

Detektion af bruske i kød- produkter



TEKNOLOGISK
INSTITUT



**TEKNOLOGISK
INSTITUT**

Detektion af brusk i kødprodukter

Udarbejdet af:

Teknologisk Institut
Gregersensvej 9
2630 Taastrup
DMRI

December 2021
Forfatter: LBC



1. Baggrund

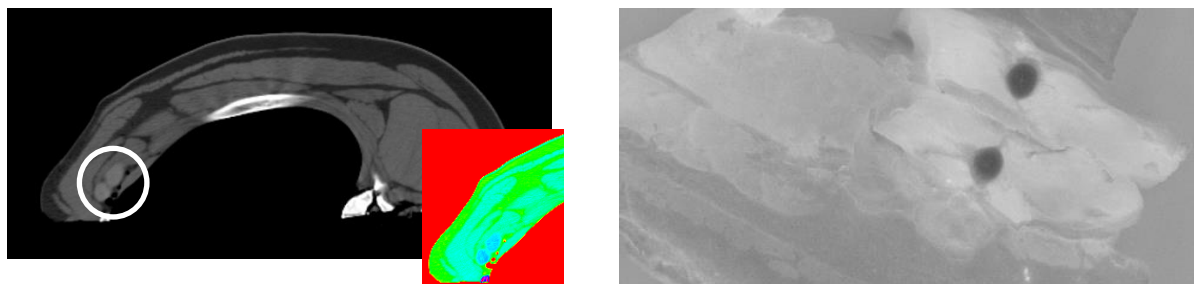
Forekomst af brusk i kødprodukter er vanskeligt at undgå i en moderne industriel og mere og mere automatiseret produktion. På trods af, at brusk er en naturligt forekommende vævstype i råvarerne, er der på mange markeder en ringe accept af og forståelse for, at denne type fremmedlegemer kan risikere at forekomme i det færdige produkt. Der er derfor behov for at reducere denne risiko til et minimum.

Fysiologisk er brusk et forstadium til skelettets knogler. Således opbygges pattedyr i forstertilstanden af bruskvæv, som senere udvikles (calcificeres) til egentligt knoglevæv. Dog forbliver visse dele af bruskvævet som elastisk og eftergiveligt væv. Det drejer sig specielt om vævet mellem knoglerne, som sikrer disses bevægelighed, fx ribbenenes bevægelighed omkring lungerne. Denne såkaldte hyaline brusktype består af kollagen (primært type II) og vand (75%) og forekommer generelt ved overgangen mellem egentligt kalkholdigt knoglevæv og det elastiske bindevæv (sener), som holder disse sammen med muskulaturen og sikrer skelettets bevægelighed.

Den gradvise overgang fra knogle, over brusk til sener kan illustreres ved en røntgenmåling af et stykke brystflæsk med en CT-skanner, se figur 1.

Allerede i dag er detektion af knoglestykker en etableret praksis i danske virksomheder, hvor gennemlysning med røntgen kan sikre mod forekomst af selv meget små (≈ 1 mm) knoglefragmenter. Røntgen-detektionen er baseret på knoglevævet's indhold af mineraler, bl.a. hydroxyapatit. Pga. det lave mineralindhold i brusk er røntgendensiteterne ikke markant forskellige mellem brusk og kød. Derfor er røntgenstråling ikke en særlig anvendelig metode til at skelne mellem brusk og kød.

Da begge vævstyper er hvide, kan et konventionelt RGB-kamera ikke umiddelbart med tilstrækkelig kontrast skelne brusk fra fedt. En kontrast på kun ca. 10% vurderes ikke tilstrækkelig til simpel detektion af brusk i den synlige del af spektret. Ved at benytte flere farvekanaler kan denne kontrast dog forbedres, men på bekostning af en mere kompliceret billedanalyse, der i praksis er vanskeligt gennemførlig pga. de forskellige kødråvarer med hver deres specifikke analyse, der skal kunne håndteres. Der er altså ingen etableret detektionsmetode, der kan skelne brusk fra en baggrund af fedt- og kødvæv.



