredriksen, 2001). In letteratura non sono stati rilevati lavori riguardanti il tonno, che rappresenta il prodotto ittico più comunemente trasformato.

La pesca avviene solitamente nelle zone tropicali, dove i tonni vengono puliti, precotti e congelati. È infatti ormai pratica comune produrre le conserve di tonno all'olio o al naturale a partire da filetti precotti e decongelati.

Scopo di questo lavoro è l'applicazione della spettroscopia NIR nella caratterizzazione quantitativa (analisi centesimale) e qualitativa di filetti di tonno precotti decongelati.

Materiali e Metodi

Sono stati analizzati 126 campioni di filetti precotti e decongelati appartenenti alle specie *Thunnus albacares* (commercialmente noto come *Yellowfin*) e *Euthynnus pelamis* (noto come *Skipjack*), entrambe ammesse per la produzione di conserve di tonno. I filetti appartenevano a pesci di diversa pezzatura (S=3-10 kg, M=11-20 kg, L=21-40 kg) catturati nell'Oceano Indiano e nell'Est Pacifico. I campioni sono stati preparati prelevando da pani di circa 7 kg 300 g di filetto di tonno, che è stato poi macinato con un *mixer* di tipo domestico.

Le analisi chimiche di riferimento sono state condotte utilizzando il metodo Kjeldhal per le proteine (Nx6.25), il metodo Soxhlet per i lipidi, e i metodi gravimetrici per residuo secco e ceneri (AOAC, 1995).

Gli spettri NIR sono stati acquisiti utilizzando uno spettrometro FT-NIR (NIRLab 200, BUCHI Labortecnick AG CH-9230 Flawil, Svizzera) con una cella di misura MCS 100 munita di portacampione rotante. Piastre Petri in vetro sono state colmate con i filetti macinati e poste nell'alloggiamento della cella di misura. Per ogni piastra sono stati acquisiti 3 spettri (64 scansioni per spettro), dei quali si è utilizzato lo spettro medio; per ogni campione sono state preparate due piastre.

Le analisi sono state condotte in riflettanza; gli spettri sono stati registrati in un intervallo compreso tra 4000 e 10000 cm^{-1} con una risoluzione di 3.86 cm^{-1} ed sono stati elaborati mediante software chemiometrico NIRCal 4.21. Per ogni variabile le calibrazioni sono state

calcolate utilizzando due set indipendenti. Il primo, impiegato per la calibrazione, era costituito da circa due terzi degli spettri totali (*C-set*); il secondo, utilizzato per la validazione del modello, era formato dagli spettri rimanenti (*V-set*). Il numero ottimale di fattori, il tipo di pretrattamento da adottare e il range di numero d'onda delle calibrazioni sono stati determinati automaticamente dal software. Le calibrazioni quantitative sono state ottenute utilizzando il metodo PLS (Partial Least Square regression); le calibrazioni qualitative sono state calcolate utilizzando il metodo dei Cluster.

Risultati e Discussione

Allo scopo di sviluppare modelli chemiometrici in grado di predire il contenuto in lipidi, proteine, residuo secco e ceneri dei campioni di tonno, sono stati valutati 126 campioni, che sono stati sottoposti ad analisi chimica per determinarne la composizione (Tabella 1).

Tabella 1: composizione chimica dei campioni di filetti di tonno (min: valore minimo rilevato; max: valore massimo rilevato; ds: deviazione standard)

Costituenti	min (g/100g)	max (g/100g)	media (g/100g)	ds
Proteine	25.8	30.6	28.2	0.9
Lipidi	0.2	13.4	2.0	2.5
Residuo secco	27.8	42.2	31.7	2.5
Ceneri	0.8	1.9	1.3	0.2

I risultati ottenuti mostrano come il tenore in proteine presenti una modesta variabilità ($CV\%=3.1\%$), mentre il contenuto in lipidi è il parametro che varia maggiormente. La variabilità di questo costituente è dovuta ad un accumulo fisiologico di grassi nel pesce, legato al periodo di deposizione delle uova. Si può osservare che per i lipidi il valore della deviazione standard è superiore al valore medio rilevato ($CV\%>100\%$). Il basso valore della media è influenzato dalla distribuzione dei valori in quanto un numero elevato di campioni presentava un contenuto in lipidi inferiore a 2 g/100g. Il residuo secco presenta un *range* di valori relativamente esteso che riflette la variabilità del contenuto lipidico. Le ceneri presentano un coefficiente di variazione percentuale del 16%.

