

Lavsaltprodukter av torsk (*Gadus morhua*) og laks (*Salmo salar*)

Betydningen av $MgCl_2$ og $MgSO_4$ på
muskelproteiners løselighet og termiske
stabilitet

Ida Benedicte Sjølie

Bioteknologi (5 årig)

Innlevert: mai 2016

Hovedveileder: Turid Rustad, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi

Forord

Denne masteroppgaven har vært avslutningen på den integrerte mastergradsutdanningen i bioteknologi (MBIOT5), ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Masteroppgaven ble utført ved Institutt for bioteknologi (IBT).

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder, Turid Rustad, for god hjelp og støtte gjennom hele dette året. Jeg setter stor pris på at hun alltid har tatt seg tid til å svare på mine utallige spørsmål, og for at hun alltid har stilt opp som en god diskusjonspartner, spesielt når jeg har gravd meg litt for dypt ned i egne tanker. Videre vil jeg takke Siri Stavrum og Wenche I. Strand for opplæring i SDS-PAGE. Jeg vil også takke Siri Stavrum for at hun alltid har vært tilgjengelig for spørsmål, og for alle hyggelige samtaler underveis i laboratoriearbeidet.

Jeg vil også takke mine medstudenter, som alle har bidratt til en fin avslutning på fem flotte år. Til slutt vil jeg rette en takk til min kjære Fredrik som alltid har stilt opp for meg når jeg har trengt hjelp med ulike dataprogrammer og korrekturlesning, og ikke minst for hans evige tålmodighet.

Trondheim, mai 2016

Ida Benedicte Sjølie

Sammendrag

Salt (NaCl) er et av de mest anvendte konserveringsmidlene i matindustrien, noe som skyldes lave kostnader og saltets bidrag til smak og konservering. Det har imidlertid vist seg at en stor andel av befolkningen konsumerer mye mer salt enn det som er anbefalt. Høyt inntak av natrium, som hovedsakelig skyldes høyt inntak av NaCl, er assosiert med høyt blodtrykk. Høyt blodtrykk er igjen assosiert med hjerte- og karsykdommer, diabetes og nyresykdommer. På grunn av dette har det blitt et behov for å redusere NaCl-innholdet i mat, og produsere såkalte lavsaltprodukter. Et redusert NaCl-nivå i mat kan blant annet oppnås ved å erstatte noe av NaCl-innholdet med andre salter, såkalte salterstatte.

Formålet med denne oppgaven har vært å undersøke om saltene $MgCl_2$ og $MgSO_4$ kan benyttes som salterstatte i produkter av torsk og laks. NaCl har blitt benyttet som referansesalt. Effekten av disse saltene i ulike konsentrasjoner har blitt undersøkt både i fersk og fryst torskfilet og laksefilet, samt varmebehandlet torskefarse og laksefarse. Dette har blitt undersøkt ved å se på hvordan saltene påvirker myofibrillproteinenes løselighet, samt muskelproteinenes termiske stabilitet.

Det ble generelt ekstrahert ut en større mengde protein, og flere typer saltløselige proteiner, fra fersk laks sammenliknet med fersk torsk. Løseligheten til sarkoplasmatiske proteiner fra begge råstoffene ble lite påvirket av fryseprosessen. Løseligheten til myofibrillproteinene fra torsk sank som følge av frysingen, mens løseligheten til myofibrillproteinene fra laks ble lite påvirket. Dette indikerer at myofibrillproteinene fra laks er mer kuldestabile enn myofibrillproteinene fra torsk. Løseligheten til myofibrillproteinene i begge råstoff sank som følge av varmebehandlingen, hvor endringene i løselighet var mest markant ved 30°C. Dette tyder på omfattende varmedenaturering av myofibrillproteiner allerede ved denne temperaturen. Myofibrillproteinene fra laks var mer varmestabile enn myofibrillproteinene fra torsk.

Løseligheten til myofibrillproteinene fra ferskt råstoff varierte både med type salt og konsentrasjon av salt. For fersk torsk ble det oppnådd høyere ekstraherbarhet med de to Mg-saltene enn med NaCl ved alle konsentrasjoner. Denne trenden var derimot ikke like fremtredende for laks, hvor dette kun var tilfellet ved laveste konsentrasjon (0,2 M). Mengden protein, samt antall ulike typer proteiner ekstrahert, var generelt høyere med $MgSO_4$ enn med $MgCl_2$. Ut fra både mengde protein og antall ulike proteiner ekstrahert, fremstår $MgSO_4$ som en mer egnet salterstatte enn $MgCl_2$, spesielt ved laveste konsentrasjon.

Type salt var imidlertid av noe mindre betydning i råstoffene som hadde vært fryst og varmebehandlet, noe som tyder på at tilstanden til råstoffene var mest avgjørende. I varmebehandlingsforsøkene ble proteinekstraksjonene utført med samme ekstraksjonsbuffer for alle prøver. Små forskjeller mellom type salt kan derfor indikere at ekstraksjonsbufferen kan ha vært vel så avgjørende for ekstraherbarheten. Tilsats av salt før varmebehandling senket den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene fra begge råstoff.

Summary

Salt (NaCl) is one of the most widely used preservatives in the food industry, which is due to low expenses and its contribution to taste and preservation. However, it has been found that a large proportion of the population consume much more salt than recommended. A high intake of sodium, mainly due to high intake of NaCl, is associated with high blood pressure. High blood pressure is again associated with cardiovascular disease, diabetes and kidney diseases. Because of this, there is a need to reduce the NaCl content in food and produce so-called low-salt products. A reduced NaCl level in food may partly be achieved by replacing some of the NaCl content with other salts, so-called salt substitutes.

The purpose of this thesis has been to investigate whether the salts $MgCl_2$ and $MgSO_4$ can be used as salt substitutes in products of cod and salmon. NaCl has been used as a reference salt. The effect of these salts in different concentrations have been investigated for both fresh and frozen cod and salmon fillets, and heat-treated minced cod and salmon. This has been studied by looking at how the salts affect the solubility of myofibrillar proteins, as well as the thermal stability of muscle proteins.

Generally, a larger amount of protein, and a higher amount of different types of salt soluble proteins, was extracted from fresh salmon compared with fresh cod. The solubility of sarcoplasmic proteins from both raw materials were little affected by the freezing process. The solubility of the myofibrillar proteins in cod decreased as a result of freezing, while the solubility of the myofibrillar proteins in salmon were little affected. This indicates that the myofibrillar proteins from salmon are more stable than the myofibrillar proteins from cod. The solubility of the myofibrillar proteins in both species decreased as a result of the heat treatment, where changes in solubility was most noticeable at 30°C. This indicates extensive heat denaturation of the myofibrillar proteins already at this temperature. The myofibrillar proteins in salmon were more heat stable than those in cod.

The solubility of the myofibrillar proteins in fresh fish varied with both type and concentration of salt. For fresh cod, a higher extractability was obtained with both Mg-salts compared to NaCl, at all concentrations. For salmon, however, this trend was only evident at the lowest concentration (0.2 M). The amount of protein, as well as the number of different types of proteins extracted, were generally higher with $MgSO_4$ than with $MgCl_2$. Based on the amount of protein and the number of different proteins extracted, $MgSO_4$ appears to be a more suitable salt substitute than $MgCl_2$, especially at low concentrations.

However, the type of salt was of less importance in the raw materials that had been frozen and heat treated, which indicates that the condition of the raw material was more crucial than the type of salt. In the heat treatment experiments, the protein extractions were carried out with the same extraction buffer for all samples. Small differences between the types of salt can therefore indicate that the extraction buffer may have been just as crucial for the extractability. The addition of salt prior to heat treatment lowered the thermal stability of the myofibrillar proteins of both raw materials.

Innholdsfortegnelse

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Innledning | 1 |
| 2 | Teori..... | 2 |
| 2.1 | Muskelkjemi | 2 |
| 2.1.1 | Proteiner i muskelvevet | 3 |
| 2.1.2 | Muskelkontraksjon | 8 |
| 2.1.3 | Muskelproteinenes funksjonelle egenskaper | 9 |
| 2.2 | Saltkjemi | 13 |
| 2.2.1 | Saltreduksjon | 15 |
| 2.3 | Effekt av temperatur | 17 |
| 2.3.1 | Frysing og tining | 17 |
| 2.3.2 | Varmebehandling | 19 |
| 2.4 | Råstoff | 21 |
| 2.4.1 | Torsk (<i>Gadus morhua</i>) | 21 |
| 2.4.2 | Laks (<i>Salmo salar</i>) | 22 |
| 3 | Materialer | 23 |
| 4 | Metoder | 25 |
| 4.1 | Proteinekstraksjon | 25 |
| 4.1.1 | Proteinekstraksjon fra ferskt og fryst råstoff | 25 |
| 4.1.2 | Varmebehandling og proteinekstraksjon fra varmebehandlet råstoff | 25 |
| 4.1.3 | Ekstraksjon med saltblanding | 26 |
| 4.2 | BioRad-metoden | 26 |
| 4.3 | Gelelektroforese: SDS-PAGE | 27 |
| 4.3.1 | PhastSystem™ | 27 |
| 4.3.2 | Dual Cool Electrophoresis System | 27 |
| 4.4 | pH-måling i råstoff | 28 |
| 4.5 | Statistisk analyse | 28 |
| 5 | Resultater og diskusjon | 29 |
| 5.1 | Fersk torskefilet | 30 |
| 5.2 | Fryst torskefilet | 35 |
| 5.3 | Varmebehandlet torskefarse | 39 |
| 5.4 | Fersk laksefilet | 50 |
| 5.5 | Fryst laksefilet | 54 |
| 5.6 | Varmebehandlet laksefarse | 58 |
| 5.7 | Sammenlikning av varmebehandlet torske- og laksefarse | 68 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 5.8 Blandingsforsøk..... | 69 |
| 6 Konklusjon..... | 71 |
| Referanser..... | 72 |
| Vedlegg A: Proteinekstraksjon..... | I |
| Vedlegg B: Varmebehandling..... | VI |
| Vedlegg C: pH i fiskemuskel | IX |

1 Innledning

I næringsmiddelindustrien er salt (NaCl) et av de mest anvendte konserveringsmidlene i mat, noe som i hovedsak skyldes lave kostnader og saltets varierte egenskaper (Albarracín, Sánchez, Grau, og Barat, 2011). NaCl konserverer mat ved å drepe eller begrense veksten av patogene mikroorganismer. NaCl fremmer også ønskede smaker og teksturegenskaper (Doyle og Glass, 2010). NaCl påvirker altså flere kvalitetsparametere, og bidrar på denne måten til å produsere trygg mat med akseptable sensoriske og strukturelle egenskaper, uten for store kostnader.

Det viser seg imidlertid at en stor andel av befolkningen konsumerer mye mer salt enn det som er anbefalt (Doyle og Glass, 2010). Nordmenns daglige NaCl-inntak ligger på ca. 10 g per person, noe som er vesentlig høyere enn Helsedirektoratets anbefaling om å ikke overskride 6 g (Helsedirektoratet, 2015). Høyt inntak av NaCl skyldes hovedsakelig et økt konsum av ulike typer prosessert mat (Doyle og Glass, 2010). Av disse er prosesserte kjøttprodukter blant de produktene med høyest NaCl-innhold (Perisic, 2012). Det er vel kjent at natrium påvirker blodtrykket, og et høyt inntak av natrium er assosiert med høyt blodtrykk (Doyle og Glass, 2010). Økt blodtrykk er igjen assosiert med økt forekomst av diabetes, hjerte- og karsykdommer og nyresykdommer. Det er derfor en utbredt enighet om at forebygging av økt blodtrykk vil bedre helsen. Ettersom hovedkilden til natrium er NaCl, har oppfatningen av NaCl endret seg betraktelig de siste tiårene.

På grunn av de negative helseeffektene relatert til et høyt inntak av NaCl, har det blitt et behov for å redusere NaCl-innholdet i mat, og produsere såkalte lavsaltprodukter (Ruusunen og Puolanne, 2005). Saltreduksjon kan gjennomføres på flere ulike måter, og det mest benyttede alternativet er salterstatning (Perisic 2012). Dette går ut på å erstatte deler av NaCl-innholdet med andre salter, som KCl, MgCl₂ eller MgSO₄. Lavsaltproduktet måles etter de samme kvalitetsparametere som normalproduktet (Ruusunen og Puolanne, 2005). Ettersom egenskapene til lavsaltproduktet ofte er forskjellig fra normalproduktet, byr dette imidlertid på flere store utfordringer. Redusert NaCl-innhold fører til endringer i produktets egenskaper, som smak, holdbarhet og tekstur. Teksturendringer er igjen knyttet til endringer av proteinenes funksjonelle egenskaper (Perisic, Afseth, Ofstad, og Kohler, 2011). Endringer i egenskaper som eksempelvis løselighet og vannbindingsevne vil blant annet påvirke saftighet og mørhet, som er viktige kvalitetsparametere i kjøttprodukter. Det å kunne utvikle produkter med et redusert NaCl-innhold, som på samme tid skal være trygge, velsmakende og lønnsomme, er derfor svært utfordrende.

Formålet med denne oppgaven har vært å undersøke om saltene MgCl₂ og MgSO₄ kan benyttes som salterstattere i produkter av torsk og laks. NaCl har blitt benyttet som referansesalt. Effekten av disse saltene i ulike konsentrasjoner har blitt undersøkt både i fersk og fryst torskefilet og laksefilet, samt varmebehandlet torskefarse og laksefarse. Dette har blitt studert ved å se på hvordan saltene påvirker myofibrillproteinenes løselighet, samt muskelproteinenes termiske stabilitet.

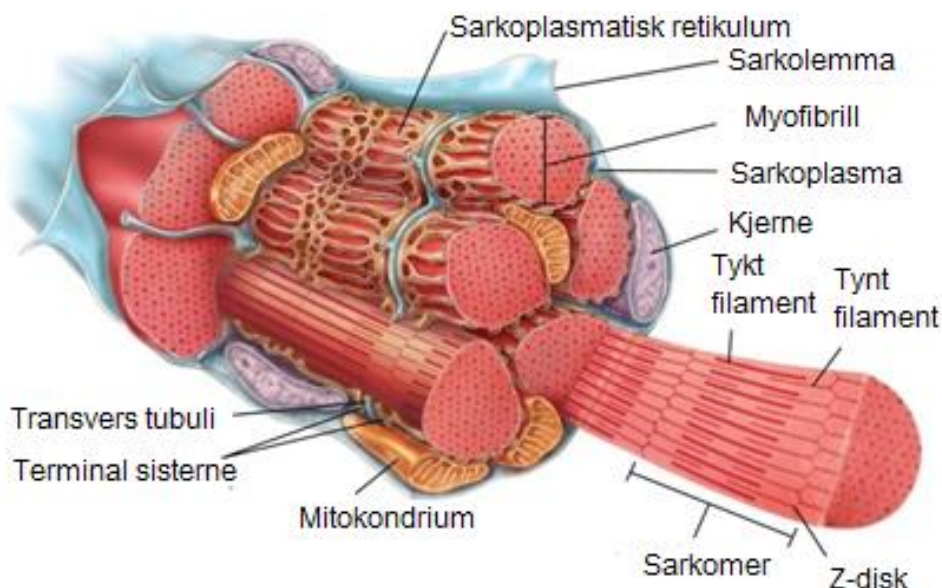
2 Teori

Hvordan råstoffet, fiskemuskel, behandles er avgjørende for kvaliteten til sluttproduktet. Det er derfor nødvendig med kunnskap om muskelkjemi for å forstå hvordan muskelproteinene påvirkes. Dette inkluderer viten om de ulike typer av proteiner som finnes i muskelvevet og deres funksjonelle egenskaper, ettersom disse påvirker ulike kvalitetsaspekter ved råstoffet. Det vil bli fokusert på hvordan salting med ulike typer salt, samt frysing og varmebehandling, påvirker de funksjonelle egenskapene til proteinene, hvor løselighet er den funksjonelle egenskapen som vil vektlegges mest. Muskel- og saltkjemi, samt temperaturbehandling, blir gjennomgått i de følgende delkapitlene.

2.1 Muskelkjemi

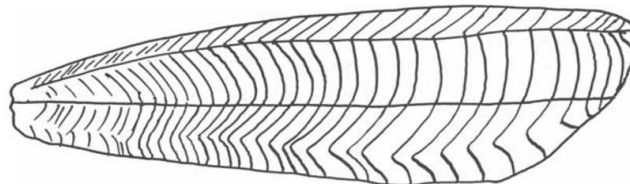
Ordet muskel er en fellesbetegnelse på kontraktile organer som fremkaller bevegelse eller stabilitet (Store medisinske leksikon, 2015). Muskel, eller muskelvev, er en av fire hovedtyper av vev, og er den vevstypen som har bevegelsesevne, grunnet dens kontraktile egenskaper. Det finnes tre typer muskelvev: hjertemuskulatur, glatt muskulatur og tverrstripet muskulatur, hvor sistnevnte ofte betegnes som skjelettmuskulatur. Skjelettmuskel er den eneste av de tre som er viljestyrt, og ofte er det den som assosieres med ordet muskel.

Skjelettmuskelen er bygget opp av flere grupperte muskelbunter (Strasburg, Xion, og Chiang, 2008). Muskelbuntene består av organiserte grupper av muskelfibre, hvor hver muskelfiber utgjør en muskelcelle. Hver muskelfiber inneholder bunter av myofibriller. Myofibrillene består igjen av tynne og tykke filamenter. Både muskelfibrene, muskelbuntene og hele muskelen er omsluttet av ulike typer bindevev (Rodger og Wilding, 1990). Bindevevet er delt i tre deler: endomysium, perimysium og epimysium. Bindevevets samlede oppgave er å beskytte og gi styrke til musklene. Muskelfibrene er omsluttet av endomysium, muskelbuntene er omsluttet av perimysium og selve muskelen er omsluttet av epimysium. Bindevevet og myofibrillene er grundigere behandlet i henholdsvis teoridel 2.1.1.2 og 2.1.1.3.



Figur 1: Skjematisk fremstilling av den strukturelle organiseringen av muskelfiber (modifisert figur fra Strasburg et al., 2008 - gjengitt fra Tortora og Derrickson, 2006).

Sammenliknet med pattedyr har fisk en enkel muskelstruktur (Huss, 1995). Det meste av kjøttet er fordelt på to fileter som går fra hodet til halen på hver side av kroppen. De to filetene er delt horisontalt av et septum, som skiller muskelen i en øvre (dorsal) og nedre (ventral) muskeldel. Fiskemuskelene er delt opp i en rekke muskelblokker kjent som myotomer. Myotomene er omgitt og adskilt av en bindevevshinne kalt myokommata. Myokommata går i et skrått mønster som står vinkelrett på lengdeaksen (septum) til fisken, og er forankret i skjelettet og musklene. Muskelfibrene i myotomene strekker seg mellom to myokommata, og de går parallelt med lengderetningen til muskelen, altså parallelt med septum. Lengden av muskelfibrene varierer fra hode (anterior) til halen (posterior). Muskelfibrene er omgitt og skilt fra hverandre av endomysium, også kalt sarkolemma.



Figur 2: Skjematisk fremstilling av organiseringen av myotomer i fiskefilet. De svarte linjene representerer bindevevet som omgir og skiller myotomene fra hverandre (Rodger og Wilding, 1990).

2.1.1 Proteiner i muskelvevet

Proteiner i skjelettmusklene kan inndeles etter løselighet eller biologisk funksjon (Strasburg et al., 2008). Inndelingen etter løselighet er basert på ulikheter i løselighet ved varierende saltkonsentrasjoner. Denne kategoriseringen gir tre klasser av proteiner som også sammenfaller med den cellulære plasseringen til proteinene: sarkoplasmatiske proteiner, myofibrillproteiner og stromale proteiner.

Sarkoplasmatiske proteiner kalles ofte vannløselige proteiner (VLP) fordi de er løselige i vann og ved svært lave ionestyrker (Strasburg et al., 2008). Disse utgjør ca. 30% av totalt muskelprotein. Myofibrillproteinene refereres ofte til som saltløselige proteiner (SLP) fordi de løses ved høye ionestyrker ($> 0,5$) (Sikorski, Sun Pan, og Shahidi, 1994). Det kan bemerkes at dette er en generalisering, ettersom Stefansson og Hultin (1994) hevder at det i noen tilfeller er observert full løselighet av myofibrillproteiner i torsk ved svært lave ionestyrker ($< 0,0002$) (siteret etter Strasburg et al., 2008). Myofibrillproteinene utgjør den største klassen av proteiner og står for ca. 50-60% av totalt muskelprotein (Strasburg et al., 2008). De stromale proteinene omtales ofte som uløselige proteiner, fordi de som regel ikke løses under normale ekstraksjonsforhold (\sim nøytral pH, lav temperatur, og både ved høye og lave ionestyrker). De stromale proteinene utgjør ca. 10-20% av totalt muskelprotein. Mengden av de ulike gruppene av protein varierer mellom fiskearter, og er også påvirket av livssyklusen til fisken, og vil derfor variere noe med årstidene (Sikorski et al., 1994). De tre klassene av proteiner grundigere behandlet i de påfølgende delkapitlene, hvor myofibrillproteinene vil vektlegges mest.

2.1.1.1 Sarkoplasmatiske proteiner

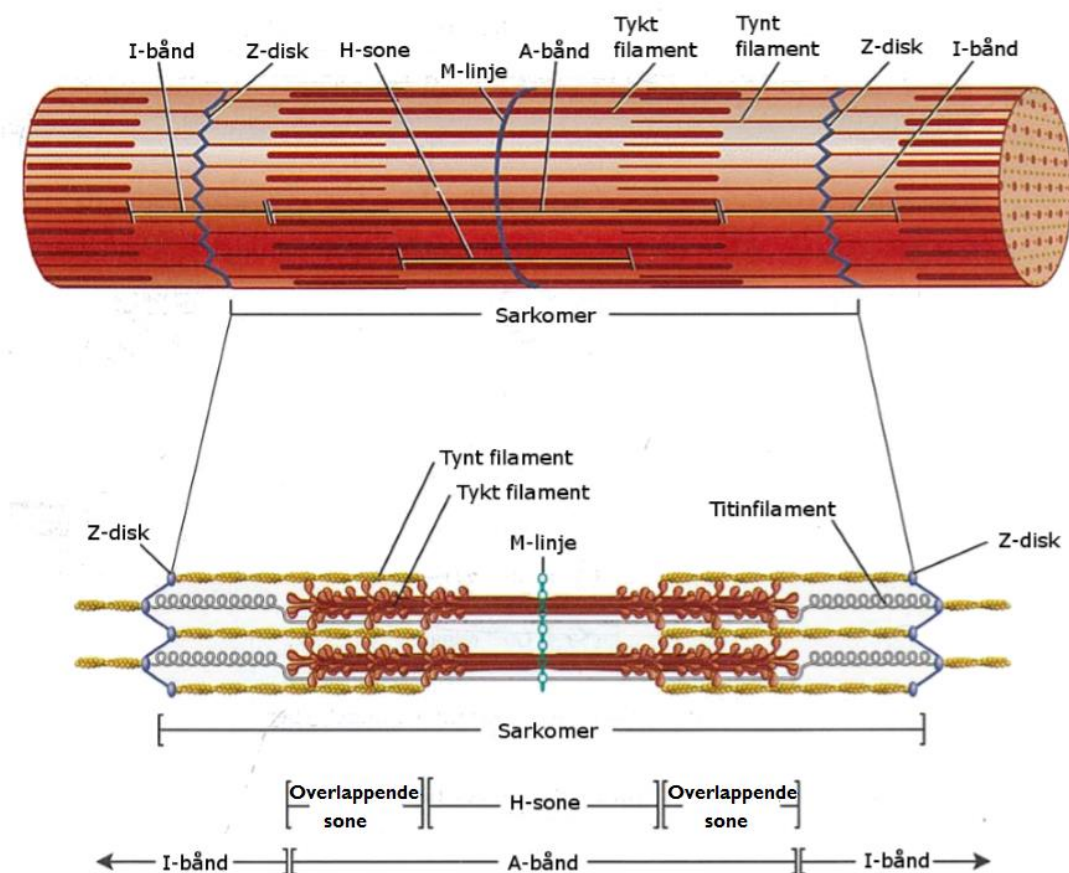
Sarkoplasmatiske proteiner er proteiner som hovedsakelig finnes i sarkoplasma (Strasburg et al., 2008). De sarkoplasmatiske proteinene består av et stort antall vannløselige proteiner, hvor de fleste er enzymer (Rodger og Wilding, 1990). Sarkoplasmatiske proteiner inkluderer blant annet myoglobin, glykolytiske proteiner og andre enzymer involvert i metabolismen (Strasburg et al., 2008). De sarkoplasmatiske proteinene er relativt stabile, og blir lite påvirket av frysing og tining (Rodger og Wilding, 1990).

2.1.1.2 Stromale proteiner

De stromale proteinene danner bindevevet som beskytter og gir styrke til musklene (Rodger og Wilding, 1990). Bindevevet er delt i tre deler: epimysium, perimysium og endomysium. Den sterke matriksen som bindevevet danner er nødvendig for å opprettholde muskelfunksjon og elastisitet (Strasburg et al., 2008). Kollagen er det dominerende proteinet i bindevevet. Kollagenmolekylene er kovalent kryssbundet, og antallet kryssbindinger øker med alderen på dyret. Mengden av kryssbindinger varierer også med art, muskelfunksjon og aktivitet. Kollagen bidrar signifikant til muskelseighet i pattedyr. Kollagen bidrar imidlertid mindre til muskelseighet i fiskemuskel. Dette skyldes at det både er mindre kollagen, og færre kryssbindinger mellom kollagenmolekylene i fiskemuskel, sammenliknet med pattedyrmuskel. Kollagen bidrar til tekstur, og er derfor en funksjonell ingrediens i ulike matprodukter, som blant annet gelatin.

2.1.1.3 Myofibriller

Myofibrillene okkuperer ca. 80% av muskelfibervolumet (Rodger og Wilding, 1990). Myofibrillene er trådformede strukturer med diameter på ca. 1 μm . Myofibrillene består av over 20 ulike proteiner, hvor de kontraktile proteinene myosin og aktin utgjør den største andelen (ca. 65%). Det er myofibrillene som danner grunnlaget for den kontraktile enheten, kalt sarkomeren. Sarkomeren utgjør altså den strukturelle enheten for muskelkontraksjon. Muskelkontraksjon er gjennomgått i teoridel 2.1.2.

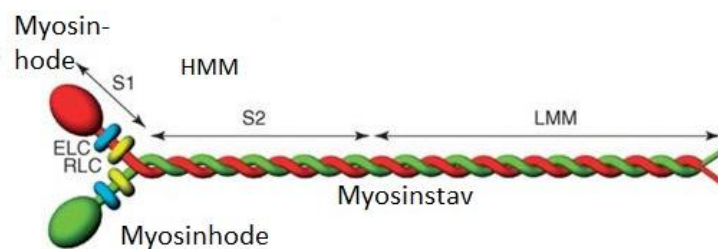


Figur 3: Strukturell arrangement av en sarkomer (modifisert figur fra Strasburg et al., 2008 - gjengitt fra Tortora og Derrickson, 2006).

Sarkomeren består av vekselvis tynne og tykke filamenter (Strasburg et al., 2008). Den sarkomere enheten til en myofibrill strekker seg fra en Z-disk til en annen; grensene for sarkomeren er altså satt av disse. De tynne filamentene er forankret i Z-disken, mens de tykke filamentene er å finne i senteret av sarkomeren. Denne arrangementen av proteiner utgjør M-linjen. Videre kan sarkomeren deles inn i I-, A- og H-bånd. I-båndene består av tynne filamenter, A-båndene består av både tynne og tykke filamenter, mens H-båndene kun består av tykke filamenter.

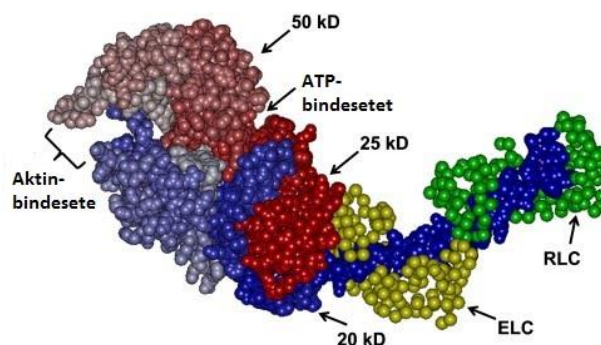
Myosin

Myosin utgjør ca. 45% av myofibrillproteinene, og er derfor det mest utbredte proteinet i skjelettmusklene (Strasburg et al., 2008). Myosin er hovedkomponenten i de tykke filamentene, og myosinfilamentet består av 200-300 aminosyrer som er ordnet i en høyrehendt trippelheliks (Puolanne og Halonen, 2010). Myosinfilamentet finnes i senteret av sarkomeren. De er bipolare, ved at de upolare aminosyresidegruppene er orientert innover, mens de polare er orientert utover.



Figur 4: Skjematisk fremstilling av de strukturelle egenskapene til et myosinmolekyl (modifisert figur fra Strasburg et al., 2008 - gjengitt fra Craig og Woodhead, 2006).

Proteinet myosin utgjør den molekylære motoren for muskelsammentrekning (Strasburg et al., 2008). Myosinmolekylet består av seks subenheter: to tunge kjeder ($M_r \sim 220$ kDa) og fire lette kjeder ($M_r \sim 16 - 20$ kDa). Kombinert danner disse seks subenhetene et protein med en molekylmasse på ca. 500 kDa. N-terminalene til de to tunge kjedene danner to strukturer, kalt myosinhoder. C-terminalene til de to tunge kjedene er to lange α -helikser som kveiles sammen til en lang stavformet kveilet spiral. To og to lette kjeder er bundet til hvert sitt myosinhode. Lett kjede 1 (LC1) og lett kjede 3 (LC3) kalles ofte for essensiell lett kjede (ELC), mens lett kjede 2 (LC2) ofte kalles for regulatorisk lett kjede (RLC). Delvis proteolyse av myosinmolekylet gir et tungt meromyosinfragment (HMM) og et lett meromyosinfragment (LMM). Delvis proteolyse kan også gi to subfragmenter av HMM: subfragment 1 (S1) og subfragment 2 (S2).

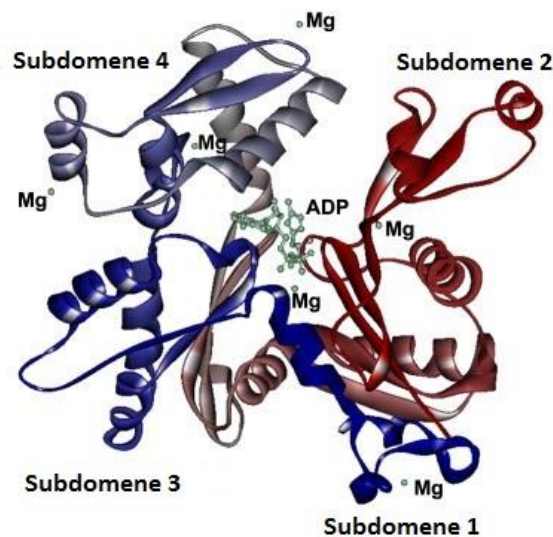


Figur 5: Fremstilling av den tredimensjonale strukturen til myosin subfragment 1 (modifisert figur fra Puolanne og Halonen, 2010 - gjengitt fra Rayment et al., 1993).

Myosinhodet og myosinstaven har to essensielle, men ulike funksjoner (Strasburg et al., 2008). Myosinhodene danner drivkraften bak muskelsammentrekningen, mens myosinstaven legger det strukturelle grunnlaget for dannelsen av det tykke filamentet. Myosinhodene er å finne i S1, og S1 kan videre deles inn i tre subregioner: Den N-terminal subregionen (25 kDa), sentralseksjonen (50 kDa) og konverteringsdomenet (20 kDa) (Puolanne og Halonen, 2010). Den N-terminale subregionen inneholder ATP-bindesetet (også kalt det katalytiske setet), mens sentralseksjonen inneholder aktinbindesetet. Det er disse to funksjonene som utgjør den såkalte motoraktiviteten. I tillegg inneholder S1 et langt α -helikssegment som binder sammen myosinhodene med myosinstaven. Denne heliksen fungerer som en vektarm hvor konformasjonsendringene assosiert med bevegelsen av myosinhodene foregår under muskelkontraksjon (Strasburg et al., 2008).

Aktin

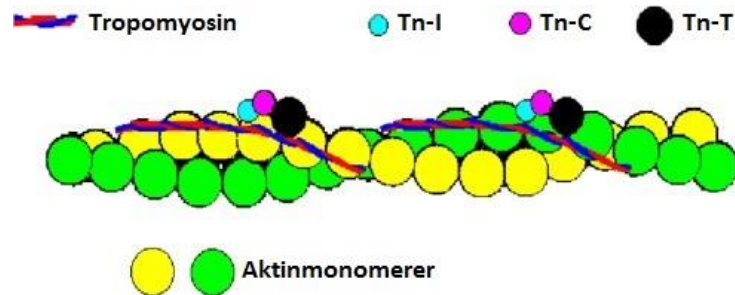
Aktin utgjør ca. 20% av myofibrillproteinene, og er derfor det nest mest utbredte proteinet i skjelettmusklene (Strasburg et al., 2008). Aktin er hovedkomponenten i de tynne filamentene. Aktinmonomeren kalles for globulært aktin, eller G-aktin. Dette er en enkel polypeptidkjede med en molekylvekt på ca. 42 kDa. Aktinmolekylet har form som et peanøttskall. Aktinmolekylet er delt inn i et stort domene og et mindre domene (Puolanne og Halonen, 2010). Det lille domenet er igjen delt i to subdomener, hvor subdomene 1 har en netto negativ ladning, mens subdomene 2 har en netto positiv ladning. Førstnevnte domene er involvert i bindingen av myosinhodet. Det store domenet består igjen av subdomene 3 og subdomene 4. Ifølge Wiggins (1990) har aktin totalt 21% negative ladninger og 12% positive ladninger, slik at netto ladning av G-aktin blir negativ (sitert etter Puolanne og Halonen, 2010). Det er en kløft mellom de to hoveddomene (nærmere bestemt mellom subdomene 1 og 3) som innehar et ATP-bindesete (Puolanne og Halonen, 2010).