Figur 1. Tv.: Et eksempel på CT-skanning af et stykke brystflæsk, som viser vævsforskellen mellem muskel-, brusk- og knoglevæv. Vævsforskellene er fremhævet med farvelægning (illustration Dennis Brandborg Nielsen, DMRI). Th.: Et eksempel på en flerkanalanalyse (468 nm og 929 nm) af brusk, som giver øget kontrast til fedt, men mindsket kontrast til kød (illustration Claus Borggaard, DMRI).

2. Vævsforskelle mellem brusk og kød

Der er altså behov for en mere generelt gyldig metode til at detektere brusk. En tilgang er at udnytte andre materialespecifikke forskelle end farven og røntgendensiteten. En mulig materialespecifik egenskab er UV-fluorescens.

En grundlæggende forskel mellem knoglevæv og brusk, ud over mineralindholdet, er indholdet af (hydroxylsyl-)Pyridinolin (PYD), som ændres i takt med overgangen fra (hyalin) brusk til egentligt mineraliseret og uelastisk knoglevæv (<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/03008209309014236>). PYD-molekylet er et såkaldt fluorofor, hvilket betyder, at det under visse omstændigheder udsender lys med en specifik bølgelængde (auto-fluorescens). Pyridinolin kan derfor være en kandidat til entydig detektion af hyalinbrusk i kødprodukter ved at udnytte dets fluorescerende egenskab.

Autofluorescens opstår typisk, når et materiale (kaldet en fluorofor) belyses (eksiteres) med og absorberer ultraviolet lys. De ultraviolette fotoner indeholder nemlig tilstrækkelig energi til at flytte elektronerne fluoroforen til en højere, men ustabil tilstand. Elektronerne falder tilbage til den stabile energitilstand og udsender lys, svarerende til energitabet. Men før dette sker, vil en del af den absorberede energi give anledning til elektronvibrationer i den eksiterede tilstand, så det genudsendte lys har lavere energi end det eksiterende UV-lys. Lavere fotonenergi betyder lavere fotonfrekvens og dermed længere bølgelængde af det emitterede lys.

I tilfældet med hyalint brusk benyttes eksitation med 365 nm (UV-A), og den resulterende emission sker ved ca. 450 nm på grund af det omtalte interne energitab.

Et ganske anderledes forskningsområde, som udnytter autofluorescens yderligere, er den spirende "tissue engineering", hvor kunstigt væv bygges op i laboratoriet til erstatning for naturlige vævstyper som ledbrusk. Disse processer skal overvåges og styres for at opnå de ønskede egenskaber. En beskrevet metode udnytter en lignende eksitation med 365 nm og et specialbygget spektralt kamera med en høj følsomhed og en opløsning på omkring 10 nm til at detektere brusk, der opbygges af kollagen type I og type II. Begge typer emitterer mellem 440 nm og 450 nm. Kødfibre indeholder type III kollagen i cellemembranen, mens knoglevæv og brusk domineres af kollagen af type I og type II.



3. Metode

3.1. Forsøgsopstilling

Forsøgsopstillingen består af en eksitationslyskilde, i form af en simpel UV-A belysning med 365 nm lysdioder, som leverer ca. $715 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ målt på produktoverfladen (6 stk. Inolux IN-C33ATNU2 fra Inolux, forsynet med 100 mA), og et UV-enhanced kamera (JAI CM-140 GE-UV) med objektivets blænde sat til 1,6 og med et båndpas-filter med en centerbølgelængde på ca. 445 nm og en bredde på 40 nm (FB450-40 fra Thorlabs). Kameraets integrationstid var indstillet til 60 ms. Dette kan give et udgangspunkt for den belysning (intensitet), som for en given båndhastighed er nødvendig for at gentage målingerne under produktionslignende forhold (båndhastigheden giver sammen med pixelstørrelsen den mulige integrationstid).

Forsøgsopstillingen blev afprøvet både med og uden afdækning af den omgivende belysning i laboratoriet.



