

Kvalitetsavvik sildefilet

Spektroskopisk karakterisering av blodinnhold

Karsten Heia, Bjørn Dissing, Svein Kristian Stormo og Stein Harris Olsen





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 400 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra, Averøy og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
NO-5141 Fyllingsdalen

Sunndalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
Faks: 64 97 03 33
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA

Rapport

		ISBN: 978-82-8296-086-1 (trykt) ISBN: 978-82-8296-087-8 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Kvalitetsavvik sildefilet Spektroskopisk karakterisering av blodinnhold		<i>Rapportnr.:</i> 22/2013
		<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Karsten Heia, Bjørn Dissing, Svein Kristian Stormo og Stein Harris Olsen		<i>Dato:</i> 06. mai 2013
<i>Avdeling:</i> Sjømatindustri		<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 8
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond		<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 900518
<i>Stikkord:</i> Blodinnhold, sild, spektroskopi		<i>Prosjektnr.:</i> 1202
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> <p>Gjennom spektrofotometriske målinger av hemoglobin i fiskemuskel og avbildende spektroskopi er tre ulike grupper med flekket sild studert for å avdekke hvordan pumpetrykk påvirker mengde restblod i silden. Effekten på mengde restblod ble studert for tre ulike pumpetrykk, 80, 120 og 160 bar. Resultatene viste at det var signifikant mer restblod i filetene hvor pumpetrykket var 160 bar og at variasjonen innad i hver gruppe var veldig stor.</p>		
<i>English summary/recommendation:</i> <p>A study of the effect of pumping pressure on residual blood in herring was carried out. The amount of residual blood was quantified by photo spectroscopic measurements of hemoglobin content and imaging spectroscopy. The effect was documented for three different pumping pressures, 80, 120 and 160 bars. The results showed significantly higher blood content in herring pumped at 160 bars as compared to the other groups. There was high variation in blood content within each group.</p>		

Innhold

1	Bakgrunn	1
2	Material og metode	2
2.1	Råstoff	2
2.2	Spektrofotometrisk måling av hemoglobin i fiskemuskel	2
2.3	Avbildende spektroskopi	2
2.4	Dataanalyse	3
3	Resultater	5
3.1	Spektrofotometrisk måling av hemoglobin i sildemuskel	5
3.2	Estimert blodinnhold basert på hyperspektral avbildning	5
4	Konklusjon	7
5	Referanser	8

1 Bakgrunn

Innenfor prosjektet «Kvalitetsavvik sildefilet», som er finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF), var det definert en aktivitet som gikk på spektroskopisk karakterisering av sildefilet utsatt for ulikt pumpetrykk. Målsettingen var å kunne karakterisere mange fileter innenfor hver gruppe og basert på spektroskopiske målinger estimere blodinnholdet i hver filet. På denne måten kan ulike behandlinger sammenlignes og eventuelle forskjeller i blodinnhold påvises.

2 Material og metode

2.1 Råstoff

NVG sild ble fanget med not i desember 2012. Fisken ble pumpet om bord med 3 forskjellige trykk, henholdsvis 80, 120 og 160 bars. Fisken ble deretter kjølt i RSW-tanker før den ble levert etter 2 dager til Austevoll Fiskeindustrier. Deretter ble fisk av hver gruppe pakket, fryst og sendt til Nofima i Tromsø. Det vil si at den eneste forskjellen i behandlingen som disse sildene har vært utsatt for er ulikt pumpetrykk. Sildene ble så tatt ut av frysen og tint i kasser på kjølerom i 2 døgn før spektroskopimålinger ble gjennomført. Etter at spektroskopien var utført ble 10 fileter tilfeldig valgt ut fra hver kasse for spektrofotometrisk måling av hemoglobinkonsentrasjon.

2.2 Spektrofotometrisk måling av hemoglobin i fiskemuskel

En metode som er rask, enkel og relativt sikker er Hornsey's hem-jern metode (Hornsey, 1956), beskrevet av Carpenter og Clark (1995). Metoden går ut på å omdanne hemoglobinet til et stabilt fargepigment ved hjelp av kjemikalier (Aceton og saltsyre). Hemgruppen i hemoglobinet blir omdannet til surt hematin (Fe^{2+} til Fe^{3+}), som gir et stabilt fargepigment. Et fargepigment har sitt spesielle område hvor lys absorberes og hemjern metoden måler på vannløselige hematinkomponenter ved 512 og 640 nm.

