

Wykorzystanie NIRS w krajowej hodowli trzody chlewnej – szybka i nieinwazyjna metoda analizy tłuszczu śródmięśniowego w mięsie wieprzowym

Wojciech Wróblewski , Robert Gąsior 

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Analityki Laboratoryjnej –
Centralne Laboratorium, ul. Krakowska 1, 32-083 Balice k. Krakowa;
robert.gasior@iz.edu.pl (corresponding author)*

Oznaczenie zawartości tłuszczu śródmięśniowego jest jednym z podstawowych parametrów określających mięso – ważnym dla konsumentów (Wood i in., 2008), ale również dla przemysłu mięsnego. Dotychczasowe metody analityczne są czasochłonne i kosztowne, co ogranicza liczbę analizowanych próbek. Wraz z rozwojem elektroniki i informatyki powstały nowe, alternatywne, szybkie i tanie metody analityczne. Idealną metodą może być spektroskopia w bliskiej podczerwieni (NIRS), która już od wielu lat jest stosowana do analiz, między innymi pasz i mleka. NIRS jest to metoda analityczna, w której widmo badanej próbki jest porównywane z bazą złożoną z setek lub nawet tysięcy próbek, dla których wykonano wcześniej analizy referencyjne. W ten sposób opracowana jest kalibracja analizatora NIR, na podstawie której wykonuje się predykcję wyników dotyczących analizowanych parametrów. Spektroskopia w bliskiej podczerwieni to szybka, bezinwazyjna i nie niszcząca próbek metoda analityczna, w której nie powstają żadne odpady (takie jak pozostałości poekstrakcyjne czy uwalnianie do atmosfery ropopochodnych ekstrahentów przy oznaczaniu tłuszczu), co czyni ją też metodą ekologiczną, zaliczaną do tzw. „zielonej chemii” (EPA U.S. Environmental Protection Agency, 2022). Od 2007 r. metoda NIRS do oznaczania zawartości w mięsie: tłuszczu, wilgotności oraz białka wy-

stępuje jako procedura AOAC Official Method 2007.04. W metodzie tej stosuje się spektrometr FOSS FoodScan. Jest to urządzenie wykorzystujące technikę NIR transmisyjną, w której wiązka promieniowania przechodzi przez próbkę i jest następnie analizowana. Z kolei, analizator FOSS InfraXact 7500, który jest w posiadaniu Instytutu Zootechniki, jest urządzeniem NIR odbiciowym, dokonującym analizy odbitej od próbki wiązki promieniowania elektromagnetycznego i co do zasady przeznaczonym do analizy pasz. Wielu badaczy podjęło zakończone sukcesem próby wykorzystania różnych aparatów odbiciowych NIR do analizy mięsa (Prevolnik i in., 2004; Prieto i in., 2009; Alomar i in., 2003), w tym wieprzowego (Savenije i in., 2006; Zamora-Rojas i in., 2011; Bonin i in., 2020). Centralne Laboratorium Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego (IZ PIB) też podjęło próbę poszerzenia możliwości analitycznych posiadanego aparatu o analizy mięsa. Ze względu na charakterystykę metody – brak ścisłej zależności między badanym parametrem a punktami charakterystycznymi w widmach – obserwuje się w widmach liczne nadtony i ich kombinacje, zależne od analizowanego parametru i rodzaju matrycy (Burns i Ciurczak, 2008). Sprawia to, że do interpretacji widm (na podstawie bazy kalibracyjnej) konieczne jest zastosowanie zaawansowanych matematycznych modeli predykcyjnych opartych na chemometrii.

Wykorzystanie techniki NIRS ma niebagatelne znaczenie praktyczne. Opracowana przez Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy kalibracja pozwala na oznaczanie tłuszczu śródmięśniowego w schabie i może być wykorzystana w rutynowych badaniach na rzecz oceny jakości mięsa w programie kontroli użytkowości rzeźnej trzody chlewnej. Powinna ona być kalibracją odporną, która odzwierciedla naturalną zmienność próbek pochodzących od różnych ras świń hodowanych w różnych okresach roku na przestrzeni wielu lat.