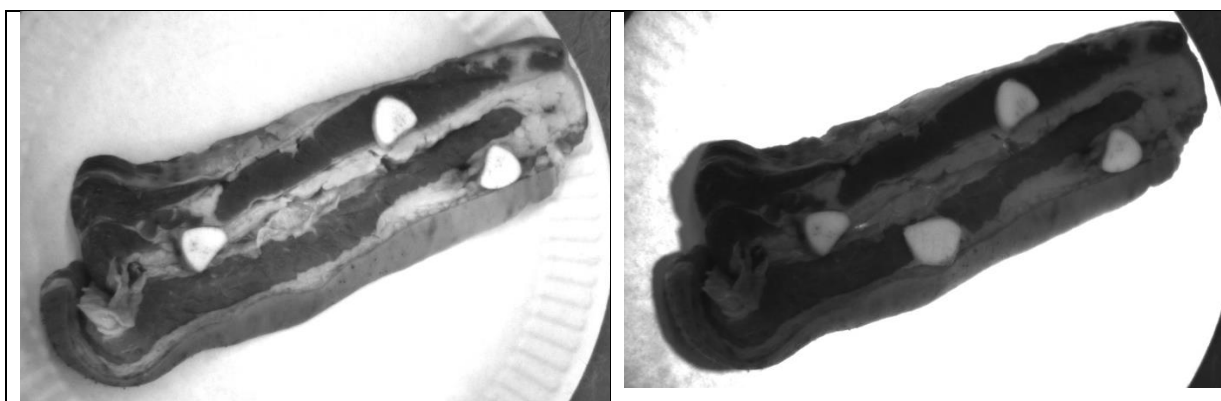
Figur 2. Måleopstilling til detektion af auto-fluorescens fra brusk på kødoverflade.



3.2. Forsøgsmateriale

Til demonstrationsforsøget blev der benyttet brystflæsk med svær som produktbaggrund og stykker af fjederben som eksempler på bruske. Denne kombination er relevant, da visse slutprodukter fremstillet af brystflæsk forventes af være fri for bruske.

Der blev benyttet bruske med en frisk, ren snitflade samt hakket bruske for også at simulere den praksisnære situation med bruske i et hakket kødprodukt. Alle bruskestykker var afskåret 24 timer pm.



Figur 3. Indledende forsøg uden afdækning af laboratoriebelysning (dagslys). Illustrationen tv. er uden UV-A belysning, hvor billedet th. er med UV-A belysning. Det kan ses, at det fluorescerende signal bidrager til højere kontrast til det hvide fedtvæv.

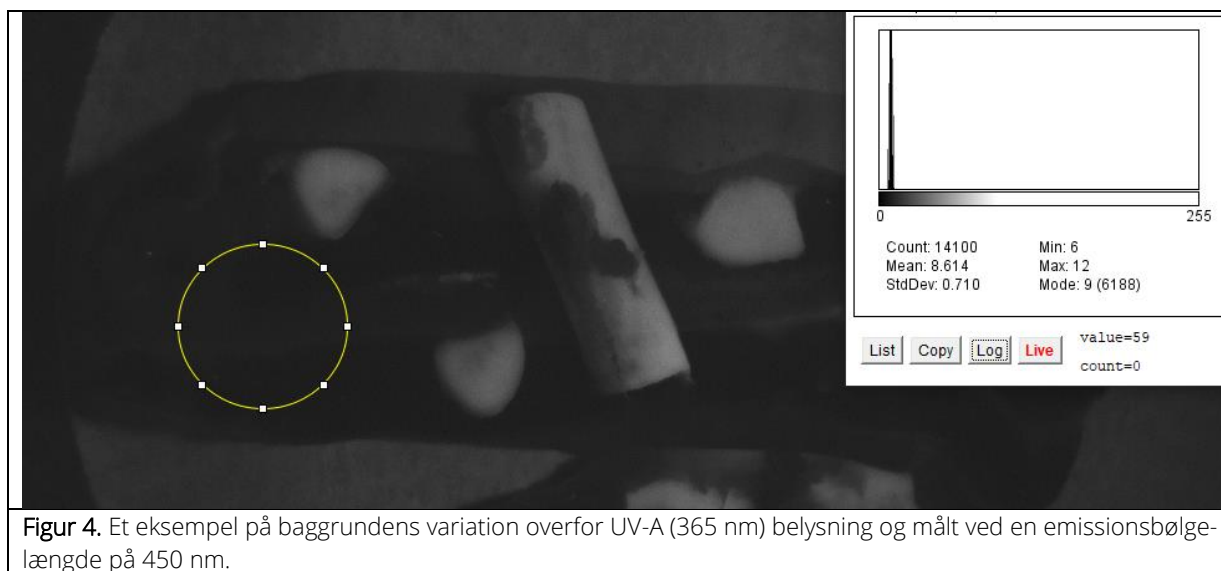
3.3. Billedbehandling

Billedbehandlingen i dette forsøg blev lavet manuelt med programmet ImageJ, hvor de optagne billeder blev komprimeret til 8 eller 16 bit monokrom for derefter at blive filtreret med et simpelt intensitetsfilter med en passende tærskelværdi.

