

Verkefnaskýrsla Rf
03 - 06



Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins

Mars 2006

**NOTKUN FISKPRÓTEINA Í FLAKAVINNSLU
MYNDGREINING**

**Guðrún Anna Finnbogadóttir
Þóra Valsdóttir
Sigurjón Arason
Kristín Anna Þórarinsdóttir**



<i>Titill / Title</i>	Notkun fiskpróteina í flakavinnslu. Myndgreining		
<i>Höfundar / Authors</i>	Guðrún Anna Finnbogadóttir, Þóra Valsdóttir, Sigurjón Arason Kristín Anna Þórarinsdóttir		
<i>Skýrsla Rf / IFL report</i>	1624	<i>Útgáfudagur / Date:</i>	Mars 2006
<i>Verknr. / project no.</i>			
<i>Styrktaraðilar / funding:</i>	AVS, Tækniþróunarsjóður Rannís		
<i>Ágrip á íslensku:</i>	<p>Í þessu verkefni var lagt mat á notkun myndgreiningar til aðgreiningar á milli sprautaðra og ómeðhöndlaðra flaka. Flök voru sprautuð með smækkuðum vöðva og/eða saltþækli.</p> <p>Sprautun veldur því að flatarmál frumna eykst. Þá litast umfrymisvökvi frumna á annan hátt í sprautuðum flökum en ósprautuðum. Þegar próteinum er sprautað í fiskvöðva má sjá flyksur, sem líklega eru vöðvaþræðir, í umfrymisvökvanum. Niðurstöður benda til þess að unnt sé að nota myndgreiningu til að greina á milli sprautaðra og ósprautaðra flaka.</p>		
<i>Lykilorð á íslensku:</i>	<i>Myndgreining, sprautun, viðbætt prótein</i>		
<i>Summary in English:</i>	<p>The application of microstructure analysis for discrimination between injected and non-injected fillets was evaluated. Fillets were injected with minced muscle and/or saltbrine.</p> <p>Injection resulted in increased area/size of cells and different staining of the external cellular fluid. When the injection brine included proteins, flakes that probably are muscular fibers, were observed in the external cellular fluid.</p> <p>The results indicate that it is possible to use microstructure analysis to distinguish between injected and non-injected fillets.</p>		
<i>English keywords:</i>	<i>Microstructure analysis, injection, added proteins</i>		

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	1
2. FRAMKVÆMD.....	3
Hráefni.....	3
Aðferð við myndgreiningu	4
3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐA	5
Marningur og próteinblanda.....	5
Samanburður á flakapörum	6
4. ÁLYKTANIR	9
5. ÞAKKARORÐ	10
6. HEIMILDIR.....	11
7. VIÐAUKI.....	12

1. INNGANGUR

Á undanförunum árum hefur það fæst í vöxt að bæta próteinum og aukefnum í sjávarafurðir í þeim tilgangi að auka nýtingu þeirra, bæta gæði (s.s útlit, bragð, draga úr örveruvexti) eða hafa áhrif á aðra eiginleika. Samhliða þessari þróun hefur þrýstingur frá kaupendum og neytendum sjávarafurða aukist um merkingarskyldu slíkra vinnsluáferða. Til þess að unnt sé að fylgja eftir reglum um merkingarskyldu þarf að vera unnt að greina hvort og þá hvernig varan hefur verið meðhöndluð.

Matvælarannsóknir Keldnaholti (MATRA) hafa síðastliðin ár byggt upp góða aðstöðu til smásjárrannsókna á matvælum. Tilgangur þessara rannsókna hefur verið að skilja betur breytingar sem verða á eðli og útliti matvöru, t.d. við geymslu og vinnslu. Oft er nauðsynlegt að gera mælingar á smásjármyndum til að átta sig betur á þeim breytingum sem eiga sér stað og er slík úrvinnsla almennt nefnd smásæ greining eða myndgreining. Þessi tækni hefur meðal annars verið notuð til að kanna breytingar á þorski við saltfiskvinnslu, greina gerð og hlutföll mismunandi vöðvaþráða í hrygg- og lærvöðvum sauðfjár, kanna dreifingu sojapróteina í farski og til að bera kennsl á óþekkt efni eða aðskotaefni (Guðmundur Örn Arnarson, 2002). Rannsóknir á hegðun viðbættra fiskpróteina í vöðva með myndgreiningartækni hafa ekki áður verið framkvæmdar að neinu ráði.

