

LA SPETTROSCOPIA NIR APPLICATA AL CONTROLLO QUALITÀ DEL CAVIALE: RISULTATI PRELIMINARI

Maurizio Grassi*, Stefania Barzagli **, Marina Buccheri*, Mario Pazzaglia***, Mauro Vasconi****, Tiziana M.P. Cattaneo*

* Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, CRA-IAA, Milan, Italy;

** Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, CRA-FLC, Lodi, Italy;

*** Agro Ittica Lombarda S.p.A., Viadana di Calvisano (BS), Italy;

**** Università degli Studi di Milano, Dip. Scienze Veterinarie per la salute, la produzione animale e la sicurezza alimentare (VESPA), Milano, Italy

Riassunto

Il presente lavoro si propone di applicare la spettroscopia NIR per la caratterizzazione del caviale grazie anche alla disponibilità di strumentazione miniaturizzata e portatile, potenzialmente utilizzabile anche in azienda nel controllo di processo e di prodotto. A questo scopo, tre serie di 19 campioni di caviale, ottenuti da tre differenti pesci della specie *Acipenser transmontanus*, sono state analizzate utilizzando uno spettrometro microNIR (Diessechem). Gli spettri sono stati raccolti nell'intervallo da 900 a 1600 nm (200 scansioni; 128 punti). In parallelo è stato determinato il contenuto in umidità, lipidi e proteine con metodi di riferimento. I dati sono stati elaborati mediante PLSR dopo pretrattamento SNV e Mean Center, utilizzando PLSToolbox (Eingenvector) e le pre-calibrazioni (LV = 5) sono state verificate in cross-validazione. La capacità discriminante della tecnica al fine di identificare la provenienza dal singolo pesce è stata valutata mediante PCA ad un livello di confidenza del 95%.

I parametri statistici associati alle determinazioni quantitative hanno fornito risultati promettenti con valori di RMSECV e di R^2CV rispettivamente di 0,46 e 0,892 (umidità SEL 0,25); 0,51 e 0,845 (proteine SEL 0,42); 0,78 e 0,606 (lipidi SEL 0,51). Il potere discriminante intraspecie della tecnica ha permesso inoltre di identificare correttamente il pesce di provenienza. Questa prima indagine fa parte di un progetto più ampio che prevede lo studio di campioni di caviale ottenuti da differenti specie raccolti nell'arco di 18 mesi di produzione.

Introduzione

La storionicoltura lombarda oggi è prevalentemente orientata alla produzione del caviale e in questo campo ha raggiunto la condizione di leadership produttiva mondiale. Il caviale è un prodotto alimentare che nella sua preparazione appare estremamente semplice, essendo costituito da uova di storione e sale. La sua qualità dipende, oltre che dal perfetto dosaggio degli ingredienti, dal lungo ciclo di allevamento dello storione (circa 10-13 anni) e dall'esatta tempistica dell'estrazione. Da qui l'esigenza dell'industria di essere e rimanere competitiva, offrendo al mercato un prodotto di qualità il più possibile costante, privo di difetti, ben caratterizzato dal punto di vista sensoriale e supportato

da informazioni documentate e verificabili ottenute con metodi di indagine affidabili [1-3] ed a costi contenuti, dato l'elevato valore commerciale delle materie prime.

È necessario infatti definire rigorosamente i parametri qualitativi ed i metodi per misurarli, avviando il miglioramento sperimentale del prodotto e lo sviluppo del linguaggio più idoneo alla sua caratterizzazione e descrizione.

In particolare è fondamentale lo sviluppo di un sistema di analisi dedicato ai prodotti ittici e specializzato per il caviale. In questo ambito appare molto promettente l'utilizzo della spettrometria nel vicino infrarosso (NIR),[4-5] non solo per l'analisi qualitativa del prodotto finale, ma anche come innovativo strumento di controllo lungo la linea produttiva.

Negli ultimi anni, la spettrometria NIR è stata soggetto di un'evoluzione tecnica impressionante, con la creazione di apparecchi sufficientemente affidabili, ma estremamente compatti, in grado di operare nell'ambiente produttivo con tempi rapidissimi di risposta.[6-7] La difficoltà maggiore nell'applicazione di questo approccio sta nell'esigenza di definire adeguate curve di calibrazione mediante numerose analisi chimiche ottenute con metodi convenzionali e un sistema complesso di analisi statistiche. Una volta implementato questo approccio, è possibile migliorarlo nel tempo attraverso ulteriori calibrazioni, contribuendo al processo di miglioramento continuo del prodotto. Si tratta di settore innovativo per l'applicazione della tecnica, non ancora utilizzata a questo scopo soprattutto in ambito industriale.