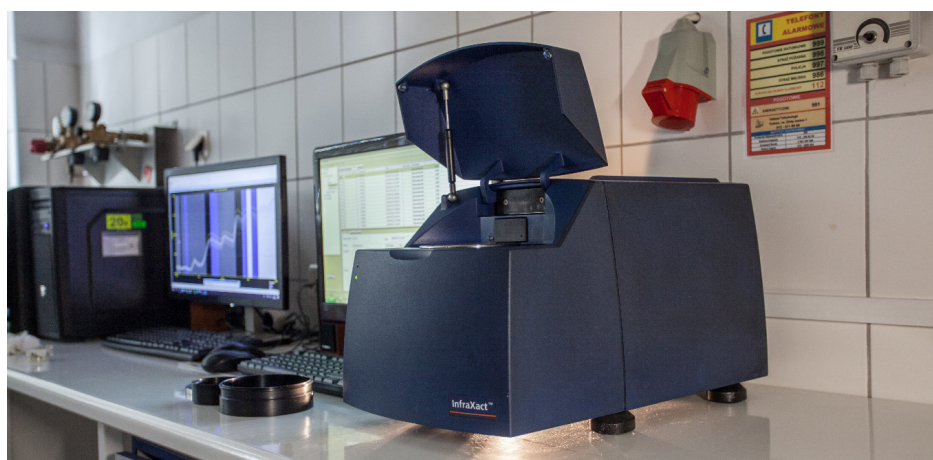
Celem pracy było opracowanie i wdrożenie metody NIRS oznaczania tłuszczu śródmięśniowego na potrzeby oceny jakości mięsa świń prowadzonej w Stacjach Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTCh).

Materiały i metody

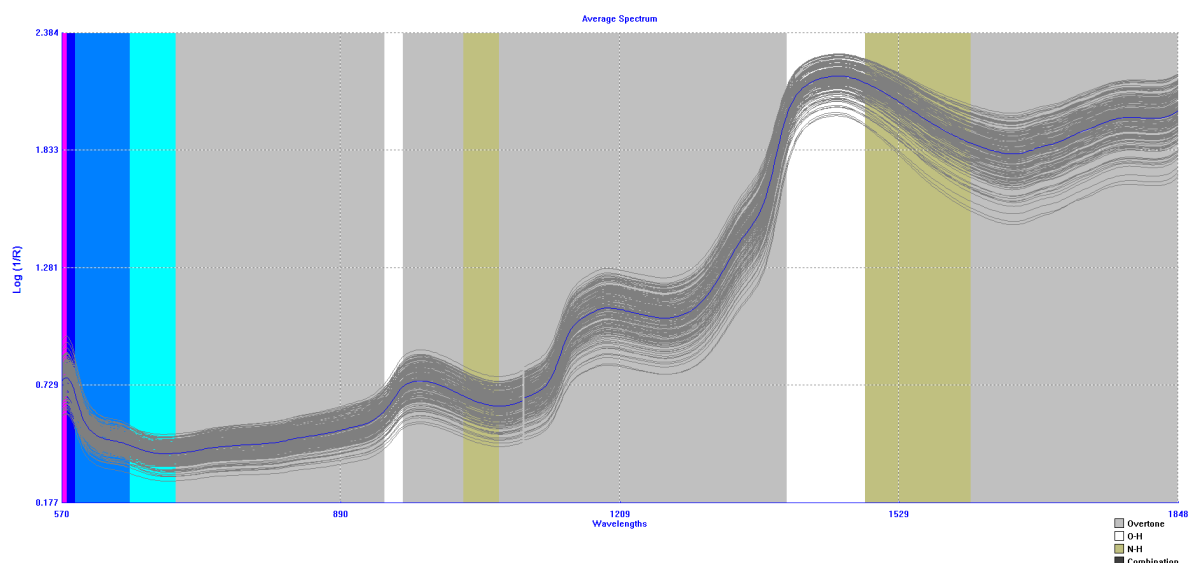
Kalibrację opracowano w Centralnym Laboratorium Działu Analityki Laboratoryjnej IZ PIB, które posiada wdrożony system jakości według normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02 w ramach zadania 17-1.70.9 pt. „Analiza zawartości tłuszczu śródmięśniowego metodą NIRS”. Jako referencyjną w stosunku do metody NIRS wykorzystano akredytowaną w Polskim Centrum Akredytacji metodę oznaczania tłuszczu w mięsach i produktach mięsnych według PN-ISO

1444:2000. W celu określenia podstawowych parametrów kalibracji wykonano walidację krzyżową na zewnętrznych zbiorach próbek walidacyjnych PN-EN ISO 12099:2017-10.

