



Rapport fra forprosjekt;

Farge pre-rigor røyt laks – avbildende spektroskopi for påvisning av blod og farge

Hovedprosjekt:

”Fargeegenskaper i muskel ved pre-rigor produksjon av røyt laksefilet”

FORPROSJEKTRAPPORT

	<i>Tilgjengelighet:</i> ÅPEN	<i>Rapp. nr.:</i> 2
<i>Tittel</i> Rapport fra forprosjekt; farge pre-rigor røykt laks – avbildende spektroskopi for påvisning av blod og farge	<i>Dato:</i> Januar 2009	
	<i>Antall sider og bilag:</i> 6	
<i>Forfatter(e):</i> Karsten Heia	<i>Prosjektnr.:</i> 20637 / 1155	
<i>Oppdragsgiver:</i> NSS	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> Kristin Lauritzen	
<i>Stikkord:</i> Spektroskopi, blod, farge, fluorescence	<i>Går til:</i> Prosjektdeltakere og arkiv	



Nofima Marin AS

Postboks 6122, NO-9291 Tromsø
Besøksadresse: Muninbakken 9–13
Tlf.: 77 62 90 00, faks: 77 62 91 00
marin@nofima.no
www.nofima.no



Nofima Norconserv AS

Rickard Johnsensgate 4
4021 Stavanger
post.st@nofima.no
www.nofima.no

Innholdsfortegnelse

1	Avbildende spektroskopi for påvisning av blod og farge.....	1
2	Fluorescensmåling av harskning	5
3	Referanser.....	6

1 Avbildende spektroskopi for påvisning av blod og farge

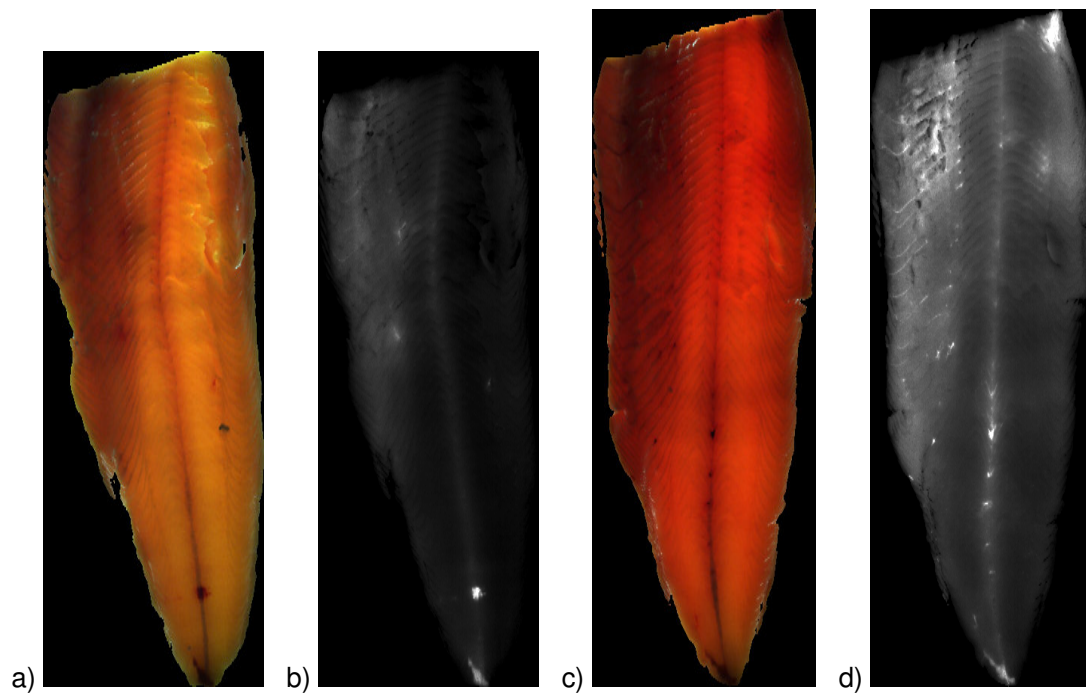
Nær infrarød (NIR) Spektroskopi har vist seg å være en hurtig, ikke-destruktiv og anvendbar teknikk for områder som inkluderer matkvalitet, farmasøytiske anvendelser og petrokjemisk sektor (Blanco and Villarroya, 2002). I løpet av de siste 30 årene har bruken av NIR spektroskopi økt betraktelig innenfor et stort spekter av anvendelser for ulike matkvalitetsparametere (Osborne and Fearn, 1986; Tyholdt and Isakson, 1997; Uddin et al, 2005; Nilsen and Heia, 2008). Det er også publisert et arbeid hvor spektroskopi er anvendt for kvantifisering av blod i fiskemuskel (Olsen et al, 2008). Bruk av spektroskopi for kvantifisering er en indirekte metode slik at den største utfordringen med bruk av spektroskopi for kvantitativ bestemmelse av kjemiske stoffer er behovet for en kjemisk referanse. Modellen som utvikles er aldri bedre enn referansen, men målingen er hurtig og ikke-destruktiv.