Vinnsla á tæknilegum próteinum úr sjávarfangi til íblöndunar í matvæli er almennt skammt á veg komin. Hugsanlegt er að í framtíðinni verði prótein, sem unnin eru úr sjávarfangi, framleidd sem íblöndunarefni. Próteinunum yrði síðan hægt að koma aftur inn í vinnslukeðjuna og væntanlegar söluafurðir til að bæta nýtingu og auka verðmæti vannýtttra afurða, hvort sem um er að ræða ákveðnar fisktegundir eða aukahráefni sem falla til við vinnslu sjávarfangs.

Algengasta leiðin til að koma próteinum aftur í fiskvöðva er sprautun og með því móti næst einnig besta dreifingin. Sprautun leiðir til ákveðinnar þyngdaraukningar en eiginleikar próteinanna og önnur samsetning þækils hefur síðan áhrif á hversu vel

viðbættu próteinin og vatn ná að bindast í vöðvanum. Saltstyrkur getur skipt miklu máli m.t.t. bindieiginleika og vatnsheldni vöðvapróteina.

Áhrif af notkun fiskpróteina hafa þegar verið rannsökuð að nokkru leyti. Sýnt hefur verið fram á að prótein úr skelfiski geta dregið úr neikvæðum breytingum á próteinum í fiski (lizard fish (*Saurida wanieso*)) við frystingu og aukið vatnsbindingu (Darmanto o.fl., 1997b). Sýnt var fram á jákvæð áhrif við þurrkun afurða, vatnsvirkni minnkaði og hlutfall þess vatns sem var bundið í vöðvanum jókst (Darmanto o.fl., 1997a). Einnig hefur verið sýnt fram á að aukinn vatnsbindieiginleiki af völdum viðbættra laxapróteina geti dregið úr dripi í laxi við þíðingu (Kristinsson og Rasco, 2000b).

Á Rf hafa verið gerðar prófanir á notkun próteindufts, einangraðra próteina og smækkaðs vöðva á nýtingu. Sprautun með próteindufti leiddi til aukningar (2%) á nýtingu sem þó var ekki tölfræðilega marktæk. Hins vegar var mæld vatnsheldni (í skilvindu) mun hærri en í viðmiðunarflökum sem fryst voru án meðhöndlunar (Thorarinsdottir og fl. 2004).

Þessi skýrsla lýsir greiningu á sprautuðum og ósprautuðum flökum með myndgreiningu. Tilgangur greiningarinnar var að kanna hvort að unnt væri að aðgreina sprautuð flök frá ómeðhöndluðum með myndgreiningartækni. Markmiðið var að kanna hvernig dreifing viðbættra próteina í fiskvöðva er háttáð og hvernig sprautun hefur áhrif á vöðvagerð.

2. FRAMKVÆMD

Hráefni

Sýni til myndgreiningar voru tveir þorskar sem voru veiddir á línu af Páli Jónssyni 6 dögum fyrir vinnslu. Þorskarnir voru flakaðir í fiskvinnslu Vísis á Þingeyri 27. október 2005 og fengu flakapörin sitt hvora meðhöndlunina til að fá raunhæfan samanburð (tafla 1). Einnig voru tekin sýni af þækilblöndu (18% prótein, 2% salt) og af þorskmarningi (framleiddur á Húsavík viku áður og frystur) sem notaður var í þækilblönduna til myndgreiningar.

Sýnataka fyrir myndgreiningu var tekin samhliða sýnatöku fyrir efna- (6 flök/hóp) og þyngdarmælingar (36 flök/hóp). Efna- og þyngdarmælingarnar eru ekki beinn þáttur í þessum verkþætti, en verða notaðar til samanburðar við niðurstöður myndgreiningar (sjá nánar í töflum VI og V2, viðauka I).