Do wykonania kalibracji na oznaczenie zawartości tłuszczu śródmięśniowego wykorzystano próbki mięśni wieprzowych (schab) pozyskane w ciągu dwóch lat w Stacjach Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej – Zakład Doświadczalny IZ PIB Pawłowice oraz Zakład Doświadczalny IZ PIB Chorzelów sp. z o.o. Mięso pozyskano od świń ras: pbz (polska biała zwiśloucha), wbp (wielka biała polska) i puławskiej. Zwierzęta ubito w przedziale 100–120 kg masy ciała. Do czasu wykonania analiz mięso przechowywano zamrożone w temperaturze $<-20^{\circ}\text{C}$. Próbki homogenizowano przy użyciu rozdrabniacza Philips HR1674/90. Widma w bliskiej podczerwieni (widma NIR) próbek mięsa uzyskano przy użyciu spektrometru odbiciowego Foss InfraXact 7500 (fot. 1 i ryc. 1) o zakresie pracy 570–1848 nm z interwałem skanowania co 2 nm. Analizy NIR wykonywano przy użyciu oprogramowania Foss ISIScan ver. 4.6. Każdą z próbek mięsa skanowano trzykrotnie w kuwetach o średnicy 6,5 cm. Kalibracje opracowano za pomocą oprogramowania Foss WinISI ver. 4.10. Analizę referencyjną na zawartość tłuszczu wolnego wykonano według metody PN-ISO 1444:2000.



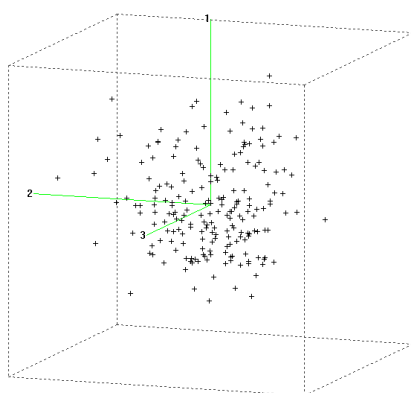
Fot. 1. Aparat FOSS InfraXact 7500 (fot. K. Wojtycza)
Photo 1. FOSS InfraXact 7500 apparatus



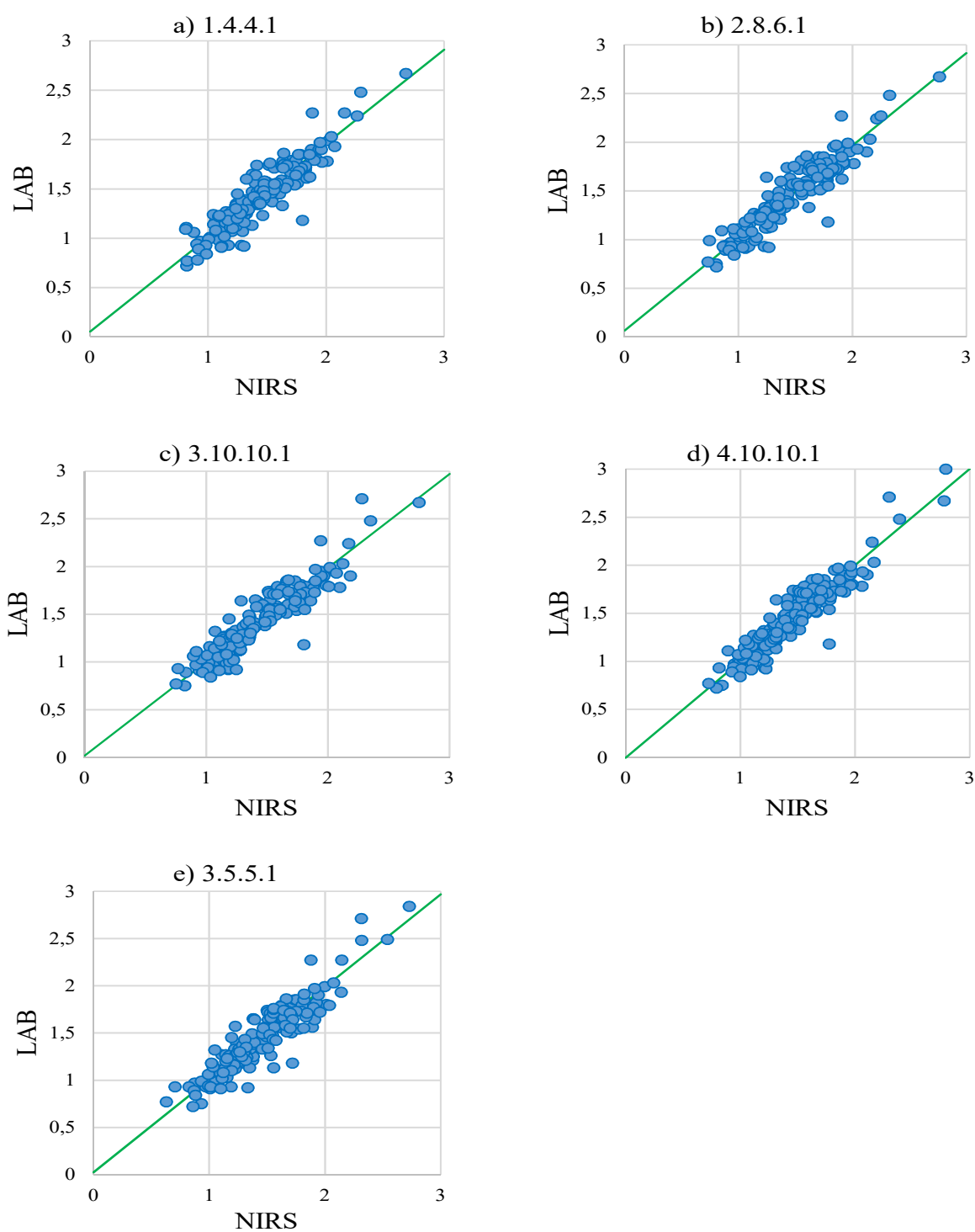
Ryc. 1. Widma NIR próbek schabów
 Fig. 1. NIR spectra of pork loin samples