Avbildende spektroskopi er en ny måte å analysere innhomogene prøver på. Den baserer seg på å generere et todimensjonalt bilde av objektet hvor hvert piksel i bildet er representert med et lysspekter (Herrala and Okkonen, 1996; Hyvarinen et al., 1998). I motsetning til situasjonen for tradisjonell spektroskopi, som angir et midlere spektrum fra et avgrenset område på prøven, gir avbildende spektroskopi et stort antall spektra fra hele prøven. Når man for eksempel basert på et spektrum kan angi mengde blod i en prøve, kan man basert på avbildende spektroskopi også lokalisere romlig fordeling av blodet.

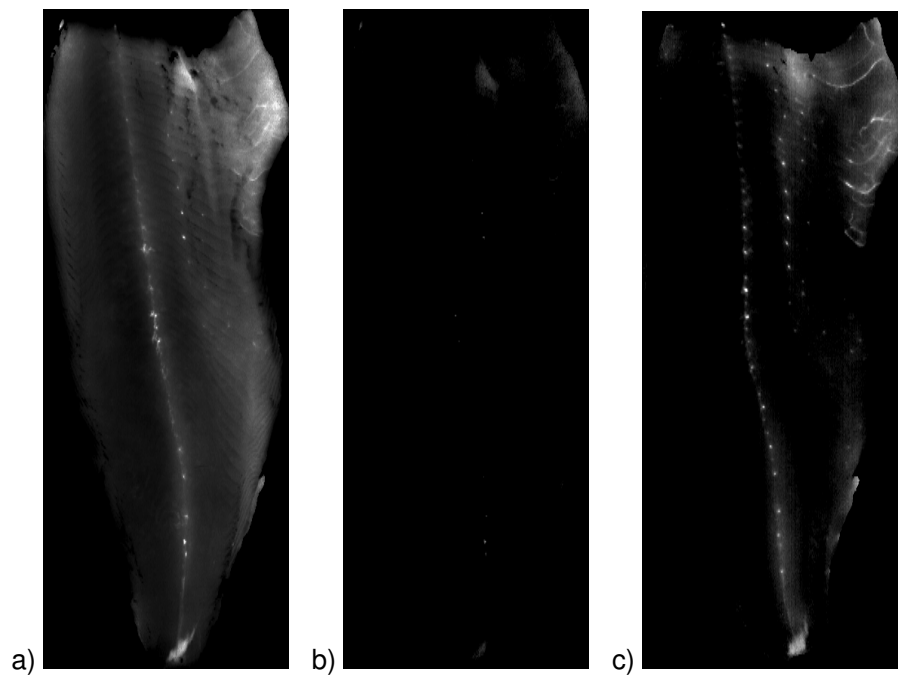
I Figur 1 er det vist noen eksempler fra avbildning av laksefileter. Figur 1a og b vises resultatet av å analysere en godt utblødd laksefilet, mens en dårlig utblødd laksefilet er vist i Figur 1c og d. Gitte bølgelengder brukes for å fremheve blod, og resultatene i Figur 1b og d og kan direkte sammenlignes. Fargebildene derimot kan ikke sammenlignes da de ikke er kalibrert for fargeinformasjon.