Questa ricerca si inserisce in un contesto progettuale più ampio, di cui si riportano i risultati preliminari.

Materiali e Metodi

Tre serie di 19 campioni di caviale, ottenuti da tre differenti pesci della specie *Acipenser transmontanus*, sono state analizzate utilizzando uno spettrometro MicroNIR 1700 (Diessechem S.r.l., Italia – Fig. 1).



Figura 1 – MicroNIR 1700 (Diessechem S.r.l., Italia)

Gli spettri (Figura 2) sono stati raccolti nell'intervallo da 900 a 1700 nm (200 scansioni; 128 punti). In parallelo è stata determinata la composizione chimico-centesimale dei campioni di caviale. Il contenuto in umidità è stato determinato tramite disidratazione del campione a 105°C fino a peso costante e il contenuto in proteine grezze mediante titolazione del contenuto di azoto secondo Kjeldahl (A.O.A.C, 1990) [8]. I lipidi sono stati estratti e quantificati utilizzando il metodo di Folch (1957)[9]. Tutte le analisi sono state eseguite in duplicato.

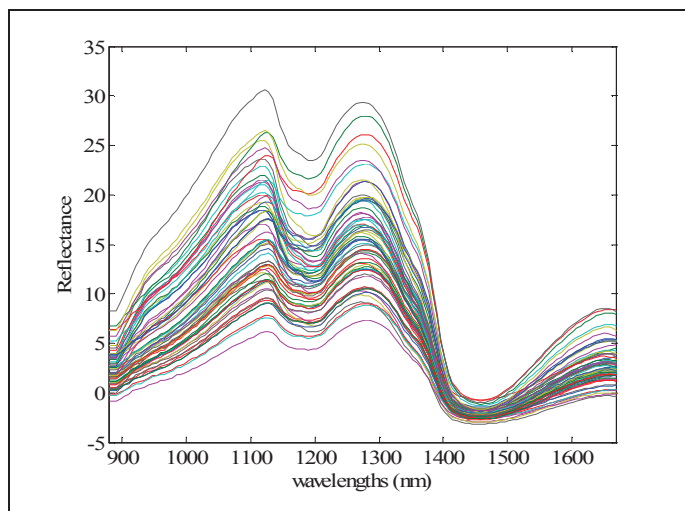


Figura 2 – Esempi di spettri raccolti con microNIR1700 di campioni di caviale.

I dati sono stati elaborati mediante PLSR dopo pretrattamento SNV e Mean Center, utilizzando PLSToolbox (Eingenvector) e le pre-calibrazioni sono state verificate in cross-validazione (venetian blinds w/ 4 splits). In particolare le regressioni sono state ottenute utilizzando un numero di variabili latenti (LV) di 4 per il contenuto in proteine e pari a LV = 5 per grasso e umidità.

L'analisi PCA è stata applicata, ad un livello di confidenza del 95%, per la verifica della capacità discriminante della tecnica al fine di identificare la provenienza dal singolo pesce.

Sono stati calcolati i principali parametri statistici associati alle curve di calibrazione e di cross-calibrazione, tenendo conto anche dell'errore standard di laboratorio (SEL), associato ai metodi di riferimento utilizzati.

Risultati e Discussione

Analisi quantitativa

Gli intervalli di variabilità dei costituenti principali dei campioni analizzati sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1- Intervalli di concentrazione dei principali costituenti la matrice

Costituenti	min	max	media
Umidità (%)	52.10	58.53	55.46
Proteine (%)	22.48	27.06	24.75
Grasso (%)	13.64	18.46	16.41

Si evidenzia come la composizione possa variare per singolo costituente di circa 5 punti percentuali, all'interno della stessa specie. L'intervallo di variabilità viene considerato sufficiente alla predisposizione di curve di calibrazione utili ad una verifica di fattibilità.

In Figura 3 si riporta, a titolo di esempio, lo score plot relativo all'analisi PLSR applicata per la costruzione delle curve di calibrazione e cross-validazione per il contenuto di umidità.