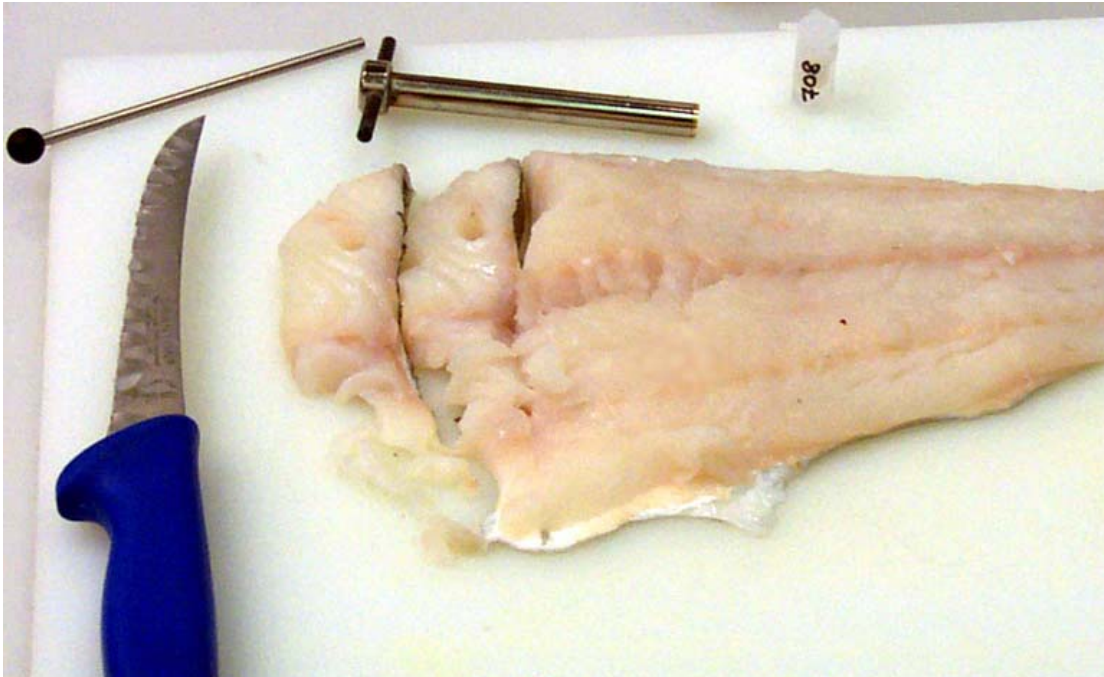
Tafla 1. Flök sett í myndgreiningu.

Flakapar	Sýni nr	Meðhöndlun	Þækill	
			Prótein (%)	Salt (%)
I	svartur 587	Ómeðhöndlað	-	-
I	svartur 588	Sprautað	18	2
II	brúnn 577	Sprautað	18	2
II	brúnn 576	Sprautað	0	2

Sprautuðu flökin voru ýmist sprautuð með blöndu af vatni og salti eða blöndu af vatni, þorskmarningi og salti. Blanda til sprautunar var blönduð í Cozzini búnaði og henni síðan sprautað í flökin úr sprautuvél frá Traust ehf við 2,4 bör á 20 rpm hraða (nálastærð 3-4 mm, 1 nál/haus, nalar opnast niður (4 göt)). Flökin voru pökkuð í frauðplastkassa eftir sprautun og send til Reykjavíkur þar sem sýni voru meðhöndluð fyrir myndgreiningu 4 dögum síðar.

Aðferð við myndgreiningu

Sýni voru tekin með korkbor 2,5 cm fyrir neðan fremsta bakugga þannig að sílinder sem skorinn er úr vöðvanum liggur í sömu stefnu og fiskurinn. Sýnin voru sett ásamt frystilími (Tissue-Tek, OCT, Sakura, USA) í sívalningslaga plastglös (15 mm í þvermál og 30 mm á lengd) og fryst í fljótandi köfnunarefni LN₂ (Ísaga, Reykjavík) í 50 sek. Eftir frystingu voru sýnin geymd í frysti við –83°C þar til þau voru skorin í frystiskera (“cryosectioned”).



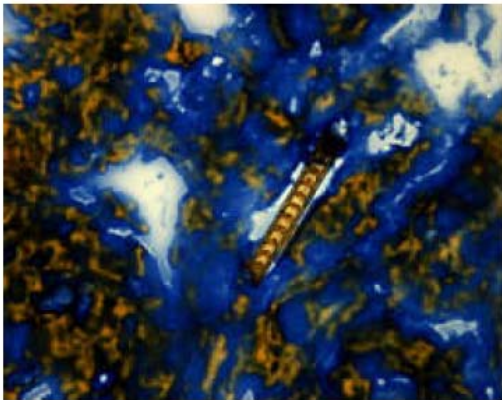
Mynd 1. Sýnataka fyrir myndgreiningu á þorski.