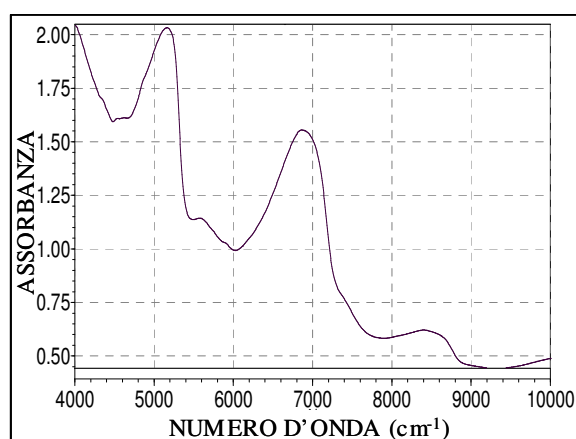


Figura 1: esempio di spettro FT-NIR di un campione di filetto di tonno precotto decongelato.

Dai dati chimici rilevati e dall'analisi dei campioni mediante spettrometro FT-NIR sono stati sviluppati dei modelli chemiometrici che permettessero di predire la composizione dei filetti utilizzando gli spettri NIR. La Figura 1 riporta a titolo di esempio lo spettro FT-NIR di un campione di filetto di tonno precotto decongelato.

Per ogni variabile è stata impostata una calibrazione e sono stati definiti un *set* di calibrazione (*C-set*, che include i valori estremi rilevati) e uno di validazione (*V-set*), indipendenti tra loro. Ogni modello è stato calcolato utilizzando il metodo PLS (Partial Least Square Regression). La Figura 2 mostra, oltre al numero di spettri considerati nel *C-set* e nel *V-set*, i pretrattamenti applicati, l'intervallo di numero d'onda e il numero di variabili latenti ottimali.

Tabella 2: parametri utilizzati per il calcolo delle calibrazioni.

Costituenti	spettri		Pretrattamenti	Intervallo ν^{-1} (cm ⁻¹)	Variabili Latenti
	<i>C-set</i>	<i>V-set</i>			
Proteine	163	81	derivata prima	4393-4801, 5392-6603, 7798-10000	13
Lipidi	164	82	smoothing + normalizzazione + derivata prima	4393-4801, 5392-6603, 7798-10000	7
Residuo secco	164	82	MSC	4998-10000	10
Ceneri	158	77	smoothing + normalizzazione + derivata prima	4393-4801, 5392-6603, 7798-10000	9

La Figura 2 mostra i grafici relativi alle rette di calibrazione per proteine, lipidi, residuo secco e ceneri. Nella Tabella 3 sono riportati i valori utilizzati per la valutazione delle calibrazioni. Sono stati presi in considerazione il coefficiente di regressione della retta di calibrazione (*r*) e l'errore standard della predizione (SEP).

Tabella 3: parametri per la valutazione delle calibrazioni.

Costituenti	<i>r</i>	SEP
Proteine	0.886	0.40
Lipidi	0.998	0.19
Residuo secco	0.994	0.25
Ceneri	0.952	0.10

I valori di *r* indicano che esiste una buona correlazione tra i dati chimici e gli spettri NIR, soprattutto per quanto riguarda residuo secco e lipidi. I valori di SEP appaiono più bassi dei valori riportati in letteratura per altri prodotti ittici. Lee et al. (1992) hanno valutato il contenuto di lipidi in trote intere utilizzando un *probe* a fibre ottiche e hanno osservato che a seconda della zona del pesce analizzata l'errore standard della predizione, calcolato con il metodo PLS e impiegando una *cross-validation*, era compreso tra 2.27 e 6.64 g/100g. Nortvedt et al. (1998) hanno osservato che nei filetti di halibut, prelevati in diverse zone muscolari, il SEP è compreso tra 3.2 e 10 g/kg per i lipidi, tra 4.4 e 15.2 g/kg per le proteine, tra 6.1 e 8.6 g/kg per l'estratto secco. Cozzolino et al. (2002) hanno utilizzato uno spettrometro NIR con monocromatore per analizzare porzioni muscolari macinate provenienti

da diverse specie ittiche. Gli Autori hanno rilevato errori standard della *cross-validation* di 8.01 g/kg per i lipidi, 3.86 g/kg per il contenuto in acqua e 3.51 g/kg per il contenuto in azoto volatile totale. Risultati simili da quelli da noi ottenuti sono riportati da Solberg e Fredriksen (2001). Questi Autori hanno calcolato una calibrazione per il contenuto lipidico (da 0 a 12%), rilevando un coefficiente di correlazione maggiore di 0.98 e un SEP inferiore a 0.25.