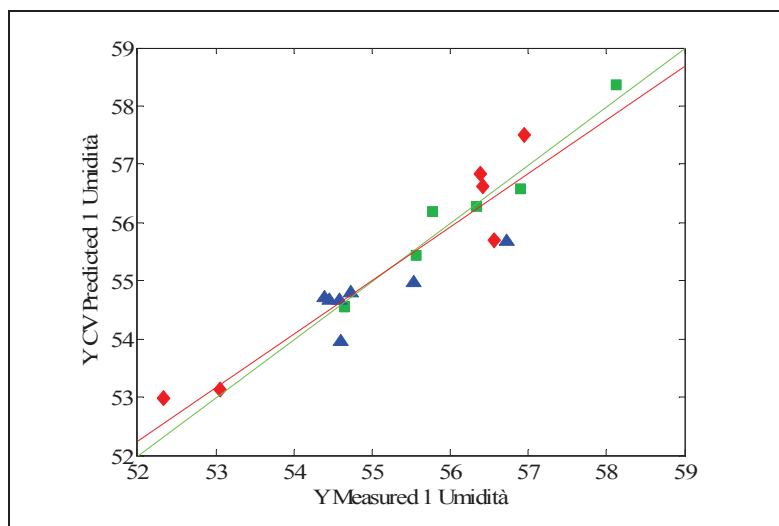


Figura 3 – Scoreplot di calibrazione e cross-validazione (PLSR) – contenuto di umidità %: campioni di caviale ottenuti da tre pesci della stessa specie (3 diversi colori nello score plot).

I valori dei parametri statistici delle rispettive curve di cross-validazione, relativi ai tre costituenti analizzati, sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2- Parametri statistici

Cross-validazione (PLSR)	R^2_{cv}	LV	RMSECV	CV Bias	SEL
Umidità (%)	0.893	5	0.463	-0.025	0.25
Proteine (%)	0.845	4	0.515	-0.089	0.42
Grasso (%)	0.606	5	0.797	-0.001	0.51

In tutti i casi, i parametri statistici associati alle determinazioni quantitative hanno fornito risultati promettenti, pur considerando il valore non ancora completamente soddisfacente del coefficiente di determinazione calcolato per il tenore in grasso. Oltre al limitato numero di campioni, possono aver inciso sul valore di questo indice alcuni fattori legati ad effetti di scattering, non ancora corretti, e ascrivibili al posizionamento dello strumento. Importante peraltro sottolineare come gli errori in cross-validazione (RMSECV) risultino già accettabili rispetto ai valori dell'errore analitico di laboratorio (SEL), che si assestano su valori inferiori a $2 \times \text{SEL}$.

Passando ad analizzare le variabili maggiormente determinanti (VIP) per la performance delle curve PLSR, si può notare l'influenza di alcune lunghezze d'onda, ascrivibili a vibrazioni di legame di gruppi presenti nei diversi costituenti, come evidenziato in Figura 4.

In particolare, si evidenziano:

- OH overtone (1380 - 1430 nm) - acqua
- CH stretching, secondo overtone (1130 – 1170 nm)
- OH banda di combinazione (1210 – 1240).

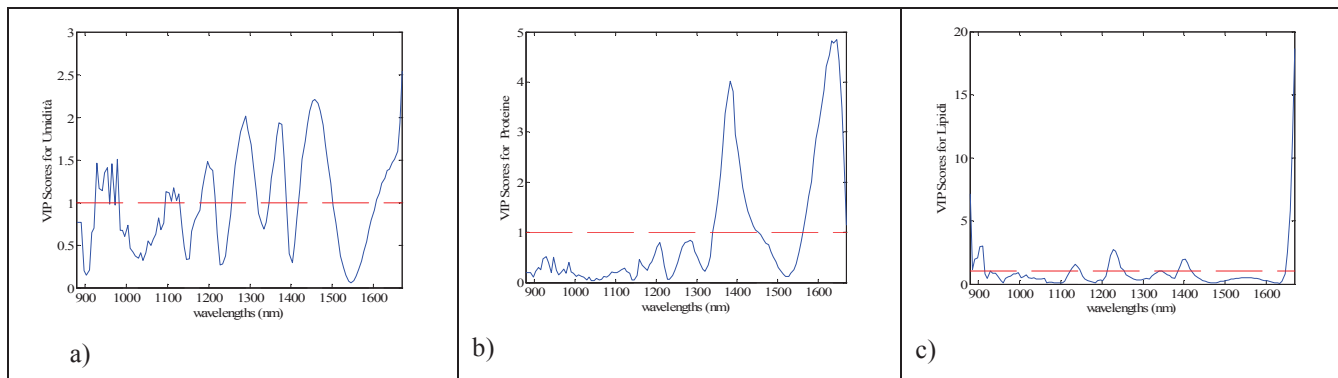


Figura 4 – VIP scores: a) umidità %; b) proteine %; c) grasso %.

Analisi PCA

I risultati relativi all'applicazione dell'analisi PCA per la verifica della capacità discriminante della tecnica al fine di identificare la provenienza dal singolo pesce sono mostrati in Figura 5.