Sýnin voru skorin í 10 µm þykkar sneiðar í frystiskera (Leica CM 1800) við –27°C eftir að hafa verið látin jafna sig í frystiskeranum í 20 mín. Skorin sýni voru geymd á sýnaglerjunum (SuperFrost/Plus, 25 x 75 x 1,0 mm frá Menzel-Gläser, Þýskalandi) við –83°C þar til þau voru lituð. Sýnaglerin voru lituð með Orange G (0,5g CI 16230 (Polysciences Inc., USA), 99,0 mL vatn, 1,0 mL ediksýra) og Methyl Blue (0,07g CI 42780 (Sigma, USA), 99,0 mL vatn, 1,0 mL ediksýra). Eftir að sýnin höfðu þornað við stofuhita var þekjugler fest á sýnaglerið með MOUNTEX (Histolab, Svíþjóð). Sýnin voru skoðuð í Leica DMRA2 smásjá í 100x, 200x og 400x stækkun, og myndir teknar í gegnum smásjána með Leica DC300F stafrænni myndavél.

3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐA

Marningur og próteinblanda

Teknar voru myndir af smækkuðum marningi og blöndu þar sem búið var að blanda marningnum saman við saltþækilinn. Markmiðið með þessum myndum var að skoða hvernig vöðvaþræðir kæmu út á myndinni og hvort það myndi auðvelda greiningu á myndunum af fiskvöðvunum fyrir og eftir íblöndun.



Mynd 2. Blanda með smækkuðum marningi í 400x stækkun. Litað hefur verið fyrir próteinum (gulur) til að greina þau úr blöndunni.

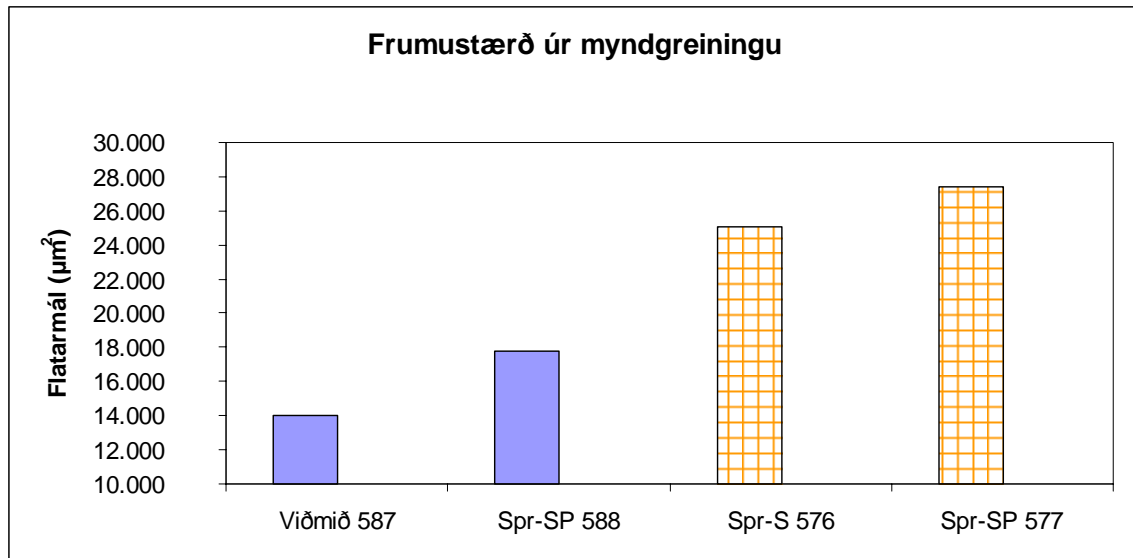
Á mynd 2 má sjá greinilegan vöðvaþráð í blöndunni (litast gulur). Þegar litað er fyrir fitu má sjá fitu tengda vöðvaþráðum (mynd 3). Það er því hægt að greina vöðvaþræði í blöndunni sem sprautað er í flökin bæði út frá litun próteina og fitu.



Mynd 3. Blanda með smækkuðum marningi í 400x stækkun. Litað hefur verið fyrir fitu (rauður) en hún er tengd vöðvaþráðum.