Framgangsmåte:

- Tre paralleller på 5.0 gram muskel veies inn i 50 ml sentrifugerør (En prøve med 4,5 ml destillert vann brukes som blankprøve)
- Vannmengde i 5 gram beregnes muskel og tilsett mer vann til hver prøve, slik at den totale vannmengden blir 4,5 ml (vann i muskel + tilsatt vann = 4,5 ml)
- Tilsett deretter 20,5 ml surt aceton til hver prøve
- Blandingen homogeniseres og settes i kjøleskap i en time for å sikre at hemoglobinet skal omdannes til surt hematin
- Blandingen filtreres deretter gjennom en Whatman filterpapir (No 1)
- Etter filtrering avleses absorbansen til supernatanten ved 640 nm eller 512 nm. NB! Ved måling på fet fisk kan fett påvirke målingene, ved at det skapes blakking av filtratet. Hvis så skjer, må prøven filtreres på nytt
- Hemoglobinmengden i muskelprøven beregnes ved hjelp av standardkurven

2.3 Avbildende spektroskopi

Instrumenteringen består av en transportbåndmodul fra Baader, et avbildende spektrometer fra Norsk Elektro Optikk og en spesialtillaget lyskilde. Transportbandet går med en hastighet på 40 cm/s og det avbildende spektrometeret avbilder en stripe på tvers av transportbandet 400 ganger i sekundet. Slike etterfølgende striper settes sammen i datamaskinen til et hyperspektralt bilde. Bildet har en romlig oppløsning på 0.5 mm x 1.0 mm, der hvert piksel kan representeres med et spekter som beskriver energifordeling til lyset med 10 nm oppløsning i området 400–1000 nm. Måleoppsettet refereres til som interaktans der to lyslinjer projiseres ned på prøven, en på hver side av stripen som måles. Ved å projisere lyslinjene ned på prøven i en avstand fra målestripen unngås

det at refleksjoner fra overflaten blir målt. Alt lyset som registreres fra stripen som avbildes har beveget seg inne i fisken mellom belysningsstripene og målestriben. Dette illustreres veldig godt i Figur 1 som viser en laksefilet som ligger inne i maskinen slik at begge lysstripene er på fileten. Årsaken til at fileten lyser opp rundt de kraftige lysstripene er lys som har vært inne i fileten og kommer ut igjen.



Figur 1 Laksefilet med projiserte lyslinjer som viser interaktansoppsettet. Spektrografen registrerer hvor mye lys som kommer ut av fileten midt mellom lysstripene.

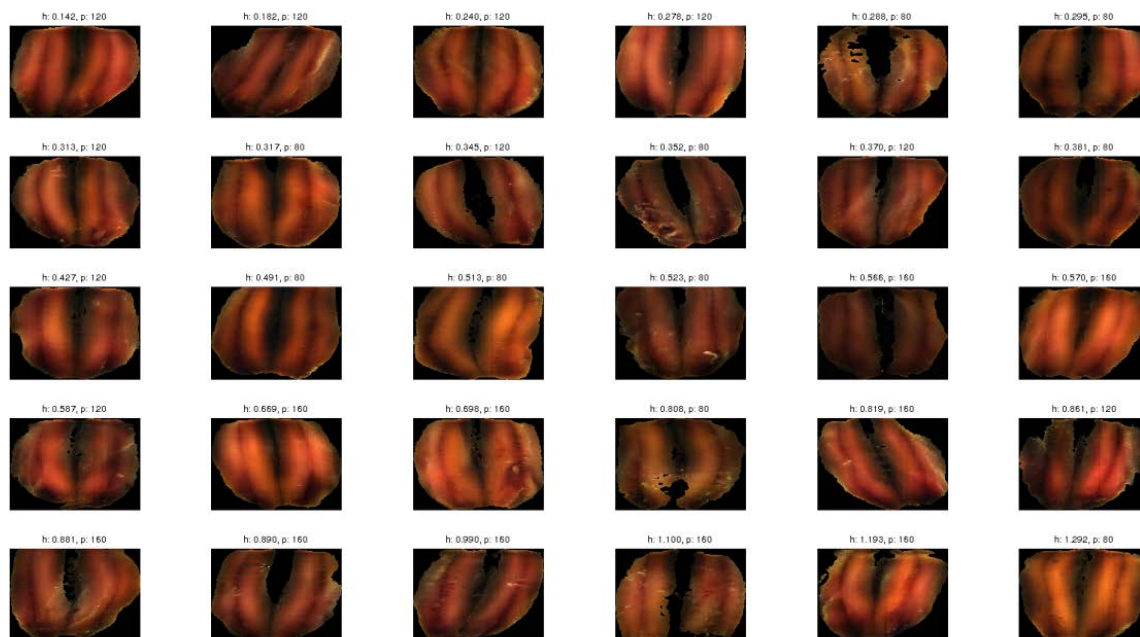
På denne måten får vi en måling av innsiden av fileten, ikke bare overflaten, og målemetoden kan brukes på fileter både med og uten skinn.