Figur 6: Fremstilling av subdomenene til G-aktin (modifisert figur fra Puolanne og Halonen, 2010 - gjengitt fra Geeves, Fedorov og Manstein, 2005).

G-aktin finnes bare som monomer ved svært lave ionestyrker (Strasburg et al., 2008). Ved fysiologisk ionestyrke og i tilstedeværelsen av MgATP vil G-aktin polymeriseres (fra ende til ende) til en dobbeltrådet kveilet spiral, kalt filamentært aktin, eller F-aktin. F-aktin består av ca. 400 aktinmolekyler og er vridd i en superheliks (Puolanne og Halonen, 2010). De to endene av aktinfilamentet er ulike, hvor den ene enden kalles for den «spisse» enden og den andre

kalles for den «piggete» enden. Den spisse enden er negativt ladet og peker mot A-båndet, mens den piggete enden er positivt ladet og peker mot Z-disken. To aktinfilamenter er derfor forankret i hver sin Z-disk (på motsatt side av M-linjen) (Strasburg et al., 2008). Under kontraksjon beveger begge seg mot-M-linjen, og dermed også mot hverandre. Strukturen og egenskapene til F-aktin avhenger av hvilke ligander som er bundet (ATP/ADP) og type ioner i løsningen (Puolanne og Halonen, 2010).



Figur 7: Skjematisk fremstilling av F-aktin (modifisert figur fra Puolanne og Halonen, 2010).

Regulatoriske proteiner

Aktinfilamentene er omsluttet av de regulatoriske proteinene tropomyosin og troponin (Strasburg et al., 2008). Sammen utgjør tropomyosin og troponin den regulatoriske bryteren som skrur muskelkontraksjonen av og på i sarkomeren. Funksjonen til tropomyosin er å regulere interaksjonen mellom de tynne og de tykke filamentene, samt stabilisere de tynne filamentene (Puolanne og Halonen, 2010). Tropomyosin består av to α -heliks-subenheter som flettes sammen for å danne en lang stavliknende kveilet spiral (Strasburg et al., 2008). Det er funnet to ulike typer tropomyosin i muskelen: α -tropomyosin og β -tropomyosin. Disse kan kombineres på ulike måter og danner da enten homodimere eller heterodimere. Troponin er et kompleks bestående av tre proteiner: troponin-T, troponin-I og troponin-C (Puolanne og Halonen, 2010). Troponin-komplekset binder seg til tropomyosin og responderer på endringer i kalsiumkonsentrasjon for å kontrollere aktin-myosin-interaksjoner, og dermed også muskelkontraksjon (Strasburg et al., 2008).

Strukturelle proteiner

Titin er det tredje mest utbredte proteinet i musklene og er det største proteinet som hittil er funnet (Strasburg et al., 2008). Titin er et fleksibelt, elastisk filamentært protein hvor N-enden er forankret i Z-disken og C-enden er forankret i M-linjen. Titin fungerer som en molekylær «fjær», ved at den opprettholder den strukturelle arrangementen av tynne og tykke filamenter. Titin bidrar dermed til en passiv muskelstivhet. Når muskelen slapper av er det også titin som bidrar til å gjenopprette den fulle lengden av sarkomeren.

Nebulin er også et stort protein og er tilstede i ca. samme mengde som tropomyosin og troponin (Strasburg et al., 2008). Nebulin fungerer som en molekylær «linjal», ved at den bidrar til å spesifisere lengden til tynne filamenter. Proteinene er også involvert i signaltransduksjon, kontraktregulering og i styrkeregulering av myofibrillene.

α -aktinin er en stor komponent i Z-disken og fungerer som et aktin-bindingsprotein (Strasburg et al., 2008). α -aktinin har tre domener, et globulært N-terminalt aktinbindesete, et sentralt stavdomene, og et C-terminalt domene. Det sentrale stavdomenet fungerer som et bindeledd for

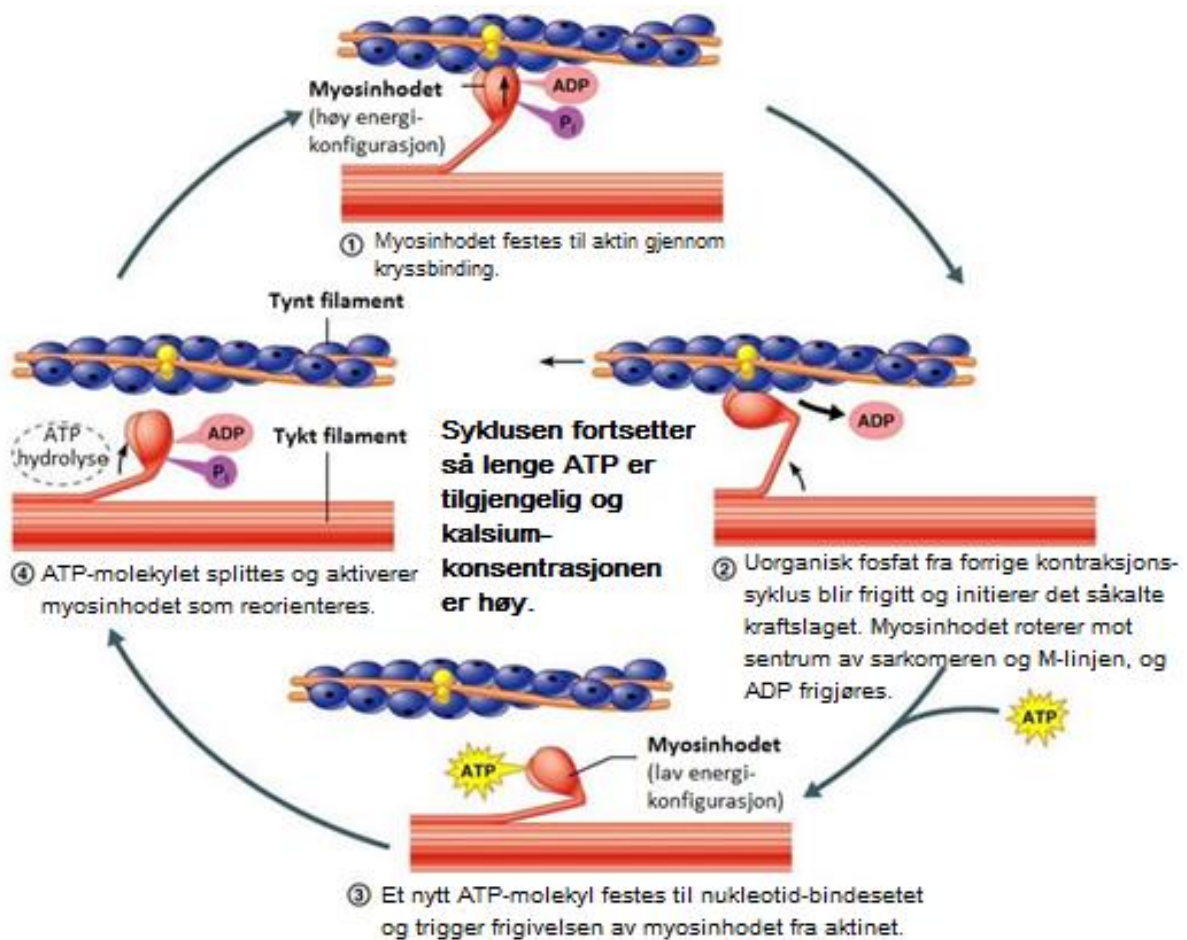
aktin- og titinfilamenter fra to nærliggende sarkomerer, ved at de stabiliserer antiparallele dimere som danner kryssbindinger mellom de to filamentene.

Cap-Z og tropomodulin kalles ofte for kappeproteiner, og er proteiner som stabiliserer endene til aktinfilamentene; tropomodulin stabiliserer den spisse enden, mens Cap-Z stabiliserer den piggete enden (Puolanne og Halonen, 2010).

Det er også flere andre strukturelle proteiner tilstede i myofibrillene, slik som desmin, filamin, C-protein, H-protein og myomesin. Disse er sammen med de ovennevnte proteinene også med på å bidra til stabilitet og elastisitet (Strasburg et al., 2008).

2.1.2 Muskelkontraksjon

Grunnlaget for muskelkontraksjon er interaksjonen mellom de tykke og de tynne filamentene (Rustad, 1998). Myosin og aktin utgjør hovedkomponentene i henholdsvis de tykke og de tynne filamentene, og det er kryssbindinger mellom disse proteinene som kobler de tykke og de tynne filamentene sammen (Strasburg et al., 2008). Dette blir muliggjort som følge av myosinhodenes orientering i de tykke filamentene. Muskelkontraksjon er forårsaket av at de tykke og tynne filamentene trekkes mot hverandre (Rustad, 1998). Filamentene opprettholder konstant lengde, noe som fører til at sarkomeren, og dermed hele muskelen, blir kortere og tykkere. Den kjemiske energien som kreves til muskelkontraksjonen kommer fra nedbrytning av ATP. Kjemisk energi i form av ATP blir altså omdannet til mekanisk energi, slik at muskelen kan trekke seg sammen.



Figur 8: Kontraksjonssyklus (modifisert figur fra Shier, Butler, og Lewis, 2008).

I en hvilende muskel (ikke-kontrahert tilstand) er myosinhodene og aktin ikke bundet sammen, fordi tropomyosin er plassert på en slik måte at dannelse av kryssbindinger mellom de to proteinene blir forhindret (Strasburg et al., 2008). Myosinmolekylet har et ATP-molekyl bundet til seg, men splittelsen av ATP blir ikke aktivert grunnet for lav kalsiumkonsentrasjon (Rustad, 1998). Dette skyldes at kalsiumionene oppholder seg i sarkoplasmatiske retikulum. Kalsium vil imidlertid bli frigjort når nerveimpulser mottas på membranoverflaten. Dette fører til en økning i kalsiumkonsentrasjonen inne i cellen, slik at kjedereaksjonen som fører til muskelkontraksjon aktiveres.

Kalsiumioner bindes til troponin-C, noe som fører til en konformasjonsendring i troponin-komplekset (Strasburg et al., 2008). Denne konformasjonsendringen fører igjen til en forflyttelse av tropomyosin. Denne forflytningen gjør at det aktive setet i aktinmolekylet blir ledig, slik at det kan binde myosinhoder fra de tykke filamentene (Rustad, 1998). Kalsiumioner aktiverer også ATP-ase-aktiviteten til myosin, slik at ATP-molekylene splittes på samme tid som myosinhodene bindes til aktin. Det kan nå sies at myosin er i sin aktiverte tilstand. Energien i myosin frigjøres ved konformasjonsendringer i myosinhodene, slik at de under de ulike stegene i syklusen opptrer i ulike vinkler i forhold til de tykke filamentene. Dette gjør at de for hver runde i syklusen reagerer med ulike aktinmolekyler. Uorganisk fosfat fra forrige kontraksjonssyklus blir så frigitt og initierer det såkalte kraftslaget; myosinhodene roterer mot sentrum av sarkomeren og trekker på aktinfilamentet slik at aktin og myosin går mot hverandre (Strasburg et al., 2008). Videre frigjøres ADP slik at et nytt ATP-molekyl bindes til myosinmolekylet (Rustad, 1998). Dette trigger frigjøring av myosin fra aktin. Syklusen vil gjentas så lenge det er nok ATP tilstede og kalsiumkonsentrasjonen er høy (Strasburg et al., 2008). Når nerveimpulsen opphører, pumpes kalsium tilbake til sarkoplasmatiske retikulum av en ATP-dreven pumpe, og tropomyosin returnerer til sin opprinnelige posisjon, slik at aktin ikke kan reagere med myosinhodene (Rustad, 1998). Syklusen er nå inaktivert og muskelen er tilbake i hviletilstand.

2.1.3 Muskelproteinenes funksjonelle egenskaper

De funksjonelle egenskapene til proteinene refererer til proteinenes fysiske og kjemiske egenskaper, og hvordan disse påvirker oppførselen til proteinene i mat under lagring og prosessering (Kinsella, 1982). De fysiske og kjemiske egenskapene som påvirker proteinfunksjonalitet er proteinstørrelse og form, aminosyresammensetning og -sekvens, netto ladning og ladningsfordeling, forholdet mellom hydrofob og hydrofil karakter, sekundær-, tertiær- og kvartærstruktur, molekylær fleksibilitet og stivhet, og evnen til å reagere med andre komponenter (Damodaran, 2008). De funksjonelle egenskapene til proteiner inkluderer løselighet, vannbindingsevne, viskositet, geling, emulgeringsevne, skumdannelse, elastisitet, fett- og smaksbinding og kohesjon-adhesjon. Av de nevnte egenskapene er det løselighet og vannbindingsevne som er de viktigste funksjonelle egenskapene i mat basert på muskel, og disse vil derfor bli gjennomgått i de følgende delkapitlene.

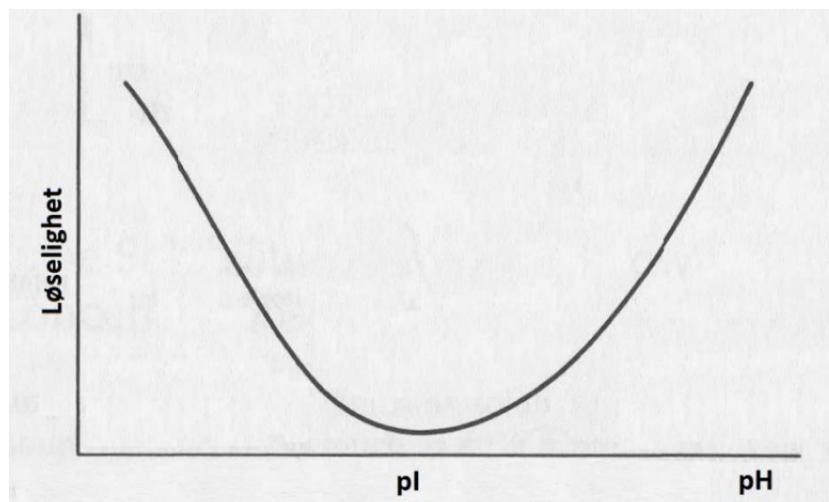
2.1.3.1 Løselighet

Løselighet er en funksjonell egenskap med stor betydning, grunnet sin innflytelse på de andre funksjonelle egenskapene til proteinene (Pelegrine og Gasparetto, 2005). Nakai og Li-Chan (1985) og De Wit og Fox (1989) påpeker at proteinene i mat trenger en høy løselighet for å blant annet gi gode emulsjoner og gelingsevner, samt god skumdannelse (sitert etter Pelegrine og Gasparetto, 2005). Som beskrevet av Vojdani (1996) vil altså lav løselighet ha en negativ

innvirkning på den helhetlige funksjonaliteten til proteinet (sitert etter Pelegrine og Gasparetto, 2005).

Løselighet kan defineres som den prosentvise mengden protein som holdes i en løsning under gitte forhold, og som ikke felles ut ved moderate sentrifugalkrefter (Skaara og Regenstein, 1990). Proteinløselighet er bestemt av likevekten mellom protein-protein-interaksjoner og protein-vann-interaksjoner (Damodaran, 2008). Løselighet påvirkes altså av interaksjoner som påvirker den hydrofobe og hydrofile karakteren til proteinet. Hydrofobe interaksjoner fremmer protein-protein-interaksjoner og reduserer løselighet. Hydrofile interaksjoner promoterer protein-vann-interaksjoner og øker løselighet. Proteinløselighet påvirkes av blant annet pH, salt og temperatur.

pH påvirker løseligheten ved å endre ladningene på muskelproteinene (Damodaran, 2008). Proteinløseligheten er minst ved det isoelektriske punktet til proteinene, grunnet elektrostatisk nøytralitet. Dette betyr dominans av hydrofobe områder som fremmer protein-protein-interaksjon. Ved pH-verdier over eller under det isoelektriske punktet har proteinet henholdsvis netto negativ eller netto positiv ladning. En økning i hydrofil karakter vil fremme interaksjoner mellom proteiner og vann, og dermed gi en økt løselighet. En graf som viser sammenhengen mellom pH og proteinløselighet vil derfor ha en tydelig U-formet kurve. De fleste proteiner i mat har et isoelektrisk punkt ved sur pH, noe som gjør proteinene mindre løselige ved pH-verdier under pI, og mer løselige ved pH-verdier over pI. Dette gjelder også myofibrillproteinene, hvor både myosinfilamentet og F-aktinet er polyelektrolytter med en netto negativ ladning ved fysiologisk pH (Perisic, 2012). Myofibrillproteinene har minst løselighet ved pH 4,5-5,5 (isoelektrisk punkt) og størst løselighet ved pH-verdier over pI (Huss, 1988).



Figur 9: Sammenheng mellom pH og proteinløselighet i muskelvev (modifisert figur fra Scopes, 2013).

Som nevnt er både aktin og myosin klassifisert som saltløselige proteiner, men løseligheten deres er derimot ulik; myosin løses mye lettere enn aktin (Perisic, 2012). Ved fysiologisk pH, og dermed også ofte ved det pH-området som benyttes i mat, vil myosinhalene i myosinmolekylene vekselvirke med hverandre, og dermed være lite løselige i vann og fortynnede saltløsninger (Rodger og Wilding, 1990). For å øke løseligheten må derfor vekselvirkningene mellom halene reduseres. Dette kan gjøres ved å benytte saltløsninger med

høy ionestyrke. Dette kan også kombineres med å justere pH. Ettersom myosinfilamentene har en netto negativ ladning, blir det mest gunstig å benytte en pH som ligger over det isoelektriske punktet. Det er vanlig å ekstrahere myosin med salt- og fosfatblandinger med en pH på rundt 7.

Når ionestyrken til saltløsningen er over 0,25 vil de tykke filamentene gradvis starte å dissosiere til myosinmolekyler, og ved høye saltkonsentrasjoner (0,6 M KCl) vil salt løse opp myosinfilamentene (Perisic, 2012). Dette skjer mens aktin fortsatt er bundet til det tykke filamentet. Aktin derimot, er mye mindre løselig, og ifølge Offer og Trinick (1983) og Offer og Knight (1988), løses ikke aktin før NaCl-konsentrasjonen er over 2,7 M (sitert etter Perisic, 2012). Offer og Trinick (1983) hevder videre at tilsetning av salt forårsaker en depolymerisering av de tykke filamentene med bundet aktin, som fortsatt er intakt (sitert etter Perisic, 2012). Ifølge Rodger og Wilding (1990) har aktin dårligere gelningsegenskaper enn myosin, og de har derfor hevdet at det er viktigere å fokusere på å bedre løselighetsegenskapene til myosin fremfor aktin. Påvirkningen av salt vil bli gjennomgått grundigere i teoridel 2.2.

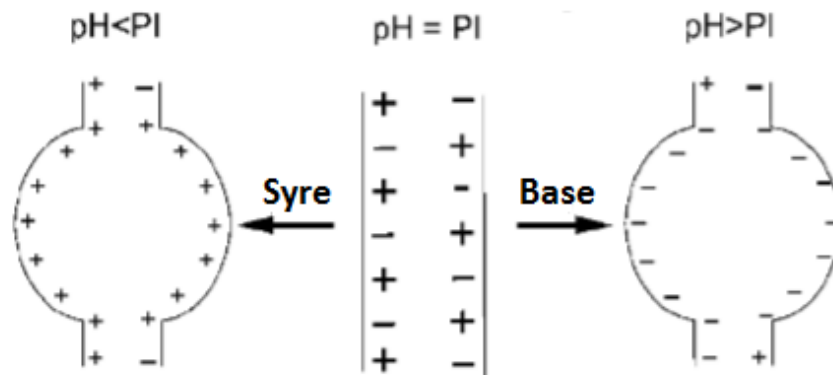
2.1.3.2 Vannbindingsvne

Murray og Burt (1969) påpeker at vann er en betydningsfull bestanddel i all mat, deriblant i kjøtt- og fiskeprodukter (sitert etter FAO, 2001). Murray og Burt (1969) hevder at vann utgjør opptil 70-80% av den totale vekten til fiskemuskel (sitert etter FAO, 2001). Vann er et dipolart molekyl og tiltrekkes derfor av ladde molekyler, slik som for eksempel proteiner (Huff-Lonergan og Lonergan, 2005). De viktigste funksjonelle egenskapene til proteiner er relatert til deres interaksjon med vann, og disse protein-vann-interaksjonene påvirker egenskaper slik som blant annet vannbindingsevne, løselighet, svelling, viskositet, geldannelse og emulgeringsevne (Damodaran, 2008). Proteinenes evne til å holde på vann virker inn på tekstur, saftighet, mørhet, farge og smak, og er derfor en av de mest avgjørende faktorene for kvaliteten til kjøtt og fisk (Zayas, 1997).

I litteraturen har interaksjonene mellom vann og proteiner blitt definert om hverandre som blant annet vannholdingskapasitet, vannbindingsevne, vannhydrering, vannretensjon og vannabsorbans (Zayas, 1997). Det eksisterer ingen standardisert terminologi for disse begrepene, og det er derfor ulike kombinasjoner av begreper og forklaringer av fenomenet. I denne oppgaven har jeg valgt å holde meg til begrepet vannbindingsevne (VBE).

I litteraturen er det gitt mange varianter av begrepet vannbindingsevne. Zayas (1997) definerer VBE som matvarenes evne til å holde på sitt eget eller tilsatt vann under påvirkning av ytre krefter, slik som pressing, sentrifugering eller oppvarming. Damodaran (2008) referer til VBE som proteinenes evne til å absorbere og holde på vann i en proteinmatriks som påvirkes av en ytre kraft. Dette vannet er summen av bundet vann, kapillærvann og fysisk fanget vann. Vannet i musklene er lokalisert inne i myofibrillene (mellom de tynne og tykke filamentene), mellom myofibrillene, mellom myofibrillene og cellemembranen, mellom muskelfibre, og mellom muskelbuntene (Huff-Lonergan og Lonergan, 2005). Noe av vannet er direkte bundet til proteinene. Denne typen vann kalles ofte for bundet vann. En annen fraksjon av vann er også lokalisert inne i muskelstrukturen, men er ikke direkte bundet til proteinene. Denne typen vann kalles ofte for fanget vann eller immobilisert vann. Det er dette vannet som bidrar mest til VBE, og har dermed også størst betydning for kvaliteten til produktet. Det er derfor ønskelig å holde på så mye som mulig av dette vannet.

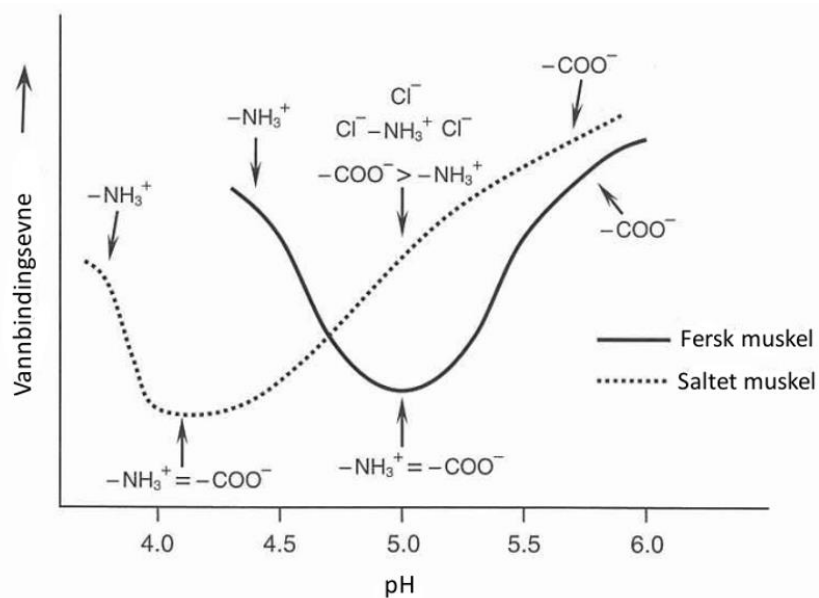
Det er flere faktorer som påvirker VBE, slik som pH, salt, temperatur og proteinkonformasjon (Damodaran, 2008). pH endrer VBE ved å påvirke ladningene til muskelproteinene. VBE er lavest ved det isoelektriske punktet grunnet dominans av protein-protein-interaksjoner, og dermed liten grad av vann-protein-interaksjoner. Ved pH-verdier over eller under det isoelektriske punktet, vil proteinene bære en henholdsvis netto negativ eller netto positiv ladning. Dette vil gi en økning i elektrostatiske frastøtninger mellom myofibrillene, som igjen vil føre til økt VBE og svelling.



Figur 10: Innvirkning av pH på proteinladning og svelling (modifisert figur fra Albarracín et al., 2011 - gjengitt fra Girard 1991).

Salt påvirker VBE ved å endre ladningene på muskelproteinene (Strasburg et al., 2008). Det er enighet om at dette hovedsakelig er forårsaket av en selektiv binding av ioner til muskelproteinene (Ruusunen og Puolanne, 2005). Hvordan denne selektive bindingen fører til endringer i VBE er imidlertid noe usikkert. Hamm (1972) hevder at dette forårsaker frastøtning mellom myofibrillproteinene, slik at myofibrillene sveller (sitert etter Ruusunen og Puolanne, 2005). Offer og Knight (1988) hevder derimot at svelling induseres av en endring i myofibrillgitteret, forårsaket av frastøtning mellom myosinfilamentene (sitert etter Ruusunen og Puolanne, 2005).

Damodaran (2008) hevder at tilsats av salt påvirker VBE på to måter, avhengig av konsentrasjonen. Ved lave saltkonsentrasjoner (<0,2 M) vil VBE øke fordi hydrerte saltioner, spesielt anioner, bindes til ladde grupper på proteinet. Ved høye saltkonsentrasjoner derimot, er mesteparten av vannet allerede bundet av saltionene, og det oppstår derfor en konkurranse om vannet mellom proteinene og overskuddet av saltionene, noe som vil resultere i en redusert VBE. Albarracín et al. (2011) hevder derimot at tilsats av salt ved lave konsentrasjoner ikke nødvendigvis gir en økning i VBE. Ved $pH > pI$ er det de positive ladningene som dominerer. Tilsats av kloridioner vil da nøytralisere en del av de positive ladningene og på denne måten minke frastøtningen mellom myofibrillene, som igjen vil resultere i mindre svelling og dårligere VBE. Ved $pH < pI$ er det de negative ladningene som dominerer. Tilsats av kloridioner vil da nøytralisere de få gjenværende positive ladningene, og på denne måten øke frastøtningen mellom myofibrillene. Dette gir økt svelling og større VBE. Ved høye saltkonsentrasjoner vil tilsats av salt endre det isoelektriske punktet til myosin (Strasburg et al., 2008). På grunn av en økt netto negativ ladning forflyttes pI til en lavere pH-verdi. Dette gjør at myosin vil bære en større netto ladning innenfor det normale pH-området. Påvirkningen av salt vil bli grundigere gjennomgått i teoridel 2.2.



Figur 11: Skjematisk fremstilling av forholdet mellom pH og vannbindingsevne til proteiner i ferskt og saltet kjøtt (modifisert figur fra Strasburg et al., 2008).

VBE til proteiner vil som regel minke med økende temperatur (Damodaran, 2008). Dette skyldes at antall hydrogenbindinger og hydreringen av ioniske grupper reduseres. Dersom temperaturøkningen resulterer i denaturering, vil VBE derimot kunne øke. Dette skyldes økning i overflateareal og eksponering av hydrofobe grupper. Dersom denatureringen fører til aggregering, kan derimot VBE minke igjen grunnet fortregning av vann, som følge av en økning i protein-protein-interaksjoner. I mat derimot, har VBE vist seg å variere lite mellom de to proteintilstandene. De denaturerte proteinene har imidlertid vist seg å ha lavere løselighet. Dette betyr at det ikke nødvendigvis kan trekkes slutninger om endringer proteinenes løselighet, kun på grunnlag av endringer i VBE. Påvirkningen av temperatur vil bli gjennomgått i teoridel 2.3.

2.2 Saltkjemi

Ifølge Timasheff og Fasman (1969) påvirker salt egenskaper til proteiner, slik som stabilitet, løselighet og biologisk aktivitet (sitert etter Arakawa og Timasheff, 1984). Tanford (1961) hevder at effekten av saltet ved lave saltkonsentrasjoner, kun er avhengig av ionestyrken (sitert etter Arakawa og Timasheff, 1984). Ionestyrken i en løsning gir et mål på konsentrasjonen av ioner i løsningen (Damodaran, 2008). Ionestyrken er definert som:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i Z_i^2 \quad (1)$$

hvor C_i representerer den molare konsentrasjonen til ionet i , og Z_i representerer ladningen. Tanford (1961) hevder videre at lave saltkonsentrasjoner vil stabilisere proteiner gjennom ikke-spesifikke elektrostatiske interaksjoner (sitert etter Arakawa og Timasheff, 1984). Saltionene nøytraliserer altså ladningene på proteinoverflatene. Damodaran (2008) hevder derimot at denne laddingsnøytraliseringen ikke alltid vil føre til en økt proteinestabilitet. Laddingsnøytraliseringen kan ha to utfall, avhengig av egenskapene til proteinenes overflate; stabiliteten vil øke for proteinoverflater dominert av upolare områder, mens stabiliteten vil synke for proteiner dominert av hydrofile områder. Ved høye saltkonsentrasjoner derimot, avhenger effekten både av type salt og konsentrasjon (Arakawa og Timasheff, 1984). Slik som hevdet av von Hippel og Wong (1962), kan det altså sies at effekten av salter på proteiner er

ionespesifikke, hvor effekten enten kan være stabiliserende eller destabiliserende (sitert etter Lawal, 2006). Effekten av ionene følger Hofmeisterserien – anioner vil ha en minkende stabiliserende effekt i rekkefølgen: $\text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4 > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$, mens kationer vil ha en økende stabiliserende effekt i rekkefølgen: $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$ (Puolanne og Halonen, 2010).

Den blå fargen indikerer at ionet er kaotroft, mens den røde fargen indikerer at ionet er kosmotroft. Ifølge Wiggins (2001) refererer termen «kaotrof» til salter som destabiliserer proteinstrukturen, mens termen «kosmotrof» referer til salter som stabiliserer proteinstrukturen (sitert etter Lawal, 2006). Ifølge de Xammar Oro (2001) har definisjonen i senere tid blitt utvidet til å omhandle struktureringen av vann, som en forklaring på ionenes stabiliserende og destabiliserende effekter (sitert etter Lawal, 2006). Uedaira og Uedaira (2001) hevder at kaotrofe salter svekker nettverket av vann ved å bryte hydrogenbindinger (sitert etter Lawal, 2006). Dette gir proteinene mer strukturell frihet og bidrar dermed til økt svelling og denaturering. Denne destabiliseringen gir en økt proteinløselighet (innsalting). Kosmotrofe salter øker ordningen av vann, og minker dermed den strukturelle friheten til proteinene, og bidrar dermed til økt aggregering. Denne stabiliseringen gir en redusert proteinløselighet (utsalting). Zhao (2005) hevder at proteiner stabiliseres av sterke kaotrofe kationer og kosmotrofe anioner, og destabiliseres av kosmotrofe kationer og kaotrofe anioner (sitert etter Puolanne og Halonen, 2010).

Perisic (2012) hevder at Hofmeisterserien hovedsakelig er utviklet med hensyn på vannløselige globulære proteiner, og at serien derfor kun bør brukes som en retningslinje når det kommer til tolkning av interaksjonene mellom myofibrillproteiner og salt. Videre, ifølge Perisic (2012), impliserer den utvidede definisjonen av begrepene «kosmotrof og kaotrof» at ionene påvirker proteinene ved å først påvirke struktureringen av vann. Det er altså endringene i struktureringen av vann som fører til endringer i proteinkonformasjonen. Perisic (2012) sår tvil om denne utvidede definisjonen, ettersom han hevder at en rekke nye studier heller har foreslått direkte interaksjon mellom ionene og proteinene.

Ifølge Puolanne og Halonen (2010) har Hofmeisterserien lenge vært «glemt». Dette mener de skyldes at teorien har manglet en teoretisk forklaring på hvorfor ulike salter reager forskjellig med proteinene. Dette har Collins (1997) forklart med «Loven om matchende vannaffiniteter» (sitert etter Puolanne og Halonen, 2010). Ifølge Collins (1997) vil positive og negative ioner med tilnærmet samme størrelse og ladning foretrekke hverandre (sitert etter Puolanne og Halonen, 2010). Dette betyr altså at likt foretrekker likt (Puolanne og Halonen, 2010). Ifølge Squire et. al (1998) er ionene i Hofmeisterserien arrangert etter ladningstettheten på overflaten, som korrelerer med ionenes vannaffinitet (sitert etter Puolanne og Halonen, 2010). Dette betyr at anioner og kationer som er kaotrofe vil foretrekke å bindes til hverandre, mens anioner og kationer som er kosmotrofe vil foretrekke hverandre (Puolanne og Halonen, 2010). Collins (2007) rangerer styrken av interaksjoner i vandige saltløsninger i følgende minkende rekkefølge: to kosmotrofer > kosmotrofer og vann > to vannmolekyler > kaotrofer og vann > to kaotrofer (sitert etter Puolanne og Halonen, 2010). Loven om matchende vannaffiniteter kan brukes til å forklare effekten av NaCl på aktin- og myosinfilamenter (Puolanne og Halonen, 2010).

NaCl er et salt bestående av et kosmotroft kation og et kaotroft anion (Puolanne og Halonen, 2010). Natrium vil som nevnt gjerne binde seg til kosmotrofe anioner, slik som karboksylsyrer.

Disse er å finne i asparagin- og glutaminsyre, som igjen er lokalisert i sidekjedene på myosinmolekylene. I tillegg vil natrium akkumuleres rundt F-aktinet. Natrium skaper derfor en ladningsnøytralisering og bidrar til en økt stabilitet av proteinene. Klorid kan derimot sentrere seg rundt upolare områder på myosinmolekylene og dermed gjøre overflaten mer negativt ladet. Dette gir frastøtning mellom myosinmolekylene som fører til en svelling av myosinfilamentene, og dermed også en svelling av hele myofibrillen. Ifølge Hamm (1972) er dette bidraget dominerende, noe som dermed vil gi en netto destabilisering og økt løselighet (sitert etter Puolanne og Halonen, 2010). Ut fra dette kan altså NaCl kalles et destabiliserende salt, ettersom den helhetlige effekten er destabiliserende (Puolanne og Halonen, 2010).

