

Kemometrisk kvalitetskontrol af alginat – et eksempel fra den virkelige verden

I samarbejde med Danisco A/S er udviklet en hurtigmetode baseret på kemometri og infrarød spektroskopi til analyse af fødevaringrediensen alginat. Metoden reducerer analysetiden og optimerer kvalitetskontrollen af alginat

Af Tina Salomonsen, Søren Balling Engelsen, Lars Nørgaard og Rasmus Bro, Københavns Universitet

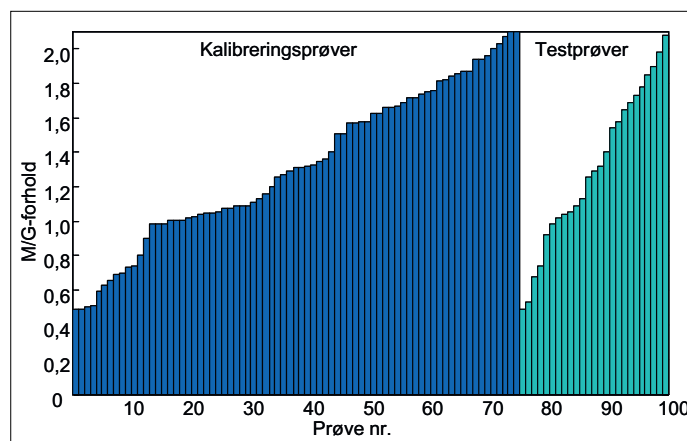
Metoden, der beskrives her, er udarbejdet i forbindelse med et ErhvervsPh.d.-projekt, der udføres som et samarbejde mellem ErhvervsPh.d.-studerende Tina Salomonsen, Danisco A/S og forskningsgruppen Kvalitet og Teknologi ved Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet. Den nye metode kan på under et minut forudsige alginatets molekylære sammensætning [1], som har betydning for funktionaliteten i de produkter, hvor det anvendes.

Baggrund

Alginat er et lineært polysakkarid, som udvindes fra brunalger (*Phaeophyceae*), og primært anvendes i fødevarerindustrien til dannelse af varmestabile marmelade-geler i bake-off-produkter samt til restrukturering af frugt, grøntsager, fisk og kød. Byggestenene i alginatmolekylet er α -L-guluronsyre (G) og β -D-mannuronsyre (M) og forholdet mellem dem er tæt forbundet med funktionaliteten i produkterne. Hvis man f.eks. ønsker en meget fast og hård gel, anvendes et alginat med meget G, hvorimod en blødere og mere elastisk gel dannes fra et alginat med meget M. M/G-forholdet varierer ift. arten af tang, høsttidspunkt og vækstbetingelser. Det er vigtigt for producenten at kende M/G-forholdet i de færdige produkter, for at sikre at funktionaliteten stemmer overens med kundernes specifikationer. M/G-forholdet måles traditionelt vha. kernemagnetisk resonans (NMR) spektroskopi. Ulempen ved denne metode er, at prøveforberedelsen er forholdsvis langvarig. For at opnå brugbare NMR-spektre er det nødvendigt at nedbryde polysakkariderne. De består typisk af omkring 1500 monomer-enheder, som skal nedbrydes til kæder med omkring 150 enheder. Denne proces involverer flere trin og er derfor tidskrævende. Derudover kræver det ekspertise at betjene et NMR-instrument, hvorfor det typisk vil være placeret centralt i virksomhedens udviklingsafdeling og ikke ude i produktionen. Det blev derfor undersøgt, om spektre opnået ved infrarød spektroskopi (hurtig måling) kunne korreleres med M/G-forholdet bestemt ved NMR (langsom måling) og dermed opbygge en prædiktiv model, som prædikerer M/G-forholdet i det kommercielle alginatpulver ud fra et spektrum af pulveret.

Prøverne

For at udvikle en prædiktiv model blev der sammensat et prøvesæt bestående af 100 prøver af den type alginat (natriumalginatpulver), som virksomheden ønsker at benytte modellen til. Prøverne blev udvalgt således, at de varierede mest muligt



Figur 1. M/G-forholdene af de 75 kalibreringsprøver og de 25 testprøver.