2.4 Dataanalyse

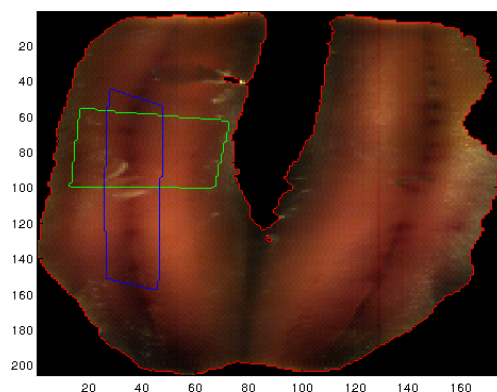
I alt 128 sildefileter ble avbildet spektroskopisk. Av de 128 filetene ble 30 analysert for hemoglobininnhold ved hjelp av Hornsey's hem-jern metode. For å evaluere hvorvidt spektroskopi kan brukes for å måle hemoglobininnholdet i sildefiletene ser vi etter sammenhenger mellom de to metodene. Dette er ikke enkelt, og for å gi et overblikk over datasettet er det i Figur 2 vist RGB-bilder av de 30 filetene hvor hemoglobininnholdet ble målt sortert fra minst til mest hemoglobin. I øvre venstre hjørne vises den fileten med minst målt hemoglobininnhold, mens den med høyest målt hemoglobin er vist i nedre høyre hjørne.

For å kunne sammenligne de to teknikkene trekkes det ut «egenskapsvektorer» fra de målte bildene. Dette er forsøkt gjort i forskjellige områder på fisken. Da det var en del av venstrefileten som ble brukt til Hornsey's analyse har vi ekstrahert egenskapsvektorer til videre prediksjon fra samme filet. Figur 3 viser 3 ulike typer masker som er forsøkt brukt.

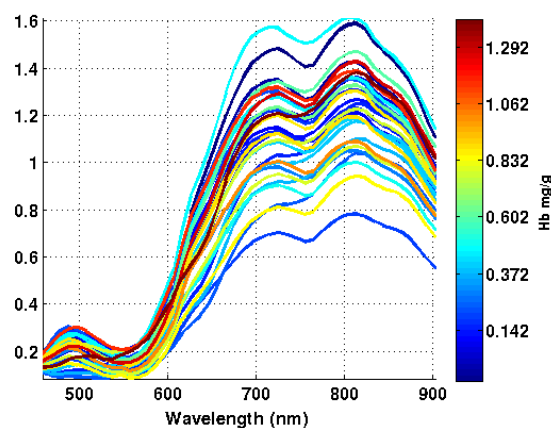
Umiddelbart er det vanskelig å se en sammenheng mellom RGB-bildene og de målte hemoglobin-verdiene, hvilket også er indikert i Figur 4 hvor middelspektre fra alle 30 sildefileter er vist og farvet etter hemoglobininnhold. En årsak kan være at tykkelsen på sildefiletene har for stor innflytelse på målingene og dermed ødelegger signal- til støyforholdet. Vi har forsøkt å kompensere for denne tykkelsesvariasjon ved å forprosessere bildene. Metodene som er forsøkt brukt til forprosessering er standard normal variate (SNV) og Savitzky Golay's glatting og derivasjon, samt enkel middelveidisentrering.



Figur 2 RGB-representasjon av de 30 filetene med målt hemoglobinnhold.