Fileten til venstre i Figur 1 er godt utblødd, og forventes å ha lavere blodinnhold enn fileten til høyre som er dårlig utblødd. Dette kommer godt frem i de blodfremhevede bildene. I den godt utblødde fileten (Figur 1a) var det en blodflekk på senterlinjen bak på sporden, og den kommer godt frem i det blodfremhevede bildet (Figur 1b) Vi har ikke i dette forsøket brukt noen kjemisk referanse til å verifisere disse resultatene for fersk filet, men visuell inspeksjon samsvarer med instrumentell måling og analyse. Forsøk med innplassering av blod i fersk filet viser at blodflekker lokalisert ned til ca 1 cm er synlig i de blodfremhevede bildene.

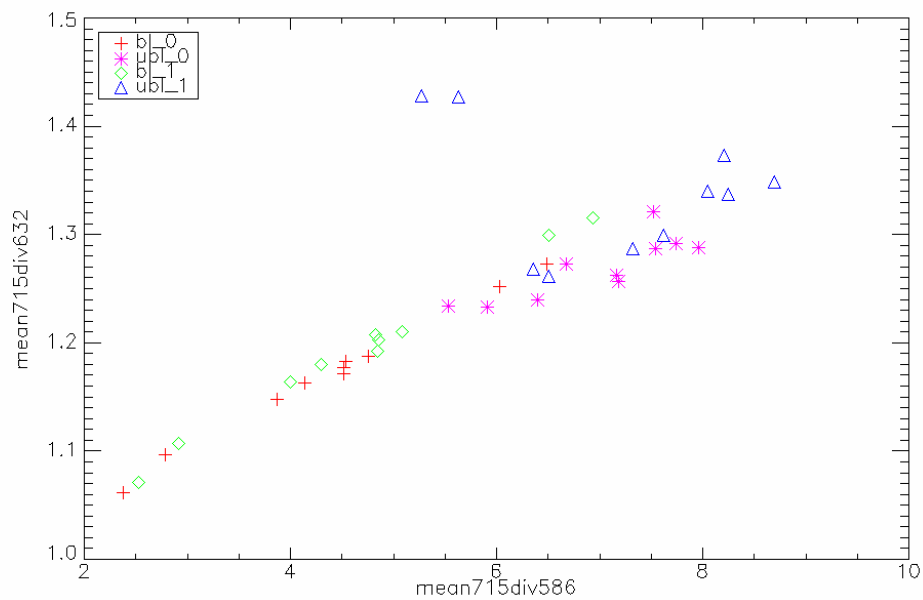
10 lakser (5 godt og 5 dårlig utblødde) ble filetert og målt. Deretter ble filetene lagt på is og dekket med plast før de ble målt på nytt et døgn senere. I Figur 2 vises blodfremhevingsbilder av samme filet (dårlig utblødd) avbildet med et døgns mellomrom. Figur 2a viser hemoglobinfremhevet bilde på dag 0, mens Figur 2b og c viser med hemoglobinfremhevet bilde på henholdsvis dag 0 og 1. Det er tydelig ut fra dette eksemplet at en oksidasjonsprosess har foregått siden analysen tilsier at det er betraktelig mer med hemoglobin i fileten på dag 1. Figur 3 viser hvordan midlere med hemoglobinverdi og hemoglobinverdi skiller seg mellom godt utblødde og dårlig utblødde laksefileter. Det er en viss overlapp mellom godt og dårlig utblødde fileter, men visuell inspeksjon viste at mengde blod kunne være ganske likt mellom gruppene. To av filetene skiller seg ut på dag 1 med en forhøyet midlere med hemoglobinverdi. En av disse filetene ble vist i Figur 2. Dette illustrerer at hvor fort oksidering opptrer avhenger av flere faktorer, men at denne metoden kan påvise om oksidering har startet.



