

ANALYS AV ANTOCYANINHALTER, BRIX-VÄRDE OCH HALTEN TORRSUBSTANS I ÖSTERBOTTNISKA BLÅBÄR MED HJÄLP AV NIR-SPEKTROSKOPI

Tom Lillhonga, John Dahlbacka, Otto Lillhonga & Åke Jåfs



Analys av antocyaninhalter, BRIX-värde och halten torrsubstans i österbottniska blåbär med hjälp av NIR-spektroskopi

Tom Lillhonga¹, John Dahlbacka¹, Otto Lillhonga¹ och Åke Jåfs²

1) Yrkeshögskolan Novia, Bomullgränd 3, 65200 Vasa, Finland

2) Ketek teknologicerter, Karleby, Finland

Inledning

Många forskningsresultat antyder att ett intag av de antioxidanter som finns i frukt och grönsaker har hälsobefrämjande effekter för människan (Kähkönen m.fl., 2003; Faria m.fl., 2005). I våra nordliga trakter är blåbär (*Vaccinium myrtillus*) en av de bästa källorna till antioxidanter. En ökad konsumtion av blåbär kunde ha en positiv inverkan på den åldrande befolkningens hälsa (Berglöf, 2008). Mängden antioxidanter i blåbären varierar under växtsäsongen. Faktorer som regnmängd, växtplats, tillgången till solljus och plockningstidpunkt bestämmer den slutliga halten av antioxidanter i de bär som plockats. I denna studie plockades blåbär kontinuerligt under hela växtsäsongen (sommaren 2014) och deras kemiska egenskaper undersöks med nära-infraröd (NIR) spektroskopi (Osborne m.fl., 1986).

De bär som plockas används i regel främst som föda, men också i kosmetika och som färgämnen. Eftersom endast en bråkdel av de årliga bärskördarna tas tillvara (3-10 %) finns det potential att utveckla näringslivet kring skogliga produkter. En ökning av förädlingsgraden, nya innovationer, användning av ny teknik, utvecklingen av nya produkter och tjänster kring skogliga produkter skulle ge ett mervärde till regionen och dess näringsliv. Snabba och effektiva mätmetoder som kan avgöra bärens kvalitet och kemiska egenskaper är en viktig del i denna utveckling.

I denna undersökning studeras enbart blåbär. De viktigaste antioxidanterna i blåbär kallas för antocyaniner. Tidigare studier visar att halten antocyaniner varierar under växtsäsongen (Åkerström m.fl., 2009) och av speciellt intresse är frågan när och under vilka förhållanden som koncentrationen av antocyaniner är som störst? Blåbär som plockas i kommersiellt syfte fryslagras och en eventuell sortering sker i ett senare skede. Därför är det också en intressant frågeställning hur antocyaninhalterna påverkas av fryslagring. Tidigare studier har visat att antocyaninerna degraderar över tid och att halveringstiden påverkas av lagringstid och lagringstemperatur (Hellström m.fl., 2010; Reque m.fl., 2014). Som analysmetod för att analysera antocyaninhalterna i blåbären användes HPLC kromatografi (Zhang m.fl., 2004). Metoden är arbetsdryg, långsam och resurskrävande. Om man kunde hitta en snabbare, enklare och billigare mätmetod så kunde man eventuellt redan i skogen mäta den aktuella antocyaninhalten och därmed plocka bären vid rätt tidpunkt om målet är att maximera antocyaninhalten. NIR spektroskopi är en etablerad mätmetod som används inom många sammanhang för att analysera organiska ämnen i olika typers prover. NIR baserade mätmetoder är icke-destruktiva och påverkar inte det prov som analyseras nämnvärt, vilket ger möjligheter till realtidsmätningar. Vi har inspirerats av andra studier som också använt NIR och VIS (synligt ljus) för att studera blåbär; antocyaniner (Sinelli m.fl., 2008), bärens fysiska egenskaper

(Leiva-Valenzuela m.fl., 2013), effekter av lagring (Georgieva m.fl., 2013) och mognadsgrad (Beghi m.fl., 2013). Vår studie visar att man med hjälp av NIR spektroskopi kan kvantitativt bestämma andelen antocyaniner i råa blåbär med en noggrannhet som är tillräcklig i många sammanhang.

Metoder och material

Bärplockning och uppdelning i delprov

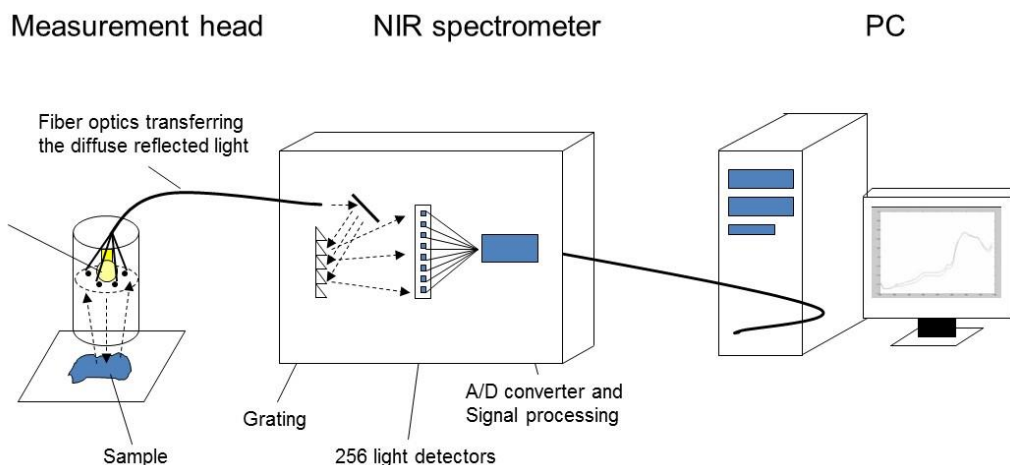
Ett specifikt område från vilka bären plockades utvaldes. Plockningen och mätningarna gjordes en gång per vecka under 10 veckor mellan tidpunkterna 15 juli och 22 september 2014. För att få jämförbara resultat plockades alla blåbär från samma område. Av praktiska och logistiska skäl valdes skogsområdet kring Storberget i Gerby (63°08'15.8"N 21°34'36.6"E) till plockområde. Plockområdet ligger ca 6 km norr om Vasa centrum och området domineras av blandad gran- och tallskog. Generellt var sommaren 2014 ett dåligt blåbärsår i Vasatrakten. Den ursprungliga planen var att vid varje plockningstillfälle plocka ca 1 liter blåbär. Under de två första plockveckorna gick det dock inte under en rimlig plocktid att få ihop tillräckligt med blåbär för att bären skulle räcka till alla planerade prov. De färska bären rensades direkt. Blad, stjälkar samt omogna kart och svarta bär utan vaxhinna togs bort. Därefter delades bären upp i åtta delprov med ca 1 dl bär per delprov (Dp 1-8, enligt Figur 2).