Do wykonania kalibracji użyto 246 próbek schabu. Wyjściowy zbiór próbek podzielono pseudolosowo (generator liczb pseudolosowych w MS Excel) na zbiory testowe (walidacyjne). Dla każdego zbioru walidacyjnego utworzono po jednym zbiorze uczącym (kalibracyjnym) takim, by nie zawierał próbek z danego zbioru walidacyjnego. Każdy ze zbiorów kalibracyjnych

ustalono metodą analizy głównych składowych (PCA) przy ustawieniach programu WinISI: 1.4.4.1, 2.8.6.1, 3.10.10.1, 4.10.10.1 oraz 3.5.5.1, gdzie pierwsza liczba to wartość pochodnej, druga to odstęp, przez który obliczana jest pochodna (wyrażona w punktach danych), trzecia to liczba punktów danych podlegających wygładzaniu, a czwarta oznacza drugie wygładzanie.



Ryc. 2. Wizualizacja trójwymiarowej przestrzeni ukazująca globalne odległości Mahalanobisa GH w programie WinISI (dla ustawień 4.10.10.1)
 Fig. 2. Three-dimensional visualization showing global Mahalanobis GH distances in WinISI (for settings 4.10.10.1)



Ryc. 3 Zależności między wartościami przewidywanymi przez NIRS a wartościami LAB zmierzonymi referencyjną metodą analizy tłuszczu śródmięśniowego dla wszystkich zestawów walidacyjnych w wariantach:

a) 1.4.4.1, b) 2.8.6.1, c) 3.10.10.1, d) 4.10.10.1, e) 3.5.5.1

Fig. 3. Relationships between predicted NIRS values and LAB values measured with the reference method of intramuscular fat analysis for all validation sets in variants:

a) 1.4.4.1, b) 2.8.6.1, c) 3.10.10.1, d) 4.10.10.1, e) 3.5.5.1

Wykres obrazujący rozmieszczenie próbek i globalne odległości Mahalanobisa „global-H” (GH) w przestrzeni trójwymiarowej przedstawiono na ryc. 2. GH to odległość danej próbki od centrum populacji. Odrzucono próbki, dla których globalna odległość Mahalanobisa przekraczała wartość 3,5 (Saha i in., 2017). Zbiory kalibracyjne, pozbawione uprzednio próbek odrzuconych, użyto następnie do utworzenia kalibracji przy ustawieniach programu WinISI: 1.4.4.1, 2.8.6.1, 3.10.10.1, 4.10.10.1 oraz 3.5.5.1, stosując zmodyfikowaną metodę cząstkowych najmniejszych kwadratów (MPLS), a także transformację opartą na normalizacji widm wraz z korektą linii bazowych. Powstałe kalibracje sprawdzono na przypisanych 7 zbiorach walidacyjnych. W kolejnym etapie ze zbiorów walidacyjnych odrzucono próbki, dla których GH przekraczała wartość 3,0, a także te, dla których „neighborhood-H” (NH), oznaczająca odległość próbki do najbliższego