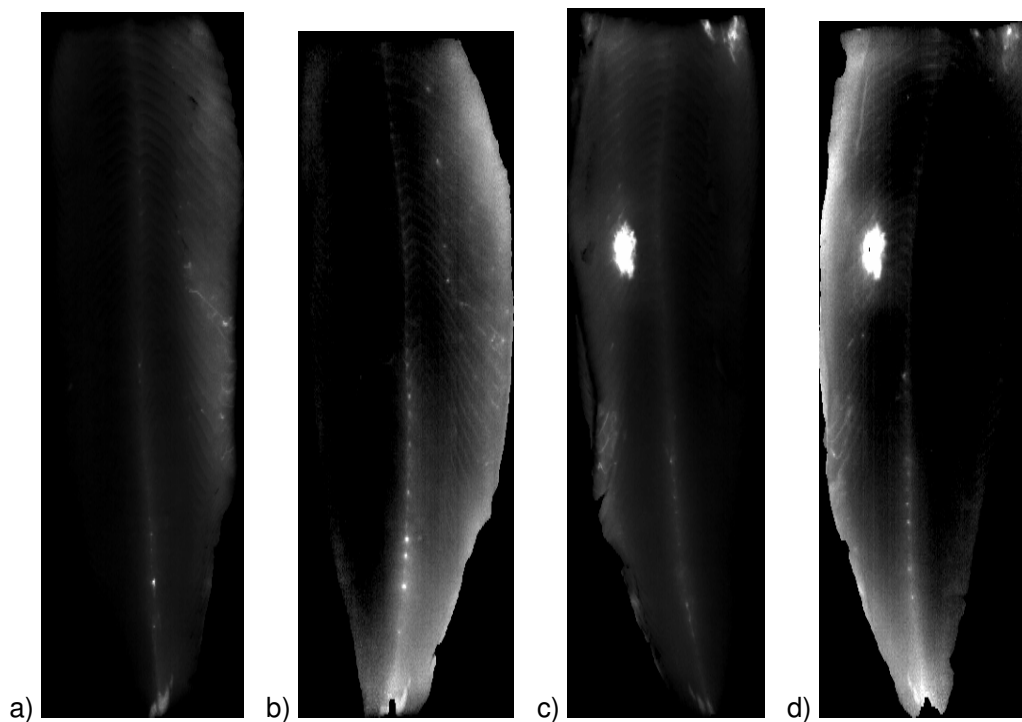
Figur 1. a) og c) viser kunstige fargebilder av laks generert fra avbildende spektroskopi data for tre bølgelengder, mens b) og d) viser tilhørende resultat av å anvende blodfremhevingsalgoritmene på spektroskopidata vist i a) og c).



Figur 2. Blodfremhevede bilder av samme laksefilet avbildet to påfølgende dager. a) og b) viser blodfremhevede bilder av filet på dag 0 og 1 basert på fremheving av henholdsvis hemoglobin og met hemoglobin, mens c) viser met hemoglobinfremhevet bilde målt på dag 1.



Figur 3. Midlere met hemoglobin verdi i bukklapp plottet mot midlere hemoglobin verdi i bukklapp for fileter fra bløggede og ubløggede lakser målt på dag 0 og 1.