Vägning och torkning av prov för analys av torrhalt

Delproven 1 och 2 vägdes och frystes in (-18 °C). I september analyserades torrhalten i Yrkeshögskolan Novias laboratorium i Technobothnia. Bären tinades upp och torkades i torkskåp (105 °C, 24 h) och torrsubstansen beräknades efter en ny vägning. En parallellanalys av torrhalten för delproven 7 och 8 gjordes i samband med analys av antocyaninhalterna vid Keteks laboratorium i Karleby under senhösten 2014. Torrhalten anges i procent.

NIR-mätning av färska frysta och upptinade bär

NIR-instrumentet som användes vid alla mätningarna var ett InGaAs diode-array instrument av märket Sentronic, utrustat med en mätenhet av typen Sentrohead (Sentronic GmbH, Dresden Tyskland). Provet som skall mätas placeras under mätenheten och belyses med en kvartshalogenlampa placerad i mitten av mätenheten. Vi gjorde vårt bästa för att hålla avståndet mellan lampan och provytan konstant, men det är svårt med ett blåbärsprov. Optiska effekter som uppkommer i samband med mätningen kan delvis reduceras med hjälp av matematiska förbehandlingsmetoder i kalibreringsskedet. NIR-ljuset växelverkar kemiskt med provet och reflekteras diffust mot 7 st. fiberoptiska detektorer placerade i en ring runt halogenlampan. En principskiss av instrumentet visas i Figur 1. Våglängdsområdet som användes var 905-1605 nm med en spektral upplösning på 3 nm. De nyplockade och rensade bären (delprov 3 och 4) mättes vardera 5 gånger med NIR-instrumentet (NIR1a). För att få en uppfattning om den naturliga variabiliteten i ett prov gjordes alltså fem replikatmätningar av ett och samma prov med omblandning av bären mellan mätningarna. Efter mätningen frystes bären in och frysagrades en vecka. Efter en vecka togs bären ur frysen och mättes frysta med NIR (NIR1b). Efter mätningen ställdes båda delproven i ett mörkt rumstempererat utrymme för upptining och mättes följande dag (24 h) med NIR en tredje gång (NIR1c).



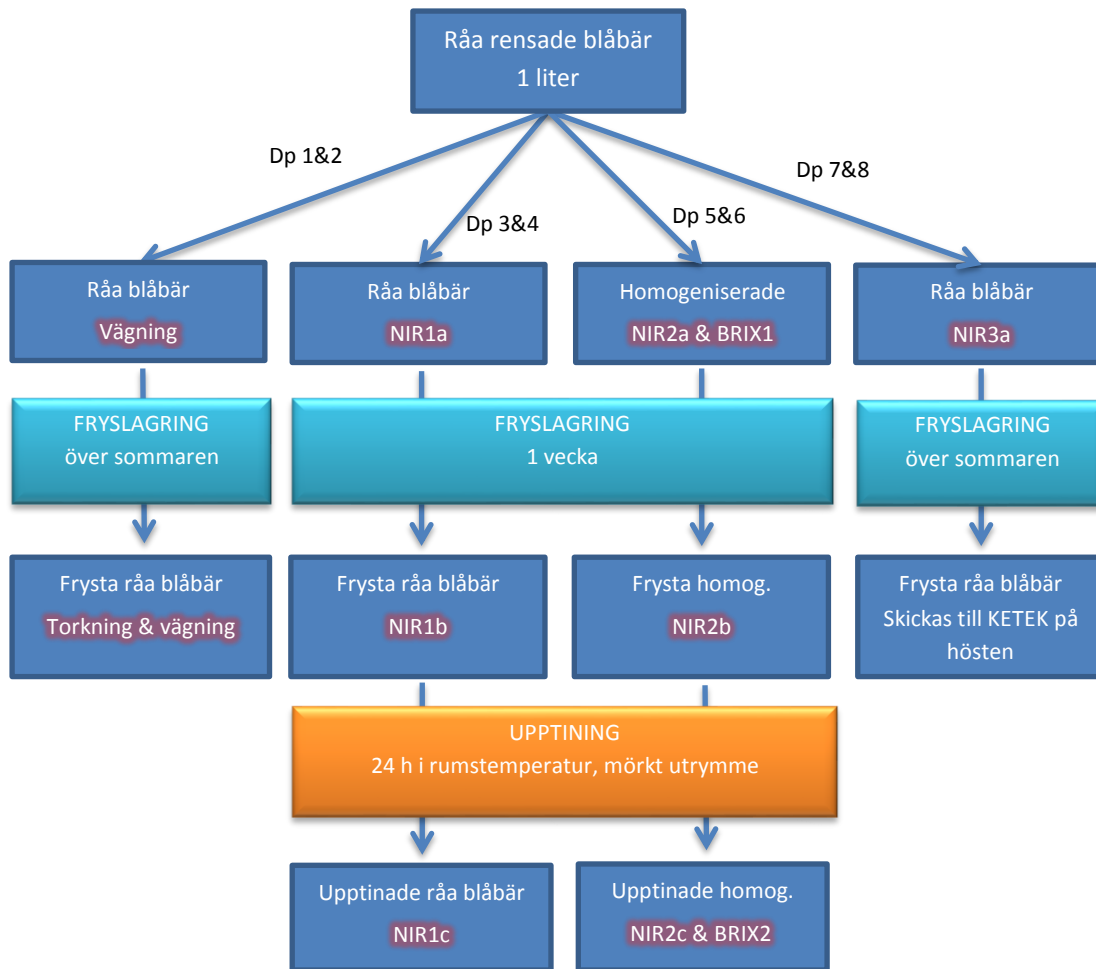
Figur 1. NIR-spektrometern med tillhörande mätenhet.

BRIX- och NIR-mätning av homogeniserade bär

Den ursprungliga tanken att ha två replikatprov för homogeniserade bär avlogs, dels för att spara tid och dels för att det ofta blev för liten mängd bär för att kunna göra två olika delprov. Delprov 5 och 6 sammanslogs till ett prov och homogeniserades i 5 minuter och på det sammanslagna provet gjordes en refraktometrisk bestämning av sockerhalten (BR1X1) med ett handburet instrument (PAL-1, ATAGO CO.,LTD) och en NIR-mätning (NIR2a). Efter mätningarna frystes provet och lagrades en vecka i frysen. Proven togs upp ur frysen och mättes direkt med NIR (NIR2b). Efter mätningen ställdes proven i ett mörkt rumstempererat utrymme för tining och mättes följande dag (24 h) med NIR (NIR2c). Efter NIR-mätningen gjordes också en ny BR1X-mätning (BR1X2) på saften från de upptinade bären. BR1X-värdet anger hur många viktprocent socker bären innehåller.