Figur 3 Masker som er forsøkt brukt til å generere egenskapsvektorer til prediksjonsalgoritmene

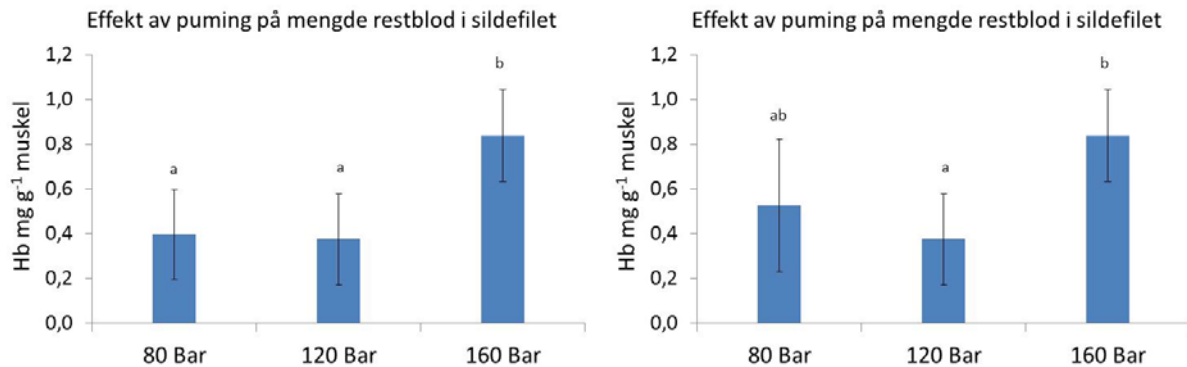


Figur 4 Middelspektrum fra hver av de 30 sildefiletene (det er midlet over begge filetene)

Forprosesseringsmetodene ble evaluert ved å lage scoreplotts og å bruke forprosesserte spektre i prediksjonsmodellene, men ingen av de undersøkte metodene forbedret ytelsen. Av de egenskapsvektorene vi har forsøkt å bruke har vi ikke funnet noen som er markant bedre enn enkle middelveier trukket ut fra den grønne konturen i Figur 3.

3 Resultater

3.1 Spektrofotometrisk måling av hemoglobin i sildemuskel

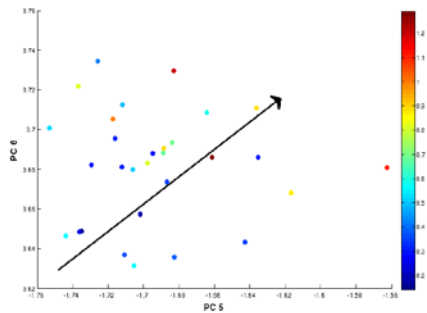


Figur 5 Hemoglobin i muskel på sild pumpet med 80, 120 og 160 bars trykk. a) utelatt en uteligger i analysen $n=[9, 10, 10]$ og b) alle filetene med, $n=[10, 10, 10]$.

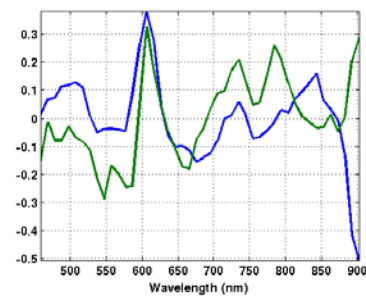
Når det gjelder mengde hemoglobin i sildemuskelen, ser det ut til at pumpetrykket påvirker konsentrasjonen i muskel, men det var stor variasjon innad i enkelte gruppene. En del av variasjonen kan komme av stor individforskjell med tanke på stress og påvirkning under fangst, noe som kan bidra til økt blodmengde i muskel. I gruppen med filet som ble utsatt for 80 bar pumpetrykk, var det en uteligger med tanke på restblod. Denne uteliggeren bidro til stort standardavvik og ulik varians, sammenlignet med 120 og 160 bars-gruppene. En Dunnetts test ble derfor benyttet til å predikere mulige signifikante forskjeller mellom gruppene. Vi fjernet først uteliggeren fra 80 bars-gruppen (Figur 5a), før vi gjennomførte statistikkberegning av data. Vi ser da at 80 ($n=9$) og 120 ($n=10$) bars pumpetrykk medfører signifikant ($P<0.05$) lavere hemoglobin i muskelen, sammenlignet med sild som ble pumpet ved 160 ($n=10$) bar. Når uteliggeren fra 80 bars-gruppen inkluderes i datamaterialet, ser vi ingen signifikante forskjeller ($P=0.055$) i hemoglobinnivået i muskel mellom 80 og 160 bar (Figur 5b). Uansett, med tanke på forskjell i hemoglobinmengde i muskel hos sild som ble pumpet ved 120 og 160 bars trykk, kan vi konkludere med at lavere pumpetrykk kan redusere rødfargen i muskel hos sild.