sąsiada, przekraczała wartość 0,6. W ten sposób usunięto ze zbiorów walidacyjnych próbki skrajnie odbiegające od bazy kalibracyjnej (po odrzuceniu pozostało 200 próbek). Obliczono w postaci średnich wartości (z 7 zbiorów walidacyjnych): $\overline{R^2}$ (średni współczynnik determinacji oraz \overline{SEPC} (średni standardowy błąd przewidywania skorygowany o obciążenie (bias), gdzie $SEPC$ to S_{SEP} wg PN-EN ISO 12099:2017-10. Wyliczono również takie parametry kalibracji (N=200), jak: zakres oznaczanych zawartości tłuszczu (MIN, MAX, SREDNIA) i odchylenie standardowe (SD) z zakresu danych z analizy referencyjnej w zbiorze kalibracyjnym, standardowy błąd kalibracji (SEC), standardowy błąd walidacji krzyżowej (SECV), \overline{SEPC} i \overline{SEPC} % (względny %) oraz oszacowano jakość kalibracji za pomocą parametru $SD/SEPC$, który jest analogiczny do parametru RPD podanego przez Rushinga i Saha (Rushing i in., 2016; Saha i in., 2017).

Tabela 1. Uśrednione wartości parametrów (n=7) walidacji kalibracji na podstawie próbek zewnętrznych przy różnych ustawieniach programu WinISI

Table 1. Average parameter values (n=7) of calibration validation based on external samples, with different WinISI settings

Ustawienia WinISI – <i>WinISI settings</i>		
1.4.4.1	0,849	0,134
2.8.6.1	0,865	0,134
3.10.10.1	0,844	0,143
4.10.10.1	0,873	0,134
3.5.5.1	0,830	0,157

Wyniki i ich omówienie

Przy wyborze kalibracji do oznaczeń rutynowych zawartości tłuszczu w schabie kierowano się lepiej oddającymi rzeczywistość kryteriami dotyczącymi walidacji na podstawie zestawów próbek zewnętrznych, tzn. znajdujących się poza bazą kalibracyjną. Wybrano kalibrację, dla której \overline{SEPC} jest najniższa a $\overline{R^2}$ najwyższa (tab. 1). Uzyskane kalibracje dla każdego z wariantów ustawień programu WinISI: 1.4.4.1, 2.8.6.1, 3.10.10.1, 4.10.10.1, 3.5.5.1

przedstawiono na wykresach: ryc. 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, odpowiednio.

Krzywa kalibracji charakteryzowała się dobrymi parametrami, przy jednocześnie dużej liczbie próbek w zbiorze kalibracyjnym (tab. 2), co czyni opracowaną kalibrację jeszcze bardziej wiarygodną. Parametr szacujący jakość modelu kalibracyjnego RPD, bliski wartości wynoszącej 3, należy uznać za wystarczająco dobry. W badaniach Rushinga (Rushing i in., 2016) wartości tego parametru waha-

ły się od 2,45 do 3,45. Parametry sporządzonej kalibracji podano w tabeli 2. Standardowy błąd przewidywania skorygowany o bias jest praktycznym i możliwie najbardziej realnym wskaźnikiem odchyień otrzymywanych wyników od wartości referencyjnych uznanych jako najbliższe rzeczy-