Referensanalys av antocyaniner

NIR-spektra (NIR3a) mättes på delprov 7 och 8, med åtminstone 5 replikatmätningar på varje delprov. Alla prov frystes ned direkt efter NIR-mätningen och skickades senare under hösten till Ketek i Karleby för referensmätningar av antocyaniner. Egentligen analyseras inte antocyaninerna direkt utan det är motsvarande antocyanid som analyseras vid referensmätningarna. Skillnaden mellan dessa är att en antocyanin är en antocyanid med en tillhörande sockergrupp i sin molekylstruktur. Eftersom antalet antocyanin- och antalet antocyanidmolekyler är detsamma så får man reda på halten antocyanin i bär genom att analysera motsvarande halt antocyanid. De antocyanider som analyserades var Petunidin, Delphinidin, Cyanidin och Pelargonidin. Dessutom beräknades totala mängden antocyanider som är summan av de fyra enskilda. Analysen gjordes med vätskekromatografi (HPLC) och apparaturen var av märket Shimadzu Prominence med kolonnen Merck C18. Vätskeflödet var 1 ml/min, eluent Asetonitril (+ 0,4 % TFA) / H₂O (+ 0,4 % TFA) och proven kördes som gradientkörningar. Våglängden som användes vid detektion var 520 nm (diode array detektor). Metoden beskrivs närmare i annan litteratur (Zhang m.fl., 2004).



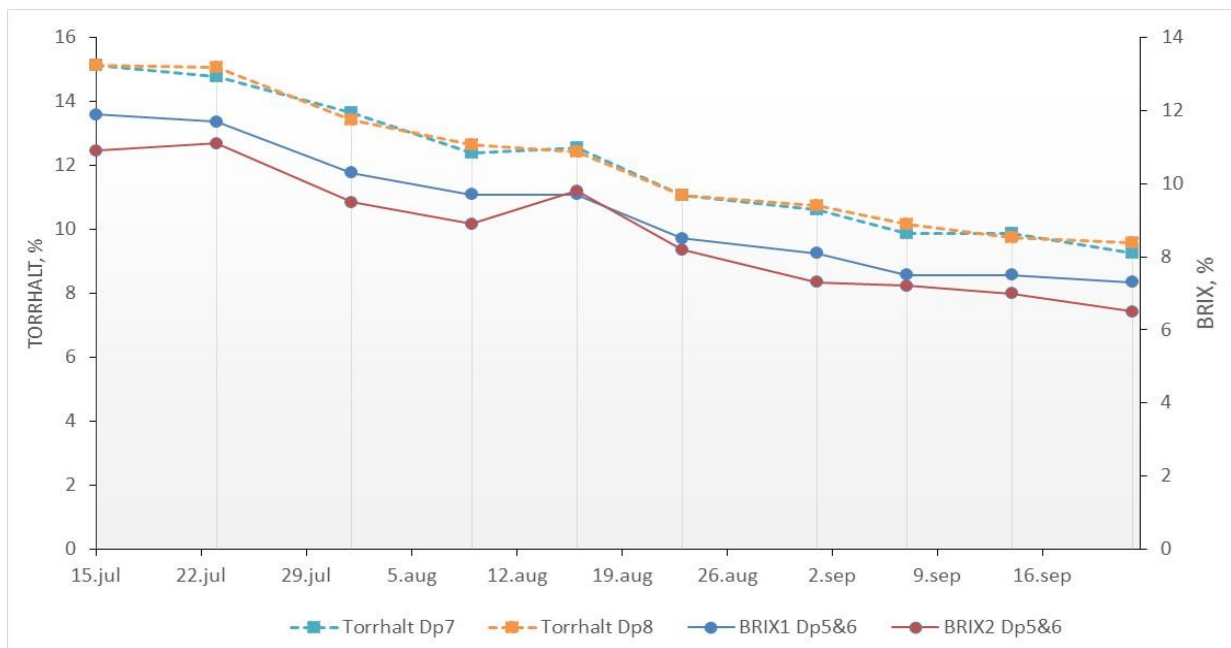
Figur 2. Experimentell uppställning och översikt över analysaktiviteter (NIR1a-3a och BRIX1&2) av de åtta delproven (Dp 1-8)

Analys och resultat

Analys av torrhalt och BRIX

Torrhalten analyserades både vid Novia (Dp1 & 2) och vid Ketek (Dp7 & 8). När resultaten från de båda analyserna jämfördes så bedömdes resultaten från Ketek vara mera pålitliga på grund av mindre variationer mellan respektive delprov. Torrhalten av delproven 7 och 8 som funktion av plockdatum presenteras i Figur 3. För att undersöka eventuella skillnader mellan delproven gjordes en ANOVA (*Analysis of Variance*) beräkning. Inga signifikanta skillnader mellan de båda delproven kunde påvisas. Torrhalten avtar under sommaren vilket kan förklaras av att blåbären växer och blir saftigare. I Figur 3 visas också två BRIX-kurvor som funktion av plockdatum. Den blå kurvan är mätt på saften från färska blåbär som homogeniserats (Dp 5 och 6 sammanslagna). Den röda kurvan visar BRIX-mätningar som funktion av plockdatum på upptinade prov. BRIX-värdet på färska homogeniserade bär är konsekvent högre än BRIX på bär som fryslagrats en vecka och tinats upp. Halveringstiden för antocyaniner har diskuterats i andra undersökningar (Hellström m.fl., 2010). Det är samma prov som mäts både före och efter fryslagring så inga andra faktorer förväntas påverka resultatet. Skillnaderna mellan värdena är statistiskt signifikanta (ensidigt t-test). BRIX-värdena avtar

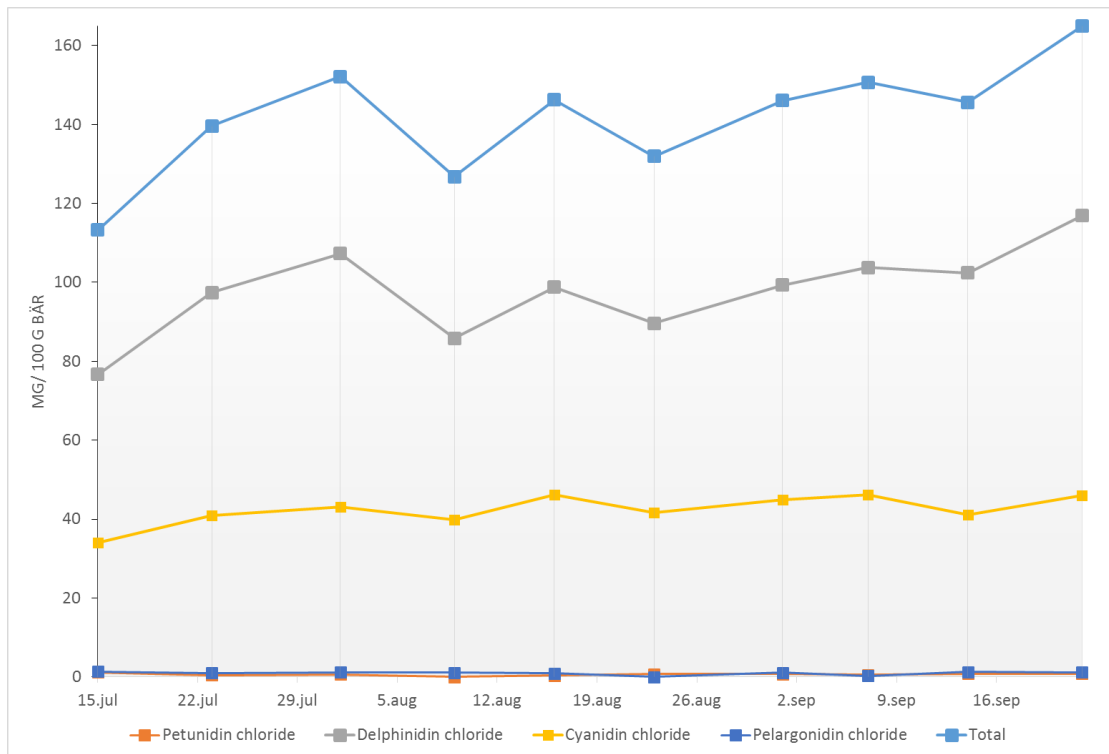
under sommaren (16 augusti är ett undantag). Förklaringen torde vara att det inte hinner produceras socker i den takt som det skulle behövas för att kompensera volymökningen i bären. Det är också en slående korrelation mellan torrhalt och BRIX-värdena.