4. Resultater

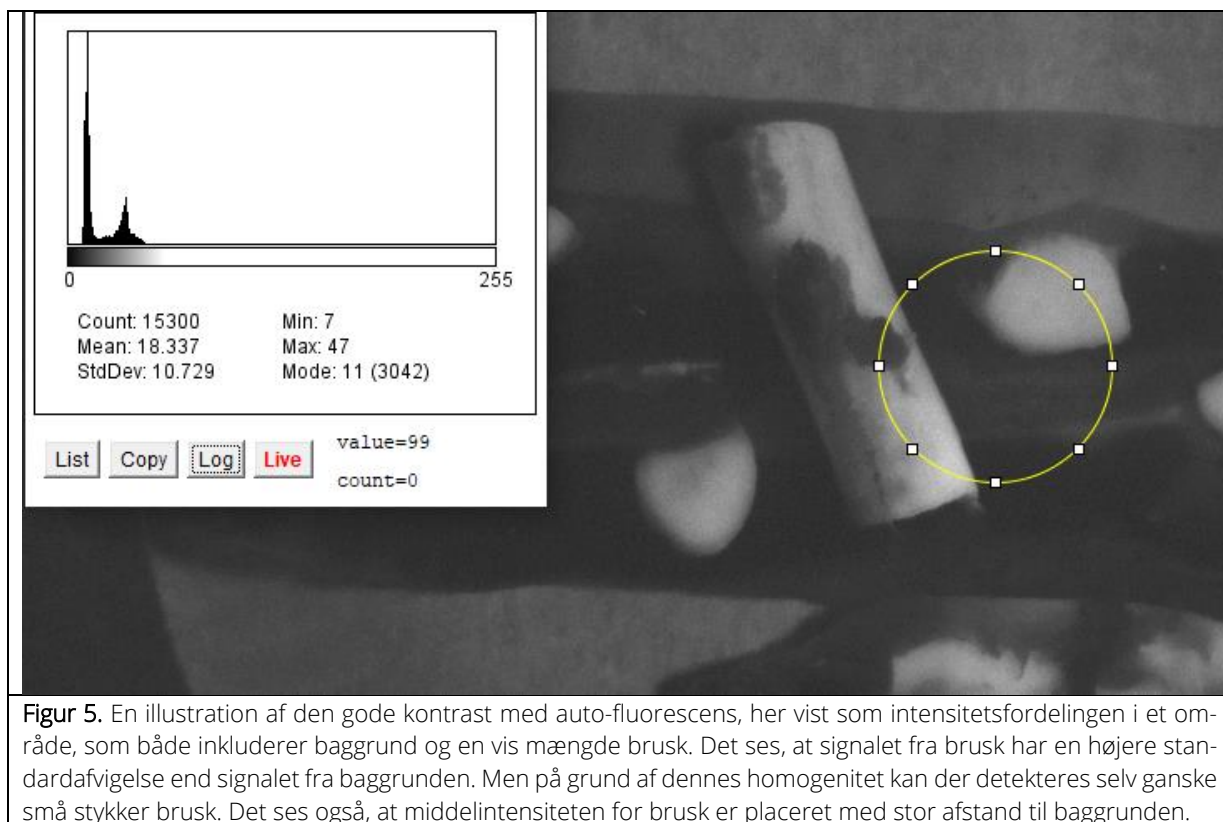
Optagelser af produktbaggrunden (kød og fedt) med både dagslys og UV har en variation (SD/mean) på 0,28. Denne reduceres til ca. 0,08, når dagslyset fjernes, dvs. en forbedret følsomhed blot ved at baggrunden bliver 2-3 gange mere ensartet med UV-belysning alene. Sagt på en anden måde, så fluorescerer de to baggrundsmaterialer fedt og kød ret ens og meget lidt, hvorimod de reflekterer synligt lys i området omkring 450 nm ret forskelligt. Det sidste er naturligvis ikke overraskende, da vi oplever, at kød og fedt har meget forskellig farve.