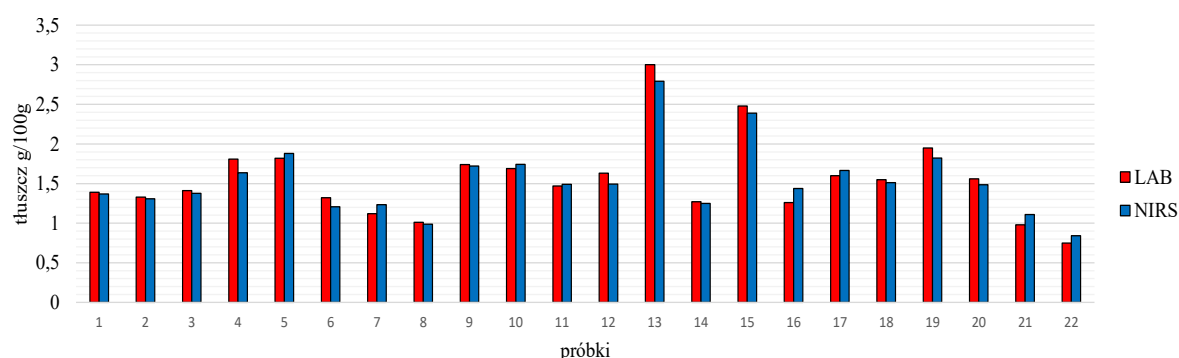
wistym. Obejmuje on składowe niepewności związane między innymi z czynnikiem odtwarzalności (próbki są analizowane w szerokim, wieloletnim przedziale czasowym) oraz zmienności indywidualnej oznaczanych próbek (dotyczą wielu próbek pochodzących od różnych ras świń).

Tabela 2. Zestawienie parametrów kalibracji NIRS, N = 200
Table 2. Summary of NIRS calibration parameters, N = 200

Zakres danych (tłuszcz, g/100 g) Data range (fat, g/100 g)				SEC	SECV	\overline{SEPC}	$\overline{SEPC}\%$	RPD
MIN	MAX	ŚREDNIA MEAN	SD					
0,720	3,120	1,480	0,416	0,125	0,150	0,134	9,05	3,104

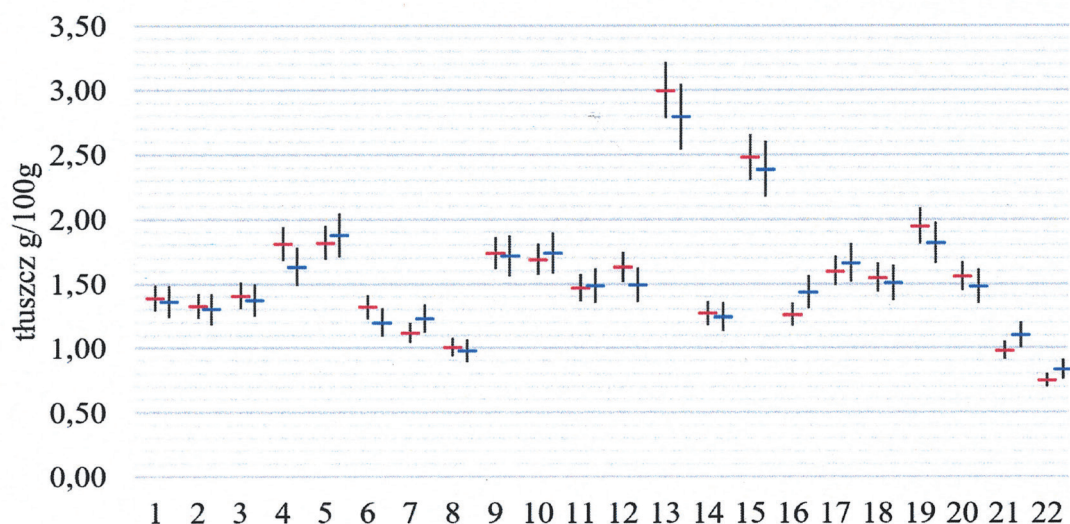
- N – ilość próbek w kalibracji
SD – odchylenie standardowe z zakresu danych z analizy referencyjnej w zbiorze kalibracyjnym
SEC – standardowy błąd kalibracji
SECV – standardowy błąd walidacji krzyżowej
 \overline{SEPC} – średni standardowy błąd przewidywania skorygowany o bias
 $\overline{SEPC}\%$ – \overline{SEPC} wyrażony jako względny %
RPD – stosunek standardowego odchylenia z zakresu danych z analizy referencyjnej w zbiorze kalibracyjnym do \overline{SEPC}

- N – number of samples in calibration
SD – standard deviation of the data range from the reference analysis in the calibration set
SEC – standard error of calibration
SECV – standard error of cross-validation
 \overline{SEPC} – Average standard error of prediction adjusted for bias
 $\overline{SEPC}\%$ – \overline{SEPC} expressed as relative %
RPD – ratio of the standard deviation of the data range from the reference analysis in the calibration set to \overline{SEPC}



próbki – samples; tłuszcz – fat

Ryc. 4. Wykres słupkowy wyników referencyjnych (kolor czerwony) i predykcji NIRS (kolor niebieski)
Fig. 4. Bar graph of reference results (red) and NIRS predictions (blue)