Figur 3. Torrhalt (streckade linjer) och BRIX (heldragna linjer) som funktion av plockdatum år 2014

Analys av antocyaniner

Figur 4 visar mängden antocyaniner i mg per 100 g råa blåbär. Det är två föreningar som dominerar, Delphinidin och Cyanidin. De står tillsammans för 97 % av totala halten av antocyaniner. Andra studier av blåbär har visat att det i blåbär borde det vara Delphinidin och Petunidin som dominerar och Cyanidin i mycket mindre halter. Dessutom visar andra studier att totala halten av antocyaniner är mellan 550 och 850 mg/100g bär (Määttä-Riihinen m.fl, 2004). I våra prov är det en annorlunda fördelning mellan de inbördes halterna av antocyaninerna och totalkoncentrationen är betydligt lägre än vad som kunde förväntas jämfört med andra studier. Den låga totalhalten förklaras av att Malvidin inte kunde mätas i denna studie.

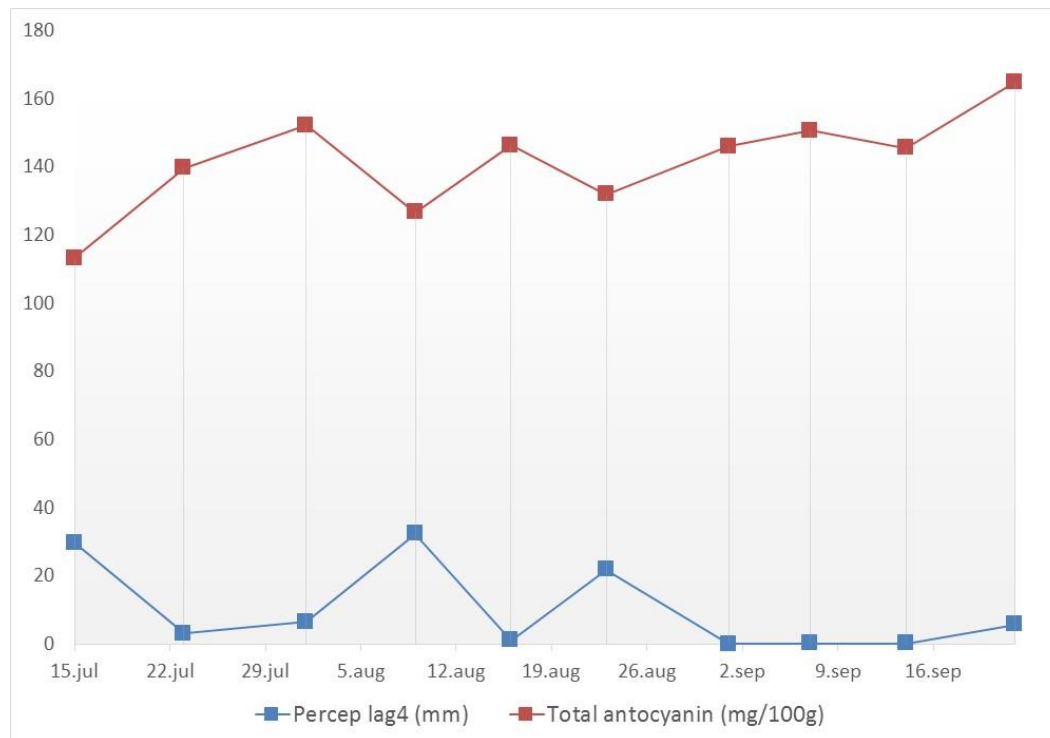


Figur 4. Mängden enskilda och totala mängden antocyaniner (mg) per 100 g blåbär som funktion av datum

Korrelation mellan referensvärden och väderdata

Väderdata från den aktuella plockperioden jämfördes med förändringar i uppmätta referensvärden. Väderdata som användes är från Vasa flygfält, vilket ligger ca 15 km från den aktuella plockplatsen. Vi tittade på daglig regnmängd (mm) och daglig medeltemperatur (°C) samt beräknade släpande (laggade) regnmängder och medeltemperaturer. T.ex. variabeln "TempLag3" betyder att man beräknar medeltemperaturen av alla dagar från den aktuella dagen och tre dagar tillbaka i tiden. PrecipLag4 betyder att man adderar alla regnmängder från den aktuella dagen och 4 dagar tillbaka i tiden. Korrelationskoefficienter beräknades för alla tänkbara par av referensvärden (BRIX, antocyaniner och torrhalt), TempLag0 till TempLag7 samt PrecipLag0 till PrecipLag7. Många av korrelationerna är intuitivt självklara men den som vi fann intressant är korrelationen mellan regnmängd med lag4 (PrecipLag4) och totala mängden antocyaniner. Korrelationskoefficienten för detta par är -0,80. I Figur 5 visas sambandet mellan dessa två variabler. Korrelationskoefficienten är hög och grafiskt sett är korrelationen uppenbar, men det är totalt sett få mätpunkter så korrelationens signifikans kan diskuteras. Ifall man antar att sambandet är kausalt så skall den negativa korrelationen tolkas så att när det regnar mer under en fyra dagars period så minskar den totala antocyaninhalten. Vad är förklaringen till detta? När det regnar suger bären upp mera vatten och deras volym ökar. Antocyaninerna koncentreras till fruktköttet, kärnorna och skalet vilket betyder att mängden antocyaniner minskar i förhållande till bärens totalvikt som till stor del består av vätskemängden i bären. Detta kunde vara en förklaring till korrelationen. Man bör också i sammanhanget lyfta fram att det inte kunde påvisas någon korrelation mellan medeltemperaturerna

och antocyaninmängderna i bären. Inga övriga korrelations samband kunde heller identifieras än det ovan nämnda.