2.2.1 Saltreduksjon

NaCl er en av de mest brukte ingrediensene i prosessert mat (Ruusunen og Puolanne, 2005). NaCl er et utbredt og billig konserveringsmiddel. Saltet påvirker blant annet smaken, teksturen og holdbarheten til produktet. Gillette (1985) påpeker at NaCl gir en opplevd saltsmak, samt bringer frem den karakteristiske smaken til produktet (sitert etter Ruusunen og Puolanne, 2005). Det er hovedsakelig natrium som står for den ønskede saltsmaken, mens klorid bidrar til å modifisere oppfattelsen av denne saltsmaken (Desmond, 2006). Dette gjør NaCl til det mest saltmakelige saltet (Doyle og Glass, 2010). Ifølge Terrell (1983) forbedrer NaCl også vann- og fettbindingsegenskaper, noe som resulterer i en ønskelig tekstur ved matlaging (sitert etter Ruusunen og Puolanne, 2005). I tillegg har NaCl en konserverende effekt, som påpekt av Marsh (1988) og Sofos (1984) først og fremst skyldes saltets evne til å redusere vannaktiviteten (sitert etter Ruusunen og Puolanne, 2005).

Basert på vitenskapelig informasjon, har matindustrien og forbrukere blitt mer oppmerksomme på forholdet mellom natrium og høyt blodtrykk (Ruusunen og Puolanne, 2005). Ettersom NaCl er hovedkilden til natrium, har etterspørselen etter lavsaltprodukter økt betraktelig. Matindustrien har derfor utviklet en rekke lavsaltprodukter for å imøtekomme kravene til forbrukerne. Utvikling av lavsaltprodukter er imidlertid ikke enkelt. Målestokken til lavsaltproduktet er normalproduktet, og de samme kvalitetsegenskapene gjelder derfor for lavsaltproduktet. Dette byr på store utfordringer, ettersom egenskapene til lavsaltproduktet ofte er forskjellig fra normalproduktet. Et spesielt problem med lavsaltprodukter er ikke bare at den opplevde saltsmaken avtar, men også at intensiteten av den karakteristiske smaken til produktet minker. I tillegg vil produktet kunne gi andre teksturegenskaper, grunnet NaCl sin påvirkning på vann- og fettbinding. Som nevnt, er også bruk av NaCl en billig konserveringsmetode, slik at andre alternativer vil øke kostnaden av produktet. Det å kunne utvikle produkter med et redusert NaCl-innhold, som på samme tid skal være trygge, velsmakende og lønnsomme, er derfor svært utfordrende.

Det er flere fremgangsmåter som kan benyttes for å produsere lavsaltprodukter (Desmond, 2006). Reduksjon av NaCl kan utføres i kombinasjon med tilsetning av andre salter, såkalte salterstatte. Det kan også benyttes mineralblandinger, smaksforsterkere og maskerende forbindelser, eller såkalte «bindeforbindelser». Saltreduksjon kan også utføres i kombinasjon med teknikker som eksempelvis fokuserer på å endre den fysiske formen til saltet, eller som fokuserer på selve kjøttet. Disse metodene vil bli beskrevet i de påfølgende delkapitlene, hvor det vil bli fokusert mest på bruken av salterstatte.

2.2.1.1 Salterstattere

Bruk av salterstattere er en av de vanligste metodene for å redusere NaCl i prosessert mat (Desmond, 2006). Forskning indikerer at 25-40% av NaCl kan erstattes uten at endringen i smak merkes av konsumentene. Det er derfor vanlig å benytte saltblandinger, slik at deler av NaCl-innholdet erstattes med andre salter. Salterstatningen kan gjennomføres på ulike måter. Natrium kan erstattes med et annet kation, slik som kalium, kalsium, magnesium eller litium, noe som gir saltene KCl, CaCl₂, MgCl₂ og LiCl. NaCl kan også erstattes fullstendig av andre salter slik som MgSO₄ og kaliumlaktat. KCl er antakeligvis den mest benyttede salterstatteren.

Magnesium er et essensielt mineral som inngår i mange fysiologiske prosesser i menneskekroppen (Barat, Pérez-Esteve, Aristoy, og Toldrá, 2013). Magnesium er nødvendig for at kroppens metabolisme, samt hjerte og andre muskler skal fungere som normalt. Barat et al. (2013) hevder at det til nå ikke er påvist noen negative helseeffekter av et økt magnesiuminntak, noe som blant annet skyldes at et eventuelt overskudd utskilles via nyrene. Sett ut ifra et helseperspektiv, virker erstatning av natrium med magnesium som et lovende alternativ (Barat et al., 2013). Det er imidlertid flere problemer knyttet til bruken av magnesium. Magnesium, slik som de fleste andre salter, stimulerer flere ulike smaker, og mest karakteristisk er saltsmak og bittersmak. I tillegg er magnesium kjent for å gi opphav til avsmak. Magnesium byr derfor blant annet på et sensorisk problem. Dette kan imidlertid kompenseres for ved bruk av maskerende forbindelser og lengre lagring etter salting.

Magnesium er et divalent kation, og oppfører seg derfor noe annerledes enn monovalente kationer, som natrium (Barat et al., 2013). Bruk av magnesium kan derfor ha ulik effekt på funksjonelle egenskaper slik som løselighet og VBE. Magnesium har en større ladningstetthet enn natrium, og har derfor vanskeligere for å penetrere muskelvevet. Ifølge Xiong og Brekke (1991) bindes også magnesium sterkere til polare grupper i proteinet, og styrker dermed interaksjonene mellom proteinene (sitert etter Barat et al., 2013). Ifølge Xiong og Brekke (1991) har de forsterkede protein-protein-interaksjonene vist seg å kunne hindre penetrering av andre ioner, slik som klorid (sitert etter Barat et al., 2013). Videre vil disse protein-interaksjonene kunne føre til aggregering, og aggregeringen vil ifølge Nayak, Kenney og Slider (1996) øke med økende konsentrasjon av saltet (sitert etter Martínez-Alvarez, Borderías, og Gómez-Guillén, 2005). Ifølge Barat et al. (2013) har disse elementene vist seg å kunne ha en negativ effekt på både løselighet og VBE.

2.2.1.2 Andre fremgangsmåter

Bruk av mineralblandinger gjør det mulig å opprettholde den samme saltsmaken med lavere mengde NaCl (Ruusunen et al., 2005). Noen av disse mineralblandingene har blitt kommersialiserte (Desmond, 2006). Et eksempel på dette er Pansalt[®]. I Pansalt[®] er natriuminholdet nesten halvert ved at det er erstattet av KCl, MgSO₄ og L-lysin hydroklorid. L-lysin hydroklorid er tilsatt for å forsterke saltsmaken, samt for å maskere smaken av kalium og magnesium.

Bruk av smaksforsterkere og maskerende forbindelser vil henholdsvis kunne kompensere for den tapte saltsmaken og kamuflere uønskede smaker (Desmond, 2006). Det er flere smaksforsterkende og maskerende forbindelser som er kommersielt tilgjengelige, slik som gjærekstrakt, laktater, mononatrium glutamat og nukleotider. Ifølge Brandsma (2006) fungerer smaksforsterkere ved å aktivere reseptorer i munn og hals, og kompenserer derfor for den reduserte saltsmaken som følge av saltreduksjonen (sitert etter Desmond, 2006). Maskerende

forbindelser fungerer ved å kamuflere uønskede smaker fra andre salter, slik som for eksempel den metalliske smaken av KCl (Desmond, 2006). I lavsaltprodukter kan smaksforsterkere brukes alene, eller i kombinasjon med andre salter og maskerende forbindelser.

Såkalte «bindeforbindelser» kan benyttes for å erstatte saltløselige proteiner i fravær av NaCl eller ved reduserte NaCl-nivåer (Desmond, 2006). Disse ingrediensene forbedrer bindingen av kjøttbiter i farseprodukter. I tillegg kan de også øke vannbindingsevnen til produktet. Det er mange ulike forbindelser som kan brukes som bindeforbindelser, slik som for eksempel funksjonelle proteiner, fiber, hydrokolloider og stivelse.

Å optimalisere den fysiske formen til saltet vil kunne gjøre at saltsmaken blir mer tilgjengelig (Desmond, 2006). Intensiteten på saltsmaken er avhengig av saltets krystallstørrelse og krystallform. Det har blitt gjennomført forskning med flaket og kornet salt, hvor Campbell (1979) har vist at flaksalt er mer funksjonelt når det kommer til blant annet binding, økning i pH og proteinløselighet, samt utbytte under matlagning (sitert etter Desmond, 2006). Flaksalt har bedre og raskere løselighet enn kornet salt, og har derfor vist seg å være et bedre alternativ i for eksempel tørkede produkter hvor vann er fraværende (Desmond, 2006).

Bruk av alternative prosesseringsteknikker som fokuserer på selve kjøttet, er ifølge Monahan og Troy (1997) også et lovende alternativ i saltreduksjon (sitert etter Desmond, 2006). Dette kan eksempelvis gjøres ved å benytte høytrykksteknologi (Desmond, 2006). Ifølge Cheftel og Culioli (1997) kan trykkbehandling av selve kjøttet bidra til å forbedre proteinfunksjonaliteten ved et redusert NaCl-nivå (sitert etter Desmond, 2006).

2.3 Effekt av temperatur

Temperaturbehandlinger, slik som frysing og varmebehandling, er metoder som i stor grad benyttes i forbindelse med henholdsvis prosessering og lagring (Strasburg et al., 2008; Skipnes, 2011). Frysing er en vanlig måte å lagre og konservere mat på, mens varmebehandling er en vanlig metode i både prosessering og konservering. Selv om begge er effektive konserveringsmetoder, vil temperaturendringene som de medfører kunne føre til reaksjoner som induserer og fremmer proteindenaturering. Denaturering referer til omdannelse av proteinstrukturen, hvor proteinet mister sin opprinnelige form som et resultat av endringer i miljø (Damodaran, 2008). Proteinene endres fra en veldefinert foldet struktur, dannet under fysiologiske betingelser, til en utfoldet tilstand, under ikke-fysiologiske betingelser. I tillegg til temperatur, kan også miljøfaktorer som pH og ione styrke indusere denaturering. Proteindenaturering vil påvirke muskelproteinenes funksjonelle egenskaper, og dermed også ulike aspekter ved kvalitet.

2.3.1 Frysing og tining

Frysing er en av de mest effektive metodene for å konservere mat (Strasburg et al., 2008). Fra -10°C og nedover vil mikrobiell vekst og enzymatiske reaksjoner være vesentlig begrenset slik at kvalitetstapet til produktet minimaliseres. Fysiske og kjemiske reaksjoner kan derimot fortsatt skje under frysing, og dermed påvirke kvaliteten. Flere aspekter ved redusert kvalitet er knyttet til muskelproteinene, spesielt myofibrillproteinene, og skyldes hovedsakelig frysedenaturering og aggregering. Denaturering og aggregering gir et økt vanntap, samt redusert VBE og løselighet. Dette virker igjen inn på kvaliteten til produktet ved at blant annet saftighet og mørhet reduseres, noe som gir en uønsket hardere muskeltekstur i kjøtt og fisk.

Frysedenaturering av proteiner skjer som følge av dannelse og vekst av iskrystaller, som igjen fører til dehydrering og en økning i konsentrasjon av intracellulære komponenter i vannfasen (Strasburg et al., 2008). Jiang, Hwang og Chen (1998) har vist at selve denatureringen hovedsakelig skyldes dannelsen av disulfidbindinger, hydrogenbindinger og hydrofobe interaksjoner som følge av disse hendelsene (sitert etter Benjakul og Bauer, 2000). Dette kan føre til dannelse av kryssbindinger og dermed aggregering av proteinene (Benjakul og Bauer, 2000). Myofibrillproteinene er mindre stabile enn de sarkoplasmatiske proteinene, og er derfor mest utsatt for frysedenaturering (Shenouda, 1980). Stabiliteten til de ulike myofibrillproteinene er imidlertid svært varierende, hvor eksempelvis myosin har vist seg å være mer sensitiv for frysedenaturering enn aktin.

Kvalitetsendringene som oppstår under frysing, som følge av blant annet denaturering og aggregering av proteinene, påvirkes av hastigheten på frysingen og tiningen, varigheten på fryselagringen, frysetemperaturen og ikke minst hva slags atmosfære maten er pakket i under frysingen (Strasburg et al., 2008). Det har også blitt vist av blant annet Benjakul og Bauer (2000) at gjentatte fryse- og tineprosesser påvirker kvaliteten.

Johnston (1994) hevder at det som skjer med fisk under frysing ofte fremstår som forvirrende og motstridende i litteraturen. Dette er spesielt tilfellet når forskjellen mellom langsom og rask frysing omtales (Johnston, 1994). Ifølge Johnston (1994) skyldes denne tilsynelatende forvirringen hovedsakelig at kunnskapen ikke har vært tilstrekkelig for å forklare forskjellene i frysehastighet. Det er i dag antatt at en langsom fryseprosess er mer skadelig for kvaliteten enn rask frysing (Johnston, 1994). Hovedårsaken til forskjellene er ment å være proteindenaturering. Denatureringen avhenger av temperaturen, og redusert temperatur fører til mindre grad av denaturering. Denatureringen avhenger også av konsentrasjonen av intracellulære komponenter. Utfrysning av vann vil resultere i en høyere konsentrasjon av intracellulære komponenter, noe som igjen vil føre til økt denatureringshastighet. Det har blitt demonstrert at temperaturen for maksimal aktivitet ligger mellom 1°C og -2°C. Ifølge Johnston (1994) er altså dette det kritiske temperaturområdet for denaturering. Langsom frysing betyr mer tid i dette temperaturområdet, og det er denne faktoren som utgjør hovedforskjellen mellom langsom og rask frysing (Johnston, 1994).

Frysedenaturering og aggregering er vist å være artsavhengig (Benjakul og Bauer, 2000). Frysing bidrar til teksturendringer, og ifølge Ragnarsson og Regenstein (1989) er disse teksturendringene spesielt fremtredende i fisk tilhørende torskefamilien (sitert etter Benjakul og Bauer, 2000). Sotelo, Pineiro og Perez-Martub (1995) og Ang og Hultin (1989) hevder at en årsak til dette kan være produksjon av formaldehyd, som antas å reagere med proteiner og akselerere uønskede teksturendringer (sitert etter Benjakul og Bauer, 2000). Ang og Hultin (1989) hevder at nedgangen i proteinløselighet hovedsakelig er forårsaket av formaldehydmedierte kryssbindinger av proteiner (sitert etter Benjakul og Bauer, 2000). Hvorvidt dette faktisk er årsaken er imidlertid usikkert.

Det har vært rapportert et høyere vanntap for superkjølt torskefilet sammenliknet med superkjølt laksefilet (Duun og Rustad, 2008). Ifølge Duun og Rustad (2007) har mengden vann som tapes sammenheng med fiskeartens vanninnhold. Fisk med høyere vanninnhold har generelt et høyere vanntap, fordi de har en høyere andel svakt bundet vann. Studiet utført av Duun og Rustad (2008) viste også høyere grad av denaturering av saltløselige proteiner fra torskefilet, noe som også forklarer et høyere vanntap.

2.3.2 Varmebehandling

Varmebehandling er en av de vanligste metodene benyttet for å konservere mat (Skipnes, 2011). Varmebehandling er derimot utfordrende, spesielt i fisk, fordi det lett kan oppstå uønskede kvalitetsendringer i produktet. En utfordring av stor betydning innen varmebehandling er økt vanntap. Et økt vanntap er forårsaket av endringer i VBE til fiskemuskelproteinene. I fiskefileter og fiskefarse vil vanntap kunne påvirke kvalitetsparametere som blant annet tekstur, saftighet, farge og smak.

Varme er ansett for å være den vanligste denatureringsfaktoren i matprosessering og konservering (Damodaran, 2008). Under varmeprosessering blir proteinene utsatt for ulik grad av denaturering og forårsaker dermed strukturelle endringer i proteinnettverket (Skipnes, 2011). Disse endringene fører til at muskelen krymper, noe som resulterer i økt vanntap. Vanntap oppstår som følge av redusert VBE, og Huff-Lonergan og Lonergan (2005) hevder at det er det immobiliserte vannet som har størst innvirkning på VBE. Det er tilsynelatende enighet om at endringer i VBE i stor grad er knyttet til myofibrillproteinene. Myofibrillproteiner har stor evne til å immobilisere vann, og Olsson (2003) hevder at 5-15% av vannet i muskelen er immobilisert av disse (sitert etter Skipnes, 2011). Det har også blitt hevdet av Brown (1987) at myofibrillproteinenes rolle er mer avgjørende i fisk enn i kjøtt, ettersom kollagenmengden, samt stabiliteten til kollagen, er lavere (sitert etter Skipnes, 2011). Ifølge Hultin (1996) er kollagen et av de mest labile proteinene funnet i fiskemuskel, med en denatureringstemperatur på 30°C (sitert etter Skipnes, 2011). Flere av myofibrillproteinene er også kjent for å være varmelabile, men stabiliteten til de ulike proteinene varierer betraktelig. Ifølge Hultin (1996) vil eksempelvis α -aktinin, myosin, aktin, samt tropomyosin og troponin være uløselige ved henholdsvis 50°C, 55°C, 70-80°C og 80°C (sitert etter Skipnes, 2011).

Dunajski (1980) hevder at de sarkoplasmatiske proteinene har liten kapasitet til å immobilisere vann, og derfor bidrar lite til de strukturendringene som oppstår under varmebehandling (sitert etter Skipnes, 2011). Et studie utført av Greiff, Staurem, Nordvi, og Rustad (2015) på saltreduert fiskepudding, viste imidlertid en sterk korrelasjon mellom sarkoplasmatiske proteiner og VBE. Denne korrelasjonen ble forklart med at høye saltnivåer førte til en større mengde oppløste myofibrillproteiner i farsen, som igjen førte til at en større mengde av de sarkoplasmatiske proteinene ble holdt tilbake. De sarkoplasmatiske proteinene som er fanget i proteinnettverket ble videre hevdet å bidra til en økt mengde bundet vann, på grunn av osmotiske krefter. Dette var ment å være noe av forklaringen på økt VBE. Det som er hevdet av Dunajski (1980) er basert på den opprinnelige fiskemuskel, og ikke saltede farseprodukter av fiskemuskel. Det er derfor vanskelig å trekke en generell slutning om de sarkoplasmatiske proteinenes bidrag. Som nevnt, er fiskefarse et komplekst system, og det er tenkelig at rollen til de sarkoplasmatiske proteinene varierer med type produkt.

Tillagning av farseprodukter er en god måte å utnytte råstoffet på, og ulike former for fiskefarse har lang tradisjon i land som Norge. Fiskefarse brukes blant annet til å lage fiskekaker, fiskeboller og fiskepudding. Torsk er tradisjonelt mye benyttet i fiskefarse, men i senere tid har også fiskearter slik som laks blitt vanligere å benytte. Et av de viktigste aspektene ved produksjon av fiskefarse er å oppnå høy kokestabilitet for å forhindre tap av vann og fett (Ofstad, Kidman, Myklebust, Olsen, og Hermansson, 1995). Fiskefarse er et komplekst system fordi produktets egenskaper både avhenger av det opprinnelige muskelvevet og de nye strukturene som dannes i muskelvevet under prosessering. De funksjonelle egenskapene til et

slikt produkt tilsvarer derfor summen av egenskapene til de gjenværende individuelle fibrene og det nye nettverket som dannes.

Ofstad et al. (1993) undersøkte strukturelle endringer og VBE i oppdrettstorsk og -laks under varmebehandling. Vanntapet var tilnærmet uendret mellom 5°C og 20°C, og økte deretter noe mellom 20°C og 35°C. Et signifikant vanntap ble observert ved 30-35°C. De største strukturelle endringene i bindevevet oppstod ved lave temperaturer (5-40°C), og det ble antatt at dette hovedsakelig var forårsaket av denaturering og smelting av kollagen. Maksimalt vanntap ble observert ved 45-50°C. Dette ble antatt å være forårsaket av at muskelceller krymper som et resultat av denaturering av myosin. Fibrene krymper i tverrgående retning, noe som igjen fører til at sarkomerene krymper, slik at avstanden mellom de strukturelle enhetene øker. Det ble videre hevdet at denne nettverkssammentrekningen fører til at immobilisert vann lettere lekker ut som en følge av økt trykk. Over 50°C sank vanntapet for begge fiskearter, og var hevdet å mest sannsynlig skyldes aggregering av sarkoplasmatiske proteiner. Aggregatene ble hevdet å ha en bedre evne til å holde på vannet og/eller tette de intracellulære kapillærene, slik at vannet ikke slipper ut. Hatae, Yoshimatsu og Matsumoto (1984, 1990) og Kanoh et. al. (1988) hevder at variasjoner i VBE og vanntap mellom arter kan skyldes ulik mengde av koagulerende sarkoplasmatiske proteiner og/eller ulikheter i fiberdiameter (sitert etter Ofstad et al., 1993).

Ofstad et al. (1993) fant et signifikant vanntap i torskemuskel ved 30°C, mens et signifikant vanntap for laksemuskel først ble observert ved 35°C. Videre ble maksimalt vanntap for torskemuskel observert ved 45°C, mens et maksimalt vanntap for laksemuskel først ble observert ved 50°C. I tillegg hadde torskemuskel et dobbelt så stort vanntap som laksemuskel. Noe av forskjellen kan forklares av ulikheter i målte pH-verdier for de to fiskeartene. Torsk ble målt til å ha en pH som lå noe nærmere det isoelektriske punktet enn laks. I tillegg har laks mer intracellulært fett og større mengde av sarkoplasmatiske proteiner. Dette kan være med på å bidra til mindre vanntap hos laks sammenliknet med torsk. Til tross for dette tyder resultatene på at lakseproteiner er mer stabile enn torskeproteiner, og at laksmuskel totalt sett er mer varmestabil enn torskemuskel.

Salt tilsettes ofte fiskefarsen for å bedre teksturen til sluttproduktet (Ofstad et al., 1995). Tilsats av salt til fiskefarsen vil øke VBE og fettbindingsevnen slik at vanntapet reduseres under varmebehandling. Økt VBE og fettbindingsevne opprettholder saftigheten, og bedrer derfor kvaliteten på sluttproduktet. Tilsats av salt vil imidlertid kunne senke den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene, og på denne måten fremme proteindenaturering (Thorarinsdottir, Arason, Geirsdottir, Bogason, og Kristbergsson, 2002). Den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene vil påvirkes av både type salt og konsentrasjon av salt. Thorarinsdottir et al. (2002) viste at 7% salt i torskemuskel senket den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene. Som følge av dette denaturete både myosin og aktin ved lavere temperaturer. Wu, Akahane, Lanier, og Hamann (1985) viste at tilsats av 3% salt senket den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene fra varmtvannsfisken *Genyonemus lineatus*. Denatureringstemperaturen for myosin og aktin ble senket fra henholdsvis 43°C og 71°C til 37°C og 66°C. Howell, Matthews, og Donnelly (1991) hevder at den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene er artsavhengig.

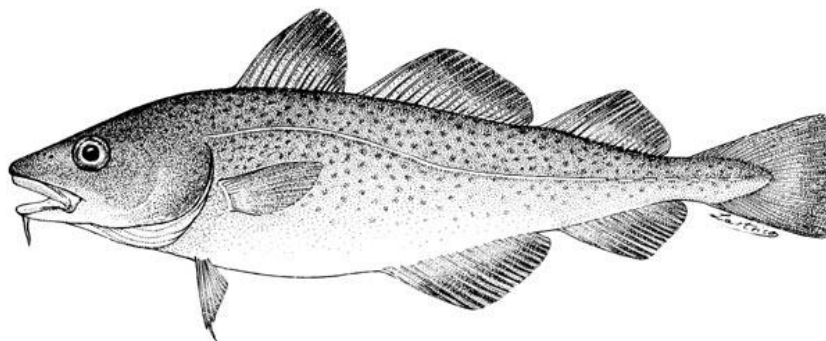
2.4 Råstoff

I denne oppgaven har det blitt benyttet to ulike fiskearter: torsk (*Gadus morhua*) og laks (*Salmo salar*). Torsk er klassifisert som en mager fiskeart, mens laks er klassifisert som en fet fiskeart. Mengden av hovedkomponentene varierer derfor noe i de to fiskemusklene. Torsk og laks har også noe ulike egenskaper, og vil derfor kunne påvirkes annerledes av ulike typer behandling, slik som for eksempel frysing og varmebehandling. Sammensetningen av hovedkomponenter er hentet fra NIFES (2013). Dataene er hentet fra torske- og laksefilet fra oppdrett, og målingene for de to fiskeartene ble gjennomført i henholdsvis 2005 og 2006. Muskelsammensetningen for de to fiskeartene er vist i Tabell 1.

Tabell 1: Sammensetning av hovedkomponenter i torsk og laks som prosent av våtvekt (NIFES, 2013).

| Hovedkomponenter (%) | Torsk | Laks |
|----------------------|-------|------|
| Vann | 79,0 | 66,0 |
| Protein | 19,2 | 19,2 |
| Fett | 1,0 | 13,2 |

2.4.1 Torsk (*Gadus morhua*)

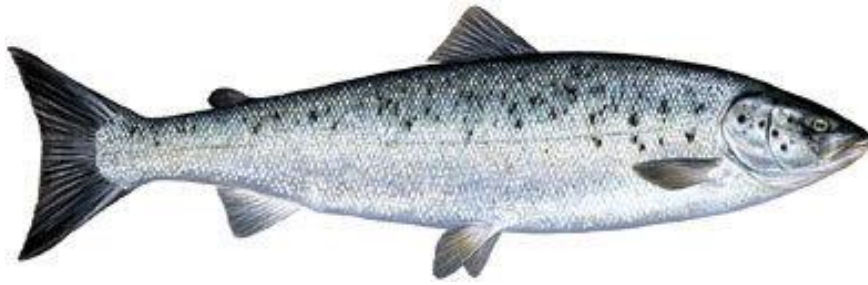


Figur 12: *Gadus morhua* (FAO, 2016a).

Torsk (*Gadus morhua*), også kalt atlanterhavstorsk, er en fiskeart tilhørende torskefamilien (FAO, 2016a). Torsken er å finne i Atlanterhavet og Barentshavet, og utbredelsesområdet inkluderer dermed også den norske kysten. Torsken deles ofte inn i to hovedtyper ut ifra habitat og levemåte; kysttorsk og vandrende oseanisk torsk. Kysttorsken er en stedbunden fisk, og er ofte å finne langs havbunnen. Den vandrende oseaniske torsken har en mer pelagisk livsstil og er ofte å finne på dypere og mer åpent hav. Torsken lever også ved svært varierende salinitetsnivå og i et bredt temperaturområde (0-20 °C). Torsken blir ofte beskrevet som en altetende fiskeart. På yngelstadiet er hovedkilden til næring hovedsakelig virvelløse dyr, hvor små krepsdyr er av spesiell betydning. Senere blir dette hovedsakelig erstattet med større krepsdyr og småfisk. Andre organismer slik som børstemark, pigghuder og andre bunndyr utgjør også en del av torskens matinntak.

Torsk er ansett som en god proteinkilde, og ifølge NIFES (2013) er proteininnholdet på 19,2%. Dersom det blir tatt utgangspunkt i denne verdien, samt at SLP utgjør ca. 50-60% og VLP utgjør ca. 30% av det totale proteininnholdet, gir dette henholdsvis ca. 10-12% SLP og 6% VLP. Torsken blir sett på som den viktigste kommersielle fiskearten innen torskefamilien (FAO, 2016a). Det er en matfisk med en rekke ulike bruksområder. Den selges både fersk, fryst, tørket, røkt og saltet. Den benyttes også i ulike farseprodukter, slik som fiskekaker og fiskepudding.

2.4.2 Laks (*Salmo salar*)



Figur 13: *Salmo salar* (Store norske leksikon, 2009).

Laks (*Salmo salar*), også kalt atlantehavslaks, er en fiskeart tilhørende laksefamilien (FAO, 2016b). Vill atlantisk laks betegnes som en endemisk fiskeart (geografisk begrenset utbredelse) og er å finne i Atlanterhavet. Laksen er en anadrom fiskeart. Den tilbringer opp til 4 år på dypvann i havet hvor den blant annet spiser pelagisk fisk, slik som sild og brisling. Etter fôringsperioden vandrer laksen opp til elver for å gyte. Det er vanlig at laksen gyter i den samme elven som den opprinnelig kom fra, og de fleste dør etter gyting. Lakseeggene må klekkes og utvikles i ferskvann. Lakseyngelen holder seg en stund i elven før den etter 2-5 år vandrer ut i havet for å livnære seg til den selv blir gyteklar.

Laks er ansett som en god proteinkilde, og ifølge NIFES (2013) er proteininnholdet på 19,2%. Etter de samme beregningene som ble gjort for torsk, kan mengden SLP og VLP anslås til henholdsvis ca. 10-12% og 6%. Laksen blir sett på som en særdeles verdifull fisk i Norge, hvor den både er en ettertraktet matfisk og sportsfisk (Store norske leksikon, 2009). Det at den er svært ettertraktet som matfisk, har gjort at den gjennom oppdrettsnæringen har blitt en meget viktig eksportvare. Lakseoppdrett er en av Norges største og viktigste eksportnæringer. Dette har blant annet blitt mulig på grunn av temperaturen i havet, som verken er for høy eller for lav. Det er oppdrettslaksen som dominerer i Norge, fremfor vill atlantisk laks.

3 Materialer

Råstoffet som ble benyttet til de ulike forsøkene var torskefilet og laksefilet fra butikkjedene Rema 1000 og Meny, samt fra fiskebutikken Fiskehallen. Ferske laksefileter til alle lakseforsøkene (ferske-, fryste- og varmebehandlede forsøk) ble kjøpt ferdigpakket på Rema 1000 fra leverandøren Godehav. Ferske torskefileter til forsøkene med fersk og fryst torsk ble kjøpt på Meny fra ferskvaredisken eller ferdigpakket fra leverandøren Lerøy. Ferske torskefileter til varmebehandlingsforsøkene ble kjøpt på Fiskehallen. For fiskefiletene fra Godehav og Lerøy ble både pakke-/slaktedato og utløpsdato notert, og forsøkene ble alltid gjennomført innen utløpsdatoen. For fiskefileten kjøpt i ferskvaredisken på Meny og Fiskehallen ble slaktedato notert, og forsøket ble alltid gjennomført innen én uke etter slaktedato.

Til de ferske forsøkene ble innkjøpene gjort dagen før eller samme dag som gjennomføringen av forsøkene. Fiskefiletene ble oppbevart på kjøling (+4°C) frem til bruk og under forsøkene. Til fryseforsøkene ble det også kjøpt inn fersk fiskefilet som deretter ble fryst, med unntak av én torskefilet som ble kjøpt ferdig fryst og tint. Fiskefiletene ble tint over natten i kjølerom, og i likhet med de andre ferske filetene, ble de oppbevart på kjøling under forsøkene. Til varmebehandlingsforsøkene ble det også kjøpt inn fersk fiskefilet dagen før eller samme dag som gjennomføring av forsøkene, og fiskefarsene ble oppbevart på kjøling under forsøket.

Tabell 2: Oversikt over innkjøps-, slakte- og utløpsdato av råstoff, samt dato for de ulike eksperimentutførelsene.

| Forsøks- nr. | Innkjøps- dato | Pakket/ slaktet | Utløps- dato | Fryst | Tint | Varme- behandlet | Protein- ekstraksjon | Protein- bestemmelse med BioRad |
|-----------------|-------------------|--------------------|-----------------|----------|----------|---------------------|-------------------------|--|
| 1 | 07.09.15 | 01.09.15 | 08.09.15 | - | - | - | 07.09.15 | 07.09.15 |
| 2 | 30.11.15 | 23.11.15 | x | - | - | - | 30.11.15 | 30.11.15 |
| 3 | 14.09.15 | 11.09.15 | 18.09.15 | 15.09.15 | 22.11.15 | - | 23.11.15 | 23.11.15 |
| 4* | 16.11.15 | x | 17.11.15 | x | x | - | 16.11.15 | 16.11.15 |
| 5 | 03.03.16 | 01.03.16 | x | - | - | 04.03.16 | 04.03.16 | 05.03.16 |
| 6 | ----- | ----- | ----- | - | - | 06.03.16 | 06.03.16 | 07.03.16 |
| 7 | 07.03.16 | 04.03.16 | x | . | - | 08.03.16 | 08.03.16 | 09.03.16 |
| 8 | 28.09.15 | 21.09.15 | 07.10.15 | - | - | - | 28.09.15 | 29.09.15 |
| 9 | ----- | ----- | ----- | - | - | - | 30.09.15 | 01.10.15 |
| 10 | 16.11.15 | 06.11.15 | 23.11.16 | 16.11.15 | 22.11.15 | - | 24.11.15 | 24.11.15 |
| 11 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | - | 25.11.15 | 25.11.15 |
| 12 | 15.02.16 | 03.02.16 | 20.02.16 | - | - | 16.02.16 | 16.02.16 | 16.02.16 |
| 13 | 22.02.16 | 15.02.16 | 02.03.16 | - | - | 23.02.16 | 23.02.26 | 23.02.16 |
| 14 | ----- | ----- | ----- | - | - | 26.02.16 | 26.02.16 | 26.02.16 |
| 15 | 30.11.15 | 23.11.15 | x | - | - | - | 01.12.15 | 01.12.15 |

Forsøkene er nummerert fra 1-15 og er satt i samme rekkefølge som resultatene er presentert i resultat- og diskusjonsdelen (kapittel 5). Forsøk 1-7 (kategori 1) representerer forsøkene utført med torsk, mens forsøk 8-14 (kategori 2) representerer forsøkene utført med laks. I både kategori 1 og 2 representerer de to første forsøkene eksperimentene med fersk fisk, mens de to neste representerer de med fryst fisk, og de tre siste representerer varmebehandlingsforsøkene. Forsøk 15 er et saltblandingsforsøk med fersk torskefilet.