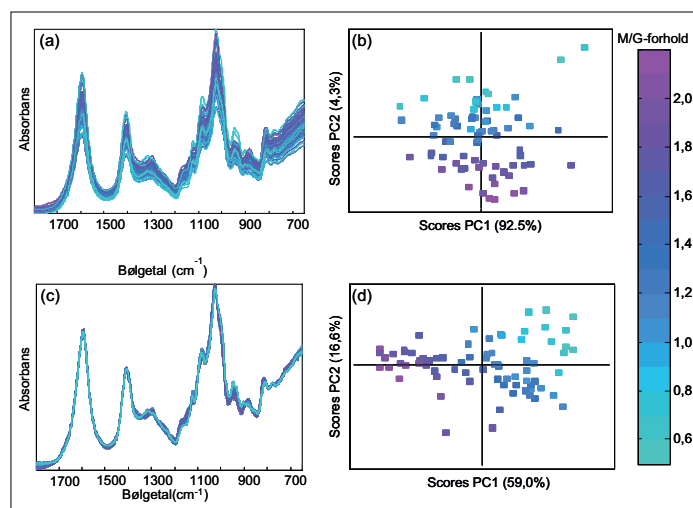
i deres M/G-forhold (0,5-2,1). M/G-forholdet af alle prøverne blev bestemt ved NMR-spektroskopi (referencemetoden). Prøverne blev opdelt i et kalibreringssæt og et testsæt bestående af hhv. 75 og 25 prøver. Figur 1 viser M/G-forholdet af de 75 kalibreringsprøver og 25 testprøver ordnet efter M/G-forholdet bestemt vha. referencemetoden. Der blev ligeledes målt Fourier transform infrarød (FT-IR) spektre af alle prøverne på et Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spektrometer udstyret med en attenuated total reflectance (ATR)-enhed med en single-bounce diamant. Spektrene blev målt i området 650 til 4000 cm^{-1} med 1 cm^{-1} intervaller. Til dataanalysen blev kun området fra 650 cm^{-1} til 1800 cm^{-1} (1150 variable) anvendt. Hver prøve måltes tre gange og gennemsnitsspektret blev brugt i dataanalysen.

Eksplorativ dataanalyse

I figur 2a ses de rå spektre af de 75 kalibreringsprøver. Spektrene er farvet efter M/G-forholdet, men ved visuel inspektion er det svært at få et overblik over, hvilke dele af spektret der er relateret til M/G-forholdet. For at få et overblik over variationen i data udføres først en *Principal Component Analysis* (PCA) af de rå spektre efter centrering (hver måling er fratrukket variabelens middelværdi). PCA og centrering er tidligere beskrevet i denne klumme (Dansk Kemi 2, 2008). Scoreplottet fra PCA af de rå spektre er vist i figur 2b og viser at principal komponent et (PC1) og to (PC2) forklarer hhv. 92,5% og 4,3% af variationen i data. Det ses ligeledes, at

prøverne i scoreplottet, som ligeledes er farvet efter M/G-forholdet, er fordelt langs PC2. Der ses en gradient fra det laveste M/G-forhold øverst i plottet til højeste M/G-forhold nederst i plottet. Der kan altså konkluderes, at hovedparten af den spektrale variation (92,5%) er relateret til anden information end M/G-forholdet. Denne ukendte variation er sandsynligvis relateret til små forskelle i kontakten til diamanten på ATR-enheden. Det er altså sandsynligt, at den variation, der forklares i PC1, er ikke-kemisk og med fordel kan fjernes vha. *Multiplicative Scatter/Signal Correction* (MSC) (Dansk Kemi 1, 2009). Derved opnås en mere simpel model, der udelukkende fokuserer på den kemiske information. De MSC-behandlede spektre er vist i figur 2c, og der ses en tydelig effekt af forbehandlingen.

I scoreplottet fra en PCA af de MSC-behandlede spektre ses nu ligeledes en tydelig systematisk variation i forhold til M/G-forholdet (farvekode) langs PC1, som forklarer 59,0% af variationen i data. Den eksplorative analyse af data viser, at FT-IR-spektrene indeholder information om M/G-forholdet, og det kan derfor forventes, at det er muligt at opbygge en kalibreringsmodel mellem spektrene (hurtig måling) og M/G-forholdet bestemt vha. referencemetoden (langsom måling).