Ryc. 5. Porównanie wyników referencyjnych (kolor czerwony) z wynikami NIRS (kolor niebieski), pionowe odcinki wyznaczają niepewności wyników

Fig. 5. Comparison of the reference results (red) with NIRS results (blue); vertical lines indicate the uncertainties of the results (red) and NIRS productions (blue)

W celu porównania dokładności metody NIRS z metodą referencyjną porównano odpowiadające sobie parametry statystyczne dotyczące niepewności obu metod (Gąsior i in., 2015). Dla metody referencyjnej była to względna % niepewność standardowa (Arendarski, 2003) – $u_{ref}\% = 7,22$, a dla metody NIRS jest to niepewność predykcji, która może być wyrażona jako SECV lub SECV% (Gąsior i in., 2015), albo tak jak w niniejszej pracy – jako względny % średni standardowy błąd przewidywania skorygowany o bias $\overline{SEPC}\%$ (tab. 2). Kalibracja NIRS jest wystarczająco dokładna, jeżeli stosunek obu niepewności (analizy NIRS i referencyjnej: $\overline{SEPC}\%/u_{ref}\%$) nie przekracza wartości liczbowej około 2. Dla uzyskanej kalibracji stosunek ten wynosił 1,25 i należy uważać go za bardzo dobry (Gąsior i in., 2015).

Na ryc. 4 przedstawiono zestawienie wyników referencyjnych uzyskanych tradycyjną metodą ekstrakcji tłuszczu i wyników przewidywanych metodą NIRS, dotyczących próbek nie występujących w zbiorze kalibracyjnym. Na ryc.

5 porównano je ze sobą z uwzględnieniem $u_{ref}\%$ i $\overline{SEPC}\%$. Zestawienie parami poszczególnych wyników z uwzględnieniem niepewności uzyskanych metodą referencyjną i predykcji NIRS pozwala zauważyć, że niepewności każdej z par nachodzą na siebie. Przy przyjętych niepewnościach obu metod wyniki należy uznać za statystycznie nie różniące się.

Podsumowanie i wnioski

Opracowana metoda pozwala na wykorzystanie techniki odbiciowej NIRS do oznaczenia zawartości tłuszczu śródmięśniowego w schabie i jest oparta na dokładnej i odpornej kalibracji, to znaczy takiej, która była sporządzona na podstawie próbek pochodzących od różnych ras świń hodowanych w różnych okresach roku na przestrzeni wielu lat. Uzyskano zadowalające parametry walidacyjne, takie jak: R^2 , \overline{SEPC} , SECV czy RPD. Niepewność uzyskanej metody wynosi 9,05% (wyrażona jako $\overline{SEPC}\%$) i jest nieznacznie większa od niepewności metody odniesienia wynoszącej 7,22% ($u_{ref}\%$). Kalibracja może być

użyta w dowolnym spektrometrze Foss InfraXact 7500, w tym w najnowszych modelach aparatów Foss, np. DS2500, DA1650. Opracowana metoda pozwala na wykonanie dużej liczby szybkich, tanich, nie niszczących próbek i ekologicznych analiz (EPA U.S. Environmental Protection Agency, 2022) wykonywanych przez Centralne Laboratorium Działu Analityki Laboratoryjnej IZ PIB. Znalazła ona zastosowanie w ocenie jakości mięsa świń prowadzonej w Polsce w Stacjach Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej. Od momentu wdrożenia metody w bliskiej podczerwieni (od 2018 r.) w celu oznaczania tłuszczu śródmięśniowego

w schabie (Żak i in., 2018) Centralne Laboratorium analizuje blisko 1000 próbek rocznie, stale poszerzając w wyniku rewalidacji bazę widm, służącą poprawie jakości analiz.

Podziękowania

Serdecznie dziękujemy dr. hab. Mirosławowi Tyrze, prof. IZ PIB i dr. hab. Grzegorzowi Żakowi prof. IZ PIB z Zakładu Hodowli Trzody Chlewnej Instytutu Zootechniki PIB za udostępnienie materiału do badań ze Stacji Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej – Zakład Doświadczalny IZ PIB Pawłowice oraz Zakład Doświadczalny IZ PIB Chorzelów sp. z o.o.