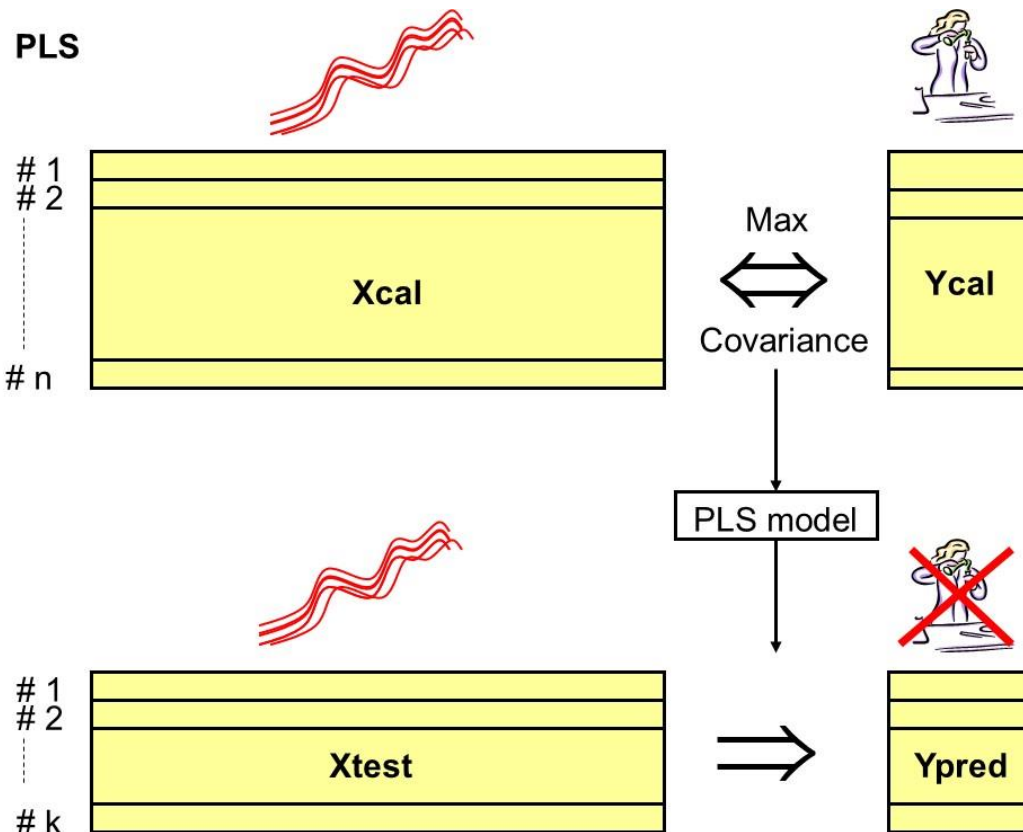


Figur 5. Regnmängderna adderade från 4 dagar tillbaka och totala mängden antocyaniner som funktion av datum. Plockdagarna år 2014 är utmärkta med gråa vertikala linjer.

NIR-resultat

Målet med NIR analysen är att skapa en matematisk regressionsmodell mellan uppmätta spektra och uppmätta referensvärden. Vanligen används en PLS (Partial Least Squares) regressionsteknik som maximerar kovariansen mellan spektra och referensvärden (Geladi & Kowalski, 1986). Modellen genomgår olika statistiska test och om modellen klarar testerna kan den senare användas för att prediktera antocyaninhalten i blåbär. En principskiss av kalibreringsprocessen visas i Figur 6.

I ett idealfall borde varje NIR-mätning som görs (se Figur 2) svara mot ett analyserat referensvärde. När våra referensvärden mättes var det på prov som varit nedfrysta under olika långa tider. Det första provet frystes in den 15 juli, det sista 22 september och referensmätningarna gjordes under senhösten 2014. För att kunna modellera spektra mot referensvärden är vi tvungna att anta att referensvärdena är representativa gentemot alla uppmätta spektra. Alltså, de referensvärden som fås för en viss plockdag antas representera alla spektra uppmätta den dagen. Spektra och referensvärden paras alltså ihop utgående från plockdatum. Det finns undersökningar som visar att både nedfrysning och lagring påverkar antocyaninhalten i bär (Hellström m.fl., 2010; Reque, m.fl., 2014). Detta var vi medvetna om, men i denna pilotstudie fanns dock inte resurser att göra fler referensanalyser än vad som gjordes. Dessutom bör påpekas att fryslagringen till en viss del också torkar ut bären. Under de rådande experimentella förutsättningarna får man betrakta kalibreringsresultaten enbart som riktgivande i bestämmandet av antocyaninhalten.



Figur 6. Principskiss för NIR-kalibrering. En PLS-modell som maximerar kovariansen mellan uppmätta spektra (**Xcal**) och tillhörande referensvärden (**Ycal**) beräknas. Modellen används för att från uppmätta NIR-spektra (**Xtest** = spektra av blåbär med okänd antocyaninhalten) prediktera antocyaninhalten (**Ypred**) i blåbär. Ifall modellen är relevant kan antalet våtkemiska analyser minimeras eller i bästa fall helt ersättas av prediktioner utgående från uppmätta spektra.

Olika statistiska mått används för att testa PLS-modellerna. Ett viktigt mått är *RMSEP* (Root Mean Squared Error of Prediction), som anger standardavvikelsen för prediktionsfelet, dvs. standardavvikelsen av skillnaden mellan uppmätta referensvärden (y_i) och predikterade värden från

PLS-modellen (\hat{y}_i). *RMSEP* definieras som $RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$. Om modellen används för

prediktion är sannolikheten 95 % för att det riktiga värdet ligger i intervallet $\hat{y} \pm 2 \cdot RMSEP$. Ett annat viktigt mått att beakta är *Bias*, som indikerar ett eventuellt systematiskt fel i prediktionerna.

Prediktionernas *Bias* definieras som $Bias = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)}{n}$, dvs. medelvärdet av prediktionsfelen. *SEP* (*Standard Error of Prediction*) är ett *Bias*-korrigerat mått på prediktionsstyrkan. D.v.s. om man lyckas

korrigera modellens *Bias*-fel kommer modellen att prediktera det riktiga värdet med denna noggrannhet. Sambandet mellan *RMSEP*, *Bias* och *SEP* är följande: $SEP = \sqrt{RMSEP^2 - Bias^2}$. Om

modellen har väldigt låg *Bias* kommer $SEP \approx RMSEP$. För att hitta en optimal modell skall man alltid studera både *RMSEP* och *Bias*. För att ytterligare avgöra om en modell är bra kan man studera modellens *RPD*-värde (*Ratio of standard error of Performance to standard Deviation*). *RPD* definieras

som $RPD = \frac{s_{ref}}{SEP_{pred}}$ dvs. kvoten mellan standardavvikelsen för referensvärdena och *SEP* för

prediktionerna (Williams, 1987). Referensvärdenas standardavvikelse i täljaren är konstant och bestäms helt utgående från referensvärdena, medan *SEP*-värdet i nämnaren varierar beroende på kalibreringsmodellen. Ju mindre *SEP*-värde desto högre *RPD*-värde. Detta kan användas för att jämföra olika kalibreringsmodeller med varandra. Tillförlitligheten i måttet har dock debatterats bl.a. på grund av att det är känsligt för extremvärden i referensvärdena. Följande riktvärden ges för *RPD*:

2.4-3.0 svag modell

3.1-4.9 modellen är nöjaktig för sållningsundersökningar (screening)

> 5 modellen kan med fördel användas för kvantitativa ändamål.

Ett annat liknande mått är *RER* (*Range Error Ratio*), som vissa forskare föredrar gentemot *RPD*. *RER* definieras som $RER = \frac{\max(ref) - \min(ref)}{SEP_{pred}}$, dvs. kvoten mellan spannet av referensvärdena och *SEP* för prediktionerna (Williams, 1987). Följande riktvärden ges för *RER*:

≥ 4 modellen är acceptabel för sållningsundersökningar (screening)

≥ 10 modellen är acceptabel för kvalitetskontroll

≥ 15 modellen är bra för kvantifiering.