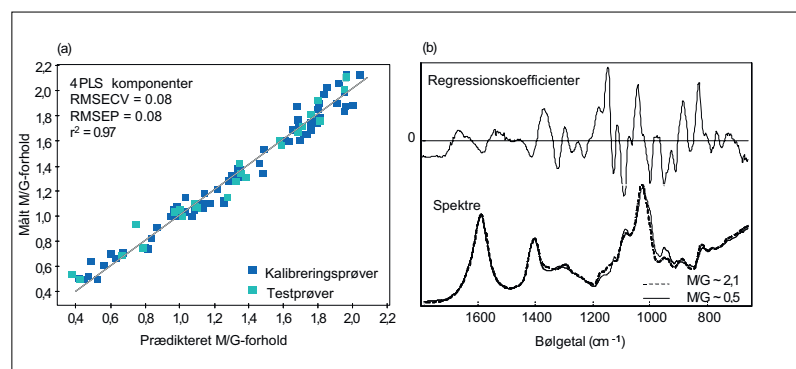


Figur 2. (a) Rå og (c) MSC-behandlede FT-IR-spektre af de 75 alginat kalibreringsprøver i det spektrale område 650-1800 samt PCA scoreplot på de (b) rå og (d) MSC-behandlede spektre. Spektre og scores er farvet efter prøvernes M/G-forhold.

Kalibreringsmodellen

Kalibreringsmodellen mellem de MSC-behandlede spektre (figur 2c) og referenceværdierne (figur 1) blev opbygget vha. *Partial Least Squares* (PLS) regression (Dansk Kemi 11, 2008). Spektrene og referenceværdierne blev centreret inden modellering for at fokusere på variationerne mellem de enkelte prøver i stedet for det overordnede signalniveau. De 75 kalibreringsprøver blev brugt til udviklingen af modellen, hvorefter de 25 testprøver blev brugt til at teste, hvor god modellen er til at prædiktere nye prøver. Det optimale antal PLS-komponenter for denne model blev bestemt til at være fire ved fuld krydsvalidering (Dansk Kemi 3, 2009). I figur 3a ses M/G-forholdene målt vha. referencemetoden plottet mod M/G-forholdene prædikeret ud fra FT-IR-spektrene for både kalibreringsprøverne og testprøverne. Både *Root Mean Square Error of Cross Validation* (RMSECV) og *Root Mean Square Error of Prediction* (RMSEP), som er hhv. den gennemsnitlige

kalibreringsfejl og den gennemsnitlige prædiktionsfejl (Dansk Kemi 3, 2009), blev beregnet til 0,08, som er i samme størrelsesorden som standardafvigelsen på referencemetoden. Det betyder at fejlen i PLS-modellens prædiktioner er på niveau med referencemetoden, samt at det kan forventes, at modellen er lige så god til at prædiktere nye ukendte prøver, som den er til at prædiktere de prøver modellen bygger på. Med andre ord – modellen er robust. Figur 3b viser modellens regressionskoefficienter plottet sammen med et spektrum af to alginatprøver med hhv. et højt og et lavt M/G-forhold. Overordnet kan der konkluderes, at det meste af fingerprintområdet mellem 800 cm^{-1} til 1200 cm^{-1} har betydning for kalibreringen. De steder, hvor man visuelt kan se en forskel på de to spektre i figur 3b, vægtes højest.



Figur 3. (a) M/G-forholdene målt vha. referencemetoden plottet mod M/G-forholdene prædikeret ud fra FT-IR-spektrene for både kalibrerings- og testprøverne. (b) Regressionskoefficienter for PLS-modellen baseret på fire PLS-komponenter plottet sammen med FT-IR-spektrene for to ekstreme prøver (lavest og højest M/G-forhold).

Outro

Udviklingen af kalibreringsmodellen til prædiktion af M/G-forholdet i alginat har haft stor betydning for Daniscos alginatfabrik, som ligger ud til Atlanterhavet i Bretagne, Frankrig. Fabrikken sendte førhen prøver til Danmark for at få dem analyseret på NMR-instrumentet i udviklingsafdelingen og måtte vente flere dage på resultatet pga. den tidskrævende prøveforberedelse. I dag ser verden anderledes ud. Nu måles M/G-forholdet af alginaterne på under et minut på fabrikens eget FT-IR-instrument, hvori kalibreringsmodellen er indbygget.

E-mail-adresser

Tina Salomonsen: tisa@life.ku.dk

Søren Balling Engelsen: se@life.ku.dk

Lars Nørgaard: lan@life.ku.dk

Reference

1. T. Salomonsen, H.M. Jensen, D. Stenbæk & S.B. Engelsen. Chemometric prediction of alginate monomer composition: A comparative spectroscopic study using IR, Raman, NIR and NMR. *Carbohydrate Polymers* 72, 730-739, 2008.