Gjentagelsestegnene («-----») som er benyttet i tabellen indikerer at det er benyttet samme fiskefilet som i forsøket ovenfor. Feltene markert med «x» under utløpsdato indikerer at fiskefileten er kjøpt fra ferskvaredisken og at det derfor ikke var oppgitt utløpsdato. Feltene markert «-» under fryst, tint og varmebehandlet indikerer at råstoffet ikke har gjennomgått disse prosessene. Forsøk 4 er markert med «*» fordi dette forsøket ble gjennomført med en torskefilet som var fryst og tint ved innkjøp. Ettersom det ikke er kjent hvilken dato torskefileten ble fryst og tint er disse feltene også betegnet med «x». Etter samme dag som de ulike BioRad-analysene var gjennomført ble det tatt ut og preparert prøver til SDS-PAGE, som ble fryst ned samme dag. Metodene som er benyttet i de ulike forsøkene er beskrevet i kapittel 4.

4 Metoder

4.1 Proteinekstraksjon

Det ble gjennomført proteinekstraksjon for vannløselige og saltløselige proteiner ved bruk av en modifisert versjon av metoden til Anderson og Ravesi (1968) og Licciardello et al. (1982), slik som beskrevet av Hultmann og Rustad (2002). Det ble veid ut to fiskebiter (ca. 4 g) for hver analyse, som ble homogenisert i BisTris-buffer (80 mL, 0,05M, pH 7) med Ultra Turrax (full hastighet, ca. 30 sekunder). Deretter ble homogenisatet sentrifugert i en avkjølt sentrifuge (8000 x g; 4°C, 20 minutter). Supernatanten ble filtrert gjennom glassull og volumet ble justert med BisTris-bufferen (100 mL). Dette ga den vannløselige proteinfraksjonen.

Bunnfallet til prøvene fra den vannløselige proteinfraksjonen ble tilsatt BisTris buffer (80 mL, 0,05M, pH 7) med ulike salter i ulike konsentrasjoner, som så ble homogenisert med Ultra Turrax (full hastighet, ca. 10 sekunder). Deretter ble homogenisatet sentrifugert og filtrert på samme måte som for de vannløselige proteinprøvene. Dette ga den saltløselige proteinfraksjonen. Mengde protein fra den vannløselige og den saltløselige proteinfraksjonen ble bestemt ved bruk av BioRad-metoden (metodedel 4.2). De påfølgende delkapitlene viser en oversikt og beskrivelse av hvordan ekstraksjonen ble gjennomført for de ulike råstoffene benyttet i denne oppgaven.

4.1.1 Proteinekstraksjon fra ferskt og fryst råstoff

I forsøkene med ferskt og fryst råstoff (forsøk 1-4 og 8-11 – kapittel 3 Materialer) ble SLP ekstrahert med to og to salter; NaCl ble benyttet sammen med henholdsvis MgCl₂ og MgSO₄. Effekten av de tre saltene ble analysert i tre ulike konsentrasjoner (0,2 M, 0,4 M og 0,6 M). Det ble analysert to paralleller for hvert salt i hver saltkonsentrasjon. For hvert forsøk var det derfor 2 x 3 prøver med NaCl og 2 x 3 prøver med MgCl₂/MgSO₄. Dette ga til sammen 12 SLP-prøver. En oversikt over type salt og konsentrasjon av salt er vist i Tabell 3.

Tabell 3: Oversikt over salter og konsentrasjoner, samt antall prøver for hver kombinasjon av salt og konsentrasjon.

| Salt 1 | Salt 2 | Konsentrasjon (M) | Antall prøver |
|--------|-------------------|-------------------|---------------|
| NaCl | MgCl ₂ | 0,2 | 2 |
| NaCl | MgCl ₂ | 0,4 | 2 |
| NaCl | MgCl ₂ | 0,6 | 2 |
| NaCl | MgSO ₄ | 0,2 | 2 |
| NaCl | MgSO ₄ | 0,4 | 2 |
| NaCl | MgSO ₄ | 0,6 | 2 |

4.1.2 Varmedehandling og proteinekstraksjon fra varmedehandlet råstoff

Kvernet fiskefilet ble delt i porsjoner (20 g) som ble tilsatt salt (NaCl, MgCl₂ eller MgSO₄) i to ulike vektprosent (1,75% og 3,50%). I tillegg ble det benyttet fiskefarse uten tilsatt av salt. Dette ga til sammen syv farsener per varmedehandlingstemperatur (30, 40 og 50°C). Forsøket ble delt inn etter de tre varmedehandlingstemperaturene, slik at alle farsener på én temperatur ble analysert samtidig. Til sammen ga dette 21 varmedehandlede fiskefarsener. De ferdiglagde farsene ble overført til zip-poser, og posene ble klemt forsiktig, slik at farsene fordelte seg jevnt i posene og mengden luft ble minimalisert. Vannbad ble varmet opp til ønsket temperaturer (30, 40 eller 50°C), og farsene ble så varmedehandlede (15 min) ved de ulike temperaturene. Farsene

ble så kjølt ned på is. En oversikt over de ulike farsenes tilsetning og varmebehandlings-temperatur er vist i Tabell 4.

Tabell 4: Oversikt over de ulike farsens tilsetning og temperaturbehandling.

| Farse | Type salt | Konsentrasjon (%) | Temperatur (°C) |
|-------|-------------------|-------------------|-----------------|
| 1 | - | - | |
| 2 | NaCl | | |
| 3 | MgCl ₂ | 1,75 | |
| 4 | MgSO ₄ | | 30, 40, 50 |
| 5 | NaCl | | |
| 6 | MgCl ₂ | 3,50 | |
| 7 | MgSO ₄ | | |

Etter varmebehandling og nedkjøling ble det tatt ut to prøver (4 g) fra hver farse, og det ble utført proteinekstraksjon av VLP og SLP ved bruk av henholdsvis BisTris buffer (0,05 M, pH 7) og BisTris buffer med NaCl (0,6 M). Det ble også tatt ut to prøver fra en ikke-saltet og ikke-varmebehandlet farse som ble analysert sammen med de varmebehandlede farsene i ett av de tre forsøkene. Varmebehandlet råstoff viser til forsøk 5-7 og 12-14 (kapittel 3 Materialer).

4.1.3 Ekstraksjon med saltblanding

I blandingsforsøket (forsøk 15 – kapittel 3 Materialer) ble SLP ekstrahert med blandinger av NaCl og MgSO₄. Det ble benyttet fire forskjellige blandinger med ulik konsentrasjon av NaCl og MgSO₄. Det ble også gjennomført ekstraksjon med kun 0,6 M NaCl. En oversikt over de ulike saltblandingenes tilsetninger er vist i Tabell 5.

Tabell 5: Oversikt over salter, konsentrasjoner og ionestyrker, samt antall prøver for hver saltblanding.

| Saltblandings-nummer | Salt | Konsentrasjon (M) | Ionestyrke | Antall prøver |
|----------------------|-------------------|-------------------|------------|---------------|
| 1 | NaCl | 0,3 | 0,7 | 2 |
| | MgSO ₄ | 0,1 | | |
| 2 | NaCl | 0,2 | 1 | 2 |
| | MgSO ₄ | 0,2 | | |
| 3 | NaCl | 0,4 | 1,2 | 2 |
| | MgSO ₄ | 0,2 | | |
| 4 | NaCl | 0,4 | 1,6 | 2 |
| | MgSO ₄ | 0,3 | | |
| 5 | NaCl | 0,6 | 0,6 | 2 |

4.2 BioRad-metoden

Mengde protein ble bestemt ved bruk av BioRad-metoden beskrevet av Bradford (1976). BioRad-fargereagensen ble levert som konsentrat. En del BioRad-fargekonsentrat ble blandet med fire deler destillert vann og oppbevart på en mørk pumpeflaske. Bovint gamma globulin (BGG, 1 mg/mL) ble brukt som standard. En standardserie ble laget, og prøvene blandet med fargereagens (5 mL) ved bruk av en Whirl mixer.

De vannløselige proteinprøvene ble fortynnet med destillert vann og de saltløselige prøvene ble fortynnet med BisTris-buffer (0,05M, pH 7) med tilhørende salter og saltkonsentrasjoner. Det ble tatt ut tre paralleller for hver prøve (100 µL) som ble blandet med BioRad-fargeragens (5

mL) ved bruk av Whirl mixer. Standardene og prøvene ble så analysert spektrofotometrisk. Absorbansen ble lest av ved 595 nm. Ut ifra absorbansmålingene ble ekstraherbart protein i prosent av våtvekt bestemt.

4.3 Gelelektroforese: SDS-PAGE

Det ble benyttet to ulike instrumenter til gjennomføring av SDS-PAGE-analysen. For prøvene ekstrahert fra fersk og fryst fisk ble det benyttet et PhastSystem™, mens for prøvene ekstrahert fra varmebehandlet råstoff ble det benyttet et Dual Cool Electrophoresis System (Mini-Vertical Slab Gel/Blotting system DCX-700). Gjennomføringen av SDS-PAGE med de to instrumentene er beskrevet i de to påfølgende delkapitlene.

4.3.1 PhastSystem™

Tillagninger av løsninger ble utført etter instruksjonene i produsentens manual (Pharmacia LKB Biotechnology, 1990, n.d.). Prøvene ble fortynnet 1:2 med SDS-buffer (10 mM Tris-base, 1mM EDTA, 5% SDS, 10% 2-mercaptoetanol, pH 8) og fryst ned i eppendorfrør. Samme dag som gjennomføringen av gelelektroforesen ble prøvene tint og kokt (5 minutter). SDS-PAGE ble utført på de saltløselige proteinene etter fremgangsmåten beskrevet av Laemmli (1970). Det ble benyttet PhastSystem™, med PhastGel Gradient 4-15% og PhastGel Buffer Strips. Gelene ble farget med Coomassie Brilliant Blue i utviklingskammeret.

Det ble benyttet High Molecular Weight (HMW) standard, produsert av GE Healthcare. HMW-standeren inneholdt følgende proteiner: myosinets tunge kjede (220 kDa), α_2 -makroglobulin (170 kDa), β -galaktosidase (116 kDa), transferrin (76 kDa) og glutamin dehydrogenase (53 kDa). Ytterligere informasjon om standarden er beskrevet i produsentens manual (GE Healthcare, 2006).

4.3.2 Dual Cool Electrophoresis System

Prøveopparbeidelsen ble gjennomført på samme måte som beskrevet ovenfor, med unntak av tilsetning av glycerol (10%) til SDS-bufferen, og tilsetning av bromfenolblått (BFB, 0,01%) til prøvene etter koking. Glycerol ble tilsatt for å gjøre prøvene nok viskøse til å synke ned i brønnene på gelen, og BFB ble tilsatt for å visualisere prøvepåsetingen.

Det ble benyttet et Dual Cool Electrophoresis System med ClearPAGE SDS Gel 4-20% og ClearPAGE SDS Running Buffer. Bufferen ble fortynnet med destillert vann (1:20). Fortynnet buffer ble så tilsatt det indre og det ytre kammeret i elektroforesesystemet. De saltløselige og vannløselige prøvene, samt standardene, ble påsatt (10 μ L), og SDS-PAGE ble utført etter fremgangsmåten beskrevet av Laemmli (1970). Gelene ble farget med fargeløsningen InstantBlue Protein Stain (30 min). Etter fargning ble gelene skylt med destillert vann til overskuddet av fargen var vasket bort. Ytterligere informasjon om systemet er beskrevet i produsentens instruksjonsmanual (C.B.S. Scientific, 2015).

Det ble benyttet både HMW-standard og LMW-standard produsert av GE Healthcare. LMW-standardene inneholdt følgende proteiner: fosforylase b (97 kDa), albumin (66 kDa) ovalbumin (45 kDa), karboanhydrase (30 kDa), trypsin-inhibitor (20,1 kDa) og 20 α -laktalbumin (14,4 kDa). Ytterligere informasjon om LMW-standardene er beskrevet i produsentens manual (GE Healthcare, 2006).

4.4 pH-måling i råstoff

pH-en i de benyttede fiskefiletene ble målt som beskrevet i Duun og Rustad (2007). Fisk (10 g) ble homogenisert i KCl (10 mL) med Ultra Turrax (full hastighet) og pH-en ble målt ved bruk av pH-meter.

4.5 Statistisk analyse

Usikkerheten i mengde ekstrahert protein er beregnet ut fra usikkerheten i metoden. Denne er beregnet basert på alle standardavvikene for ekstrahert VLP og SLP. I resultatdelen er feilskrankene derfor oppgitt som \pm usikkerhet i metoden. For bestemmelse av signifikante forskjeller er det tatt utgangspunkt i verdien for usikkerhet i metoden, og det ble benyttet et signifikansnivå på 5% ($p = 0,05$). Alle statistiske beregninger har blitt utført i Microsoft Excel.

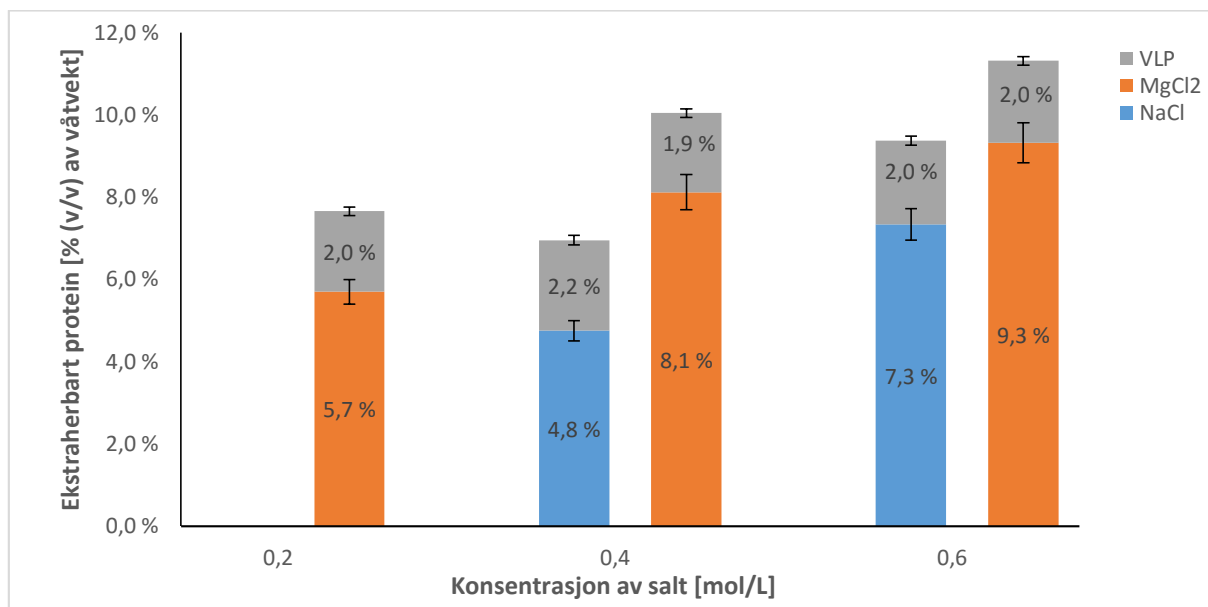
5 Resultater og diskusjon

VLP og SLP ble ekstrahert fra fersk og fryst torske- og laksefilet, samt varmebehandlet torske- og laksefarse. For fryst og fersk torske- og laksefilet ble SLP ekstrahert med NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner (0,2 M, 0,4 M og 0,6 M). De to Mg-saltene ble anvendt sammen med NaCl i hvert sitt forsøk. Det ble analysert to paralleller av ekstrahert SLP for hvert salt i hver konsentrasjon. For VLP ble proteininnholdet kun bestemt i én av de to parallellene tilhørende de ulike SLP-fraksjonene. Mengde ekstrahert VLP bør gi tilnærmet like verdier for alle prøvene fra samme råstoff. Det ble derfor ikke sett som nødvendig å analysere mer enn annenhver prøve. For torske- og laksefarse ble NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ tilsatt i to ulike konsentrasjoner (1,75% og 3,50%) før varmebehandling og proteinekstraksjon. SLP ble så ekstrahert med 0,6 M NaCl. Det ble analysert to paralleller for både VLP og SLP. VLP og SLP ble også ekstrahert fra fersk torskefilet, hvor SLP ble ekstrahert med en blanding av NaCl og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Det ble analysert to paralleller av SLP for hver saltblanding. For VLP ble kun én av de to parallellene tilhørende de ulike SLP-fraksjonene analysert.

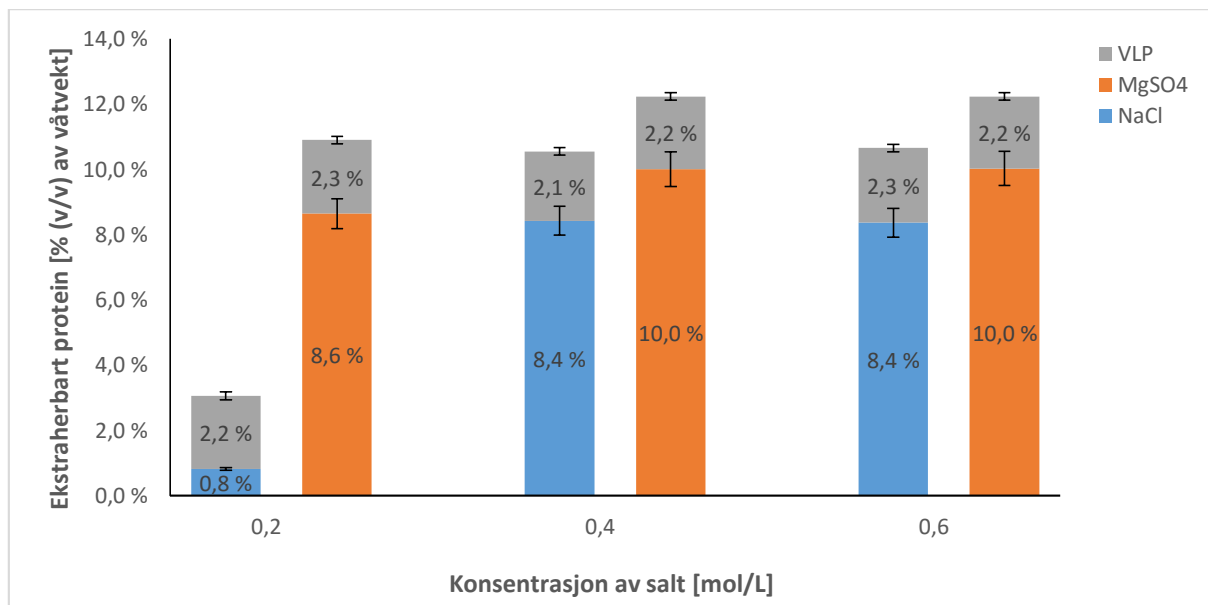
Ekstrahert SLP fra fersk og fryst torske- og laksefilet, samt ekstrahert VLP og SLP fra varmebehandlet torske- og laksefarse, ble analysert med SDS-PAGE. Begge paralleller ble analysert for fersk torskefilet og for fryst torske- og laksefilet, samt for blandingsforsøket. Kun én av parallellene ble analysert for fersk laksefilet, samt for varmebehandlet torske- og laksefarse.

5.1 Fersk torskefilet

Resultatene for mengde ekstrahert VLP og SLP fra fersk torskefilet er vist i Figur 14 (forsøk 1 – NaCl og MgCl₂) og Figur 15 (forsøk 2 – NaCl og MgSO₄). Separasjon med SDS-PAGE av ekstrahert SLP er vist i Figur 16. De ulike ekstraherte proteinene er vist i Tabell 6, hvor disse er markert med «x».



Figur 14: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgCl₂ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).



Figur 15: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

Gjennomsnittlig mengde ekstrahert VLP i de to forsøkene lå på henholdsvis 2,0% og 2,2%. Det var forventet en ekstraherbarhet rundt 6% for VLP (NIFES, 2013; Strasburg et al., 2008). Ekstraherbarhetene var derfor en del lavere enn forventet. En generelt lavere ekstraherbarhet kan blant annet skyldes råstoffet. Mengde ekstrahert SLP i de to forsøkene varierte henholdsvis fra 4,7% til 9,3% og fra 0,8% til 10,0%. Det var forventet en ekstraherbarhet rundt 10-12% for SLP (NIFES, 2006; Strasburg et al., 2008) med optimale ekstraksjonsforhold. Ettersom det ble brukt ulike konsentrasjoner av forskjellige salt, var det forventet at ekstraherbarhetene til SLP ville variere.

I forsøk 1 (Figur 14) økte ekstrahert mengde SLP signifikant fra 0,4 M til 0,6 M NaCl, samt fra 0,2 M til 0,4 M MgCl₂. I forsøk 2 (Figur 15) økte ekstrahert mengde SLP signifikant fra 0,2 M til 0,4 M med både NaCl og MgSO₄. Løseligheten vil kunne øke med økende konsentrasjon av salt (Damodaran, 2008). Ved lave saltkonsentrasjoner er løseligheten kun avhengig av ionestyrken, og løseligheten vil derfor øke med økende ionestyrke. Disse økningene i ekstraherbarhet var altså hovedsakelig forårsaket av økende i ionestyrke.

Det var ingen signifikant økning fra 0,4 M til 0,6 M med verken MgCl₂ eller MgSO₄. Ved høye saltkonsentrasjoner vil løseligheten også avhenge av saltenes ionespesifikke effekter, hvor denne effekten vil være enten destabiliserende eller stabiliserende (Damodaran, 2008). Destabiliserende salter, som NaCl og MgCl₂, vil øke løseligheten med økende ionestyrke, mens stabiliserende salter, som MgSO₄, vil senke løseligheten med økende ionestyrke (Damodaran, 2008; Puolanne og Halonen, 2010). Tilsvarende endringer i løselighet var imidlertid ikke funnet mellom 0,4 M og 0,6 M MgCl₂ og MgSO₄. Ifølge Xiong og Brekke (1991) vil divalente ioner, som magnesium, bindes sterkere til polare grupper i proteinet, og dermed styrke proteininteraksjonene (sitert etter Barat et al., 2013). Ifølge Nayak, Kenney og Slider (1996) kan dette igjen føre til aggregering, og aggregering vil øke med økende konsentrasjon av saltet (sitert etter Barat et al., 2013). Aggregeringen vil gjøre proteinene mindre løselige, slik at de ikke ekstraheres ut. Resultatet i forsøk 1 kan tyde på at magnesium har forårsaket noe aggregering av SLP ved den høyeste konsentrasjonen, slik at effekten av økt konsentrasjon ikke blir utslagsgivende med MgCl₂. Med 0,6 M MgSO₄ er det tenkelig at både magnesiums aggregerende effekt, samt sulfatets stabiliserende effekt, har bidratt til denne stagneringen i ekstraherbarhet, selv om dette ikke har ført til en redusert ekstraherbarhet. Det er også tenkelig at denne stagneringen skyldes at mesteparten av SLP allerede ble ekstrahert ut med 0,4 M MgSO₄. Det kan spekuleres i om enda høyere konsentrasjon av saltet ville gitt en mer markant effekt av de stabiliserende egenskapene, med tanke på synkende ekstraherbarhet.

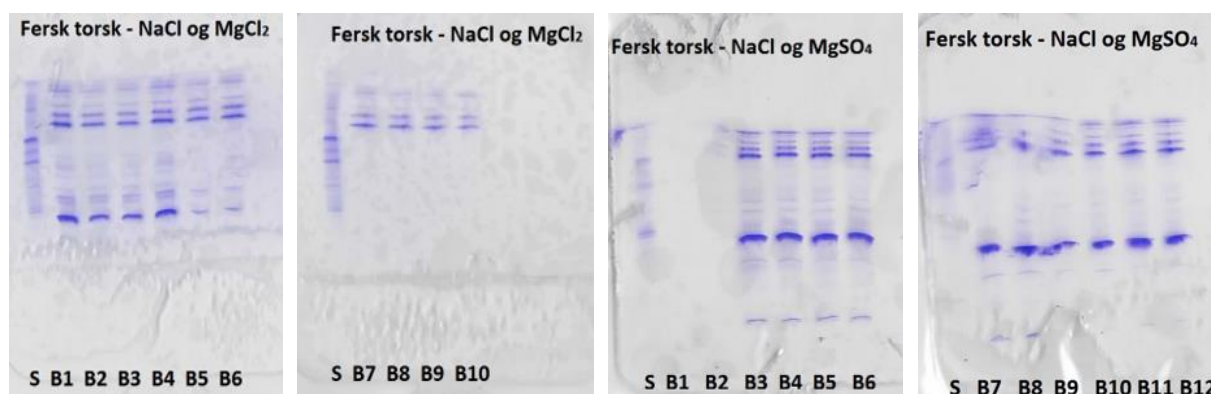
Det ble ekstrahert en signifikant større mengde SLP med MgCl₂ og MgSO₄ enn med NaCl ved de samme konsentrasjonene. Resultatene viser altså at ekstraherbarheten varierte mellom saltene i samme konsentrasjon. Monovalente ioner, som Na⁺ og Cl⁻, bidrar mindre til ionestyrken enn divalente ioner, som Mg²⁺ og SO₄²⁻. MgCl₂ som består av et divalent kation, samt to kloridioner, gir derfor en tre ganger så høy ionestyrke som NaCl. MgSO₄ som består av to divalente ioner, gir derfor en fire ganger så høy ionestyrke som NaCl. Høyere ekstraherbarhet med MgCl₂ og MgSO₄, sammenliknet med NaCl, kan derfor delvis forklares med saltenes høye ionestyrke.

Damodaran (2008) hevder at ionespesifikke effekter vil påvirke løseligheten når ionestyrken overstiger 1. Ut fra dette er det forventet at salter med samme ionestyrke vil gi så og si samme ekstraherbarhet, forutsatt at ionestyrken ikke overstiger 1. I forsøk 2 ble det ekstrahert omtrent

like mengder SLP med 0,2 M $MgSO_4$ og 0,6 M NaCl. Ionestyrkene var under 1 og nokså like for begge salter, og ekstraherbarhetene stemmer derfor godt overens med det som er hevdet av Damodaran (2008). I forsøk 1 ble det imidlertid ekstrahert en signifikant større mengde SLP med 0,6 M NaCl sammenliknet med 0,2 M $MgCl_2$, selv om begge ionestyrkene var på 0,6. I dette tilfellet kan det se ut til at ionenes spesifikke effekter påvirker løselighet allerede ved denne ionestyrken. Ifølge Hofmeisterserien er magnesium et mer stabiliserende kation enn natrium (Puolanne og Halonen, 2010). Magnesiums stabiliserende effekt kan derimot ikke være spesielt sterk ved denne ionestyrken, ettersom ekstraherbarheten økte signifikant fra 0,2 M til 0,4 M. Om ulike kationer har påvirket løseligheten er vanskelig å si, spesielt ettersom Hamm (1972) hevder at det er anionene som har størst påvirkning på løselighet (sitert etter Puolanne og Halonen, 2010).

I tillegg til at ionespesifikke effekter kun virker inn ved ionestyrker over 1, har Damodaran (2008) også hevdet at løseligheten kun avhenger av ionestyrken dersom denne er under 0,5. Disse utsagnene sett i sammenheng, kan tyde på at ionestyrken dominerer under 0,5, og at ionespesifikke effekter dominerer over 1, og at det mellom disse to verdiene vil være en gradvis overgang fra den ene dominerende effekten til den andre. Ettersom $MgSO_4$ ga en høyere ekstraherbarhet enn NaCl i dette ionestyrkeområdet, og $MgCl_2$ ikke gjorde det, kan det tyde på at $MgSO_4$ er en bedre ekstraktant enn $MgCl_2$. En mulig årsak til dette, kan som Perisic et al. (2011) beskriver, være at $MgSO_4$ gir en delvis utfolding av proteinene. Delvis utfolding vil resultere i et økt overflateareal, slik at større deler av proteinet eksponeres. Dette vil igjen kunne øke interaksjonene med vann, og dermed føre til økt løselighet.

Kombinasjon av høy ionestyrke og delvis utfolding av SLP, kan forklare en generelt høyere ekstraherbarhet med $MgSO_4$, sammenliknet med $MgCl_2$. Mengde ekstrahert SLP varierte imidlertid mellom samme konsentrasjon av NaCl i de to forsøkene. Dette er antatt å hovedsakelig skyldes variasjoner i råstoffet. Ulike råstoff er derfor også noe av årsaken til varierende ekstraherbarheter mellom de to Mg-saltene.



Figur 16: SLP fra fersk torskefilet ekstrahert med NaCl, $MgCl_2$ og $MgSO_4$ separert med SDS-PAGE. Brønnene er markert med bokstaver og tall. Bokstaven «S» representerer standarden (HMW), mens bokstaven «B» står for SLP. Bokstavene og tallene fra B1 til B10 på gelene til venstre representerer SLP ekstrahert med følgende salt og konsentrasjon; B1-B2: 0,4 M NaCl, B3-B4: 0,6 M NaCl, B5-B6: 0,2 M $MgCl_2$, B7-B8: 0,4 M $MgCl_2$ og B9-B10: 0,6 M $MgCl_2$. Bokstavene og tallene fra B1 til B12 på gelene til høyre representerer SLP ekstrahert med følgende salt og konsentrasjon; B1-B2: 0,2 M NaCl, B3-B4: 0,4 M NaCl, B5-B6: 0,6 M NaCl, B7-B8: 0,2 M $MgSO_4$, B9-B10: 0,4 M $MgSO_4$ og B11-B12: 0,6 M $MgSO_4$.

Tabell 6: Gelelektroforese (SDS-PAGE) av proteinene ekstrahert med NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Forsøk 1 (NaCl og MgCl₂) er til venstre og forsøk 2 (NaCl og MgSO₄) er til høyre. [«*»-tegnet indikerer usikkerhet i tentativt identifisert protein. Et bånd ble analysert til å ha en molekylvekt midt imellom de to markerte proteinene, og ettersom disse to proteinene har såpass lik molekylvekt, er det usikkert hvilket av de to proteinene det er.] Molekylvektene til proteinene er hentet fra Strasburg et al. (2008).

| Protein (kDa) | NaCl (M) | | MgCl ₂ (M) | | | NaCl (M) | | | MgSO ₄ (M) | | |
|------------------------------------|----------|-----|-----------------------|-----|-----|----------|-----|-----|-----------------------|-----|-----|
| | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,6 |
| Troponin-T (30) | x | x | x | - | - | - | - | - | x | x | x |
| Cap Z β (32) | - | - | - | - | - | - | - | - | x* | x* | x* |
| Cap Z α (36) | x | x | x | x | x | - | - | - | x* | x* | x* |
| Tropomyosin α-enhet (37) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tropomodulin (40) | - | - | - | - | - | - | - | - | x | x | x |
| G-aktin (42) | x | x | x | x | x | - | x | x | x | x | x |
| Desmin (55) | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - |
| Tropomyosin-kompleks (74) | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - |
| C-protein (140) | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - |
| M-protein (165) | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - |
| Myosinets tunge kjede (220) | x | x | x | - | - | - | x | x | x | x | x |

Tabell 6 viser at de samme proteinene ble ekstrahert ut med 0,4 M og 0,6 M NaCl, samt 0,2 M MgCl₂. Både myosinbåndet (myosinets tunge kjede) og aktinbåndet er tilstede på gelene. Myosin og aktin utgjør henholdsvis 45% og 20% av myofibrillproteinene (Strasburg et al., 2008), og tilstedeværelsen av disse proteinene var derfor å forvente. Det ble ekstrahert ut færre typer proteiner med 0,4 M og 0,6 M MgCl₂. Allerede med 0,2 M MgCl₂ er myosinbåndet kraftig redusert, og myosinbåndet er ikke tilstede ved de to høyeste konsentrasjonene. Ifølge Xiong og Brekke (1991) kan magnesium forårsake proteinaggregering (sitert etter Barat et al., 2013). Aggregatdannelse, som følge av høye saltkonsentrasjoner, er derfor en mulig forklaring på hvorfor blant annet myosinbåndet ikke er tilstede på gelen. Ekstraherbarheten økte imidlertid med økende konsentrasjon av MgCl₂, noe som i så fall indikerer at disse aggregatene har blitt ekstrahert ut. Dersom dette var tilfellet, er det forventet å observere disse aggregatene på gelene. Det har imidlertid ikke oppstått andre bånd fra disse prøvene. Det er derimot mulig at aggregatene som ble dannet var for store til å detekteres på gelen, eller at de overlapper med andre bånd. Selv om det ikke har oppstått andre bånd på gelen som var påsatt prøvene ekstrahert med 0,4 M og 0,6 M MgCl₂, er det generelt flere bånd fra prøvene ekstrahert med både NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ som kan tyde på aggregatdannelse.

Nedbrytning av myosin kan også være årsaken til at myosinbåndet ikke var tilstede på gelen for prøvene ekstrahert med 0,4 M og 0,6 M MgCl₂. Ifølge Ashie og Simpson (1997) er muskelproteaser en enzymgruppe som er kjent for å kunne degradere myosin og aktin (sitert etter Hultmann, Rørå, Steinsland, Skåra, og Rustad, 2004). Det har imidlertid ikke oppstått andre bånd på gelen, men det er mulig at fragmentene som kan ha blitt dannet er for små til å bli detektert på gelen. Det er også mulig at de overlapper med andre bånd. Thorarinsdottir et al. (2002) fant ved bruk av SDS-PAGE et bånd mellom 130 og 140 kDa, og et bånd på omtrent 80 kDa. Basert på denatureringsegenskapene til myosin, ble det hevdet at disse båndene kunne være nedbrytnings-produkter av molekylet. Båndet mellom 130 og 140 kDa var antatt å være et nedbrytningsprodukt av HMM, mest sannsynlig S2. Båndet på omtrent 80 var antatt å være LMM. For prøvene ekstrahert med alle konsentrasjoner av NaCl, samt 0,2 M MgCl₂, er det et bånd på 134 kDa. Dette båndet kan være S2, noe som dermed indikerer nedbrytning av myosin.