3.2 Estimert blodinnhold basert på hyperspektral avbildning

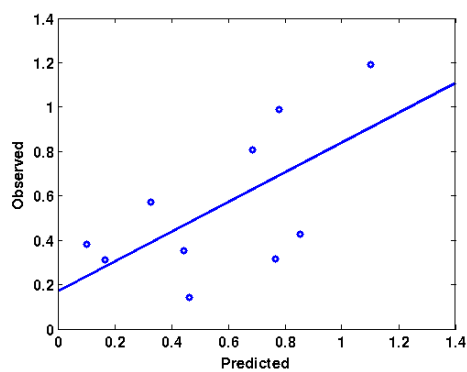
Prediksjon av hemoglobin i sildefilet med utgangspunkt i hyperspektral avbildning har ikke gitt tilfredsstillende resultater. PCA plots, Figur 6, hvor de 30 prøvene er vist som scores er farget etter hemoglobinninnhold, viser en svak tendens i 5 og 6 principal komponent. Loadings for disse to variasjonsretninger viser topper omkring 600 nm, vist i Figur 7. En PLS-modell basert på samme egenskaper med 7 komponenter funnet ved trening på 20 observasjoner og evaluert på 10 observasjoner er i stand til å prediktere hemoglobinninnholdet med en RMSEP på 0.269. Denne modellen vises i Figur 8. Brukes denne modellen til å prediktere de resterende 98 spektrale bildene fås en hemoglobinfordeling som vist i Figur 9. Det ses at det er negative verdier hvilket skyldes usikkerhet i modellen. Utslagene er store hvilket noe som tyder på en svak modell. Bruk av T-tester indikerer at det kun er signifikant forskjell mellom gruppene 80 og 120 bar på et 5 %-nivå. Som beskrevet over ble også uteliggere forsøkt fjernet, men det hadde ikke stor innflytelse på resultatet.



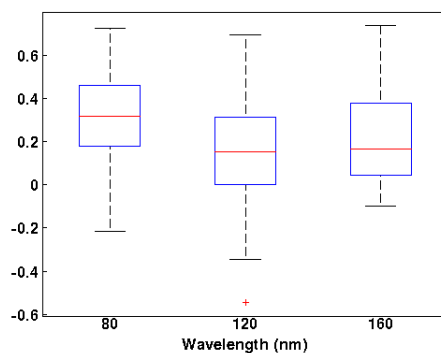
Figur 6 PCA av SNV forprosessert data. 5. og 6. komponent indikerer en mulig tendens



Figur 7 Principalkomponent, 5 og 6 loadings. Disse har begge en positiv top omkring 600 nm. og en kontrast ved 900 nm



Figur 8 Nøyaktighet til PLS-prediksjoner av et ukjent testsett på 10 observasjoner, tatt ut av de 30 målinger vi har analysert.



Figur 9 Estimert hemoglobinnhold fordelt på de 3 gruppene med fisk 80, 120 og 160 bar for de 98 filetene som kun ble målt ved spektroskopisk avbildning

Der er altså indikasjoner for at det kan la seg gjøre å måle hemoglobinnhold ved hjelp av interaktansspektroskopi, men usikkerheten er stor og det vil kreve flere målinger for å avgjøre hvor nøyaktig hemoglobinnholdet kan måles basert på interaktansspektroskopi.

4 Konklusjon

Basert på spektrofotometrisk måling av hemoglobinnhold på 30 fileter er det tydelig at det er signifikant mer blod i silden som ble pumpet på 160 bar sammenlignet med de to andre gruppene. Variasjonen innad i gruppene er stor. Det å kun ha 10 fileter fra hver gruppe som utgangspunkt for modellering av spektroskopimålingene viste seg utilstrekkelig, men resultatene viser at det er sannsynlig at et større prøvemateriale kunne gitt mer nøyaktige målinger av hemoglobin basert på spektroskopidataene. Den største utfordringen for spektroskopimålingene er knyttet til tykkelse på filetene. Sildefileter er mye tynnere enn torskefileter som måleoppsettet er optimalisert for.

5 Referanser

- Carpenter, C.E. & E. Clark (1995). Evaluation of methods used in meat iron analysis and iron content of raw and cooked meats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**: 7, pp. 1824–1827.
- Hornsey, H.C. (1956) The colour of cooked cured pork. I.-Estimation of the Nitric oxide-haem pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **7**: 8, pp. 534–540.