Literatura

- Alomar D., Gallo C., Castañeda M., Fuchslocher R. (2003). Chemical and discriminant analysis of bovine meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Meat Science*, 63: 441–450.
- AOAC Official Method 2007.04. Fat, Moisture, and Protein in Meat and Meat Products.
- Arendarski J. (2003). Niepewność pomiarów. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.
- Bonin M.N., Silva S.L., Bungler L., Ross D., Feijo G.L.D., Gomes R.C., Renno F.P., Santana M.H.A., Rezende F.M., Itavo L.C.V., Novais F.J., Surita L.M.A., Bonin M.N*, Pereira M.W.F., Ferraz J.B.S. (2020). Predicting the shear value and intramuscular fat in meat from Nelore cattle using Vis-NIR spectroscopy. *Meat Science*, 3: 1–7.
- Burns D.A., Ciurczak E.W. (2008). *Handbook of Near-Infrared Analysis*; third edition. Marcel Dekker, inc.
- EPA U.S. Environmental Protection Agency; <https://www.epa.gov/greenchemistry>. Dostępna 2022-08-29.
- Gąsior R., Kański J., Korol W. (2015). Kalibracja NIRS dla EM i wybranych aminokwasów oraz możliwość ich wykorzystania w badaniach przesiewowych. *Pasze Przemysłowe*, 2: 34–40.
- PN-EN ISO 12099:2017-10 Pasze, ziarno zbóż i produkty przemiału -- Wytyczne stosowania spektrometrii bliskiej podczerwieni.
- PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02. Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych.
- PN-ISO 1444:2000. Mięso i przetwory mięsne -- Oznaczanie zawartości tłuszczu wolnego.
- Prevolnik M., Čandek-Potokar M., Škorjanc D. (2004). Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality – a review. *Czech Journal of Animal Science*, 49 (11): 500–510.
- Prieto N., Roehe R., Lavin P., Batten G., Andres S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, 83: 175–186.
- Rushing J.B., Saha U.K., Lemus R., Sonon L., Baldwin B.S. (2016). Analysis of some important forage quality attributes of southeastern wildrye (*Elymus glaberrimus*) using near-infrared reflectance spectroscopy. *American Journal of Analytical Chemistry*, 7: 642–662.
- Saha U., Endale D., Tillman P.G., Johnson W.C., Gaskin J., Sonon L., Schomberg H., Yang Y. (2017). Analysis of various quality attributes of sunflower and soybean plants by near infrared reflectance spectroscopy: Development and validation calibration models. *American Journal of Analytical Chemistry*, 8: 462–492.

- Savenije B., Geesink G.H., Palen J.G.P., Hemke G. (2006). Prediction of pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science*, 73: 181–184.
- Wood J.D., Enser M., Fisher A.V., Nute G.R., Sheard P.R., Richardson R.I., Hughes S.I., Whittington F.M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78: 343–358.
- Zamora-Rojas E., Garrido-Varo A., Pedro-Sanz E., Guerrero-Ginel J.E., Pérez-Marín D. (2011). Monitoring NIRS calibrations for use in routine meat analysis as part of Iberian pig-breeding programs. *Food Chemistry*, 129: 1889–1897.
- Żak G., Tyra M., Lasek J. (2018). Ocena świń w Stacjach Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej – historia, stan obecny, znaczenie i zakres. *Przegląd Hodowlany*, 3: 5–6.

THE USE OF NIRS IN POLISH PIG BREEDING – RAPID AND NONINVASIVE ANALYSIS OF THE INTRAMUSCULAR FAT IN PORK MEAT

Summary

Near infrared reflection spectroscopy (NIRS) was used to determine the intramuscular fat concentration of pork chops. The NIRS is a rapid, noninvasive and nondestructive technique, it is reagent- and waste-free and requires no additional auxiliary chemicals. The article presents the development of the calibration, its parameters, selection of a mathematical model and method validation. The method is based on an accurate and robust calibration carried out on samples from different breeds of pigs reared at various times of the year and for many years. It has been used in the assessment of the quality of pig meat carried out in Poland at Pig Performance Testing Stations (SKURTCh).

Key words: meat quality, intramuscular fat in pork, NIRS, robust calibration, quantitative analysis, validation



Fot. M. Szyndler-Nędza; internet