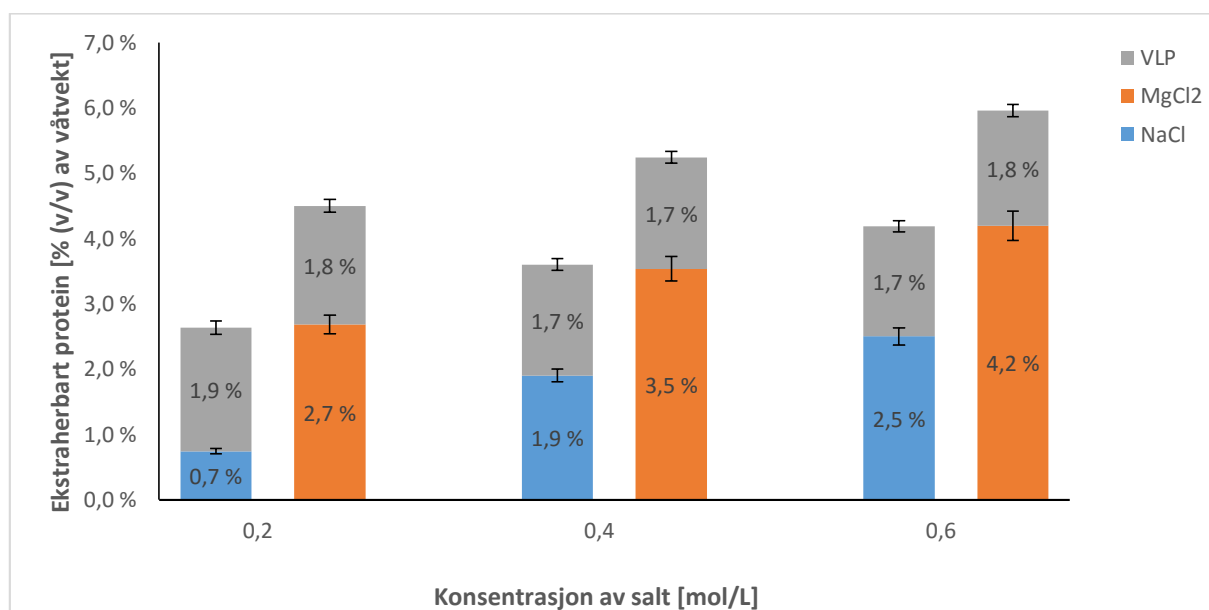
Det er også flere bånd tilstede på gelene i forsøket med NaCl og MgSO₄ som indikerer at det finnes nedbrytningsprodukter i disse prøvene.

Figur 16 viser ingen bånd med laveste NaCl-konsentrasjon. Dette samsvarer med lav ekstraherbarhet, og tyder på at ionestyrken ikke er tilstrekkelig for å ekstrahere ut SLP. Dette samsvarer med Strasburg et al. (2008), som hevder at det kreves en saltkonsentrasjon over 0,3 M NaCl for å løse myofibrillproteinene. Foruten om 0,2 M NaCl, ble det ekstrahert ut omtrent like mange typer proteiner med NaCl og MgSO₄ i alle konsentrasjoner. Dette samsvarer med de små variasjonene i ekstraherbarhet. Både myosin- og aktinbåndet er tilstede på gelene for prøvene ekstrahert med NaCl og MgSO₄. De andre ekstraherte proteinene varierte imidlertid med type salt. Dette tyder på at løselighet av de ulike proteinene varierer med type salt, og kan være forårsaket av saltenes ionespesifikke effekter.

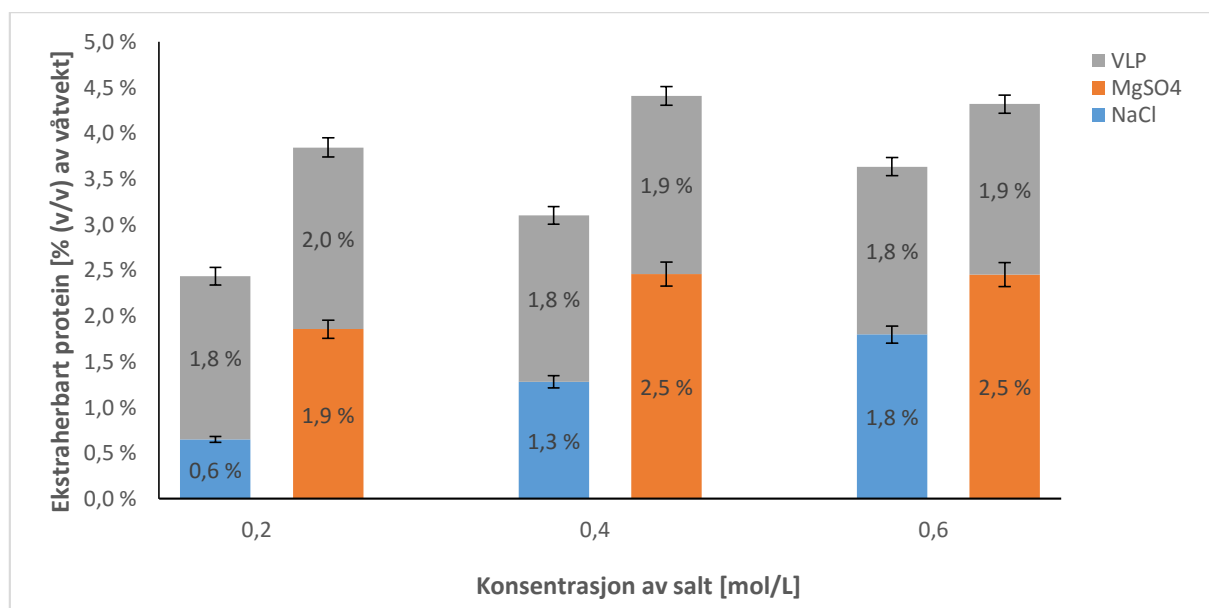
Det ble ekstrahert ulike typer proteiner med NaCl i de to forsøkene. Noe av årsaken kan være at det ble benyttet to ulike torskefileter. Det har vært vanskelig med nøyaktig avlesning av båndene fordi gelene var så små. I tillegg ble det bare benyttet HMW-standard i forsøkene med ferskt og fryst råstoff, noe som også kan ha bidratt til noe unøyaktighet. Videre i oppgaven vil usikkerhet i avlesning bli referert til som usikkerhet i metoden. Både ulike råstoff og avlesning av båndene kan derfor ha bidratt til disse variasjonene mellom prøvene ekstrahert med NaCl i hvert sitt forsøk. Det ble ekstrahert flere ulike typer proteiner med NaCl og MgSO₄ enn med MgCl₂, ved de to høyeste konsentrasjonene. Dette kan i likhet med resultatene fra proteinekstraksjonen indikere at MgCl₂ er en mindre egnet ekstraktant enn MgSO₄.

5.2 Fryst torskefilet

VLP og SLP ble ekstrahert fra torskefilet som hadde vært fryst og tint. Resultatene fra proteinekstraksjonen er vist i Figur 17 (forsøk 3 – NaCl og MgCl₂) og Figur 18 (forsøk 4 – NaCl og MgSO₄). Separasjon med SDS-PAGE av ekstrahert SLP er vist i Figur 19. De ulike ekstraherte proteinene er vist i Tabell 7, hvor disse er markert med «x».



Figur 17: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgCl₂ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Feilfeltene er oppgitt som \pm standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).



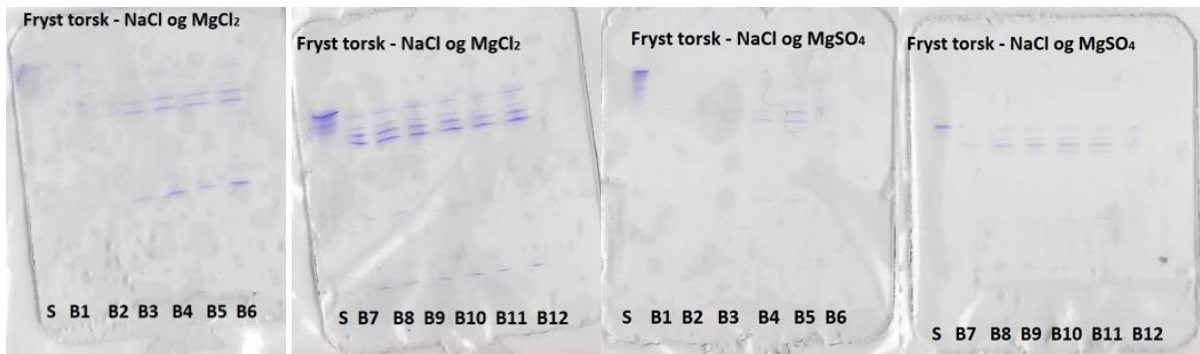
Figur 18: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Feilfeltene er oppgitt som \pm standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

Gjennomsnittlig ekstrahert mengde VLP lå på henholdsvis 1,8% og 1,9%. Ekstraherbarheten var noe lavere enn for fersk torskefilet (resultatdel 5.1). At disse endringene var såpass små, tyder på at VLP i liten grad påvirkes av fryse- og tineprosessen. Dette samsvarer med et studie gjennomført av Andreetta-Gorelkina, Greiff, Rustad, og Aursand (2015), som viste at frysing av hysefilet ikke resulterte i lavere ekstraherbarhet av VLP. Mengde ekstrahert SLP varierte henholdsvis fra 0,7% til 4,2% og fra 0,6% til 2,5%. Det ble ekstrahert en generelt lavere mengde SLP i disse forsøkene, enn i med forsøkene for fersk torskefilet. Dette resultatet viser at SLP påvirkes av fryse- og tineprosessen, noe som også er hevdet av blant annet Shenouda (1980) og Strasburg et al. (2008). Resultatet samsvarer også med studiet gjennomført av Andreetta-Gorelkina et al. (2015), som viste at frysing av hysefilet resulterte i lavere ekstraherbarhet av SLP. Dette ble forklart med konformasjonsendringer i myofibrillproteinene, forårsaket av fryselagringen. Resultatene i disse forsøkene tyder derfor på at SLP har blitt utsatt for frysedenaturering, noe som har ført til lavere ekstraherbarhet.

Figur 18 (forsøk 4) viser generelt lavere ekstraherbarhet av SLP enn Figur 17 (forsøk 3). Lavere ekstraherbarhet kan skyldes at torskefileten brukt i forsøk 4 allerede hadde vært fryst og tint ved innkjøp. Det er ikke kjennskap til hvordan fryse- og tineprosessen har foregått. Det er kjent at frysedenaturering og aggregering påvirkes av blant annet hastigheten på frysingen og tiningen, varigheten på fryselagringen og fryselagringstemperaturen (Strasburg et al., 2008). Det er altså trolig at parametere knyttet til selve fryse- og tineprosessen har hatt innvirkning på løseligheten til SLP. Parametere knyttet til fryse- og tineprosessen kan altså ha resultert i en høyere grad av denaturering og aggregering, slik at mindre SLP ekstraheres ut.

I forsøk 4 ble det ekstrahert en signifikant større mengde SLP med økende konsentrasjon av NaCl og MgSO₄, med unntak av 0,4 M og 0,6 M MgSO₄. Resultatet fra fersk torskefilet (resultatdel 5.1) viste samme trend. I tillegg til høy ionestyrke kombinert med saltets stabiliserende effekt, er det tenkelig at stagningen skyldes at alt protein, som ikke hadde frysedenaturert, allerede ble ekstrahert ut med 0,4 M MgSO₄. I forsøk 3 økte mengde ekstrahert SLP signifikant med økende konsentrasjon av saltet for både NaCl og MgCl₂. I motsetning til fersk torskefilet, økte også ekstraherbarheten fra 0,4 M til 0,6 M med MgCl₂. Dette kan ha vært en konsekvens av selve fryse- og tineprosessen. Effekten av prosessen kan ha resultert i at magnesium ikke fører til aggregering mellom proteinene ved denne konsentrasjonen. Det kan se ut til at magnesiums aggregerende effekt er mindre fremtredende i torskefileten som har vært fryst og tint.

Det ble generelt ekstrahert en signifikant større mengde SLP med MgCl₂ og MgSO₄ enn med NaCl ved de samme konsentrasjonene. Dette samsvarer med resultatene for fersk torskefilet (resultatdel 5.1). Det ble ekstrahert omtrent samme mengde med 0,2 M MgCl₂ sammenliknet med 0,6 M NaCl, noe som samsvarer med like ionestyrker. I forsøket med fersk torskefilet, ble det derimot ekstrahert en signifikant større mengde med 0,6 M NaCl. Det er tenkelig at proteinene som ekstraheres også har blitt påvirket av fryse- og tineprosessen, selv om dette ikke har resultert i at proteinene har blitt uløselige. Prosessen kan ha påvirket de ekstraherte proteinene på en slik måte at saltene har hatt en noe annerledes effekt på løseligheten. Med tanke på dette, samt at ekstraherbarheten øker fra 0,4 M til 0,6 M, kan det tyde på at saltenes ionespesifikke effekter ikke er like avgjørende for proteinløseligheten etter frysing. Dette er delvis i samsvar med resultatene til Andreetta-Gorelkina et al. (2015), som viste at konsentrasjon og type salt hadde mindre påvirkning på de fysiokjemiske egenskapene til fryst hysefilet enn fersk hysefilet.



Figur 19: SLP fra fryst torskefilet ekstrahert med NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ separert med SDS-PAGE. Brønnene er markert med bokstaver og tall. Bokstaven «S» representerer standarden (HMW), mens bokstaven «B» står for SLP. Bokstavene og tallene fra B1 til B12 representerer SLP ekstrahert med følgende salt og konsentrasjon; B1-B2: 0,2 M NaCl, B3-B4: 0,4 M NaCl, B5-B6: 0,6 M NaCl, B7-B8: 0,2 M MgCl₂/MgSO₄, B9-B10: 0,4 M MgCl₂/MgSO₄ og B11-B12: 0,6 M MgCl₂/MgSO₄.

Figur 19 viser både færre og svakere bånd på disse gelene, sammenliknet med gelene for fersk torskefilet (resultatdel 5.1). Dette samsvarer med ekstraherbarhetene for fersk og fryst torskefilet. Gelen påsatt prøvene ekstrahert med MgCl₂ har tykkere og tydeligere bånd enn gelen påsatt prøvene ekstrahert med NaCl. Dette er i overensstemmelse med resultatene fra proteinekstraksjonen, som viste at det ble ekstrahert mer SLP med MgCl₂ enn med NaCl i alle konsentrasjoner. At dette ikke gir spesielt utslag i antall bånd (dette er noe vanskelig å se av figuren, og skyldes at bildet ikke er av god nok kvalitet) viser at NaCl ekstraherer like mange typer proteiner som MgCl₂. For alle salter i alle konsentrasjoner, med unntak av 0,2 M NaCl, er både myosin- og aktinbåndene tilstede på gelene (dette er også noe vanskelig å se av figuren). Myosinbåndene er derimot svært svake, sammenliknet med de andre båndene på gelene. Ifølge Mackie (1993) skyldes dette konformasjonsendringer og aggregering av myosin under frysing (sitert etter Andretta-Gorelkina et al., 2015).

Tabell 7: Gelelektroforese (SDS-PAGE) av proteinene ekstrahert med NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Forsøk 3 (NaCl og MgCl₂) er til venstre og forsøk 4 (NaCl og MgSO₄) er til høyre. [«*»-tegnet indikerer usikkerhet i tentativt identifisert protein. Et bånd ble analysert til å ha en molekylvekt midt mellom de to markerte proteinene, og ettersom disse to proteinene har såpass lik molekylvekt, er det usikkert hvilket av de to proteinene det er.] Molekylvektene til proteinene er hentet fra Strasburg et al. (2008).

| Protein (kDa) | NaCl (M) | | | MgCl ₂ (M) | | | NaCl (M) | | | MgSO ₄ (M) | | |
|-----------------------------|----------|-----|-----|-----------------------|-----|-----|----------|-----|-----|-----------------------|-----|-----|
| | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,6 |
| Cap-Z β (32) | - | - | X | X | X | X | - | - | - | - | - | - |
| Cap-Z α (36) | | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tropomyosin α-enhet (37) | - | - | - | X | X | X | - | - | - | - | - | - |
| Tropomodulin (40) | - | - | - | - | - | - | - | X* | X* | X* | X* | X* |
| G-aktin (42) | - | X | X | X | X | X | - | X* | X* | X* | X* | X* |
| Desmin (55) | - | - | - | - | - | - | - | X | X | X | X | X |
| Myosinets tunge kjede (220) | - | X | X | X | X | X | - | X | X | X | X | X |

Tabell 7 viser at de fire samme proteinene ble ekstrahert ut med NaCl og MgCl₂, med unntak av ett protein; for prøvene ekstrahert med NaCl er båndet trolig Cap-Z α, mens for prøvene ekstrahert med MgCl₂ er båndet trolig tropomyosinets α-enhet. Ettersom disse to proteinene ligger såpass nær i molekylvekt, er det tenkelig at usikkerhet i metoden har påvirket dette resultatet. Det ble ekstrahert ut like mange typer proteiner for NaCl og MgCl₂ ved høyeste

konsentrasjon. I forsøket med fersk torskefilet (resultatdel 5.1) sank imidlertid antall ekstraherte proteiner med økende konsentrasjon av $MgCl_2$. De samme tre proteinene ble ekstrahert ut med de to høyeste konsentrasjonene av $NaCl$, som for alle tre konsentrasjoner av $MgSO_4$. At de samme proteinene ble ekstrahert ut i alle prøver, var ikke tilfellet i forsøket med fersk torskefilet.

Det ble ekstrahert ut ulike proteiner mellom fersk (forsøk 1 og 2) og fryst torskefilet (forsøk 3 og 4). Som konstatert tidligere har fryseprosessen stor påvirkning på mengde ekstrahert protein, og har derfor også mest sannsynlig hatt påvirkning på hvilke proteiner som har blitt ekstrahert ut. Studiet gjennomført Andreetta-Gorelkina et al. (2015) viste at resultatene fra SDS-PAGE var mest avhengig av tilstanden til råstoffet (fersk/fryst), fremfor type buffer og pH. Det er altså tenkelig at fryseprosessen er av større betydning, og at type salt ikke er like avgjørende for hvilke proteiner som ekstraheres ut. Dette kan altså være en grunn til at samme antall og type protein ble ekstrahert ut i alle prøver, samt til variasjonen mellom hvilke proteiner som ble ekstrahert ut for fersk og fryst torskefilet.

5.3 Varmebehandlet torskefarse

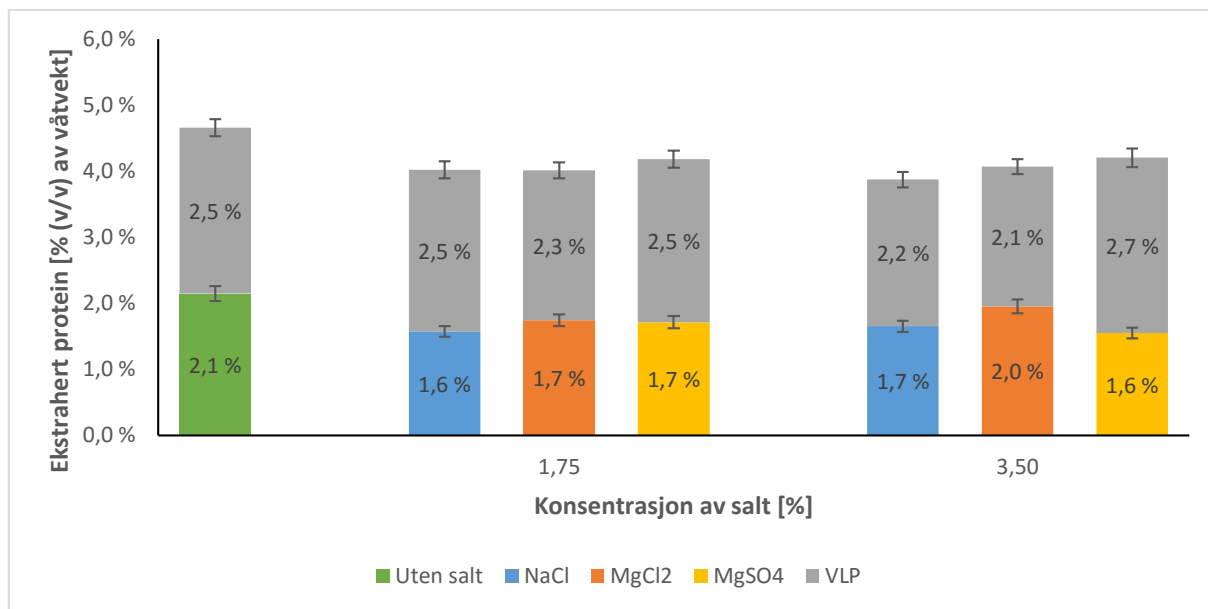
Resultatene for mengde ekstrahert VLP og SLP etter varmebehandling ved 30°C, 40°C og 50°C er vist i henholdsvis Figur 20, Figur 21 og Figur 22. En sammenheng mellom temperatur og ekstraherbarhet er vist i Figur 23. Separasjonen med SDS-PAGE av ekstrahert VLP og SLP er vist i henholdsvis Figur 24 og Figur 25. De ulike ekstraherte saltløselige proteinene er vist i henholdsvis Tabell 10, Tabell 11 og Tabell 12, hvor disse er markert med «x».

Det ble tilsatt salt direkte i torskefarsen, og hvert salt ble tilsatt i to ulike vektprosent (1,75% og 3,50%) i forhold til mengde farse. Det ble tilsatt lik vekt (i gram) av alle saltene til de ulike farseporsjonene. Hver farseporsjon hadde en vekt på 20 g. Tilsats av salt (i gram) ble regnet ut i forhold til dette, slik at det ble tilsatt 0,35 g og 0,70 g salt, tilsvarende henholdsvis 1,75% og 3,50%. Ettersom saltene ble tilsatt direkte i farsen, ble den molare konsentrasjonen av salt regnet ut på grunnlag av vann i fiskefarsen. Videre ble også tilhørende ionestyrker regnet ut. Utregning av konsentrasjon og ionestyrke er vist i Vedlegg B, og en oversikt over saltenes konsentrasjon og ionestyrke er vist i Tabell 8.

Tabell 8: Oversikt over tilsats av ulike salt, med tilhørende molare konsentrasjoner og ionestyrker.

| Salt | Mengde (%) | Mengde (g) | Konsentrasjon (mol/L) | Ionestyrke |
|-------------------|------------|------------|-----------------------|------------|
| NaCl | 1,75 | 0,35 | 0,38 | 0,38 |
| MgCl ₂ | | | 0,11 | 0,33 |
| MgSO ₄ | | | 0,09 | 0,36 |
| NaCl | 3,50 | 0,70 | 0,76 | 0,76 |
| MgCl ₂ | | | 0,22 | 0,65 |
| MgSO ₄ | | | 0,18 | 0,72 |

Som Tabell 8 viser, varierte den molare konsentrasjonen av de ulike saltene, mens de tilhørende ionestyrkene varierte mindre. Dette er i kontrast til hva som ble gjort i forsøkene med fersk og fryst torskefilet (resultatdel 5.1 og 5.2), hvor det ble tilsatt like konsentrasjoner av salt, noe som ga svært varierende ionestyrker, samt svært høye ionestyrker for Mg-saltene. I disse forsøkene ble det valgt et oppsett der ionestyrkene var lavere og jevnere.



Figur 20: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt) fra torskefarse varmebehandlet ved 30°C. Den grønne søylen representerer ekstrahert mengde SLP fra ikke-saltet farse, mens de blå, oransje og gule søylene representerer ekstrahert SLP fra farsene tilsatt henholdsvis NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike konsentrasjoner. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

Ikke-varmebehandlet og ikke-saltet farse ble brukt som sammenlikningsgrunnlag for de varmebehandlede farsene. Mengde ekstrahert VLP og SLP fra denne farsen lå på henholdsvis 3,0% og 8,2% (disse verdiene er vist i Figur 48 – Vedlegg B). Det ble ekstrahert noe mer VLP og omtrent samme mengde SLP fra denne farsen, sammenliknet med VLP og SLP fra fersk torskefilet (resultatdel 5.1). Dette tyder på at farsetillagningen ikke har hatt en negativ effekt på løseligheten av VLP og SLP. Andreetta-Gorelkina et al. (2015) fant derimot at det ble ekstrahert mindre SLP fra saltet hysefarse enn fra saltet hysefilet. I dette forsøket er imidlertid sammenlikningen gjort med farser uten tilsats av salt.

Det ble ekstrahert en signifikant mindre mengde VLP fra ikke-saltet torskefarsene varmebehandlet ved 30°C sammenliknet med den ikke-varmebehandlede farsen. Dette tyder på at varmebehandling ved 30°C har hatt innvirkning på løseligheten til VLP. Dette er ikke helt i overensstemmelse med tidligere studier, hvor sarkoplasmatiske proteiner i torsk har vært vist å ha mye høyere denatureringstemperaturer. Skipnes (2011) viste ved bruk av differensiell skanning kalorimetri (DSC) at sarkoplasmatiske proteiner i torsk denaturerte mellom 50°C og 72°C. Mengde ekstrahert VLP varierte både med type salt og konsentrasjon av salt. Dette tyder på at tilsats av salt før varmebehandling har påvirket mengde ekstrahert VLP. En mulig forklaring på dette er at noe SLP har blitt ekstrahert ut sammen med VLP-fraksjonen.

Det ble ekstrahert en signifikant større mengde SLP fra den ikke-varmebehandlede farsen sammenliknet med alle de varmebehandlede farsene. Skipnes (2011) viste at denaturering av myosin starter allerede ved 28°C. Den lave ekstraherbarheten skyldes trolig denaturering av varmelabile proteiner, som blant annet myosin og α-aktinin (Skipnes, 2011). Det ble ekstrahert en signifikant større mengde fra ikke-saltet farse sammenliknet med alle farser tilsatt salt, med unntak av farsen tilsatt 3,50% MgCl₂. Dette tyder på at tilsats av salt har hatt negativ påvirkning på mengde ekstrahert SLP fra varmebehandlet torskefarse.

Thorarinsdottir et al. (2002) har ved bruk av DSC undersøkt endringer i myofibrillproteiner fra saltet torsk under varmebehandling. De viste at tilsats av salt senket varmestabiliteten til både aktin og myosin signifikant. Begge proteiner denaturerte ved lavere temperaturer med tilsats av salt. Det er altså kjent at tilsats av salt kan senke den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene. Det er imidlertid uenighet i litteraturen med hensyn på hvilke saltkonsentrasjoner som kreves for å senke den termiske stabiliteten. Wu et al. (1985) viste ved bruk av DSC at 3% salt senket den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene fra varmtvannsfisken *Genyonemus lineatus*. Denatureringstemperaturen for myosin og aktin ble senket fra henholdsvis 43°C og 71°C til 37°C og 66°C. Howell et al. (1991) har imidlertid vist, ved bruk av DSC, at tilsats av salt allerede med ionestyrke 0,05 resulterte i en nedgang i termisk stabilitet.

Howell et al. (1991) hevder at den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene er relatert til temperaturen som arten lever i, og i dette studiet ble starttemperaturen for termisk denaturering av myofibrillproteiner funnet å ligge 11°C lavere for kaldtvannsfisk enn for varmtvannsfisk. Ettersom torsk er en kaldtvannsfisk, er det tenkelig at denatureringstemperaturene både med og uten tilsats av salt er lavere enn hva resultatene til Wu et al. (1985) viste. Resultatene i dette forsøket viste en signifikant lavere ekstraherbarhet av SLP med tilsats av 1,75% salt, noe som kan indikere at denne saltkonsentrasjonen har vært tilstrekkelig for å senke den termiske stabiliteten til SLP. Dette understøttes av resultatene til Howell et al. (1991), som viste redusert termisk stabilitet ved enda lavere ionestyrker enn i dette forsøket (0,33 - 0,76 – Tabell 8).

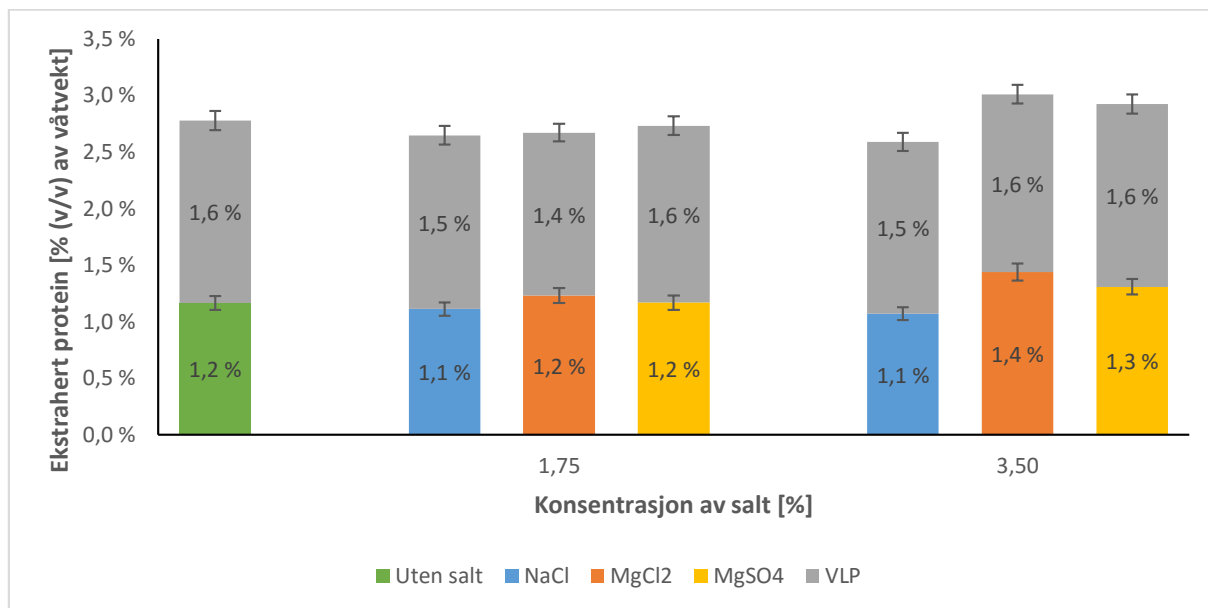
Det var ingen signifikant endring i mengde ekstrahert SLP med økende konsentrasjon av salt for verken NaCl eller MgSO₄. Det var derimot en signifikant økning i mengde ekstrahert SLP med økende konsentrasjon av MgCl₂. Howell et al. (1991) viste at den termiske denatureringstemperaturen til myofibrillproteinene fra torsk ikke ble endret med økende ionestyrke fra 0,05 til 1. Ettersom total mengde protein var tilnærmet uendret, og mengde ekstrahert VLP samtidig sank, kan denne økningen i ekstraherbarhet skyldes at det ikke ble ekstrahert ut like mye SLP i VLP-fraksjonen med 3,50% MgCl₂, som med 1,75% MgCl₂. Totalt ekstrahert protein er vist i Tabell 9.

Tabell 9: Total mengde ekstrahert protein fra torskefarsene varmebehandlet ved 30°C, tilsatt de ulike saltene i to ulike konsentrasjoner. Standardavviket er regnet ut fra usikkerheten i metoden – 5,3%.

| Type salt | Totalt ekstrahert protein (%) med 1,75% salt | Totalt ekstrahert protein (%) med 3,50% salt |
|-------------------|---|---|
| NaCl | 4,0 ± 0,2 | 3,9 ± 0,2 |
| MgCl ₂ | 4,0 ± 0,2 | 4,1 ± 0,2 |
| MgSO ₄ | 4,2 ± 0,2 | 4,2 ± 0,2 |

Det var ingen signifikante forskjeller mellom ekstrahert mengde SLP for farsene tilsatt 1,75% salt. For farsene tilsatt 3,50% salt ble det ekstrahert ut en signifikant større mengde SLP med MgCl₂ sammenliknet med NaCl og MgSO₄. Tabell 9 viser derimot ikke nevneverdige forskjeller mellom totalt ekstrahert protein for noen av farsene. Forskjellen mellom saltene indikerer derfor ikke nødvendigvis at MgCl₂ er en bedre ekstraktant. De totale mengdene var nokså like mellom de tre saltene i begge konsentrasjoner, noe som kan tyde på at type salt har lite å si for løseligheten. Ettersom SLP fra alle farsene ble ekstrahert med 0,6 M NaCl, kan dette ha «jevnet ut» forskjellene mellom de tre saltene som opprinnelig var tilsatt farsene. Andreetta-Gorelkina et al. (2015) fant at mengde ekstrahert protein både avhenger av saltet som tilsettes

råmaterialet og saltet i ekstraksjonsbufferen. Dersom det hadde vært tid, burde ekstraksjonen ha vært gjennomført med de samme saltene som var tilsatt farsene. Dette kunne forhåpentligvis gitt et mer helhetlig bilde.