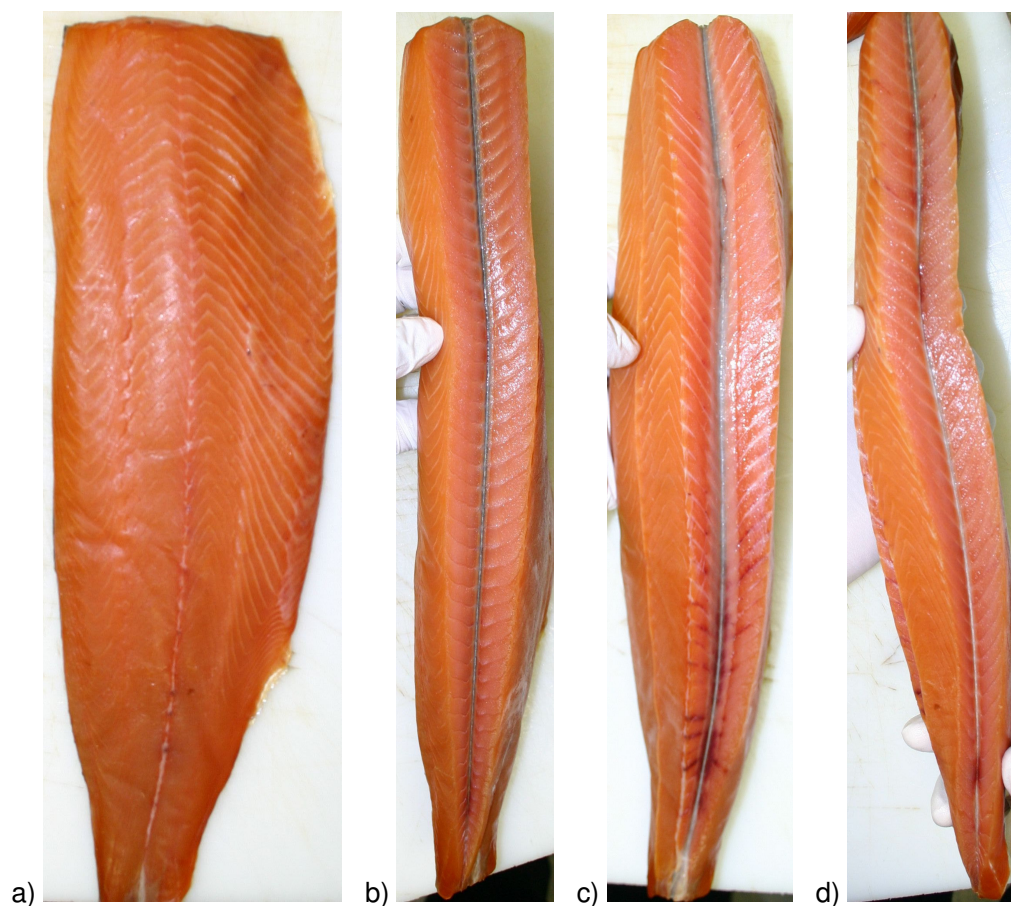


Figur 4. a) og b) viser blodfremhevede bilder for venstrefileten hhv før og etter salting/røyking, men c) og d) viser tilsvarende bilder for høyrefileten.

Etter røyking av fileten forventes blodet å oksidere og relativ mengde met hemoglobin vil øke. For å teste hvordan metoden egner seg for måling av met hemoglobin ble fire lakser (to godt utblødde og to dårlig utblødde) filetert og saltet/røkt. Filetene ble målt både som ferske og etter røyking. Det viste seg at de laksene som skulle være dårlig utblødd ikke var det likevel. Derfor var alle laksene av relativ god tilstand. I Figur 4 vises blodfremhevede bilder av filetene til den ene laksen som hadde blod i muskulaturen. Figur

4a og b viser de blodfremhevede bildene for venstrefileten hhv før og etter salting/røyking, mens Figur 4c og d viser tilsvarende for høyrefiletten.

For blodfremheving i de ferske filetene ble andre bølgelengder anvendt enn ved blodfremheving i røykte fileter. Dette medfører at bildene ikke kan sammenlignes direkte, men det er tydelig at blod fremhevet i filet som fersk også er synlig etter salting/røyking.



Figur 5. Digital bilde av røkt filet som er vist blodfremhevet i Figur 2 b). Overflaten til filet er vist i a), men b), c) og d) viser henholdsvis snittflaten i tykkfisken, senterlinjen og bukklappen.

I Figur 5 vises bilder av tre ulike snitt på langs av fileten til venstre i Figur 4. Det var vanskelig å se blod på overflaten av den røykte fileten (Figur 5a). Vi kunne kun se noe få punkter bak på senterlinjen, og to punkt fremme på bukklappen. Snittene i den røykte fileten (Figur 5b-d) viste derimot at det ikke var blod i tykkfisken, ganske mye blod langs senterlinjen og litt blod i bukklappen. Blodet lå til dels et stykke ned i fileten noe som forklarer hvorfor det ikke var synlig på overflaten av fileten. Sammenlignes disse funnene med det blodfremhevede bildet (basert på met hemoglobin bølgelengder) i Figur 4b er det en klar sammenheng.

I en annen røkt filet var det en blodflekk lokalisert 16 mm ned i fileten. Denne var det ikke mulig å påvise verken visuelt eller i det blodfremhevende bildet. Dette underbygger resultatene fra ferske fileter om at blod som ligger dypere enn 10 mm ikke kan påvises med valgt avbildningsgeometri.