Riktvärdena för *RPD* och *RER* skall inte tas bokstavligen utan som en indikation över modellens kvalitet.

PLS-modellerna använder latent variabler (LV) som är linjära kombinationer av de ursprungliga uppmätta våglängderna. En avvägning bör göras då man väljer hur många LV som skall ingå i en modell. Tillräckligt många LV måste ingå i modellen för att få med den kemiska information som finns i spektra om det referensvärde man vill prediktera. Tar man med för många LV börjar modellen modellera spektralt brus och man får en överanpassning (over-fit). En modell med för många LV fungerar bra i kalibreringsskedet men ger dåliga prediktioner. I vår analys har vi använt både PLS-modeller som använder hela våglängdsområdet samt PLS-modeller som använder bara en del av våglängdsområdet, så kallade sparse-PLS modeller (sparse = gles). Sparse-modellerna bygger på en rutin som beskrivs i (Hyonho & Sündüz, 2010). Vi har själva programmerat den rutin som beskrivs i denna artikel. Rutinen kan fås på beställning av oss. Eftersom våra blåbär innehåller mycket vatten kommer vattentoppen i spektra vid 1470 nm att dominera. Den spektrala upplösningen för vårt instrument är inte så hög och därför blir det svårt att inkludera våglängderna kring vattentoppen i våra PLS-modeller. Sparse-PLS plockar ut de våglängder som är relevanta för att prediktera antocyaninhalten. Sparse-PLS använder en gamma-parameter som reglerar hur stor andel av våglängderna som inte används i modellen. Om gamma = 0 har vi vanligt standard dense-PLS och om gamma närmar sig 1 så används väldigt få våglängder i modellen. Först optimerar man gamma-parametern via ett testset och sedan använder man den sparse-PLS modellen för att prediktera. Från varje datamatrix har vart tredje spektrum valts ut till ett testset. Kalibreringsmatrisen innehåller alltså 2/3 och testsettet 1/3 av ursprungliga spektra. Alla spektra, i alla modeller förbehandlades med första derivatan, Savgol(5,2,1), SNV och kolumnmedelvärdescentrering i nämnd ordning.

Förbehandlingen tar bort optiska effekter som uppkommer vid mätningen. Speciellt när man mäter hela blåbär så är inte avståndet mellan lampan och alla delar av bären konstant.

Tabell 1 visar en sammanfattning av de bästa PLS-modellerna som vi har beräknat för prediktion av antocyaninhalten från spektra. I tabellen är RPD och RER värdena färgade utgående från riktvärdena givna ovan, från rött till grönt och ju grönare färg desto bättre modell.

Tabell 1. PLS-resultat av modeller som predikterar totala antocyaninhalten i blåbär. Första kolumnen beskriver vilken datamatrix som använts (Raw1a-c = spektra mätta på råa hela blåbär; Hom2a-c = spektra mätta på homogeniserade blåbär och Ket3a = spektra mätta på råa hela blåbär som sändes till Ketek för referensanalys). Jämför också med Figur 1. Övriga förkortningar är: vågl. ink. = vilken del av våglängdsområdet som använts 1 motsvarar 905 nm och 260 motsvarar 1605 nm; outliers = prov som tagits bort från modellen, c står för kalibrering och t för test; # LV är antalet latent variabler; d står för dense-PLS (fullständig PLS, där alla våglängder används) och s står för sparse-PLS (gles modell där enbart vissa våglängder används); gamma = parameter som reglerar glesheten i sparse-PLS modellen, gamma är alltid ett värde mellan 0 = dense PLS och 1 = inga våglängder.

	vågl. ink.	outliers	#LV	d	bias	gamma	RMSEP	bias	SEP	RPD	RER	SEP	RPD	RER
			d	d	d		s	s	d	d	d	s	s	s
Raw1a	alla		10	4.7	0.8	0.24	4.6	-0.3	4.7	3.0	11.1	4.5	3.1	11.4
88x260	1-175		14	5.2	-0.2	0.23	5.6	0.2	5.2	2.7	9.9	5.6	2.5	9.3
	1-155		11	4.5	-0.5	0.20	4.7	0.0	4.5	3.1	11.6	4.7	3.0	11.0
	1-100		8	4.4	-0.1	0.72	4.9	0.1	4.4	3.2	11.8	4.9	2.8	10.6
Raw1b	alla	c:1,2 t:1,22	12	3.8	0.3	0.71	3.6	-0.2	3.8	3.6	13.5	3.6	3.9	14.5
85x260	1-175	c:1,2 t:1,22	13	3.9	0.1	0.01	3.9	0.1	3.9	3.6	13.4	3.9	3.6	13.4
	1-155	c:1,2 t:1,22	8	3.4	-0.1	0.01	3.4	-0.1	3.4	4.1	15.2	3.4	4.1	15.3
	1-100	c:1,2 t:1,22	8	4.2	0.1	0.93	3.7	-0.3	4.2	3.3	12.3	3.7	3.8	14.2
Raw1c	alla		6	7.6	2.6	0.72	6.7	1.6	7.2	1.9	7.2	6.5	2.1	8.0
91x260	1-175		15	4.3	1.2	0.17	4.2	1.2	4.2	3.3	12.4	4.0	3.4	12.8
	1-155		11	6.0	0.7	0.41	3.9	1.5	5.9	2.3	8.7	3.6	3.9	14.4
	1-100		7	4.8	1.8	0.50	4.3	0.7	4.4	3.1	11.6	4.2	3.3	12.3
Hom2a	alla		10	5.6	-0.3	0.54	5.5	0.9	5.6	2.5	9.2	5.4	2.6	9.5
49x260	1-175		8	6.0	1.1	0.97	6.4	0.3	5.9	2.4	8.8	6.4	2.2	8.1
	1-100		6	4.9	-0.9	0.74	4.2	-1.1	4.8	2.9	10.8	4.1	3.4	12.7
Hom2b	alla		10	5.1	0.7	0.23	3.1	0.1	5.1	2.7	10.2	3.1	4.5	16.8
34x260	1-175		10	2.5	-0.2	0.42	1.8	-0.6	2.5	5.5	20.5	1.7	8.1	30.1
	1-155		6	3.4	-0.7	0.29	1.9	-0.5	3.3	4.2	15.6	1.8	7.6	28.2
	1-100		10	3.7	-0.1	0.94	3.1	-1.5	3.7	3.7	14.0	2.7	5.1	19.0
Hom2c	alla	t:13	6	5.6	0.1	0.01	5.6	0.1	5.6	2.5	9.2	5.6	2.5	9.2
41x260	1-175	t:13	9	3.9	1.3	0.97	3.4	0.3	3.7	3.7	13.9	3.4	4.0	15.1
	1-155	t:13	12	3.6	1.5	0.89	3.4	0.4	3.2	4.3	15.9	3.4	4.1	15.1
	1-100	t:13	11	1.9	0.2	0.27	1.5	0.0	1.8	7.5	28.1	1.5	9.2	34.2
Ket3a	alla		4	9.5	0.2	0.43	9.5	0.2	9.5	1.5	5.4	9.5	1.5	5.4
70x260	1-175		3	9.6	-0.2	0.93	9.6	1.1	9.6	1.4	5.4	9.5	1.5	5.4
	1-155		7	6.3	0.6	0.96	6.3	-0.1	6.3	2.2	8.2	6.3	2.2	8.2
	1-100		6	6.0	0.8	0.74	5.81	0.233	6.0	2.3	8.7	5.8	2.4	8.9