Figur 21: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt) fra torskefarse varmebehandlet ved 40°C. Den grønne søylen representerer ekstrahert mengde SLP fra ikke-saltet farse, mens de blå, oransje og gule søylene representerer ekstrahert SLP fra farsene tilsatt henholdsvis NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike konsentrasjoner. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%)

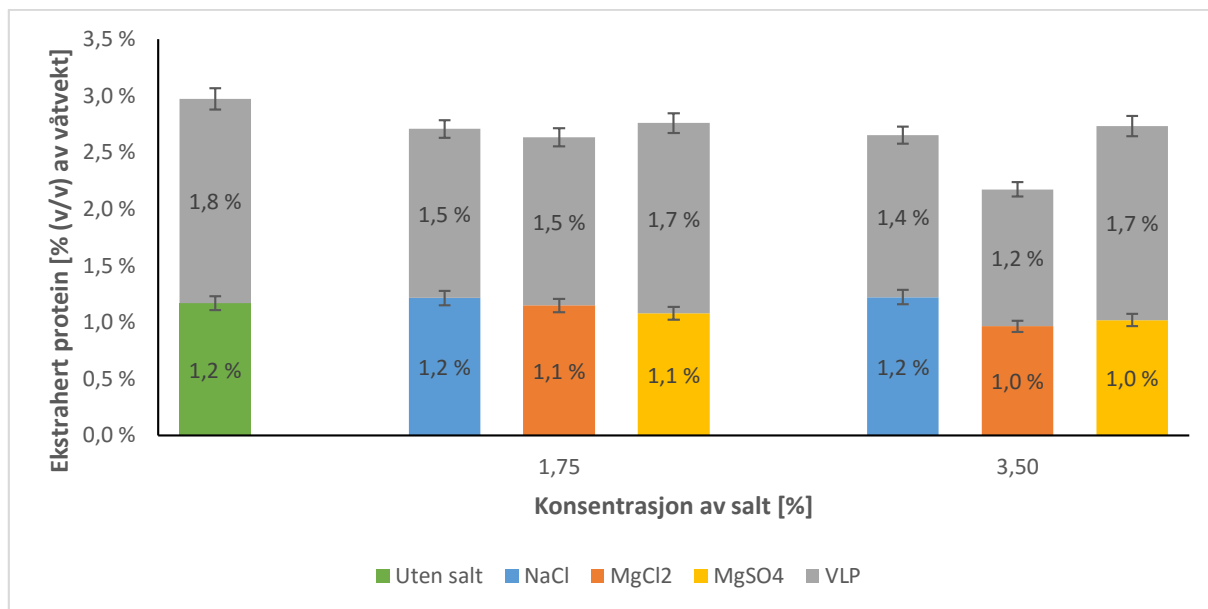
Figur 21 viser at mengde ekstrahert SLP var lavere ved 40°C enn ved 30°C. Ofstad et al. (1993) undersøkte strukturelle endringer i torskemuskel under varmebehandling, og fant et økt vanntap med økende temperatur. Et maksimalt vanntap ble registrert ved 45°C. Dette var forårsaket av at muskelcellene krymper som et resultat av denaturering av myosin. Lavere ekstraherbarhet i dette forsøket tyder på ytterligere proteindenaturering, og tilnærmet fullstendig denaturering av myosin. Det ble også ekstrahert mindre VLP ved 40°C enn ved 30°C. Som nevnt, har Skipnes (2011) vist høyere denatureringstemperatur for sarkoplasmatiske proteiner. Det er mulig at denne nedgangen skyldes at mindre SLP ble løst i VLP-fraksjonen som følge av denaturering.

Det ble ikke ekstrahert en større mengde SLP fra den ikke-saltede farsen sammenliknet med de saltede farsene, noe som er kontrast til hva som ble registrert ved 30°C. Det var en kraftigere nedgang i mengde ekstrahert SLP i den ikke-saltede farsen mellom 30°C og 40°C, sammenliknet med de saltede farsene. Dette kan tyde på at de proteinene som allerede var denaturert ved 30°C i farsene tilsatt salt, nå har denaturert i den ikke-saltede farsen. Skipnes (2011) fant maksimumstemperaturer for denaturering av myosin i torsk på 38,4°C og 44,1°C uten tilsatt av salt. Det kan altså se ut til at de samme endringene som oppsto ved 30°C for de saltede farsene, nå har skjedd for den ikke-saltede farsen. Grunnen til en mindre nedgang for de saltede farsene kan skyldes at en del av de ekstraherte proteinene har en høyere termisk stabilitet enn 40°C, og at de derfor ikke har denaturert. Ifølge Hastings, Rodger, Park, Matthews og Anderson (1985) har myosin og aktin svært ulike denatureringstemperaturer, og aktin er kjent for å være langt mer varmestabil enn myosin (sitert etter Thorarinsdottir et al., 2002).

Det ble kun ekstrahert en signifikant større mengde SLP med økende konsentrasjon av salt for MgCl_2 . Howell et al. (1991) undersøkte termisk stabilitet av myofibrillproteiner fra en rekke fiskearter, og viste at den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene generelt sank med økende ionestyrke. Som nevnt tidligere, ble det derimot vist at myofibrillene fra torsk hadde en uendret termisk stabilitet. En signifikant økning kan tyde på at økt MgCl_2 -konsentrasjon har hatt en positiv effekt på den termiske stabiliteten til SLP. Dette kan også indikere at virkningen av økt saltkonsentrasjon varierer med type salt.

Det var ingen signifikante forskjeller i mengde ekstrahert SLP fra farsene tilsatt 1,75% salt. Det ble derimot ekstrahert en signifikant større mengde SLP fra farsene tilsatt 3,50% MgCl_2 og MgSO_4 sammenliknet med farsen tilsatt 3,50% NaCl . Ut fra dette kan resultatene altså tyde på at 3,50% salt er tilstrekkelig for at ionespesifikke effekter virker inn på løseligheten. Thorarinsdottir et al. (2002) hevder at både konsentrasjon og type salt påvirker den termiske stabiliteten til proteinene. Weinberg, Regenstien, og Lillfjord (1984) undersøkte effekten av ulike salter på termisk stabilitet av myofibrillproteiner i torskefarse ved bruk av DSC. NaCl , NaI , Na_2SO_4 , MgCl_2 og CaCl_2 ble tilsatt farsene, og ionestyrken ble beregnet til 0,255 for alle saltene. Termogrammene viste at tilsatt av NaCl ga lavere og bredere topper enn kontrollen (ikke-saltet farse), MgCl_2 ga noe høyere og bredere topper, mens Na_2SO_4 ga en høyere topp uten særlig tegn til utvidelse av toppene. Resultatene viste altså at saltene hadde ulik innvirkning på den termiske stabiliteten til både myosin og aktin.

Salter kan ifølge Hofmeisterserien, kategoriseres som enten destabiliserende eller stabiliserende (Damodaran, 2008). En reduksjon i den termiske denatureringstemperaturen er forårsaket av destabilisering av proteinene. Salt som øker løselighet, altså øker destabilisering, kan da tenkes å bidra til å redusere den termiske stabiliteten til proteinene, noe som vil resultere i en lavere denatureringstemperatur. Salt som øker stabiliteten derimot, kan tenkes å motvirke temperaturens destabiliserende effekt, noe som dermed kan resultere i mindre denaturering og en høyere ekstraherbarhet. Slik som det går frem av Hofmeisterserien er både NaCl og MgCl_2 destabiliserende salter, mens MgSO_4 er et stabiliserende salt (Puolanne og Halonen, 2010). Magnesium er derimot et mer stabiliserende kation enn natrium (Puolanne og Halonen, 2010), og ifølge Xiong og Brekke (1991) er magnesium kjent for å bindes sterkere til polare grupper i proteinene (sitert etter Barat et al., 2013), og på denne måten bidra til økt stabilisering av proteinene. Som hevdet av Thorarinsdottir et al. (2002), antas proteinene å denaturere ved en kompleks prosess på grunn store endringer i vann- og saltinnhold i muskelen, og det er derfor vanskelig å si noe om hva disse forskjellene mellom saltene faktisk skyldes.

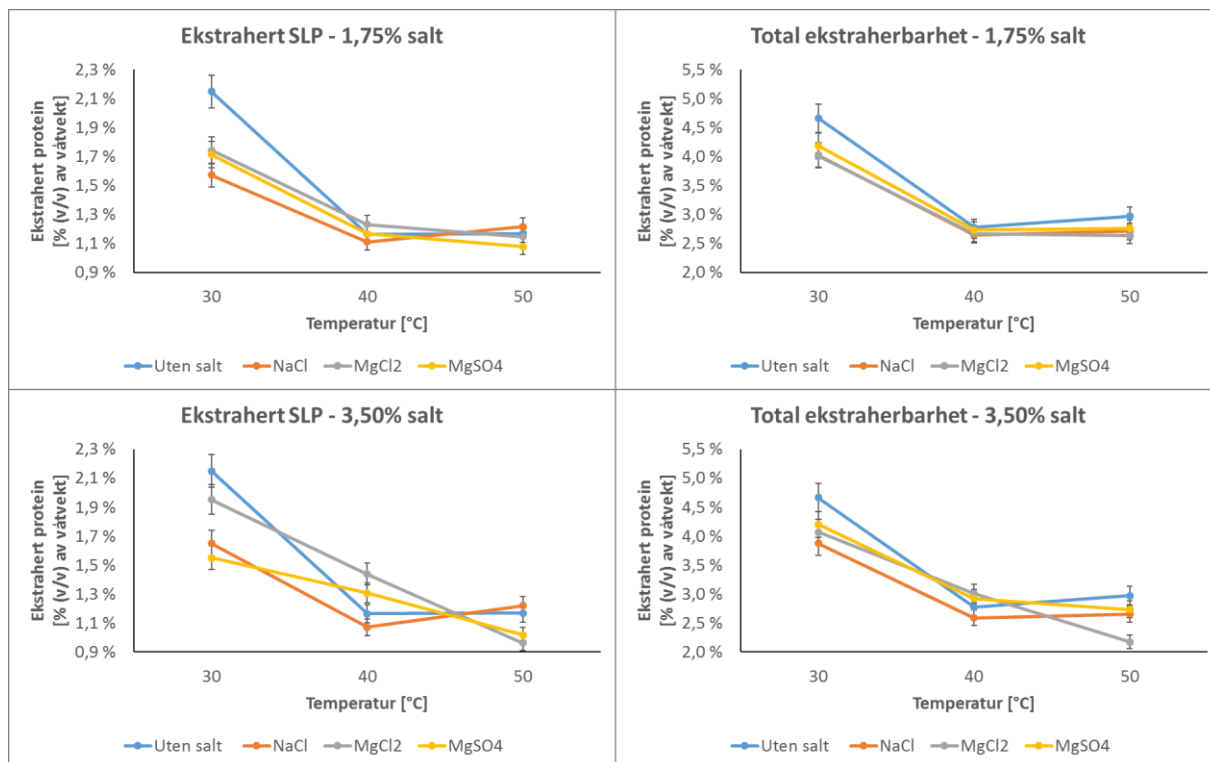


Figur 22: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt) fra torskefarse varmebehandlet ved 50°C. Den grønne søylen representerer ekstrahert mengde SLP fra ikke-saltet farse, mens de blå, oransje og gule søylene representerer ekstrahert SLP fra farsene tilsatt henholdsvis NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike konsentrasjoner. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%)

Figur 22 viser liten endring i ekstraherbarheten mellom 40°C og 50°C. Det var kun en nedgang i ekstraherbarhet for farsene tilsatt 3,50% MgCl₂ og MgSO₄. Det er å forvente en lavere ekstraherbarhet med økende temperatur. Hvorfor dette ikke var tilfellet med de andre prøvene er uvisst. Ettersom det ble ekstrahert svært lite protein allerede ved 40°C, er det tenkelig at mesteparten av proteinene allerede var denaturert ved 40°C. Selv om Skipnes (2011) viste at denaturering av aktin ikke startet før ved 58°C, tyder såpass lave ekstraherbarheter på at mer varmestabile proteiner, som aktin, mest sannsynlig har startet å denaturere.

Det var kun en signifikant forskjell mellom saltkonsentrasjonene for farsen tilsatt MgCl₂. Ved 40°C var det en signifikant økning i mengde ekstrahert SLP med økende konsentrasjon av MgCl₂, mens i dette forsøket var det derimot en signifikant nedgang i mengde ekstrahert SLP med økende konsentrasjon. Det kan derfor se ut til at effekten av økt saltkonsentrasjon varierer med temperaturen.

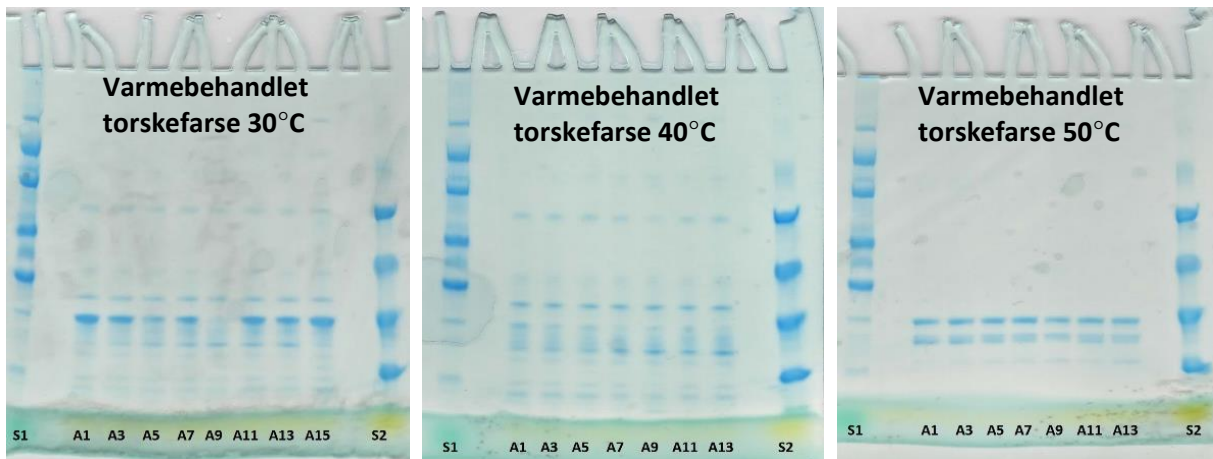
Det var ingen signifikante forskjeller mellom mengde ekstrahert SLP for farsene tilsatt 1,75% salt. For farsene tilsatt 3,50% salt ble det ekstrahert en signifikant større mengde SLP med NaCl i forhold til MgCl₂ og MgSO₄. Slik som resultatene fra varmebehandlingen ved 40°C viste, ser det ut til at saltenes ionespesifikke effekter ikke virker inn før ved tilsatt av 3,50% salt. Bedre ekstraherbarhet med NaCl er imidlertid i kontrast til resultatene ved 40°C, hvor det ble ekstrahert en signifikant mindre mengde SLP med NaCl i forhold til de to Mg-saltene. Saltenes påvirkning ser ut til å variere med temperaturen. Årsaken til denne endringen i saltenes effekt mellom temperaturene er imidlertid uvisst.



Figur 23: Sammenheng mellom ekstraherbarhet og temperatur. De to øverste diagrammene viser mengde ekstrahert SLP og totalt protein fra farsene tilsatt 1,75% salt, samt fra farsen uten salt. De to nederste diagrammene viser mengde ekstrahert SLP og totalt protein fra farsene tilsatt 3,50% salt, samt fra farsen uten salt.

Figur 23 viser at mengde ekstrahert SLP ved 30°C generelt lå lavere for farsene tilsatt salt (foruten om 3,50% MgCl₂) sammenliknet med farsen uten salt, noe som tyder på at tilsats av salt i begge konsentrasjoner har senket starttemperaturen for termisk denaturering av myofibrillproteinene. Mengde ekstrahert SLP sank mest mellom 30°C og 40°C for farsen uten salt, og er ved denne temperaturen på nivå med de saltede farsene. Denatureringen som allerede hadde oppstått i de saltede farsene, ser nå ut til å ha oppstått i farsen uten salt. Det var lite endring i ekstraherbarhet mellom 40°C til 50°C for både farsen uten og farsene med salt. Dette tyder på at mesteparten av proteinene denaturerte allerede ved 40°C, og at temperaturøkningen ved 50°C har gitt lite utslag på de mest varmestabile proteinene. Det var små variasjoner mellom saltene tilsatt i lavest konsentrasjon, mens det derimot var større variasjoner mellom saltene tilsatt i størst konsentrasjon. Dette kan indikere at 3,50% salt er tilstrekkelig for at saltenes ionespesifikke effekter til en viss grad kommer til uttrykk. Effekten av type salt ser ut til å variere med temperaturen.

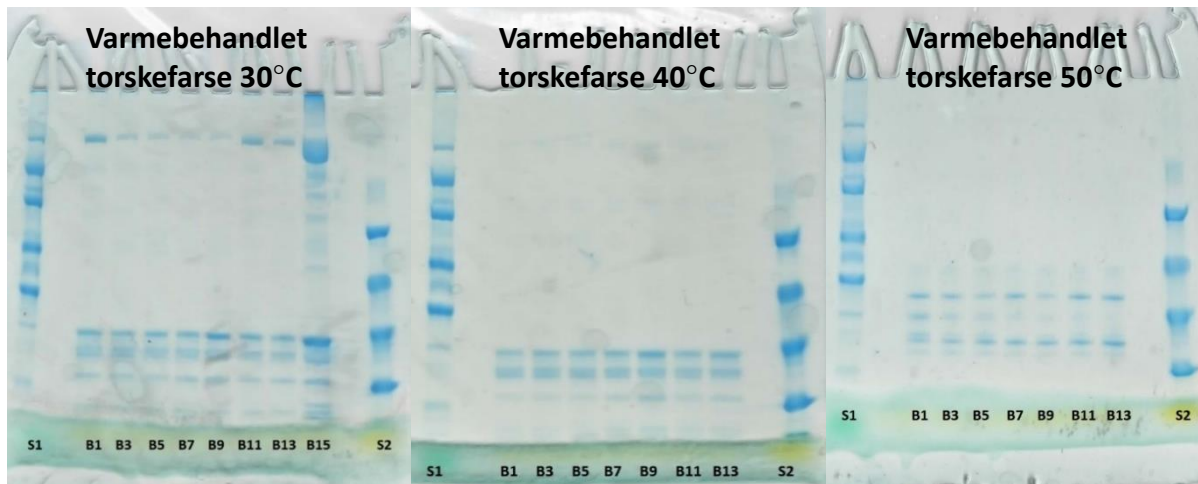
Grafene som representerer mengde ekstrahert SLP indikerer større forskjeller mellom saltene enn grafen som viser total mengde ekstrahert protein. Det at forskjellene mellom saltene er mindre fremtredende for total mengde ekstrahert protein, skyldes at variasjonene i ekstrahert mengde VLP har jevnet ut forskjellene. Variasjoner i mengde VLP skyldes som nevnt mest sannsynlig at noe SLP har blitt ekstrahert ut sammen med VLP-fraksjonene. En sammenlikning av total mengde ekstrahert protein vil derfor trolig gi en mer pålitelig slutning om de ulike saltenes innvirkning på løselighet. Dette viser derfor at det er vanskelig å si om type salt egentlig har vært av nevneverdig betydning. Totalt ekstrahert protein viser også at tilsats av salt kanskje har vært noe mindre utslagsgivende for den termiske stabiliteten ved 30°C.



Figur 24: VLP fra torskefarse varmebehandlet ved 30, 40 og 50°C separert med SDS-PAGE. Brønnene er markert med bokstaver og tall. «S1» og «S2» representerer henholdsvis HMW- og LWM-standarden. Bokstaven «A» står for VLP. Bokstavene og oddetallene fra A1 til A15 representerer VLP fra torskefarsene tilsatt følgende salt og mengde; A1: ikke-saltet, A3: 1,75% NaCl, A5: 3,50% NaCl, A7: 1,75% MgCl₂, A9: 3,50% MgCl₂, A11: 1,75% MgSO₄, A13: 3,50% MgSO₄ og A15: ikke-saltet og ikke-varmebehandlet.

Figur 24 viser at antall bånd ikke reduseres fra 30°C til 40°C. Både tykkelse og fargeintensitet er derimot redusert, noe som skyldes lavere proteinmengde i prøvene. Dette er i overensstemmelse med resultatene fra proteinekstraksjonen, som viste at mengde ekstrahert VLP ble redusert fra 30°C til 40°C. Antall bånd reduseres kraftig fra 40°C til 50°C. Resultatene fra proteinekstraksjonen viste imidlertid ingen nevneverdig nedgang i mengde ekstrahert VLP. Disse resultatene kan tyde på at de proteinene som har forsvunnet fra gelen har hatt et lite bidrag til den totale mengden ekstrahert VLP. Det er de svakeste båndene ved 40°C som har forsvunnet helt ved 50°C. En nedgang i antall bånd, men ikke i ekstraherbarhet, kan også skyldes at det har oppstått nedbrytningsprodukter og aggregater som har blitt ekstrahert ut, men som ikke har blitt detektert på gelen fordi de henholdsvis er for små eller for store.

Noen av båndene ser ut til å samsvare med molekylvektene til noen av de saltløselige proteinene, som blant annet myosinets tunge kjede og G-aktin. Dette bekrefter den tidlige antakelsen. Antall saltløselige proteinbånd reduseres med økende temperatur, forårsaket av gradvis denaturering av SLP. Ettersom noen av båndene som forsvinner ikke er SLP, er det trolig at noe VLP også denaturerer mellom 30°C og 50°C. Sarkoplasmatiske proteiner i varmtvannsfisken *Genyonemus lineatus* vil ifølge Wu et al. (1985) ikke denatureres før ved 51°C ved tilsats av salt. Howell et al. (1991) har derimot hevdet at myofibrillproteinene i kaldtvannsfisk denaturerer ved lavere temperaturer. Det er rimelig å anta at dette også gjelder for de sarkoplasmatiske proteinene, slik at også noen av disse har blitt uløselige.



Figur 25: SLP fra torskefarse varmebehandlet ved 30°C, 40°C og 50°C, separert med SDS PAGE. Brønnene er markert med bokstaver og tall. «S1» og «S2» representerer henholdsvis HMW- og LWM-standarden. Bokstaven «B» står for SLP. Bokstavene og oddetallene fra B1 til B15 representerer SLP fra torskefarsene tilsatt følgende salt og konsentrasjon; B1: ikke-saltet, B3: 1,75% NaCl, B5: 3,50% NaCl, B7: 1,75% MgCl₂, B9: 3,50% MgCl₂, B11: 1,75% MgSO₄, B13: 3,50% MgSO₄ og B15: ikke-saltet og ikke-varmebehandlet.

Tabell 10: Gelelektroforese (SDS-PAGE) av de saltløselige proteinene ekstrahert fra torskefarse tilsatt NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike konsentrasjoner, varmebehandlet ved 30°C. Molekylvektene til proteinene er hentet fra Strasburg et al. (2008).

| Proteiner (kDa) | Uten salt | 1,75% | | | 3,50% | | |
|------------------------------------|-----------|-------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|-------------------|
| | | NaCl | MgCl ₂ | MgSO ₄ | NaCl | MgCl ₂ | MgSO ₄ |
| Troponin-I (20)/LC1 (20,9) | X | X | X | X | X | X | X |
| Troponin-T (30) | X | X | X | X | X | X | X |
| Cap Z β (32) | - | - | - | - | - | - | - |
| Cap-Z α (36) | - | - | - | - | - | - | - |
| Tropomyosin α-enhet (37) | X | X | X | X | X | X | X |
| G-aktin (42) | X | X | X | X | X | X | X |
| Myosinets tunge kjede (220) | X | X | X | X | X | X | X |

Figur 25 viser klart flere bånd for prøven ekstrahert fra den ubehandlede farsen, sammenliknet med de varmebehandlede farsene. Dette er i overensstemmelse med resultatene fra proteinekstraksjonen, hvor mengde ekstrahert SLP var kraftig redusert for de varmebehandlede farsene sammenliknet med den ubehandlede farsen. I tillegg er en del av båndene fra de varmebehandlede prøvene svakere enn båndene fra den ikke-varmebehandlede prøven. Myosinbåndet er eksempelvis kraftig redusert, noe som indikerer denaturering av myosin ved 30°C. Dette samsvarer med studiet gjennomført av Skipnes (2011).

Tabell 10 viser at de samme fem proteinene ble ekstrahert for alle kombinasjoner av type salt og konsentrasjon av salt. At de samme proteinene ble ekstrahert fra alle farsene kan tyde på at type salt har liten påvirkning på løseligheten, noe som også går frem av resultatene fra proteinekstraksjonen. Som nevnt tidligere, er det tenkelig at bruk av samme ekstraksjonsbuffer for alle farsene har bidratt til å «viske ut» forskjellene.

De fleste proteinene som ble ekstrahert ut i dette forsøket, ble også ekstrahert ut fra fersk torskefilet (resultatdel 5.1). Både høyere ekstraherbarhet og flere bånd på gelene, indikerer derimot at det var forventet flere ulike ekstraherte proteiner fra fersk torskefilet. At dette ikke

er tilfellet, kan skyldes dannelse av nedbrytningsprodukter og eventuelt proteinaggregater. I tillegg var det vanskeligere med nøyaktig avlesning av båndene, ettersom gelene benyttet med fersk torskefilet var mye mindre enn gelene benyttet i dette forsøket.

Tabell 11: Gelelektroforese (SDS-PAGE) av de saltløselige proteinene ekstrahert fra torskefarse tilsatt NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike konsentrasjoner, varmebehandlet ved 40°C. Molekylvektene til proteinene er hentet fra Strasburg et al. (2008).

| Proteiner (kDa) | Uten salt | 1,75% | | | 3,50% | | |
|------------------------------------|-----------|-------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|-------------------|
| | | NaCl | MgCl ₂ | MgSO ₄ | NaCl | MgCl ₂ | MgSO ₄ |
| Troponin-I (20)/LC1 (20,9) | - | - | - | - | - | - | - |
| Troponin-T (30) | x | x | x | x | x | x | x |
| Cap Z β (32) | - | - | - | - | - | - | - |
| Cap-Z α (36) | x | x | x | x | x | x | x |
| Tropomyosin α-enhet (37) | x | x | x | x | x | x | x |
| G-aktin (42) | x | x | x | x | x | x | x |
| Myosinets tunge kjede (220) | - | - | - | - | - | - | - |

Figur 25 viser at det er noen færre bånd på denne gelen, enn på gelen for 30°C. Nedgangen i antall bånd er i samsvar med resultatene fra proteinekstraksjonen, som viste en redusert ekstraherbarhet fra 30°C til 40°C. I motsetning til 30°C, er verken myosinets tunge kjede eller LC1 ekstrahert ut. Det ser altså ut til at alt myosin har denaturert ved denne temperaturen. Dette var å forvente, ettersom myosin er et svært varmelabilt protein (Skipnes, 2011). Tabell 11 viser at de samme proteinene ble ekstrahert ut i alle prøver, noe som tyder på at type salt og saltkonsentrasjon har vært lite avgjørende for hvilke proteiner som har blitt ekstrahert ut.

Tabell 12: Gelelektroforese (SDS-PAGE) av de saltløselige proteinene ekstrahert fra torskefarse tilsatt NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike konsentrasjoner, varmebehandlet ved 50°C. Molekylvektene til proteinene er hentet fra Strasburg et al. (2008).

| Proteiner (kDa) | Uten salt | 1,75% | | | 3,50% | | |
|------------------------------------|-----------|-------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|-------------------|
| | | NaCl | MgCl ₂ | MgSO ₄ | NaCl | MgCl ₂ | MgSO ₄ |
| Troponin-T (30) | x | x | x | x | x | x | x |
| Cap Z β (32) | - | - | - | - | - | - | - |
| Cap-Z α (36) | x | x | x | x | x | x | x |
| Tropomyosin α-enhet (37) | x | x | x | x | x | x | x |
| G-aktin (42) | x | x | x | x | x | x | x |
| Myosinets tunge kjede (220) | - | - | - | - | - | - | - |

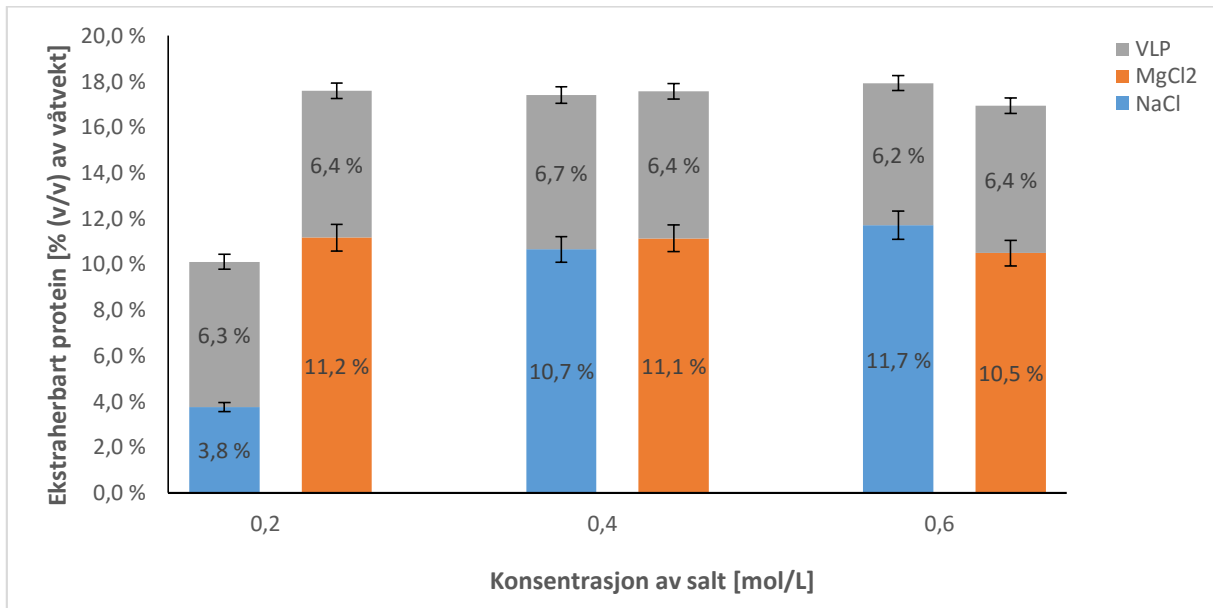
Figur 25 viser ingen nedgang i antall bånd fra 40°C til 50°C, og Tabell 12 viser at de samme proteinene ble ekstrahert ut ved begge temperaturer. Flere av båndene på gelen har imidlertid en redusert intensitet, noe som indikerer en mindre proteinmengde i prøvene påsatt gelen. Ettersom ingen bånd forsvinner, men intensiteten på båndene minker, tyder dette på at temperaturøkningen ikke er tilstrekkelig for å denaturere alt protein fra samme proteintype. Intensiteten på aktinbåndene er eksempelvis redusert. I et studie utført av Skipnes (2011) begynte ikke aktin å denaturere før 58°C. Selv om temperaturen ikke overstiger 50°C i dette forsøket, ser det likevel ut til at aktin har begynt å denaturere.

Ettersom ekstraherbarheten ikke sank nevneverdig mellom de to temperaturene, tyder dette også på at de båndene som har blitt svakere har bidratt lite til den totale mengden ekstrahert SLP. Dette kan også være et resultat av at ekstraherte nedbrytningsprodukter og aggregater ikke detekteres på gelen fordi de er henholdsvis for små eller for store. I likhet med resultatene for

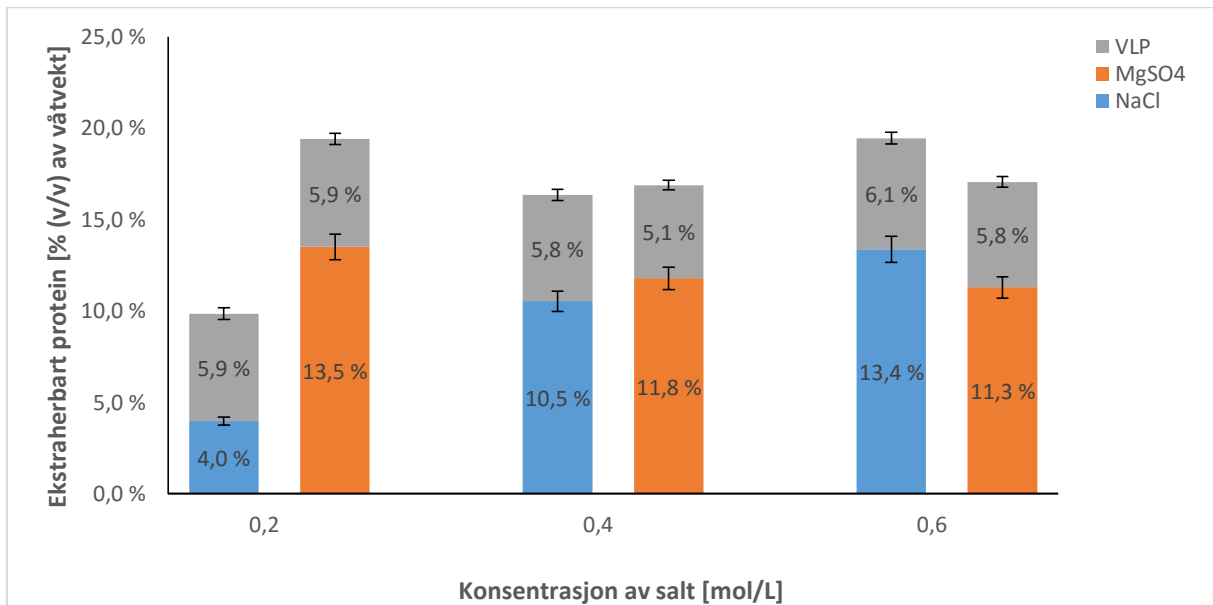
varmebehandling ved 40°C, viser disse resultatene også at type salt, samt konsentrasjon av salt, har vært lite avgjørende for hvilke proteiner som har blitt ekstrahert ut.

5.4 Fersk laksefilet

Resultatene for mengde ekstrahert VLP og SLP fra fersk torskfilet er vist i Figur 26 (forsøk 8 – NaCl og MgCl₂) og Figur 27 (forsøk 9 – NaCl og MgSO₄). Separasjon med SDS-PAGE av ekstrahert SLP fra fersk laksefilet er vist i Figur 28. De ulike ekstraherte proteinene er vist i Tabell 13, hvor disse er markert med «x».



Figur 26: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgCl₂ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).