Samanburður á flakapörum

Samanburður á þverskurðarflatarmáli frumna milli sprautaðra og ómeðhöndlaðra flaka sýnir bæði að þverskurðarflatarmál frumnanna stækkar við sprautunina (mynd 4) sem og þverskurðarflatarmál millifrumuvökvans.



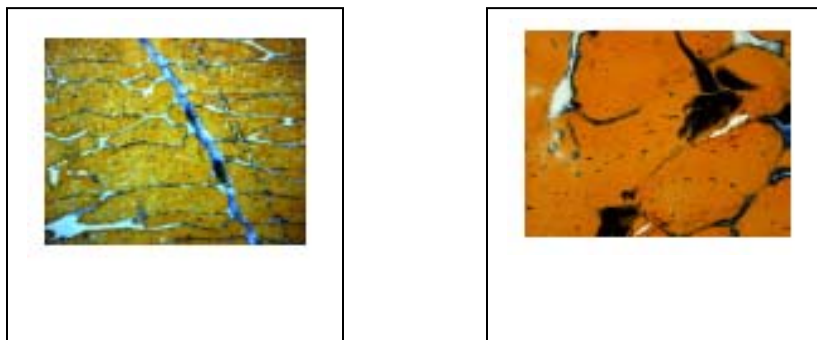
Mynd 4. Frumustærð í flökum. Flökin voru ýmist ómeðhöndluð (viðmið 587), sprautuð með salt- og próteinþækli (Spr-SP 588, Spr-SP 577) eða sprautuð með saltþækli (Spr-S 576). Flökin eru pör af tveimur þorskum; flakapar I er blátt (587/588) og flakapar II er rauðköflótt (576/577).

Þegar flakapar I er skoðað (sýni 576 og 577) sést að flak 576 (sprautað er með 2% salti) hefur minna þverskurðarflatarmál frumna að meðaltali heldur en 577 (sprautað með 2% salti og 18 % próteinum). Á mynd 5 sést að millifrumuvökvinn í 576 er hvítur og dökkblár. Líklega er blái liturinn kominn til vegna litunar á kristöllum eða gelatíni. Millifrumuvökvi í 577 (flak sprautað með 2% salti og 18 % próteinum) inniheldur gular flyksur sem líklegast eru vöðvaþræðir. Innsprautunin sést því greinilega í millifrumuvökvanum, auk þess að hafa áhrif til stækkunar frumnanna.



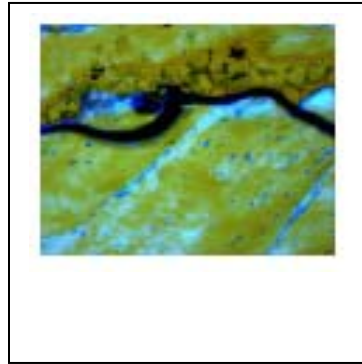
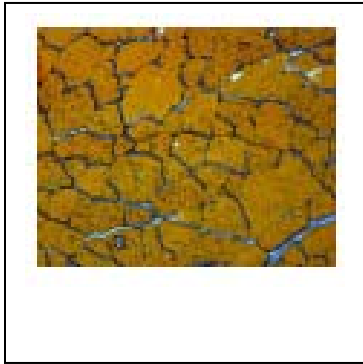
Mynd 5. Flakapar I, flak 576 (vinstri) og flak 577 (hægri) í 400x stækkun.

Töluverður munur sést á flatarmáli frumna milli flaka í flakapari II sbr mynd 4. Þverskurðarflatarmál frumna er minna í flaki 587 (ómeðhöndlað) en frumna í flaki 588 (sprautað með próteinum). Það sem er sérstakt við þetta flakapar er að svartir flekkir eru inni í frumunum í báðum flökunum sem sýnir að þeir eru ekki vegna mismunandi meðhöndlunar á flökunum (mynd 6 og 7). Ekki hefur fundist einhlít skýring á þessu en ýmsar getgátur eru á lofti um hvað gæti verið hér á ferðinni: Hefur verið mar í flakinu og litast blóðið svart í þessari litun? Er sýking í flakinu sem ekki sést með berum augum og þá um hverskonar sýkingu er að ræða? Er þetta upphafið að svörtum þráðum sem greinast stundum í eldisþorski?



Mynd 6. Flak 587 í 100x (vinstri) og í 400x stækkun (hægri).