Utgående från Tabell 1 så kan man konstatera att sparse-PLS i många fall ger bättre modeller än vanlig dense-PLS. Att prediktera antocyaninhalten utgående från homogeniserade prov är lite enklare än för hela bär. Orsaken är troligtvis att antocyaninerna återfinns i kärnorna och i skalet och då får man en starkare spektral signal då man krossat bären. Vår slutsats är att man med vårt NIR-instrument mycket väl kan screena blåbär (både hela och krossade) för deras antocyaninhalten. Vill man ha noggrannare resultat borde man förbättra instrumenteringen.

Tabell 2 visar PLS-modeller beräknade för att prediktera torrhalten i bären. Här fungerar modellerna väldigt bra och man kan med stor noggrannhet och precision prediktera torrhalten.

Tabell 2. Sammanfattning av PLS-modeller som predikterar torrhalten i bären. Kolumnerna förklaras i Tabell 1.

	vågl.ink.	outliers	#LVd	RMSEPd	bias_d	gamma	RMSEPs	bias_s	SEPd	RPDd	RERd	SEPs	RPDs	RERs
Raw1a	alla		15	0.45	-0.03	0.59	0.40	-0.04	0.45	4.4	13.1	0.40	5.0	14.7
	1-175		14	0.40	-0.04	0.01	0.40	-0.05	0.40	5.0	14.9	0.40	5.0	14.9
	1-155		9	0.35	-0.09	0.24	0.34	-0.09	0.34	5.9	17.5	0.32	6.2	18.2
	1-100		9	0.36	-0.06	0.76	0.32	-0.08	0.35	5.7	16.8	0.31	6.5	19.1
Raw1b	alla	c:1,2 t:1	12	0.67	-0.11	0.84	0.65	-0.03	0.66	3.0	8.9	0.65	3.1	9.1
	1-175	c:1,2 t:1	13	0.43	-0.14	0.65	0.39	-0.16	0.41	4.9	14.4	0.35	5.7	16.8
	1-155	c:1,2 t:1	11	0.41	-0.16	0.70	0.39	-0.15	0.38	5.2	15.5	0.37	5.5	16.1
	1-100	c:1,2 t:1	14	0.48	-0.25	0.76	0.43	-0.19	0.41	4.8	14.3	0.39	5.1	15.2
Raw1c	alla		3	0.70	-0.19	0.92	0.61	-0.06	0.67	3.0	8.8	0.61	3.3	9.7
	1-175		2	0.75	-0.16	0.73	0.44	0.05	0.73	2.7	8.1	0.44	4.5	13.4
	1-155		2	0.81	-0.11	0.21	0.49	0.00	0.80	2.5	7.4	0.49	4.0	11.9
	1-100		11	0.37	0.01	0.61	0.34	0.05	0.37	5.4	16.1	0.33	6.0	17.7
Hom2a	alla		12	0.30	0.00	0.01	0.30	0.00	0.30	6.6	19.4	0.30	6.6	19.4
	1-175		7	0.39	-0.03	0.01	0.39	-0.03	0.39	5.1	15.0	0.39	5.1	15.0
	1-155		9	0.35	0.15	0.52	0.23	0.09	0.31	6.4	18.9	0.22	9.2	27.2
	1-100		11	0.17	0.01	0.17	0.17	0.01	0.17	11.9	35.2	0.16	12.1	35.8
Hom2b	alla		7	0.49	-0.16	0.76	0.34	-0.13	0.47	4.3	12.6	0.31	6.3	18.7
	1-155		15	0.29	-0.02	0.62	0.14	0.07	0.29	6.9	20.3	0.12	17.4	51.2
Hom2c	1-175	t:13	9	0.44	-0.05	0.67	0.45	-0.01	0.44	4.6	13.5	0.45	4.5	13.2
Ket3a	alla		12	0.42	-0.05	0.01	0.42	-0.05	0.42	4.8	14.0	0.42	4.7	14.0
	1-175		11	0.38	-0.06	0.81	0.31	-0.05	0.37	5.4	15.9	0.31	6.5	19.1
	1-155		8	0.36	-0.04	0.01	0.36	-0.04	0.36	5.5	16.3	0.36	5.5	16.3
	1-100		10	0.29	0.01	0.65	0.24	0.01	0.29	6.9	20.2	0.24	8.5	25.0

Tabell 3 visar en sammanfattning av PLS-modeller som beräknats för att prediktera BRIX-halten i blåbären. Också här kan man hitta modeller som fungerar väldigt bra både utgående från hela blåbär och homogeniserade. T.ex. den glesa modellen beräknad på spektra Raw 1a med alla våglängder med från början, predikterar BRIX-värdet med noggrannheten RMSEPs = 0.36. Detta innebär att bäreans verkliga BRIX-halt med ligger med 95 % säkerhet ligger inom felmarginalen ± 0.36 % kring det värde som modellen ger. Att detta är ett bra resultat verifieras av RPD- och RER-värdena.

Tabell 3. Prediktering av BRIX-halten som är ett mått på hur många viktprocent socker bären innehåller.

	input	outliers	#LVd	RMSEPd	bias_d	gamma	RMSEPs	bias_s	SEPd	RPDd	RERd	SEPs	RPDs	RERs
Raw1a	alla		10	0.42	0.00	0.17	0.36	0.00	0.42	3.8	10.9	0.36	4.5	12.7
	1-175		5	0.49	0.02	0.01	0.35	-0.04	0.49	3.3	9.4	0.34	4.7	13.4
	1-155		8	0.32	-0.05	0.51	0.29	-0.07	0.31	5.2	14.8	0.28	5.8	16.5
	1-100		9	0.29	-0.04	0.69	0.28	-0.05	0.28	5.8	16.3	0.27	6.0	16.9
Hom2a	alla		10	0.28	-0.02	0.42	0.28	-0.03	0.27	5.7	16.8	0.28	5.5	16.2
	1-175		7	0.34	0.00	0.64	0.26	0.03	0.34	4.7	13.7	0.26	6.0	17.6
	1-155		8	0.29	0.11	0.49	0.21	0.08	0.27	5.9	17.2	0.20	7.9	23.2
	1-100		11	0.13	0.01	0.01	0.13	0.01	0.13	12.0	35.0	0.13	11.9	35.0
Hom2c	alla	t:13	8	0.52	0.06	0.01	0.52	0.06	0.52	3.0	8.9	0.51	3.1	8.9
	1-175	t:13	8	0.28	-0.07	0.65	0.23	-0.04	0.27	5.7	16.7	0.22	7.1	20.7
	1-155	t:13	8	0.25	-0.07	0.82	0.15	-0.03	0.24	6.6	19.4	0.15	10.8	31.5
	1-100	t:13	7	0.17	0.00	0.10	0.17	0.00	0.17	9.1	26.6	0.17	9.1	26.7