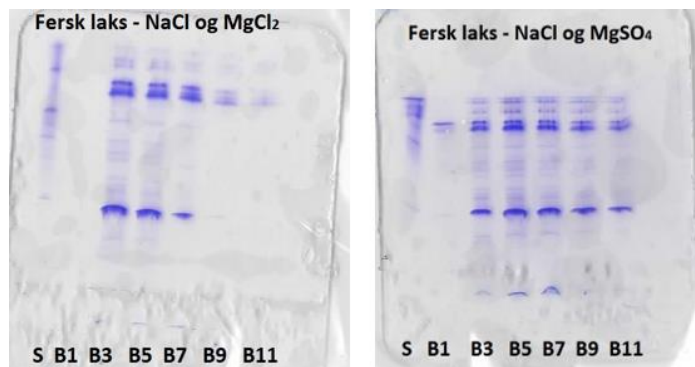
Figur 27: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

Mengde ekstrahert VLP hadde en gjennomsnittsverdi på henholdsvis 6,4% og 5,8%. Det var forventet en verdi rundt 6% for laks (NIFES, 2013; Strasburg et al., 2008). Ekstraherbarheten var derfor som forventet. Mengde ekstrahert SLP varierte henholdsvis fra 3,8% til 11,7% og fra 4,0% til 13,5% i de to forsøkene. Det var forventet en ekstraherbarhet rundt 10-12% for SLP i laks (NIFES, 2013; Strasburg et al., 2008) med optimale ekstraksjonsforhold. Mengde ekstrahert SLP lå innenfor dette området for alle prøver, med unntak av 0,2 M NaCl. Strasburg et al. (2008) hevder at myofibrillproteinene ikke løses før ved 0,3 M NaCl. Svært lav ekstraherbarhet med 0,2 M skyldes derfor for lav saltkonsentrasjon.

I forsøk 8 og 9 økte ekstraherbarheten fra 0,2 M til 0,4 M NaCl, samt fra 0,4 til 0,6 M NaCl i forsøk 9. Dette er i overensstemmelse med ionestyrkens effekt på løselighet (Damodaran, 2008). Det ble ekstrahert omtrent samme mengder SLP med alle konsentrasjoner av MgCl₂. Med MgSO₄ sank ekstraherbarheten signifikant fra 0,2 M til 0,6 M. Dette tyder på at både magnesiums aggregerende effekt og sulfatets stabiliserende effekt har stor innvirkning på proteinløseligheten. Ut fra stagneringen i ekstraherbarhet med MgCl₂, ser det ut til at magnesiums aggregerende effekt er av betydning, men ettersom MgSO₄ viser en nedgang i ekstraherbarhet, er det tydelig at sulfatets stabiliserende effekt er av størst betydning. Dette samsvarer med Hamm (1972) som hevder at det er det anioniske bidraget som er mest avgjørende for løselighet (sitert etter Puolanne og Halonen, 2010). Ut fra resultatet ser det ut til at begge saltene til dels følger Hofmeisterserien.

Det ble oppnådd en maksimal ekstraherbarhet med MgCl₂ og MgSO₄ allerede ved 0,2 M. Dette viser at det ikke er hensiktsmessig å tilsette Mg-saltene i høyere konsentrasjoner enn 0,2 M. Resultatene fra fersk torskefilet (resultatdel 5.1) viste en økende ekstraherbarhet fra 0,2 M til 0,4 M, og en stagnering fra 0,4 M til 0,6 M med begge salt. Maksimal ekstraherbarhet for begge salt ble oppnådd ved 0,4 M. Resultatene kan tyde på at de ionespesifikke effektene på SLP fra fersk laksefilet dominerer ved lavere ionestyrker enn på SLP fra fersk torskefilet. Ifølge de målte verdiene for proteininnhold i torsk og laks fra NIFES (2013) var det forventet en nokså lik ekstraherbarhet av VLP og SLP fra fersk torskefilet og laksefilet. Resultatene fra disse forsøkene viste derimot at det ble ekstrahert både mer VLP og SLP fra fersk laksefilet. Varierende ekstraherbarhet, samt de ionespesifikke effektene varierende bidrag, kan tyde på at saltene har noe ulik effekt på proteinløselighet i ulike arter, samt at lakseproteiner er lettere å ekstrahere ut enn torskeproteiner.

Det ble kun ekstrahert en signifikant større mengde SLP med MgCl₂ og MgSO₄ enn med NaCl ved laveste konsentrasjon. Dette skyldes svært varierende ionestyrker. Ved høyere ionestyrker ga NaCl og henholdsvis MgCl₂ og MgSO₄ i de to forsøkene nokså like ekstraherbarheter. Dette er et resultat av dominans av de ionespesifikke effektene. Resultatene fra de to forsøkene viste at det generelt ble oppnådd en høyere ekstraherbarhet med MgSO₄ sammenliknet med MgCl₂. Denne trenden var spesielt fremtredende ved 0,2 M. Dette skyldes mest sannsynlig høyere ionestyrke, og delvis utfolding av SLP med MgSO₄ (Perisic et al., 2011). Resultatene kan altså indikere at MgSO₄ er en mer egnet ekstrakt enn MgCl₂, spesielt ved laveste konsentrasjon.



Figur 28: SLP fra fersk laksefilet ekstrahert med NaCl og MgCl₂ (gel til venstre), samt NaCl og MgSO₄ (gel til høyre), separert med SDS-PAGE. Brønnene er markert med bokstaver og tall. Bokstaven «S» representerer standarden (HMW), mens bokstaven «B» står for SLP. Bokstavene og oddetallene fra B1 til B11 representerer SLP ekstrahert med følgende salt og konsentrasjon; B1: 0,2 M NaCl, B3: 0,4 M NaCl, B5: 0,6 M NaCl, B7: 0,2 M MgCl₂/MgSO₄, B9: 0,4 M MgCl₂/MgSO₄ og B11: 0,6 M MgCl₂/MgSO₄.

Tabell 13: Gelelektroforese (SDS-PAGE) av proteinene ekstrahert med NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Forsøk 8 (NaCl og MgCl₂) er til venstre og forsøk 9 (NaCl og MgSO₄) er til høyre. Molekylvektene til proteinene er hentet fra Strasburg et al. (2008).

| Protein (kDa) | NaCl (M) | | | MgCl ₂ (M) | | | NaCl (M) | | | MgSO ₄ (M) | | |
|------------------------------------|----------|-----|-----|-----------------------|-----|-----|----------|-----|-----|-----------------------|-----|-----|
| | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,6 |
| Troponin-I (20)/LC1 (20,9) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Troponin-T (30) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cap-Z β (32) | - | X | X | - | - | - | X | X | X | X | X | X |
| Cap-Z α (36) | - | - | - | - | - | - | - | X | X | X | X | X |
| Tropomyosin α-enhet (37) | - | - | - | - | - | - | - | X | X | X | X | X |
| Tropomodulin (40) | - | X | X | X | X | - | - | - | - | - | - | - |
| G-aktin (42) | - | X | X | X | X | - | X | X | X | X | X | X |
| Desmin (55) | - | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| H-protein (58) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tropomyosin-kompleks (74) | - | X | X | - | - | - | - | X | X | X | X | X |
| α-aktinin (97) | - | X | X | - | - | - | - | X | X | X | X | - |
| C-protein (140) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| M-protein (165) | - | X | X | - | - | - | - | X | X | X | X | - |
| Myomesin (185) | - | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Myosinets tunge kjede (220) | - | X | X | X | X | - | X | X | X | X | X | X |

Figur 28 viser ingen eller svært få bånd for prøvene ekstrahert med 0,2 M NaCl på begge geler. Dette er i overensstemmelse med proteinekstraksjonen, som viste lav ekstraherbarhet med NaCl ved denne konsentrasjonen. For prøvene ekstrahert med 0,4 M og 0,6 M NaCl er det mange bånd tilstede på begge gelene. Dette samsvarer med høy ekstraherbarhet i de to forsøkene. Tabell 13 viser at det på gelene i forsøk 8 og 9 ble ekstrahert ut ni ulike typer proteiner med både 0,4 M og 0,6 M NaCl. De samme proteinene er stort sett ekstrahert ut i begge forsøk, med unntak av et par proteiner som varierer. Disse variasjonene kan skyldes usikkerhet i metoden, ettersom de proteinene det gjelder har nokså lik molekylvekt.

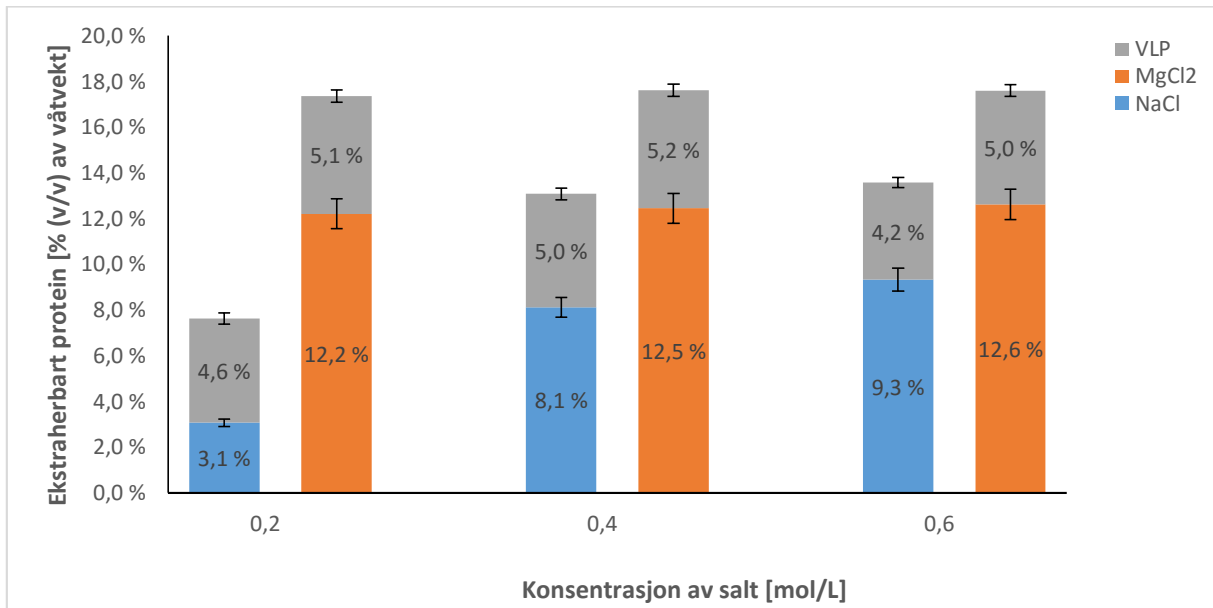
Figur 28 viser at det er færre bånd tilstede på gelen fra prøvene ekstrahert med MgCl₂ sammenliknet med prøvene ekstrahert med NaCl. For prøvene ekstrahert med MgCl₂ minker antall bånd med økende konsentrasjon. Den samme trenden ble også sett med fersk torskefilet

(resultatdel 5.1). For prøven ekstrahert med 0,2 M og 0,4 M MgCl_2 ble det ekstrahert ut fire typer proteiner. Det ble kun ekstrahert ut ett protein med 0,6 M MgCl_2 , og verken myosin- eller aktinbåndet var tilstede på gelen. Dette kan tyde på aggregatdannelse eller nedbrytning av proteinene. Som beskrevet under fersk torskefilet (resultatdel 5.1) kan proteinaggregering skyldes at magnesium bindes sterkere til polare grupper i proteinene, mens nedbrytning kan være et resultat av proteolyseaktivitet. Disse hendelsene kan være årsaken til at verken myosin- eller aktinbåndet er tilstede på gelen. Det har derimot ikke oppstått andre bånd på gelen som skulle tilsi dette, men det er tenkelig at nedbrytningsproduktene og aggregatene er henholdsvis for små eller for store til å bli detektert på gelen. De kan også overlapse med andre bånd på gelen. Selv om det ikke er flere og andre bånd på gelen påsatt prøvene ekstrahert med høyeste konsentrasjon av MgCl_2 , er det bånd på begge gelene fra alle prøvene som indikerer nedbrytningsprodukter eller aggregater.

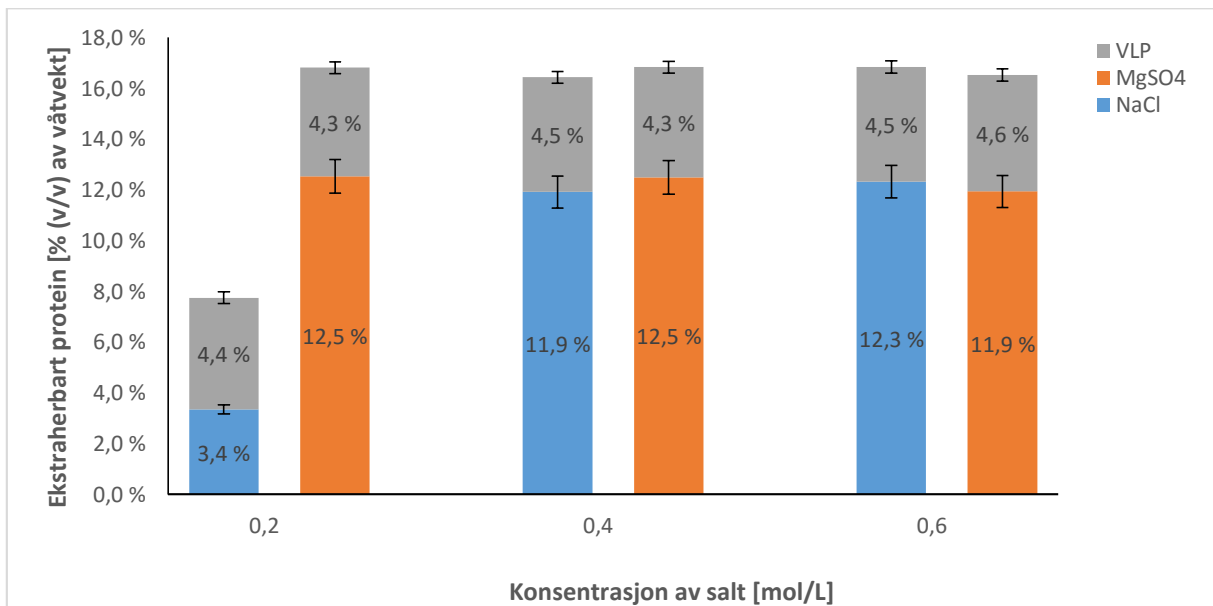
De samme ni proteinene som ble ekstrahert ut med NaCl er også ekstrahert ut med 0,2 M og 0,4 M MgSO_4 . Dette samsvarer med høy ekstraherbarhet for saltet i disse konsentrasjonene. For 0,6 M ble det ekstrahert ut syv ulike proteiner, noe som samsvarer med en lavere ekstraherbarhet ved denne konsentrasjonen. Årsaken til denne nedgangen i antall proteiner, kan være denaturering og aggregering av SLP som følge av for høy ionestyrke. Det er kjent at høye ionestyrker med stabiliserende salter kan forårsake aggregering (Damodaran, 2008). Det ble derimot ikke funnet andre bånd fra disse prøvene, men det er tenkelig at aggregatene som ble dannet er for store til å bli detektert på gelen. Det ble ekstrahert ut flere ulike typer proteiner med NaCl og MgSO_4 enn med MgCl_2 ved alle tre konsentrasjoner. I likhet med resultatene fra fersk torskefilet (resultatdel 5.1), tyder dette på at MgCl_2 er en mindre egnet ekstraktant enn MgSO_4 .

5.5 Fryst laksefilet

VLP og SLP ble ekstrahert fra laksefilet som hadde vært fryst og tint. Resultatene fra proteinekstraksjonen er vist i Figur 29 (forsøk 10 – NaCl og MgCl₂) og Figur 30 (forsøk 11 – NaCl og MgSO₄). Separasjon med SDS-PAGE av ekstrahert SLP fra fryst laksefilet er vist i Figur 31. De ulike ekstraherte proteinene er vist i Tabell 14, hvor disse er markert med «x».



Figur 29: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgCl₂ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. De grå søylene representerer ekstrahert mengde VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

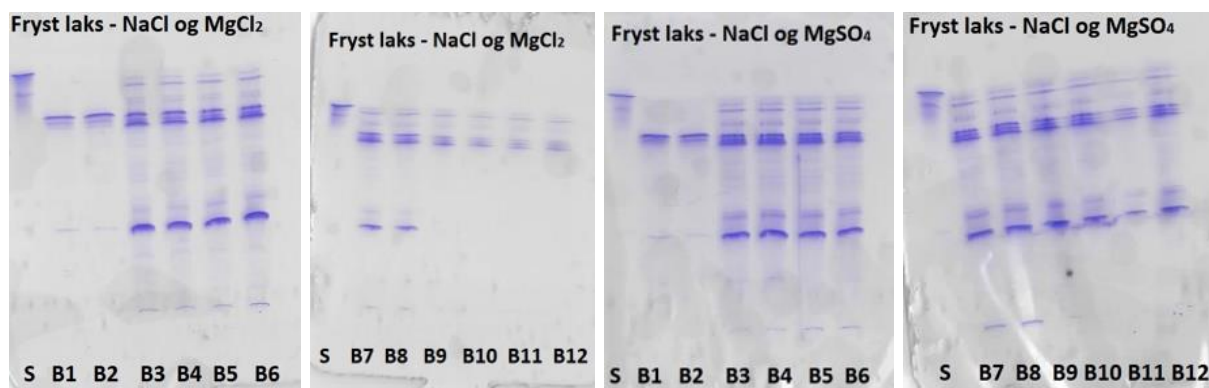


Figur 30: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

Mengde ekstrahert VLP hadde en gjennomsnittsverdi på henholdsvis 4,8% og 4,4%. Ekstraherbarheten lå litt mer enn ett prosentpoeng lavere enn i forsøket med fersk laksefilet (resultatdel 5.4). Denne nedgangen er signifikant, men ettersom det ble benyttet en annen laksefilet, var det forventet at ekstraherbarhetene ville variere noe. Denne nedgangen trenger derfor ikke nødvendigvis å indikere at VLP påvirkes nevneverdig av fryse- og tineprosessen. Mengde ekstrahert SLP varierte henholdsvis fra 3,1% til 12,6% og fra 3,4% til 12,5%. Dersom disse resultatene sammenliknes med resultatene fra fersk laksefilet, tyder dette på at SLP i laksefilet påvirkes lite av fryse- og tineprosessen. Dette er i kontrast til resultatene med fryst torskefilet, hvor ekstraherbarheten var kraftig redusert etter frysing og tining. Dette indikerer at SLP fra laks påvirkes mindre av fryse- og tineprosessen enn SLP fra torsk. Frysedaturering og aggregering er vist å være artsavhengig, hvor fisk tilhørende torskefamilien er vist å være spesielt sensitiv for teksturendringer (Ragnarsson og Regenstein, 1989). Resultater fra Duun og Rustad (2008) viste også at myofibrillproteiner fra torsk var mindre stabile enn myofibrillproteinene fra laks.

Det var en signifikant økning i mengde ekstrahert SLP fra 0,2 M til 0,4 M NaCl i begge forsøk. Det var en signifikant høyere ekstraherbarhet med 0,2 M MgSO₄ enn med 0,2 M NaCl. Dette var forventet, ettersom 0,2 M NaCl ikke gir en tilstrekkelig ionestyrke for løseliggjøring av SLP (Strasburg et al., 2008). Det var ingen signifikant endring i mengde ekstrahert SLP mellom 0,4 M og 0,6 M NaCl i de to forsøkene. Det var ekstrahert omtrent like mengder SLP ved alle konsentrasjoner av MgCl₂ og MgSO₄. I forsøket med fersk laksefilet var det en synkende ekstraherbarhet med økende konsentrasjon av MgSO₄, noe som var å forvente ettersom MgSO₄ har stabiliserende effekt ved høy ionestyrke (Damodaran, 2008). Det ble ekstrahert omtrent like mengder med 0,4 M NaCl og 0,4 M MgSO₄, samt med 0,6 M NaCl og 0,6 M MgSO₄. Tilnærmet lik ekstraherbarhet mellom konsentrasjonene av samme salt, samt tilnærmet lik ekstraherbarhet mellom NaCl og MgSO₄, tyder på at både ionestyrke og ionespesifikke effekter ikke er like fremtredende etter frysing og tining. Dette er i samsvar med studiet gjennomført av Andreetta-Gorelkina et al. (2015), som viste at konsentrasjon og type salt hadde mindre påvirkning på de fysiokjemiske egenskapene til det fryste produktet.

Ettersom det derimot var store variasjoner mellom NaCl og MgCl₂ ved de samme konsentrasjonene, kan det virke som ionestyrke og ionespesifikke effekter likevel er avgjørende. Ekstraksjon med NaCl ga imidlertid en lavere ekstraherbarhet med fryst laksefilet enn med fersk laksefilet (resultatdel 5.4). Det var derimot ingen nedgang i ekstraherbarhet mellom fersk og fryst laksefilet med NaCl i forsøket med MgSO₄. Dersom ekstraherbarheten med NaCl ikke hadde sunket i forsøket med MgCl₂, ville det ikke vært nevneverdige forskjeller mellom de to saltene. Årsaken til denne nedgangen i ekstraherbarhet er uvisst, ettersom dette ikke er tilfellet i forsøket med MgSO₄.



Figur 31: SLP fra fryst laksefilet ekstrahert med NaCl MgCl₂ og MgSO₄ separert med SDS-PAGE. Brønnene er markert med bokstaver og tall. Bokstaven «S» representerer standarden (HMW), mens bokstaven «B» står for SLP. Bokstavene og tallene fra B1 til B12 representerer SLP ekstrahert med følgende salt og konsentrasjon; B1-B2: 0,2 M NaCl, B3-B4: 0,4 M NaCl, B5-B6: 0,6 M NaCl, B7-B8: 0,2 M MgCl₂/MgSO₄, B9-B10: 0,4 M MgCl₂/MgSO₄ og B11-B12: 0,6 M MgCl₂/MgSO₄.

Figur 31 viser at det er like mange og sterke bånd på disse gelene, som på gelene fra fersk laksefilet (resultatdel 5.4). Tabell 14 viser at det ble ekstrahert ut like mange proteiner med 0,4 og 0,6 M NaCl i begge forsøk som det ble i forsøkene med fersk laksefilet. Resultatene fra SDS-PAGE indikerer, i likhet med proteinekstraksjonen, at fryseprosessen i liten grad har påvirket løseligheten til SLP fra laksefilet.

Tabell 14: Gelelektroforese (SDS-PAGE) av proteinene ekstrahert med NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Forsøk 10 (NaCl og MgCl₂) er til venstre og forsøk 11 (NaCl og MgSO₄) er til høyre. [«*»-tegnet indikerer usikkerhet i tentativt identifisert protein. Et bånd ble analysert til å ha en molekylvekt midt imellom de to markerte proteinene, og ettersom disse to proteinene har såpass lik molekylvekt, er det usikkert hvilket av de to proteinene det er.] Molekylvektene til proteinene er hentet fra Strasburg et al. (2008).

| Protein (kDa) | NaCl (M) | | | MgCl ₂ (M) | | | NaCl (M) | | | MgSO ₄ (M) | | |
|------------------------------------|----------|-----|-----|-----------------------|-----|-----|----------|-----|-----|-----------------------|-----|-----|
| | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,2 | 0,4 | 0,6 |
| Troponin-I (20)/LC1 (20,9) | - | X | X | - | - | - | - | X | X | X | X | X |
| Troponin-T (30) | | X | X | X | X | X | | - | - | - | - | - |
| Cap-Z β (32) | - | X | X | - | - | - | - | X | X | X* | X* | X* |
| Cap-Z α (36) | - | - | - | X | X | X | - | X | X | X* | X* | X* |
| Tropomyosin α-enhet (37) | - | - | - | X | X | X | - | - | - | - | - | - |
| Tropomodulin (40) | - | - | - | - | - | - | - | X | X | - | - | - |
| G-aktin (42) | X | X | X | X | X | X | - | X | X | X | X | X |
| Desmin (55) | - | - | - | X | X | X | - | - | - | - | - | - |
| H-protein (58) | X | X | X | - | - | - | X | X | X | - | - | - |
| Tropomyosin-kompleks (74) | - | X | X | X | - | - | - | - | - | X | X | X |
| α-aktinin (97) | - | X | X | X | - | - | - | X | X | X | X | X |
| C-protein (140) | - | X | X | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Myomesin (185) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Myosinets tunge kjede (220) | X | X | X | X | - | - | X | X | X | X | X | X |

Tabell 14 viser at det er ekstrahert ut få ulike typer proteiner med 0,2 M NaCl i begge forsøk, noe som stemmer godt overens med den lave ekstraherbarheten i de to forsøkene. Det ble ekstrahert ut omtrent like mange typer proteiner med 0,2 M MgCl₂ som med 0,4 M og 0,6 M NaCl. Både myosin- og aktinbåndene er tilstede på gelene, noe som tyder på at disse ikke har frysedenaturert. Antall proteiner synker imidlertid med økende konsentrasjon av MgCl₂.

Myosinbåndet er blant annet ikke tilstede på gelen med verken 0,4 M eller 0,6 M, noe som kan indikere aggregering eller nedbrytning av proteinet. Det er flere bånd fra disse prøvene som ikke er tilstede i prøvene ekstrahert med NaCl. Disse båndene har molekylvekter på 161 kDa, 118 kDa og 86 kDa. Thorarinsdottir et al. (2002) fant et bånd rundt 80 kDa med SDS-PAGE. Dette ble hevdet å være et nedbrytningsprodukt av myosin, mest sannsynlig LMM. Ut fra dette er det tenkelig at båndet på 86 kDa tilsvarer LMM, noe som indikerer nedbrytning av myosin.

Det ble ekstrahert ut omtrent like mange proteiner med alle konsentrasjoner av MgSO₄ som med 0,4 M og 0,6 M NaCl. Både myosin- og aktinbåndene er tilstede på gelene, noe som tyder på at disse ikke har frysedenaturert. Det er imidlertid flere bånd fra prøvene ekstrahert med NaCl i begge forsøk, samt MgSO₄, som også kan tyde på nedbrytning og aggregatdannelse. Dette ser imidlertid ikke ut til å ha vært like fremtredende i disse prøvene som for prøvene ekstrahert med MgCl₂, ettersom både myosin- og aktinbåndene er svært tydelige på gelene.

Hvilke proteiner som ble ekstrahert ut med NaCl og MgCl₂, samt NaCl og MgSO₄, var noe varierende, noe som kan tyde på noe ulik effekt med de ulike saltene. Ettersom det også er noen variasjoner mellom hvilke proteiner som ble ekstrahert ut med NaCl i de to forsøkene, er det tenkelig at variasjonene til dels skyldes usikkerhet i metoden. Ut fra antall bånd på gelene, fremstår MgCl₂ igjen som en mindre egnet ekstraktant enn NaCl og MgSO₄.

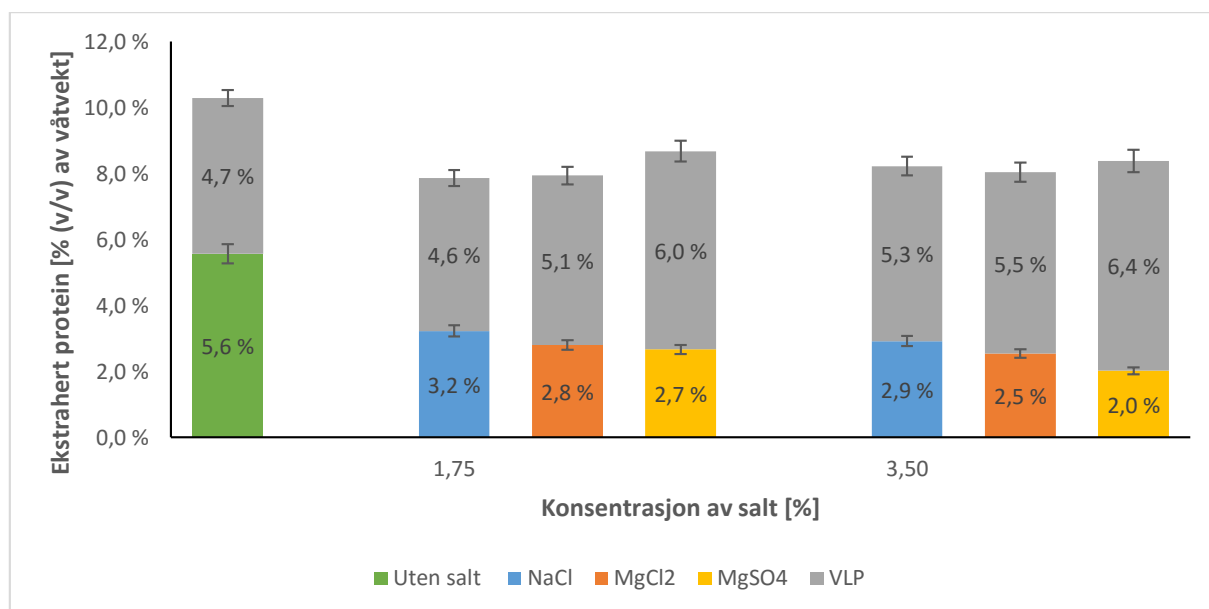
5.6 Varmerbehandlet laksefarse

Resultatene for mengde ekstrahert VLP og SLP etter varmebehandling ved 30°C, 40°C og 50°C er vist i henholdsvis Figur 32, Figur 33 og Figur 34. En sammenheng mellom temperatur og ekstraherbarhet er vist i Figur 35. Separasjonen med SDS-PAGE av ekstrahert VLP og SLP er vist i henholdsvis Figur 36 og Figur 37. De ulike ekstraherte saltløselige proteinene er vist i henholdsvis Tabell 19, Tabell 20 og Tabell 21, hvor disse er markert med «x». Tilsats av salt og beregninger av molare saltkonsentrasjoner ble gjort på samme måte som for varmebehandlet torskfarse (resultatdel 5.3). Utrekning av konsentrasjon og ionestyrke er vist i Vedlegg B, og en oversikt over saltenes konsentrasjon og ionestyrke er vist i Tabell 15.

Tabell 15: Oversikt over tilsats av ulike salt, med tilhørende molare konsentrasjoner og ionestyrker.

| Salt | Mengde (%) | Mengde (g) | Konsentrasjon (mol/L) | Ionestyrke |
|-------------------|------------|------------|-----------------------|------------|
| NaCl | | | 0,45 | 0,45 |
| MgCl ₂ | 1,75 | 0,35 | 0,13 | 0,39 |
| MgSO ₄ | | | 0,11 | 0,43 |
| NaCl | | | 0,91 | 0,91 |
| MgCl ₂ | 3,50 | 0,70 | 0,26 | 0,78 |
| MgSO ₄ | | | 0,22 | 0,86 |

Tabell 15 viser, i likhet med varmebehandling av torskfarse (resultatdel 5.3), at den molare konsentrasjonen av saltene varierte, mens de tilhørende ionestyrkene varierte mindre. De molare konsentrasjonene i disse forsøkene var noe høyere enn de molare konsentrasjonene i torskfarse, og skyldes at laks har et noe mindre vanninnhold enn torsk (NIFES, 2013).



Figur 32: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt) fra laksefarse varmebehandlet ved 30°C. Den grønne søylen representerer ekstrahert mengde SLP fra ikke-saltet farse, mens de blå, oransje og gule søylene representerer ekstrahert SLP fra farsene tilsatt henholdsvis NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike konsentrasjoner. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

Ikke-varmerbehandlet og ikke-saltet farse ble brukt som sammenlikningsgrunnlag for de varmebehandlede farsene. Mengde ekstrahert VLP og SLP fra denne farsen lå på henholdsvis

5,1% og 9,8% (disse verdiene er vist i Figur 49 – Vedlegg B). Det ble ekstrahert omtrent like mye VLP fra denne farsen som fra fersk laksefilet (resultatdel 5.4). Dette tyder på at VLP har blitt lite påvirket av farsetillagningen. Det ble imidlertid ekstrahert en del mindre SLP fra farsen sammenliknet med fersk laksefilet, noe som tyder på at farsetillagningen har hatt innvirkning på løseligheten. Andreetta-Gorelkina et al. (2015) fant at det ble ekstrahert mindre SLP med saltet hysefarse enn med saltet hysefilet. Som beskrevet av Ofstad et al. (1995), er fiskefarse et komplekst system fordi produktets egenskaper både avhenger av det opprinnelige muskelvevet og de nye strukturene som dannes i muskelvevet under prosessering. Det er tenkelig at disse endringene i muskelvevet har gitt et mer kompakt proteinnettverk, slik at interaksjonen med vann minker og løseligheten reduseres.

Det ble ikke ekstrahert en signifikant mindre mengde VLP fra de varmebehandlede farsene sammenliknet med den ikke-varmebehandlede farsen. Dette tyder på at varmebehandling ved 30°C ikke er tilstrekkelig for å denaturere de sarkoplasmatiske proteinene. Dette er i overensstemmelse med tidligere studier (Skipnes, 2011; Wu et al., 1985). Mengde ekstrahert SLP varierer både med type salt og konsentrasjon av salt. Dette kan tyde på at saltene tilsatt før varmebehandling har påvirket mengde ekstrahert VLP. Som beskrevet i resultatene for varmebehandling av torskefarse (resultatdel 5.3), kan det se ut til at noe SLP har blitt ekstrahert ut med VLP-fraksjonen. Totalt ekstrahert protein er vist i Tabell 16.