Þrátt fyrir þessa svörtu flekki má sjá greinilegan mun á sýnum 587 og 588. Í sýni 588 (sprautað með próteinum) má sjá gula flekki, sem líklega eru vöðvaþræðir. Þessa gulu flekki er ekki að sjá í sýni 587 (ómeðhöndlað). Þá litast millifrumuvökvinn í 588 að hluta til blár en í 587 er hann eingöngu hvítur.



Mynd 7. Flak 588 í 100x (vinstri) og í 400x stækkun (hægri).

Ef bornar eru saman myndir af báðum flakapörum sést að millifrumuvökvinn litast blár í þeim sýnum sem hafa verið sprautuð (576, 577, 588), virðist sem hann innihaldi bláar einingar er minna á kristalla. Þetta sést ekki í sýnum úr ósprautaða flakinu (587) en þar er millifrumuvökvinn hvítur, litast ekki. Þá má sjá samsvörun milli þeirra flaka sem sprautuð voru með próteinum (577 og 588) því í millifrumuvökva þeirra má sjá gula þræði (líklega vöðvaþræði) sem ekki er að finna í hinum flökunum. Frumustærð þessara flaka er einnig meiri en pörunarflaka þeirra er ekki voru sprautuð með próteinum.

4. ÁLYKTANIR

Við sprautun dreifist þækilinn um millifrumuvökvann en eykur einnig flatarmál frumanna svo þær draga þækilinn í sig að einhverju leyti án þess að það hafi áhrif á útlit þeirra og lögun.

Umfrymisvökinn er hvítur en eftir sprautun litast hann að hluta til blár og er þar líklega um litaða kristalla eða gelatin að ræða. Þegar próteinum er sprautað í fiskvöða má sjá gular flyksur, sem eru líklega vöðvaþræðir, í millifrumuvökvanum. Þessar flyksur sjást ekki þegar flak er ósprautað eða sprautað með saltþækli.

Á myndum úr myndgreiningunni sáust ekki sprautuför. Hvort það er almenna reglan er erfitt að segja til um því að sýnastærðin er t.t.l. lítil (15 mm í þvermál, 30 mm á lengd) og því möguleiki að sýnin hafi ekki náð yfir ístungustaðinn. Af þessum myndum er því ekki unnt að greina hvort að dreifing viðbættra próteina í kringum nálarförin sé frábrugðin dreifingu annars staðar í vöðvanum.

Samanburður á frumustærð og mældrar vatnsheldni í flökum, framleiddum samtímis myndgreingarflökum (sjá töflu V1, viðauka), leiðir í ljós að lítið samræmi er milli vatnsheldni ferskra flaka og frumustærðar. Vatnsheldni er að vísu lægri í ómeðhöndluðum flökum en sprautuðum, sem rímar við hærri frumustærð í þeim síðarnefndu. Hins vegar mælist vatnsheldni í flökum sprautuðum eingöngu með salti hærri en í flökum sprautuðum með próteinum sem er öfugt við mælda frumustærð. Það er því ekki unnt að staðfesta að aukin vatnsheldni tengist beint stækkun frumna.

Hins vegar sýna þyngdarmælingar á ofangreindum flökum ágætis samræmi við stærð frumna, þ.e. þyngdartap á snyrtum flökum við geymslu er mest í ómeðhöndluðum flökum og minnst í flökum sprautuðum með 2% salti og 18% próteinum.

Framangreindar niðurstöður sýna að unnt er að greina mun á ómeðhöndluðum flökum og sprautuðum með myndgreiningu. Þá virðist sem unnt sé að greina viðbætt prótein (vöðvaþræði) með þessari tækni. Hinsvegar virðist sem erfiðara sé að nota myndgreinartæknina til að kanna dreifingu próteina í vöðva, líklega vegna stærðar sýna.

5. ÞAKKARORÐ

Höfundar þakka AVS-sjóði og Tækniþróunarsjóði fyrir veittan styrk til verkefnisins „Fiskprótein í flakavinnslu“. Jónínu Ragnarsdóttur hjá Matra er þökkuð vinna við framkvæmd myndgreiningar, starfsfólki Vísis við framkvæmd verkefnisins og þjónustusviði Rf fyrir efna- og vatnsheldnimælingar.