Ved en så ensartet baggrund er det lettere at se afvigelser fra baggrundens intensitet og dermed opnå en god detektionsevne.



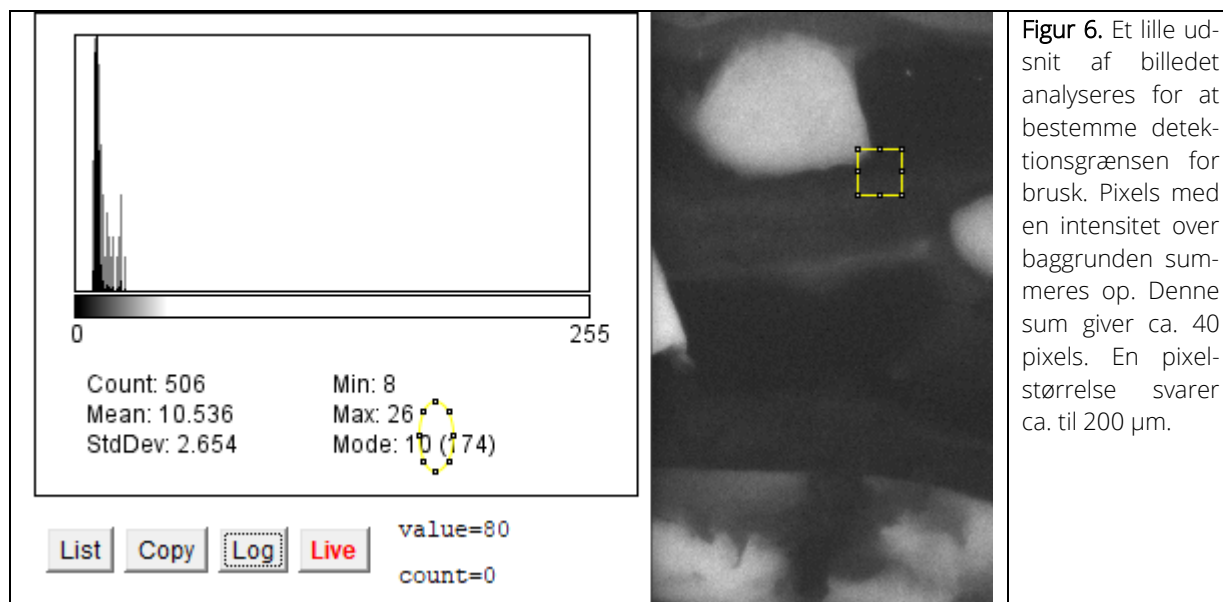
Figur 4. Et eksempel på baggrundens variation overfor UV-A (365 nm) belysning og målt ved en emissionsbølglængde på 450 nm.

En anden måde at vurdere detektionsevnen på er ved at se intensitetsfordelingen for et område med både brusk og baggrund. Denne måling viser, at intensiteten i dette forsøg fra brusk ligger 34 standardafvigelser fra middelværdien af baggrunden, dvs. detektion af brusk med fluorescens giver en meget sikker diskrimination mellem brusk og baggrund, hvilket giver en god detektionsevne. Til sammenligning giver den mere komplicerede to-kanal visionmåling i figur 1 en kontrast på 4-5 standardafvigelser.