Dallo score plot costruito utilizzando PC5 vs PC2, si evidenzia come, ad un livello di confidenza del 95%, sia possibile discriminare in modo praticamente univoco tra i campioni di caviale ottenuti da tre diversi pesci della stessa specie, che occupano zone del piano ben distinte. Questo risultato preliminare offre spunti interessanti in vista della possibilità di tracciare in modo certo la storia del prodotto.

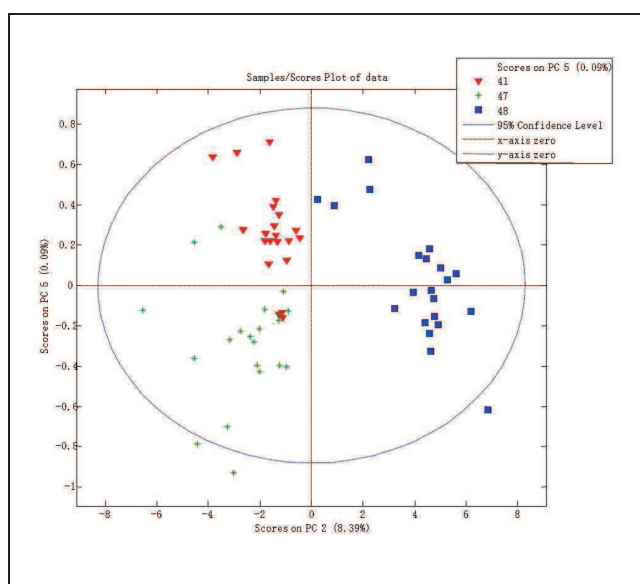


Figura 5 – Score plot PC5 vs PC2: identificazione del pesce di provenienza.

Conclusioni

I risultati ottenuti nel corso di questa prima sperimentazione hanno fornito risultati promettenti a supporto della validità dell'approccio utilizzato e della rispondenza di strumentazione portatile alle

esigenze aziendali, fornendo informazioni utili per la finalizzazione dell'impiego della spettroscopia NIR sia per il controllo puntuale delle caratteristiche di composizione di prodotto sia a scopi identificativi qualitativi.

Ringraziamenti

La ricerca è stata realizzata nell'ambito delle attività scientifiche del progetto finanziato da Regione Lombardia, Misura 124, PSR 2007-2013, coordinato da Agro Ittica Lombarda S.p.A., Viadana di Calvisano (BS), Italy.

Si ringrazia lo staff aziendale per la collaborazione.

Bibliografia e webgrafia

- [1] Wirth, M., Kirschbaum, F., Gessner, J., Krüger, A., Patriche, N., Billard, R.. (2000) Chemical and biochemical composition of caviar from different sturgeon species and origins. *Food / Nahrung*, 44 (4) 233-237.
- [2] Gessner, J., Wirth, M., Kirschbaum, F., Krüger, A., Patriche, N.. (2002). Caviar composition in wild and cultured sturgeons – impact of food sources on fatty acid composition and contaminant load. *Journal of Applied Ichthyology*, 18 (4-6) 665-672.
- [3] Gessner, J., Würtz, S., Kirschbaum, F., Wirth, M.. (2008) Biochemical composition of caviar as a tool to discriminate between aquaculture and wild origin. *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 52-56.
- [4] Sangiorgi E., Piro R.. (2013) Problems and solutions in the accreditation of a FT-NIR method for food composition. *NIR2013 Proceedings, 2-7 June, La Grande Motte, France, Bellon Maurel V., Williams P., Downey G. Eds.*, pp. 704-707.
- [5] van der Merwe S., Manley M., Wicht M.. (2013) Application of near infrared spectroscopy and chemometrics for the analysis of concentrated fish oils with limited concentration ranges in the nutraceutical industry. *NIR2013 Proceedings, 2-7 June, La Grande Motte, France, Bellon Maurel V., Williams P., Downey G. Eds.*, pp. 708-712.
- [6] Vejgaard L., Sørensen M., Larsen A.. (2013) Online FTNIR analysis of salt in processed cheese production. *NIR2013 Proceedings, 2-7 June, La Grande Motte, France, Bellon Maurel V., Williams P., Downey G. Eds.*, pp. 64-67.
- [7] Fernández Novales J., Garrido-Novell C., De Pedro-Sanz E.J., Guerrero J.E., Garrido-Varo A., Pérez-Marín D.C.. (2013) Feasibility study of a portable NIRS instrument to predict salt content during the Iberian ham salting process. *NIR2013 Proceedings, 2-7 June, La Grande Motte, France, Bellon Maurel V., Williams P., Downey G. Eds.*, pp 92-93.
- [8] AOAC 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th edition. Association Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia.
- [9] Folch, J., Less M., Stone Stanley G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-508.