2 Fluorescensmåling av harskning

Fluorescens er definert som et objekts eller en partikkels evne til å sende ut lys (emittere) på høyere bølgelengder enn det objektet/partikkelen blir belyst med (eksitert) (Gunasekaran, 2001). Metoden har vist seg som en egnet metode for hurtig og ikke destruktiv måling av harskning i fjærkre og meieriprodukter (Wold, 2000; Veberg et al., 2006a,b,c) og klippfisk fra seifilet (Sivertsen et al., 2006). Det man normalt måler er fluorescerende forbindelser som dannes etter reaksjoner mellom sekundære oksidasjonsprodukter (for eksempel aldehyder) og ulike aminosyrer og makromolekyler. Noen av disse fluorescerende forbindelsene er gulaktige på farge. De er spesielt fremtredende i klippfisk der gulning kan være et tegn på harskning. Fluorescens er en meget sensitiv metode og kan utgjøre en hurtigmetode for påvisning av harskning i laksefilet. Vi har ingen forsøk som kan underbygge denne påstanden, men har teknologien og algoritmene som skal til for å teste dette ved anledning.

3 Referanser

- Blanco, M. and Villarroya, I. (2002). NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool, *Trends in analytical chemistry*, 21(4), 240-250.
- Gunasekaran, S. (2001). *Nondestructive Food Evaluation: Techniques to Analyze Properties and Quality*, Marcel Decker, New York, USA.
- Herrala, E. and Okkonen, J., (1996) Imaging spectrograph and camera solutions for industrial applications, *International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence*, 10:43-54.
- Hyvarinen, T.S., Herrala, E., and Dall'Ava, A., (1998). Direct sight imaging spectrograph: a unique add-in component brings spectral imaging to industrial applications, in *Digital Solid State Cameras: Designs and Applications*, Williams, G.M. Jr. ed., Proc. SPIE 3302, 165-175.
- Nilsen, H.A. and Heia, K., Quality and safety assessment by VIS/NIR spectroscopy, in *Fishery Products: Quality, Safety and Authenticity*, Oehlenschläger, J. and Rehbein, H. Eds., Blackwell Publishing. In press.
- Olsen, S.H., Sørensen, N.K., Larsen, R., Elvevoll, E.O. and Nilsen, H. (2008). Impact of pre-slaughter stress on residual blood in fillet portions of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) – Measured chemically and by Visible and Near-Infrared spectroscopy. *Aquaculture*, 284(1-4), 90-97.
- Osborne, B.G. and Fearn, T. (1986). *Near infrared spectroscopy in food analysis*. Longman Scientific & Technical., 200 p.
- Sivertsen, A.H., Lauritzsen, K., Veberg, A. and Wold J.P. (2006). Rapid assessment of storage quality of cliff-fish from saithe by fluorescence spectroscopy. In *Seafood research from fish to dish*. (Eds. J.B. Luten, C. Jacobsen, K. Bekaert, A. Sæbø and J. Oehlenschläger). Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
- Thyholdt, K. and Isakson, T. (1997). Differentiation of frozen and unfrozen beef using near-infrared spectroscopy, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(4), 525-532.
- Uddin, M., Okazaki, E., Turza, S., Yumiko, Y., Tanaka, M. and Fukuda, Y. (2005), Non-destructive Visible/NIR Spectroscopy for Differentiation of Fresh and Frozen-thawed Fish, *Journal of Food Science*, 70(8), C506-C510.
- Veberg, A., Vogt, G and Wold J.P (2006a). Fluorescence in aldehyde model systems related to lipid oxidation, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 39, pp. 562–570.
- Veberg, A., Olse, E., Vogt, G., Mielnik, M., Nilsen, A.N. and Wold J.P. (2006b). Front face fluorescence spectroscopy – a rapid method to detect early lipid oxidation in freeze stored minced turkey meat. *J. Food Science*, 71(4), S364-S370.
- Veberg, A., Sørheim, O., Moan, J., Iani, V., Juzenas, P., Nilsen, A.N. and Wold J.P. (2006c). Measurement of lipid oxidation and porphyrins in high oxygen modified atmosphere and vacuum-packed ground turkey and pork meat by fluorescence spectra and images. *Meat Science*, 73(3), 511-520.
- Wold, J. P. (2000). Rapid quality assessment of meat and fish by using near-infrared spectroscopy, auto-fluorescence spectroscopy and image analysis, Ph.D Thesis, Agricultural University of Norway.