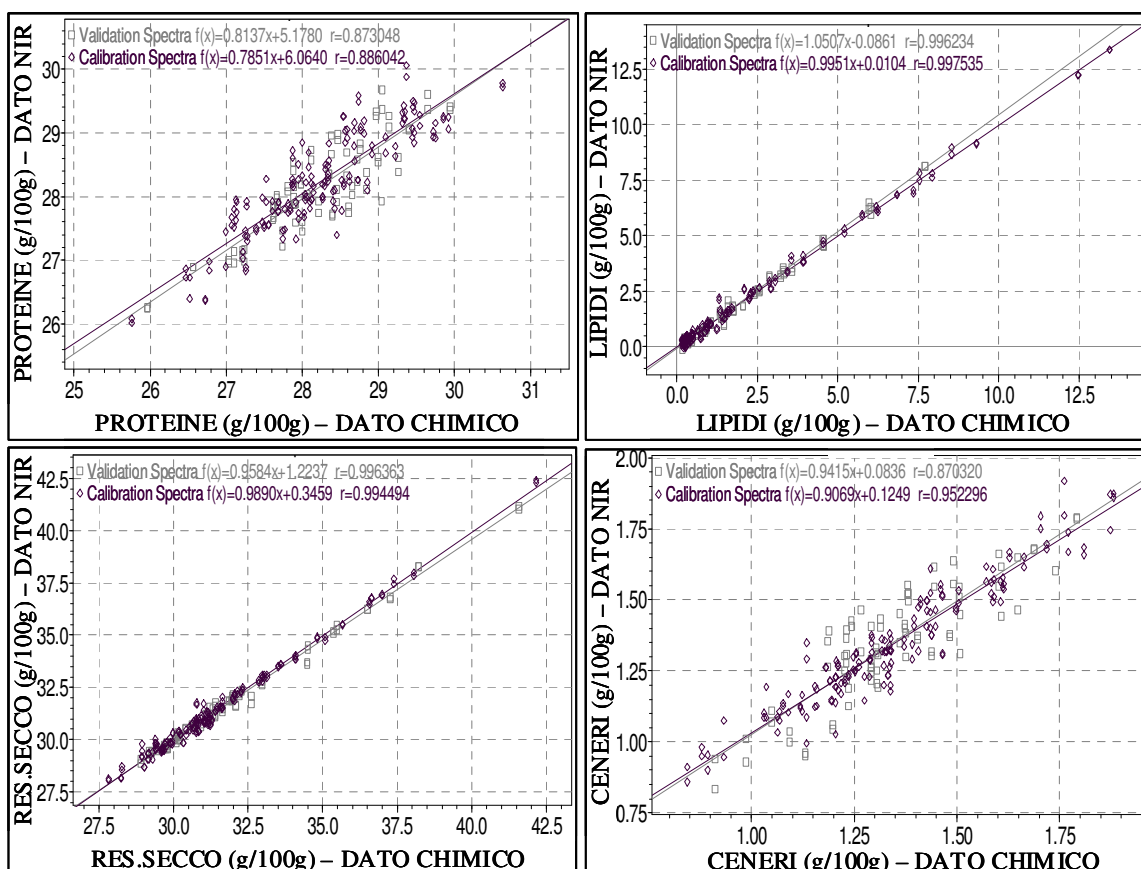


Figura 2: grafici delle rette di calibrazione.

Il calcolo del coefficiente di variazione percentuale applicato all'errore standard della predizione ($CVP\% = SEP * 100 / media$, dove per media si intende la media dei valori di riferimento) permette alcune considerazioni. Per le proteine e l'estratto secco $CVP\%$ è pari rispettivamente a 1.4% e 0.8%; la capacità predittiva del modello appare quindi per questi costituenti molto buona.