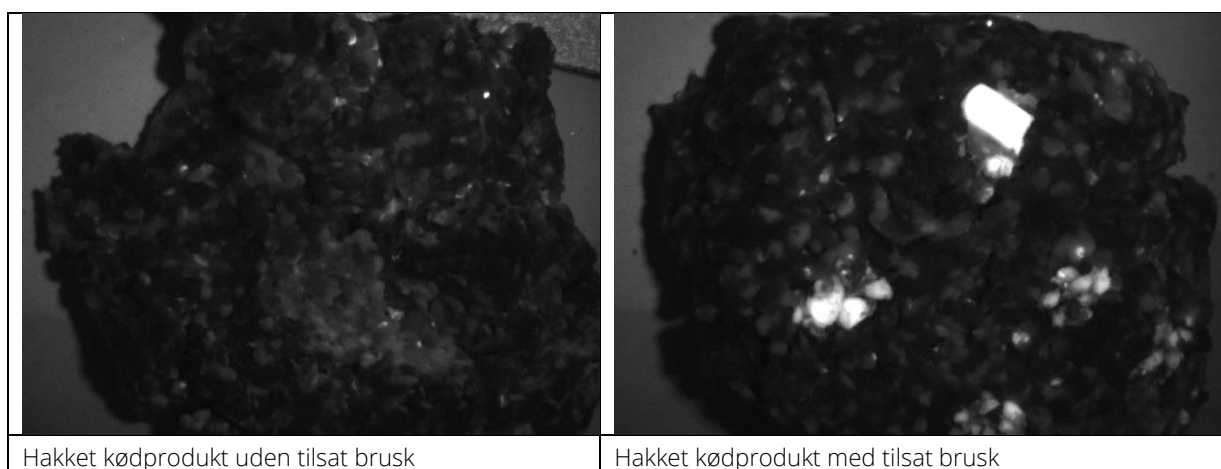
Figur 5. En illustration af den gode kontrast med auto-fluorescens, her vist som intensitetsfordelingen i et område, som både inkluderer baggrund og en vis mængde brusk. Det ses, at signalet fra brusk har en højere standardafvigelse end signalet fra baggrunden. Men på grund af dennes homogenitet kan der detekteres selv ganske små stykker brusk. Det ses også, at middelintensiteten for brusk er placeret med stor afstand til baggrunden.

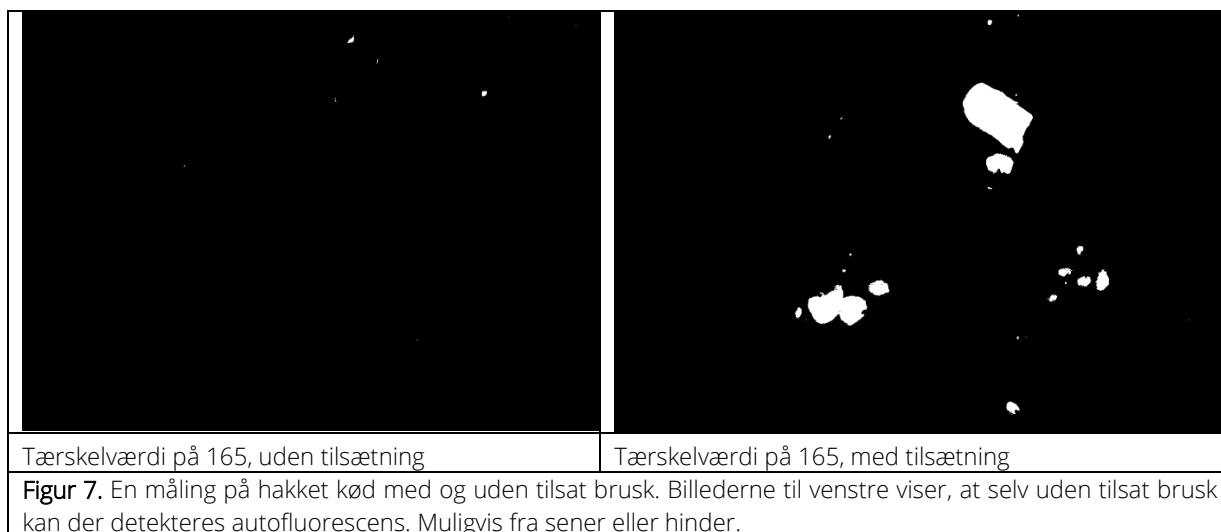
Den store kontrast giver forhåbning om en god detektionsevne. Hvis billedet analyseres med et ca. 5x5 mm område med både baggrund og en lille smule brusk, kan situationen se således ud:



Måleområdet giver anledning til den viste intensitetsfordeling, så en simpel tærskelværdi vil kunne detektere de ca. 10% pixels, der ligger udenfor baggrundsintensiteten. Eller med andre ord: I denne demonstration kan vi detektere bruskstykker på overfladen af kødproduktet med en størrelse på ca. 1 mm^2 .

Et eksempel på det hakkede kød er vist nedenfor. Til venstre et sample uden tilsat brusk og til højre et sample, hvor der er tilsat en del af de hakkede bruskstykker på overfladen af produktet.