6. HEIMILDIR

Darmanto, H. Ichikawa, M. Iwamoto, N. Abe, S. Nishimura, S. Goto og Y. Nozaki. 1997a. *Effect of protein hydrolysate of pearl oyster meat on the state of water and denaturation of fish myofibrils during dehydration.* Nippon Suisan Gakkaishi, 63, 378-385.

Darmanto, H. Ichikawa, M. Iwamoto, N. Abe, S. Nishimura, S. Goto og Y. Nozaki. 1997b. *Effect of protein hydrolysate of pearl oyster meat on the state of water and denaturation of fish myofibrils during frozen storage.* Nippon Suisan Gakkaishi, 63, 386-390.

Desmyter, E.A. og T.J. Wagner. 1979. *Utilization of vegetable proteins in meats of large cross sectional area.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 56, 334-336.

Guðmundur Örn Arnarson, 2002. Smásæ greining (myndgreining) og matvælaíðnaður. Fréttabréf Matra. 4 árg., 3 tbl.

Kristinsson, H.G. og B.A. Rasco. 2000b. *Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases.* J Agric Food Chem. 48, 657-666.

Thorarinsdottir K.A., Gudmundsdottir G., Arason S., Thorkelsson G., og Kristbergsson K. 2004. *Effects of added salt, phosphates, and proteins on the chemical and physicochemical characteristics of frozen cod (*Gadus morhua*) fillets.* Journal of Food Science, 69, 144-152.

7. VIÐAUKI

Sýni sem notuð voru til myndgreiningar voru tekin úr verkþætti 2: Sprautun með smækkuðum vöðva. Fjallað verður um niðurstöður þess verkhluta í skýrslu Rf sem verður gefin út síðar á árinu. Til viðmiðunar við niðurstöður myndgreiningar eru hér sýndar niðurstöður úr efna- og þyngdarmælingum þeirra hópa sem fengu sömu meðhöndlun og flökin sem tekin voru til myndgreiningar.

Tafla V1. Niðurstöður úr efnamælingum á pooluðum sýnum (n=3) úr flökum unnum á sama degi og myndgreiningarflökin. Hlutföll mældra efna- og eiginleika í sýnum.

Tími	hópur	Þekill		Prótein (%)	Salt (%)	pH	Vatn (%)	WHC (%)	TCA-leysnlegt N
		Prótein (%)	Salt (%)						
D5	Ferskt	-	-	15,9	0,3	7,33	84,0	85,4	0,58
D5	Ferskt	0	2	15,1	0,8	7,23	84,4	98,4	0,49
D5	Ferskt	18	2	14,7	0,7	7,25	84,7	97,4	0,49
M2	frosið	0	0	17,2	0,3	6,77	82,1	72,8	0,64
M2	frosið	0	2	14,6	1,0	6,76	84,0	80,0	0,50
M2	frosið	18	2	15,7	0,6	6,69	83,2	65,6	0,51

Tafla V2. Niðurstöður úr þyngdarmælingum á flökum unnum á sama degi og myndgreiningarflökin. Breytingar á þyngd snyrtra flaka eftir sprautun (n=47), eftir 5 (n=12) og 8 (n=12) daga geymslu í kæli og eftir 2 mánaða geymslu í frysti (n=12).

meðhöndlun	Þekill		e. sprautun (%)	e. 5d (%)	e. 8d (%)	e. 2m (%)
	Protein (%)	Salt (%)				
ómeðhöndlað	-	-	-	-2,5 ± 0,8	-3,1 ± 0,9	-2,1 ± 0,5
sprautað	0	2	12,8 ± 4,3	9,0 ± 2,5	3,9 ± 4,0	11,8 ± 3,5
sprautað	18	2	22,2 ± 2,9	16,8 ± 3,9	17,9 ± 2,8	18,8 ± 2,9

Helstu niðurstöður eru:

- Vatnsheldni er hærrí í sprautuðu en ómeðhöndluðu fersku flaki. Lægri vatnsheldni í próteinsprautuðu flaki en ómeðhöndluðu þegar geymt í frosti.
- Próteininnihald hæst í ómeðhöndluðu fersku og frosnu flaki.
- TCA-leysnlegt hæst í ómeðhöndluðu fersku og frosnu flaki.
- Sprautun flaka með blöndu af salti og próteinum gefur hæstu nýtinguna í gegnum allan geymsluferilinn, ómeðhöndluð flök gefa lökustu nýtinguna.