Per i lipidi il valore di $CVP\%$ appare elevato, essendo il dato medio di riferimento influenzato dalla distribuzione dei dati. Per meglio comprendere la precisione della calibrazione per il contenuto lipidico sono stati valutati 11 campioni di controllo. 6 campioni presentavano un contenuto in lipidi superiore al 2%: in questo caso le misure effettuate predicono il contenuto lipidico con un coefficiente di variazione ($CV\%$) inferiore al 5%. Si conclude che per i grassi la calibrazione fornisce risultati utili dal punto di vista pratico per distinguere tonni con un contenuto relativamente elevato di lipidi, mentre le basse concentrazioni di grassi vengono rilevate con un errore che può essere elevato. È infatti probabile che per valori vicini all'estremo inferiore della calibrazione si raggiunga il limite di rilevabilità dello strumento per i lipidi nel tonno.

Gli spettri acquisiti sono stati anche utilizzati per una valutazione qualitativa dei campioni, utilizzando il metodo dei Cluster. In particolare, si voleva verificare se fosse possibile distinguere i filetti in base alla specie di appartenenza, alla zona di pesca e alla pezzatura. Come si può osservare dalla Figura 3, che mostra i risultati che riguardano la provenienza e la specie, non è stato possibile individuare dei gruppi di campioni omogenei all'interno dei quali fosse possibile posizionare i campioni di filetti aventi caratteristiche simili.

In conclusione, la spettroscopia NIR può essere utilizzata per determinare il tenore in lipidi, proteine, residuo secco e ceneri nei filetti di tonno. Non è stato possibile, solo attraverso lo spettro NIR, stabilire le caratteristiche dei campioni in termini di specie, provenienza, pezzatura.

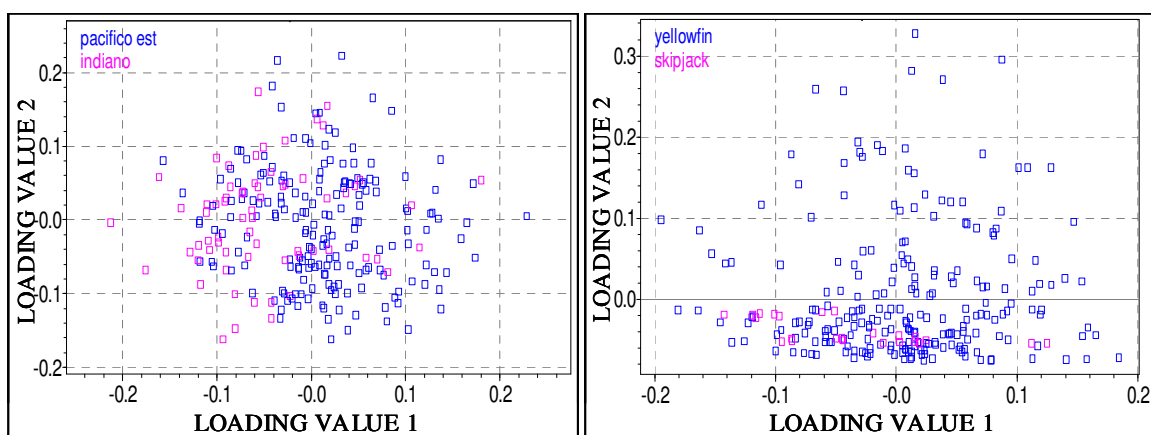


Figura 3: valutazione qualitativa dei filetti secondo la provenienza e la specie.

Bibliografia

C. Solberg, and G. Fredriksen. Analysis of fat and dry matter in capelin by near infrared transmission spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.* **9**, 221 (2001).

D. Cozzolino, I. Murray and J.R. Scaife. Near infrared reflectance spectroscopy in the prediction of chemical characteristics of minced raw fish. *Aquaculture Nutrition.* **8**, 1 (2002).

R. Nortvedt, O.J. Torrissen and S. Tuene. Application of near-infrared transmittance spectroscopy in the determination of fat, protein and dry matter in Atlantic halibut fillet. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* **42**, 199 (1998).

M. H. Lee, A.G. Cavinato, D.M. Mayes and B.A. Rasco. Noninvasive short-wavelength near-infrared spectroscopic method to estimate the crude lipid content in the muscle of intact rainbow trout. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2176 (1992).

AOAC International (1995), *Official methods of analysis of AOAC International*. Edited by Patricia Cunniff. - 16th ed. - Arlington, Virginia