Med samme tærskelværdi er begge målinger filtreret for at kunne detektere den tilsatte brusk (th, nederst). Det ses umiddelbart på resultatbilledet af det rene kødprodukt, at der er fundet nogle falske positive (ikke tilsatte) bruskfremmedlegemer. Det samme er tilfældet på produktet, hvor der er tilsat brusk. Mens de fleste tilsatte er fundet, er der yderligere detekteret falske positive.

5. Perspektivering

Den gennemførte undersøgelse af fluorescens-detektion af brusk i kødprodukter har vist lovende resultater. Metoden giver umiddelbart en meget god kontrast mellem brusk og ferske kødprodukter. Dette indikerer, at der kan bygges udstyr, som vil have tilstrækkelig kapacitet til at screene kødråvarer for overfladebrusk under produktionsforhold. De benyttede belysningsforhold kan umiddelbart genskabes i et conveyor-baseret system, der kører med tilstrækkelig hastighed, til at overvåge hakke- og blande-processer. Til sliceprocesser kræves højere målekapacitet fx 1.800 slices/min. eller 1.800 billeder af endeskiven i minuttet svarende til en maksimal integrationstid på 33 ms. En belysning på ca. $140 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ burde være tilstrækkelig jf. resultaterne i denne rapport med en integrationstid på 60 ms og $70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

Den demonstrerede homogenitet af baggrunden åbner for mulig detektion af fx sværrester. Sværen på det benyttede brystflæsk udviser også auto-fluorescens ved de benyttede eksitations-/emissionsbølglængder; blot er intensiteten svagere end tilfældet er for hyalint brusk, så det må forventes, at detektionsevnen er dårligere. Detektion af sværrester kompliceres dog af den heterogenitet, der er i sværen, så det må forventes, at fluorescenssignalet er forskelligt fra sværens over- hhv. underside.

De udførte målinger på hakket kød illustrerer en anden vigtig problemstilling: falske positive. Dvs. detektioner, som ikke skyldes brusk. Disse kan umiddelbart fjernes ved at negligere fund under en vis størrelse. Denne fremgangsmåde kunne være brugbar, da bruskstykker af denne størrelse er vanskelige at



erkende i et færdigt kødprodukt. Men fremgangsmåden vil også sætte en nedre grænse for størrelsen af de rigtige bruskstykker, som kan detekteres. Tærskelværdien på 165 er allerede så høj, at visse af de tilsatte bruskstykker ikke bliver detekteret, selvom de har en betydelig størrelse.

Årsagen til de falske positive detektioner i hakket kød skyldes formentlig, at andre vævstyper end hyalint brusk udviser auto-fluorescens med samme eksitation og emission. Nogle kraftige sener indeholder hydroxylysyl pyridinolin og kan derfor være årsag til den observerede auto-fluorescens. Denne situation kan umiddelbart ikke undgås med den simple detektion af emissionen, som er benyttet ved denne demonstration.

6. Sammenfatning

SAF-projektet "Nye målemetoder til kødindustrien" har i 2021 bl.a. gennemført en demonstration af detektion af overfladebrusk i kødprodukter med fluorescens.

Baggrunden for demonstrationen er, at det ikke med konventionelt detektionsudstyr i dag er muligt at detektere fremmedlegemer af hård brusk, som er uønsket i visse færdige kødprodukter. Fluorescensdetektion er demonstreret som en lovende kandidat til en fremtidig metode til at løse denne opgave.

Naturligt indhold af det stabiliserende (Hydroxylysyl) Pyridinolin i det hårde hyaline brusk i fx fjederben eller bovbladspidser giver mulighed for at adskille dette fremmedlegeme på overfladen af kød-/fedtprodukter med stor sikkerhed.

Metoden er relativt simpel og kan sammenlignes med andre visionsystemer, dog med en betydelig bedre kontrast mellem brusk og produktbaggrund pga. auto-fluorescensen fra Pyridinolin i hård brusk.

Det vurderes, at det er muligt at designe et detektionsudstyr baseret på denne teknik, som kan levere den ønskede detektionsevne (mindre end 1 mm²) med en detektionskapacitet, som svarer til kontrol af ferske råvarer og til slice- og nedskrottningsprocesser til danske produktionsforhold.

Det er også forsøgt at detektere knoglevæv, men uden held. Til gengæld kan detektion af denne vævstype udføres med røntgenudstyr.



TEKNOLOGISK
INSTITUT