Slutsatser

Biologiska prov är komplexa och uppvisar ofta stor variation beroende på växtplats, rådande väderleksförhållanden, samt tillgång på solljus och vatten. För att utförligt studera möjligheten att använda NIR-spektroskopi när man predikterar antocyaniner borde man ha spektraldata från minst tre somrar. Då skulle man få med tillräckligt med variation i PLS-modellerna. Tio stycken veckor ledde till 10 referensprov med 2 replikat och även detta är för litet för att få pålitliga resultat. Med tillgängligt material har vi ändå kunnat påvisa att det är möjligt att åtminstone på screening nivå kunna skilja på blåbär med mindre och större halter av antocyaniner, med en mätnoggrannhet i medeltal kring 4.6 mg/100 mg råa bär. Modellerna för torrsubstans har i medeltal en mätnoggrannhet kring 0.4 %. BRIX modellerna fungerar riktigt bra och har mätnoggrannheten i medeltal kring 0.3 % för hela bär och 0.1 % för homogeniserade.

Ett framtida försök behöver också utföras med ett bättre NIR-instrument med högre spektral upplösning och ett våglängdsintervall som gärna täcker hela NIR-området från 800-2500 nm. Det kunde också vara intressant att kombinera NIR med VIS-spektroskopi eftersom antocyaninerna är de som ger färg åt bären. Vi har också tyvärr relativt stora kast i våra referensmätningar mellan replikat. D.v.s. två parallellprov som är tagna från samma plockning uppvisar ibland stora skillnader i antocyaninhalter. Detta kan förstås vara en indikation på naturlig variation men det kan också vara så att referensmetoden borde ses över.

Detta enkla pilotförsök ger vid handen att NIR är en intressant teknik för att analysera blåbär och vi tror att man i framtiden kommer att använda NIR i allt högre grad för att snabbt kunna sortera blåbären utgående från deras antocyaninhalt.

Referenser

- Beghi, R., Giovenzana, V., Spinardi, A., Guidetti, R., Bodria, L., & Oberti, R. (2013). Derivation of a blueberry ripeness index with a view to a low-cost, handheld optical sensing device for supporting harvest decisions. *Transactions of the ASABE (American society of agricultural and biological engineers)* 56, 4, 1551-1559.
- Berglöf, E. (2008). *Nordliga skogsbär och dess hälsoeffekter, Litteraturstudie genomförd åt Institutet för Livsmedel och Bioteknik AB (SIK), Projekt Bioteknik-Bär.*
- Faria, A., Oliveira, J., Neves, P., Gameiro, P., Santos-Buelga, C., De Freitas, V., & Mateus, N. (2005). Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6896–6902.
- Geladi, P., & Kowalski, B. (1986). Partial leastsquares regression: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* 185, 1-17.
- Georgieva, M., Nebojan, I., Mihalev, K., Yoncheva, N., Gajdoš Kljusurić, J., & Kurtanjek, Ž. (2013). Application of NIR spectroscopy and chemometrics in quality control of wild berry fruit extracts during storage. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* 8 (3-4), 67-73.
- Hellström, J., Mattila, P., & Karjalainen, R. (2010). Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. *Journal of Food Composition and Analysis* 31, 12-19.
- Hyonho, C., & Sündüz, K. (2010). Sparse partial least squares regression for simultaneous dimension reduction and variable selection. *Journal of the Royal Statistical Society. B* 72 Part 1, 3-25.
- Kähkönen, M. P., Heinämäki, J., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2003). Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *J. Sci. Food Agric* 83, 1403–1411.
- Leiva-Valenzuela, G. A., Lu, R., & Aguilera, J. M. (2013). Prediction of firmness and soluble solids content of blueberries using hyperspectral reflectance imaging. *Journal of Food Engineering* 115, 91-98.
- Määttä-Riihinen, K., Kamal-Eldin, A., Mattila, P., González-Paramás, A., & Törrönen, R. (2004). Distribution and Contents of Phenolic Compounds in Eighteen Scandinavian Berry Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 4477-4486.
- Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. T. (1986). *Practical Nir Spectroscopy With Applications in Food and Beverage Analysis.* Longman Group United Kingdom.
- Reque, P. M., Steffens, R. S., Jablonski, A., Flôres, S. H., de O. Rios, A., & de Jong, E. V. (2014). Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis* 33, 111-116.
- Sinelli, N., Spinardi, A., Di Egidio, V., Mignani, I., & Casiraghia, E. (2008). Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 31-36.

- Williams, P. C. (1987). Variables affecting near-infrared reflectance spectroscopic analysis. Saint Paul, MN: American Association of Cereal Chemists Inc.
- Zhang, Z., Kou, X., Fugal, K., & McLaughlin, J. (2004). Comparison of HPLC Methods for Determination of Anthocyanins and Anthocyanidins in Bilberry Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 688-691.
- Åkerström, A., Forsum, A., Rumpunen, K., Jäderlund, A., & Bång, U. (2009). Effects of sampling time and nitrogen fertilization on anthocyanidin levels in *Vaccinium myrtillus* fruits. Åkerström A, Forsum A, Rumpunen K, Jäderlund A, Bång U. *Effects of sampling time aJournal of Agricultural Food Chemistry* 57(8), 3340-3345.

YRKESHÖGSKOLAN
NOVIA

Novia är den största svenskspråkiga yrkeshögskolan i Finland med examensinriktad ungdoms- och vuxenutbildning, utbildning som leder till högre yrkeshögskoleexamen samt fortbildning och specialiseringsutbildning. Nova har ca 4000 studerande på sex campus i Vasa, Jakobstad, Raseborg och Åbo.

Yrkeshögskolan Nova är en internationell yrkeshögskola, via samarbetsavtal utomlands och internationalisering på hemmaplan. Novias styrka ligger i närvaron och nätverket i hela Svenskfinland.

Novia representerar med sitt breda utbildningsutbud de flesta samhällssektorer. Det är få organisationer som kan uppvisa en sådan kompetensmässig och geografisk täckning. Högklassiga och moderna utbildningsprogram ger studerande en bra plattform för sina framtida yrkeskarriärer.

YRKESHÖGSKOLAN NOVIA

Wolffskavägen 33, vån 4, 65200 Vasa
Växel tfn (06) 328 5000
Fax (06) 328 5110
www.novia.fi

ANSÖKNINGSBYRÅN

Wolffskavägen 33, 65200 Vasa
Tfn (06) 328 5555
Fax (06) 328 5117
ansokningsbyran@novia.fi

Yrkeshögskolan Nova upprätthåller en publikations- och produktionsserie för att sprida information och kunskap om verksamheten såväl regionalt, nationellt som internationellt. Publikations- och produktionsserien är indelad i fem kategorier:

R - Rapporter • P - Produktioner • A - Artiklar • L - Läromedel • S - Studerandes arbete

Läs våra senaste publikationer på www.novia.fi/FoU/publikation-och-produktion