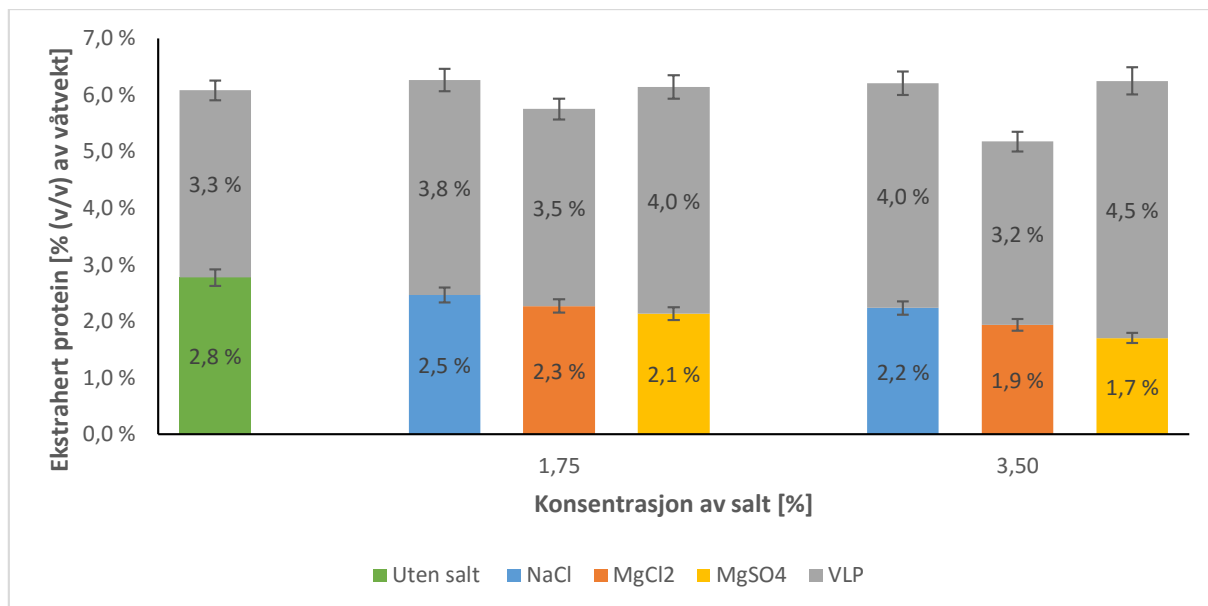
Tabell 16: Total mengde ekstrahert protein fra laksefarsene varmebehandlet ved 30°C, tilsatt de ulike saltene i to ulike konsentrasjoner. Standardavviket er regnet ut fra usikkerheten i metoden – 5,3%.

| Type salt | Totalt ekstrahert protein (%) | Totalt ekstrahert protein (%) |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | med 1,75% salt | med 3,50% salt |
| NaCl | 7,9 ± 0,4 | 8,2 ± 0,4 |
| MgCl ₂ | 7,9 ± 0,4 | 8,0 ± 0,4 |
| MgSO ₄ | 8,7 ± 0,5 | 8,4 ± 0,4 |

Det ble ekstrahert en signifikant større mengde SLP fra den ikke-varmebehandlede farsen sammenliknet med alle de varmebehandlede farsene. Dette samsvarer med resultatene fra varmebehandlet torskefarse (resultatdel 5.3), og tyder på at varmebehandling ved 30°C har hatt innvirkning på SLP. Det ble ekstrahert en signifikant større mengde SLP fra den ikke-saltede farsen sammenliknet med alle de saltede farsene. Dette samsvarer med resultatene fra varmebehandlet torskefarse, og viser at den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene senkes med tilsats av salt. Howell et al. (1991) viste at tilsats av salt allerede ved ionestyrke 0,05 resulterte i en nedgang i den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene i en rekke fiskearter, deriblant *Salmo gairdneri*.

Det var ingen signifikant endring i mengde ekstrahert SLP mellom de to saltkonsentrasjonene, med unntak av MgSO₄, hvor mengden SLP minket signifikant fra laveste til høyeste konsentrasjon. Her kan det påpekes at mengden VLP samtidig økte, noe som kan tyde på at det ble ekstrahert ut mer SLP i VLP-fraksjonen ved tilsats av 3,50% salt, enn ved tilsats av 1,75% salt. For saltene tilsatt i laveste konsentrasjon var det ingen signifikante forskjeller i mengde ekstrahert SLP mellom saltene. For saltene tilsatt i høyeste konsentrasjon ble det ekstrahert signifikant mer SLP med NaCl, sammenliknet med MgSO₄. Tabell 16 viser derimot at total mengde ekstrahert protein ikke varierer nevneverdig mellom farsene tilsatt de to saltene. Forskjellen mellom saltene trenger derfor ikke å indikere at NaCl er en bedre ekstraktant. De totale mengdene av ekstrahert protein er nokså like mellom alle tre salter i begge

konsentrasjoner. Det jevne totalutbyttet kan dermed tyde på at type salt har lite å si for løseligheten av SLP i dette tilfellet. Forskjellene i mengde ekstrahert SLP både mellom saltkonsentrasjon og mellom type salt, ser altså ut til å være forårsaket av at SLP ekstraheres ut med VLP-fraksjonen. Det ser altså ikke ut til at de ionespesifikke effektene har hatt nevneverdig innvirkning på løselighet ved denne temperaturen.



Figur 33: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt) fra laksefarse varmebehandlet ved 40°C. Den grønne søylen representerer ekstrahert mengde SLP fra ikke-saltet farse, mens de blå, oransje og gule søylene representerer ekstrahert SLP fra farsene tilsatt henholdsvis NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike konsentrasjoner. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som \pm standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

Figur 33 viser at mengde ekstrahert SLP var lavere ved 40°C enn ved 30°C. Dette tyder på at denne økningen i temperatur har hatt betydning for proteinløseligheten, noe som indikerer videre denaturering av proteinene. Skipnes (2011) fant maksimumstemperaturer for denaturering av myosin i torsk på 38,4°C og 44,1°C uten tilsatt av salt. Ut fra de lave ekstraherbarhetene i dette forsøket, er det trolig at mesteparten av myosinet, samt andre varmelabile proteiner, som blant annet α -aktinin (Skipnes, 2011), har denaturert. Det var også en nedgang i mengde ekstrahert VLP. Som beskrevet i varmebehandlingen for torskefarse (resultatdel 5.3), skyldes dette trolig denaturering av SLP, som ved 30°C ble ekstrahert ut sammen med VLP-fraksjonen. Total mengde ekstrahert protein er gitt av Tabell 17.

Tabell 17: Total mengde ekstrahert protein fra laksefarsene varmebehandlet ved 40°C, tilsatt de ulike saltene i to ulike konsentrasjoner. Standardavviket er regnet ut fra usikkerheten i metoden – 5,3%.

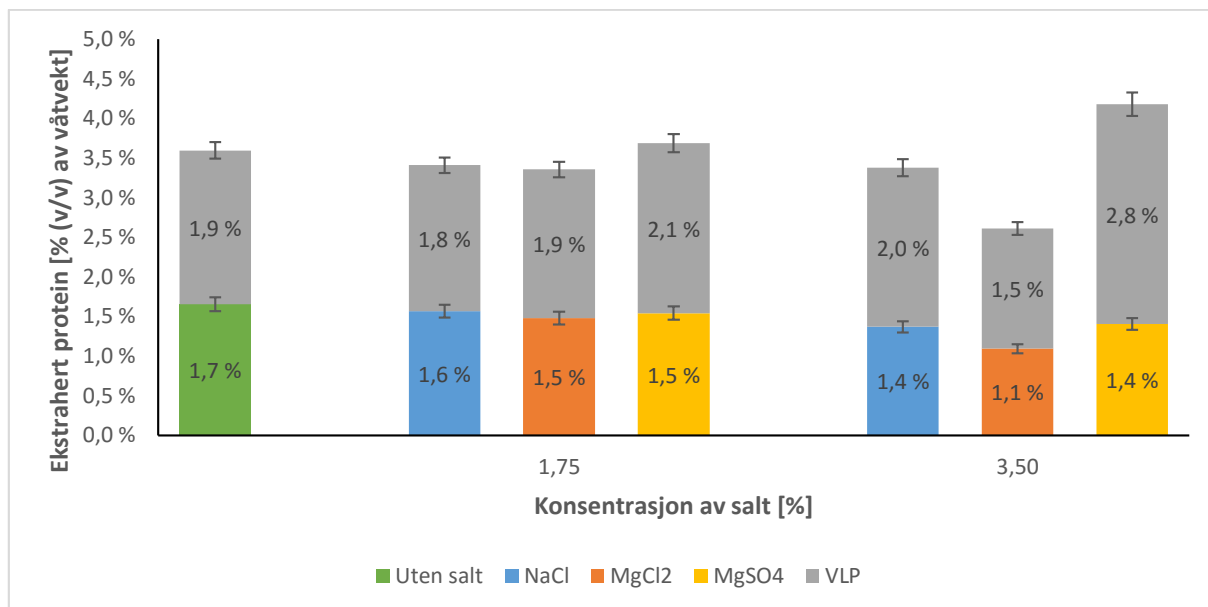
| Type salt | Totalt ekstrahert protein (%) med 1,75% salt | Totalt ekstrahert protein (%) med 3,50% salt |
|-------------------|---|---|
| NaCl | 6,3 \pm 0,3 | 6,2 \pm 0,3 |
| MgCl ₂ | 5,8 \pm 0,3 | 5,2 \pm 0,3 |
| MgSO ₄ | 6,1 \pm 0,3 | 6,3 \pm 0,3 |

Det ble ekstrahert en signifikant større mengde SLP fra den ikke-saltede farsen sammenliknet med de saltede farsene, med unntak av farsen tilsatt 1,75% NaCl. Dersom total mengde

ekstrahert protein sammenliknes, ble det derimot ikke ekstrahert en signifikant større mengde fra den ikke-saltede farsen. Forskjellen mellom den ikke-saltede farsen og de saltede farsene kan skyldes at noe SLP har gått over i VLP-fraksjonen. Det var en mye kraftigere nedgang i mengde ekstrahert SLP fra den ikke-saltede farsen mellom 30°C og 40°C, enn det var for de saltede farsene. Dette samsvarer med resultatene fra torskefarse ved samme temperatur (resultatdel 5.3). Slik som beskrevet for varmebehandlet torskefarse ved 40°C, kan dette tyde på at de proteinene som allerede var denaturert ved 30°C som følge av tilsats av salt, nå har denaturert i den ikke-saltede farsen.

Det var en signifikant nedgang i mengde ekstrahert SLP fra laveste til høyeste konsentrasjon av MgCl₂ og MgSO₄. Ekstraherbarheten av VLP økte derimot signifikant med økende konsentrasjon av MgSO₄, slik at total mengde ekstrahert protein ble tilnærmet uendret. Nedgangen i SLP kan altså skyldes at mer SLP har blitt ekstrahert ut sammen med VLP ved høyeste konsentrasjon, enn ved laveste konsentrasjon. Dette kan tyde på at økningen i ionestyrke likevel ikke har resultert i redusert løselighet med økende konsentrasjon av MgSO₄. For MgCl₂ sank også ekstrahert mengde VLP med økt tilsats av salt, noe som tyder på at økningen i ionestyrke har hatt en negativ innvirkning på løseligheten av SLP. Dette stemmer med resultatene til Howell et al. (1991), som viste en redusert termisk stabilitet av myofibrillproteinene med økende ionestyrke (0,05 – 1) for en rekke fiskearter, deriblant *Salmo gairdneri*. Det at redusert termisk stabilitet kun var tilfellet med MgCl₂ i dette forsøket, kan tyde på at virkningen av økt saltkonsentrasjon varierer med type salt.

Det var ingen signifikante forskjeller i mengde ekstrahert SLP mellom type salt tilsatt i laveste konsentrasjon. Med den høyeste saltkonsentrasjonen ble det derimot ekstrahert en signifikant større mengde SLP for farsen tilsatt NaCl, sammenliknet med farsen tilsatt MgSO₄. Tabell 17 viser derimot ikke nevneverdige forskjeller i total mengde ekstrahert protein mellom farsene tilsatt de to saltene. Det ble imidlertid ekstrahert en signifikant mindre mengde totalt protein med MgCl₂, sammenliknet med NaCl og MgSO₄. Det ser altså ut til at 3,50% salt er tilstrekkelig for at de ionespesifikke effektene påvirker løseligheten til SLP.



Figur 34: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt) fra laksefarse varmebehandlet ved 50°C. Den grønne søylen representerer ekstrahert mengde SLP fra ikke-saltet farse, mens de blå, oransje og gule søylene representerer ekstrahert SLP fra farsene tilsatt henholdsvis NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike konsentrasjoner. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

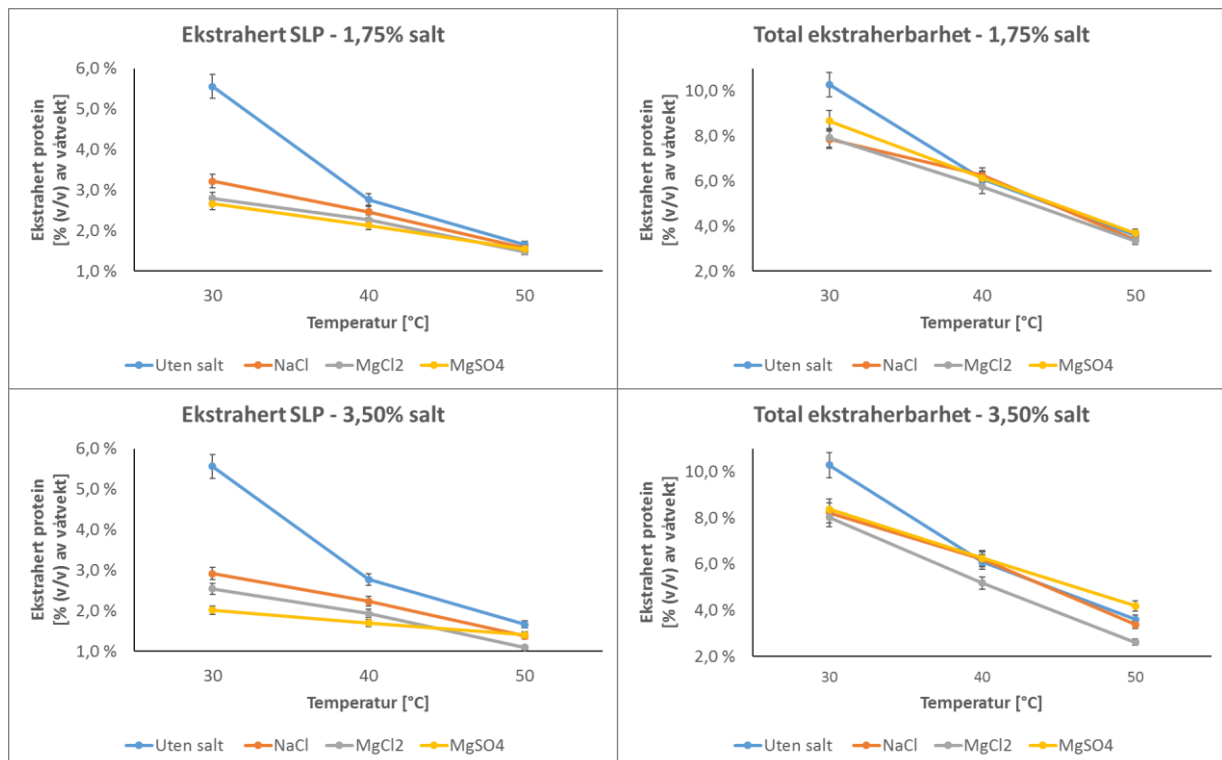
Figur 34 viser at mengde ekstrahert VLP og SLP er lavere ved 50°C enn ved 40°C. Nedgangen i ekstraherbarhet mellom 40°C og 50°C er mindre enn nedgangen mellom 30°C og 40°C. Dette skyldes nok at mesteparten av proteinene allerede var denaturert ved 40°C. Svært lav ekstraherbarhet av SLP ved 50°C tyder på omfattende denaturering av samtlige proteiner. Ofstad et al. (1993) undersøkte strukturelle endringer i laksemuskel under varmebehandling, hvor det ble registrert et økende vanntap med økende temperatur, og et maksimalt vanntap ved 50°C. Dette var forårsaket av at muskelcellene krympet som et resultat av denaturering av myosin. Det er altså trolig at så å si alt myosin har denaturert ved denne temperaturen. Skipnes (2011) viste at aktin fra torsk startet å denaturere ved 58°C uten tilsats av salt. Etersom tilsats av salt er kjent for å senke den termiske stabiliteten til SLP (Howell et al., 1991; Wu et al., 1985), er det tenkelig at aktin fra de saltede farsene også har startet å denaturere ved denne temperaturen.

Det var ingen signifikante forskjeller i mengde ekstrahert SLP mellom den ikke-saltede farsen og farsene tilsatt 1,75% salt. Det var derimot ekstrahert en signifikant større mengde fra den ikke-saltede farsen sammenliknet med farsene tilsatt 3,50% salt. Dersom total mengde ekstrahert protein sammenliknes, ble det imidlertid kun ekstrahert en signifikant mindre mengde med 3,50% MgCl₂. Slik som beskrevet i varmebehandling av torskefarse (resultatdel 5.3), er det varierende påstander i litteraturen med tanke på hvilke saltkonsentrasjoner som kreves for å senke termisk stabilitet. Termisk stabilitet ser kun ut til å synke med tilsats av 3,50% MgCl₂ når farsene varmebehandles ved 50°C. Totalt ekstrahert protein er vist i Tabell 18.

Tabell 18: Total mengde ekstrahert protein fra laksefarsene varmebehandlet ved 50°C, tilsatt de ulike saltene i to ulike konsentrasjoner. Standardavviket er regnet ut fra usikkerheten i metoden – 5,3%.

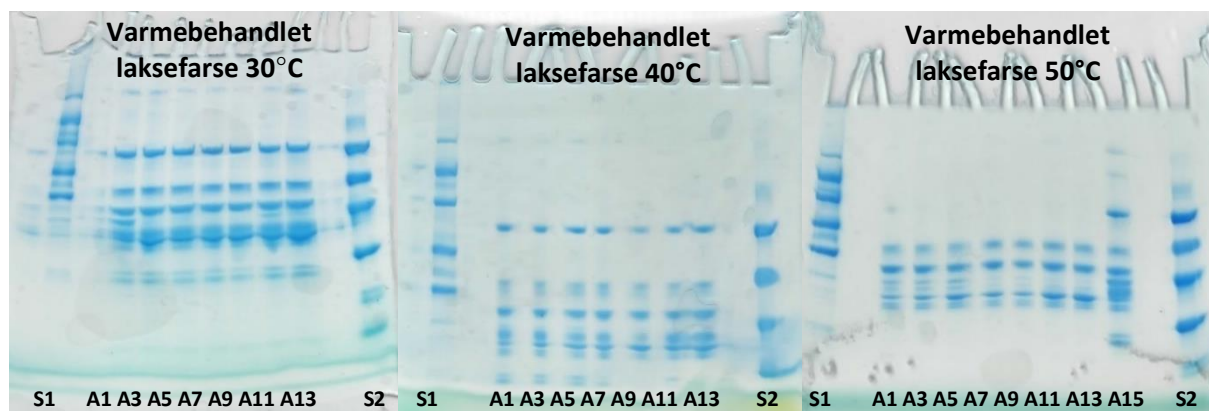
| Type salt | Totalt ekstrahert protein (%) med 1,75% salt | Totalt ekstrahert protein (%) med 3,50% salt |
|-------------------|---|---|
| NaCl | 3,4 ± 0,2 | 3,4 ± 0,2 |
| MgCl ₂ | 3,4 ± 0,2 | 2,6 ± 0,1 |
| MgSO ₄ | 3,7 ± 0,2 | 4,2 ± 0,2 |

Det ble kun ekstrahert en signifikant mindre mengde SLP med økende konsentrasjon av MgCl₂. Tabell 18 viser at total mengde ekstrahert protein også ble redusert med økende konsentrasjon av MgCl₂. Selv om det ikke er signifikante endringer i mengde ekstrahert SLP med økende konsentrasjon av MgSO₄, økte imidlertid total mengde ekstrahert protein med økende saltkonsentrasjon. Det var ingen signifikante forskjeller i mengde ekstrahert SLP mellom farsene tilsatt 1,75% salt. For farsene tilsatt 3,50% salt, ble det ekstrahert en signifikant mindre mengde SLP med MgCl₂, sammenliknet med NaCl og MgSO₄. Det er ekstrahert en signifikant større mengde totalt protein med MgSO₄ sammenliknet med NaCl og MgCl₂. Dette tyder altså på at de ionespesifikke effektene kun kommer til uttrykk ved 3,50% salt, slik som varmebehandlingen ved 40°C også viste. Dersom økningen i total mengde ekstrahert protein med økende konsentrasjon av MgSO₄ skyldes løst SLP i VLP-fraksjonen, fremstår MgSO₄ som en bedre ekstraktant enn NaCl og MgCl₂ ved 50°C. I likhet med varmebehandlingen ved 40°C, fremstår MgCl₂ som den minst egnede ekstraktanten. Dette viste også resultatene fra varmebehandlingen ved 40°C.



Figur 35: Sammenheng mellom ekstraksjon og temperatur. De to øverste diagrammene viser mengde ekstrahert SLP og totalt protein fra farsene tilsatt 1,75% salt, samt fra farsen uten salt. De to nederste diagrammene viser mengde ekstrahert SLP og totalt protein fra farsene tilsatt 3,50% salt, samt fra farsen uten salt.

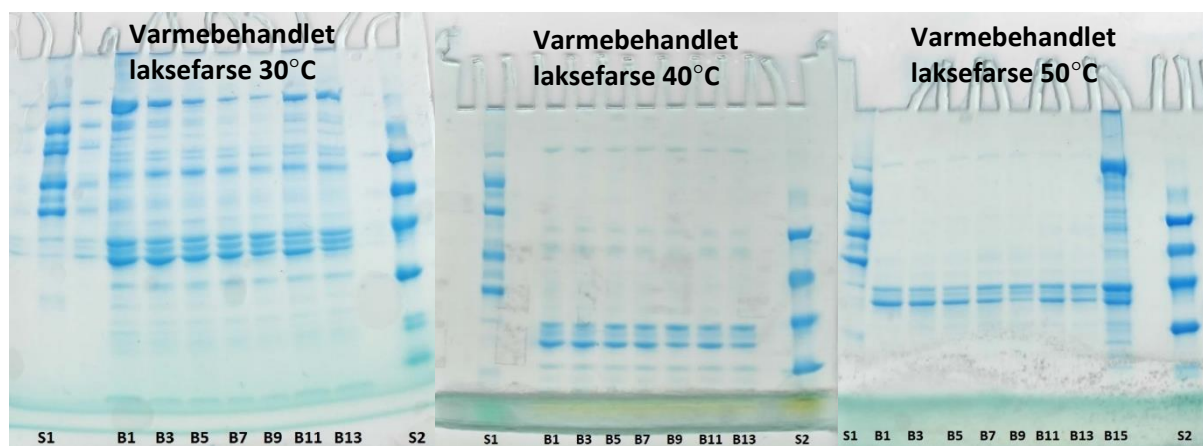
Figur 35 viser at mengde ekstrahert SLP ved 30°C generelt lå lavere for farsene tilsatt salt sammenliknet med farsen uten salt. Dette tyder på at tilsatt av salt i begge konsentrasjoner har senket starttemperaturen for termisk denaturering av myofibrillproteinene. Mengde ekstrahert SLP synker mest mellom 30°C og 40°C for farsen som ikke er tilsatt salt, og er ved denne temperaturen på nivå med de saltede farsene. Denatureringen som allerede hadde oppstått i de saltede farsene, ser nå ut til å ha oppstått i farsen uten salt. Videre synker ekstraherbarheten mellom 40°C og 50°C for både farsen uten salt og med salt. Dette tyder på ytterligere denaturering av proteinene. Det er små variasjoner mellom saltene tilsatt i lavest konsentrasjon, mens det derimot er større variasjoner mellom saltene tilsatt i størst konsentrasjon. Dette kan indikere at 3,50% salt er tilstrekkelig for at saltenes ionespesifikke effekter til en viss grad kommer til uttrykk. Det kan også se ut til at betydningen av de ionespesifikke effektene til en viss grad øker med økende temperatur. Slik som beskrevet under varmebehandlet torskefarse (resultatdel 5.3) er det imidlertid vanskelig å avgjøre hvor utslagsgivende type salt egentlig har vært, ettersom noe SLP ser ut til å ekstraheres ut med VLP-fraksjonen, hvor denne mengden ser ut til å variere med type salt og konsentrasjon av salt. Forskjellen mellom den ikke-saltede farsen og de saltede farsene ved 30°C er mindre fremtredende for totalt ekstrahert protein, noe som kan indikere at tilsatt av salt har vært noe mindre avgjørende for termisk stabilitet enn det går frem av ekstrahert SLP.



Figur 36: VLP fra laksefarse varmebehandlet ved 30, 40 og 50°C separert med SDS-PAGE. Brønnene er markert med bokstaver og tall. «S1» og «S2» representerer henholdsvis HMW- og LWM-standarden. Bokstaven «A» står for VLP. Bokstavene og oddetallene fra A1 til A15 representerer VLP fra laksefarsene tilsatt følgende salt og konsentrasjon; A1: ikke-saltet, A3: 1,75% NaCl, A5: 3,50% NaCl, A7: 1,75% MgCl₂, A9: 3,50% MgCl₂, A11: 1,75% MgSO₄, A13: 3,50% MgSO₄ og A15: ikke-saltet og ikke-varmebehandlet.

Figur 36 viser svært mange bånd ved 30°C, noe som er i overensstemmelse med proteinekstraksjonen, som viste en høy ekstraherbarhet av VLP. Flere av båndene ser ut til å samsvare med molekylvektene til de saltløselige proteinene, som blant annet myosinets tunge kjede og G-aktin, noe som bekrefter den tidligere antagelsen. Dette er trolig noe av årsaken til den høye ekstraherbarheten ved denne temperaturen. Antall bånd reduseres fra 30°C til 40°C, og antall bånd reduseres også ytterligere ved 50°C. Disse resultatene er i overensstemmelse med resultatene fra proteinekstraksjonen, hvor det ble vist at mengde ekstrahert VLP ble redusert fra 30°C til 40°C, og fra 40°C til 50°C. Nedgangen i antall bånd er hovedsakelig en nedgang i SLP-bånd. Nedgangen i antall bånd, og derfor også nedgangen i ekstraherbarhet, ser altså ut til å til dels skyldes denaturering av SLP. Tidligere studier har som nevnt vist høyere denatureringstemperaturer for sarkoplasmatiske proteiner (Skipnes, 2011; Wu et al., 1985) enn

det som er benyttet i dette forsøket. Ettersom noen av båndene som forsvinner ikke ser ut til å være saltløselige proteiner, er det tenkelig at noe VLP likevel har denaturert mellom 30°C og 50°C.



Figur 37: SLP fra laksefarse varmebehandlet ved 30°C, 40°C og 50°C, separert med SDS PAGE. Brønnene er markert med bokstaver og tall. «S1» og «S2» representerer henholdsvis HMW- og LWM-standarden. Bokstaven «B» står for SLP. Bokstavene og oddetallene fra B1 til B13 representerer SLP fra laksefarsene tilsatt følgende salt og konsentrasjon; B1: ikke-saltet, B3: 1,75% NaCl, B5: 3,50% NaCl, B7: 1,75% MgCl₂, B9: 3,50% MgCl₂, B11: 1,75% MgSO₄, B13: 3,50% MgSO₄ og B15: ikke-varmebehandlet og ikke-saltet.

Tabell 19: Gelelektroforese (SDS-PAGE) av de saltløselige proteinene ekstrahert fra laksefarse tilsatt NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike konsentrasjoner, varmebehandlet ved 30°C. Molekylvektene til proteinene er hentet fra Strasburg et al. (2008).

| Proteiner (kDa) | Uten salt | 1,75% | | | 3,50% | | |
|-----------------------------|-----------|-------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|-------------------|
| | | NaCl | MgCl ₂ | MgSO ₄ | NaCl | MgCl ₂ | MgSO ₄ |
| LC3 (16,6) | X | X | X | X | X | X | X |
| LC2/Troponin-C (18) | X | X | X | X | X | X | X |
| Troponin-I (20) | X | X | X | X | X | X | X |
| LC1 (20,9) | X | X | X | X | X | X | X |
| Troponin-T (30) | X | X | X | X | X | X | X |
| Cap Z β (32) | - | - | - | - | - | - | - |
| Cap-Z α (36)/ | - | - | - | - | - | - | - |
| Tropomyosin α-enhet (37) | X | X | X | X | X | X | X |
| Tropomodulin (40) | X | X | X | X | X | X | X |
| G-aktin (42) | X | X | X | X | X | X | X |
| Tropomyosin-kompleks (74) | X | X | X | X | X | X | X |
| α-aktinin (97) | X | X | X | X | X | X | X |
| C-protein (140) | X | X | X | X | X | X | X |
| Myosinets tunge kjede (220) | X | X | X | X | X | X | X |

Figur 37 viser svært mange bånd ved denne temperaturen, noe som ikke er helt i samsvar med proteinekstraksjonen, som viste lav ekstraherbarhet allerede ved denne temperaturen. Tabell 19 viser at det ble ekstrahert ut 12 ulike typer proteiner for alle prøvene. Det ble ekstrahert ut flere typer proteiner i dette forsøket enn i forsøket med fersk laksefilet (resultatdel 5.4). Det er tenkelig at noe av årsaken til dette skyldes type instrument. For både fersk og fryst laksefilet ble det benyttet PhastSystem™ med PhastGel Gradient 4-15%, mens det for varmebehandlet laks ble benyttet Dual Cool Electrophoresis System med ClearPAGE SDS Gel 4-20%. Ved

bruk av 4-15%-gelen ble ikke proteinene med lavest molekylvekt detektert, mens det med 4-20%- gelen derimot ble detektert proteiner helt ned til 16 kDa. Videre bør det også nevnes at det tilsettes et betraktelig større prøvevolum med dette instrumentet sammenliknet med PhastSystem™. Det er tenkelig at både porestørrelse på gelene og prøvevolum har bidratt til en bedre separasjon i dette tilfellet. Tabell 19 viser at de samme proteinene ble ekstrahert ut for alle kombinasjoner av salt og konsentrasjon av salt. Dette resultatet tyder på at type salt er lite avgjørende for hvilke proteiner som ekstraheres ut. Slik som nevnt tidligere er SLP fra alle farsere ekstrahert med 0,6 M NaCl, og det er tenkelig at dette har bidratt til å «viske ut» forskjellene mellom saltene.

Tabell 20: Gelelektroforese (SDS-PAGE) av de saltløselige proteinene ekstrahert fra laksefarse tilsatt NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike konsentrasjoner, varmebehandlet ved 40°C. Molekylvektene til proteinene er hentet fra Strasburg et al. (2008).

| Proteiner (kDa) | Uten salt | 1,75% | | | 3,50% | | |
|------------------------------------|-----------|-------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|-------------------|
| | | NaCl | MgCl ₂ | MgSO ₄ | NaCl | MgCl ₂ | MgSO ₄ |
| LC3 (16,6) | - | - | - | - | - | - | - |
| LC2/Troponin-C (18) | - | - | - | - | - | - | - |
| Troponin-I (20)/LC1 (20,9) | - | - | - | - | - | - | - |
| Troponin-T (30) | X | X | X | X | X | X | X |
| Cap Z β (32) | X | X | X | X | X | X | X |
| Cap-Z α (36) | - | - | - | - | - | - | - |
| Tropomyosin α-enhet (37) | X | X | X | X | X | X | X |
| Tropomodulin (40) | - | - | - | - | - | - | - |
| G-aktin (42) | X | X | X | X | X | X | X |
| Tropomyosin-kompleks (74) | - | - | - | - | - | - | - |
| α-aktinin (97) | - | - | - | - | - | - | - |
| C-protein (140) | - | - | - | - | - | - | - |
| Myosinets tunge kjede (220) | X | X | X | X | X | X | X |

Figur 37 viser en kraftig nedgang i antall bånd, samt redusert intensitet på båndene, fra 30°C til 40°C. Tabell 20 viser at det ble ekstrahert ut fem ulike typer proteiner for alle prøvene. Det er altså ekstrahert ut færre proteiner ved 40°C enn ved 30°C, noe som er i overensstemmelse med proteinekstraksjonen, som viste redusert ekstraherbarhet ved 40°C. Dette resultatet indikerer ytterligere denaturering av proteinene som følge av temperaturøkningen. Myosinbåndet er eksempelvis kraftig redusert ved denne temperaturen. Dette tyder på at mesteparten av myosinet har denaturert ved 40°C, noe som samsvarer med tidligere studier (Skipnes, 2011; Howell et al., 1991; Wu et al., 1985). De samme proteinene ble ekstrahert ut for alle kombinasjoner av salt, noe som tyder på at type salt har liten betydning for hvilke proteiner som ekstraheres også i dette forsøket.

Tabell 21: Gelelektroforese (SDS-PAGE) av de saltløselige proteinene ekstrahert fra laksefarse tilsatt NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike konsentrasjoner, varmebehandlet ved 50°C. [«*»-tegnet indikerer usikkerhet i tentativt identifisert protein. Et bånd ble analysert til å ha en molekylvekt midt imellom de to markerte proteinene, og ettersom disse to proteinene har såpass lik molekylvekt, er det usikkert hvilket av de to proteinene det er.] Molekylvektene til proteinene er hentet fra Strasburg et al. (2008).

| Proteiner (kDa) | Uten salt | 1,75% | | | 3,50% | | |
|------------------------------------|-----------|-------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|-------------------|
| | | NaCl | MgCl ₂ | MgSO ₄ | NaCl | MgCl ₂ | MgSO ₄ |
| LC3 (16,6) | - | - | - | - | - | - | - |
| LC2/Troponin-C (18) | - | - | - | - | - | - | - |
| Troponin-I (20)/LC1 (20,9) | X | X | X | X | X | X | X |
| Troponin-T (30) | X* | X* | X* | X* | X* | X* | X* |
| Cap Z β (32) | X* | X* | X* | X* | X* | X* | X* |
| Cap-Z α (36) | - | - | - | - | - | - | - |
| Tropomyosin α-enhet (37) | - | - | - | - | - | - | - |
| Tropomodulin (40) | X | X | X | X | X | X | X |
| G-aktin (42) | X | X | X | X | X | X | X |
| Tropomyosin-kompleks (74) | - | - | - | - | - | - | - |
| α-aktinin (97) | - | - | - | - | - | - | - |
| C-protein (140) | - | - | - | - | - | - | - |
| Myosinets tunge kjede (220) | X | X | X | X | X | X | X |

Tabell 21 viser at det ble ekstrahert ut like mange typer proteiner ved 50°C som ved 40°C. Figur 37 viser også at det ikke er store endringer i antall bånd på denne gelen, sammenliknet med gelen for 40°C. Imidlertid har noen av de veldig svake båndene ved 40°C blitt enda svakere her, og noen av dem har også har forsvunnet. Dette tyder på at denne økningen i temperatur likevel har påvirket løseligheten av SLP, noe som også er i overensstemmelse med proteinekstraksjonen, hvor resultatene viser en nedgang i ekstraherbarhet fra 40°C til 50°C. Myosinbåndet er ytterligere redusert, og knapt synlig på gelen ved denne temperaturen. Dette samsvarer med Hultin (1996), som hevder fullstendig uløselighet av myosin ved 55°C (siteret etter Skipnes, 2011).

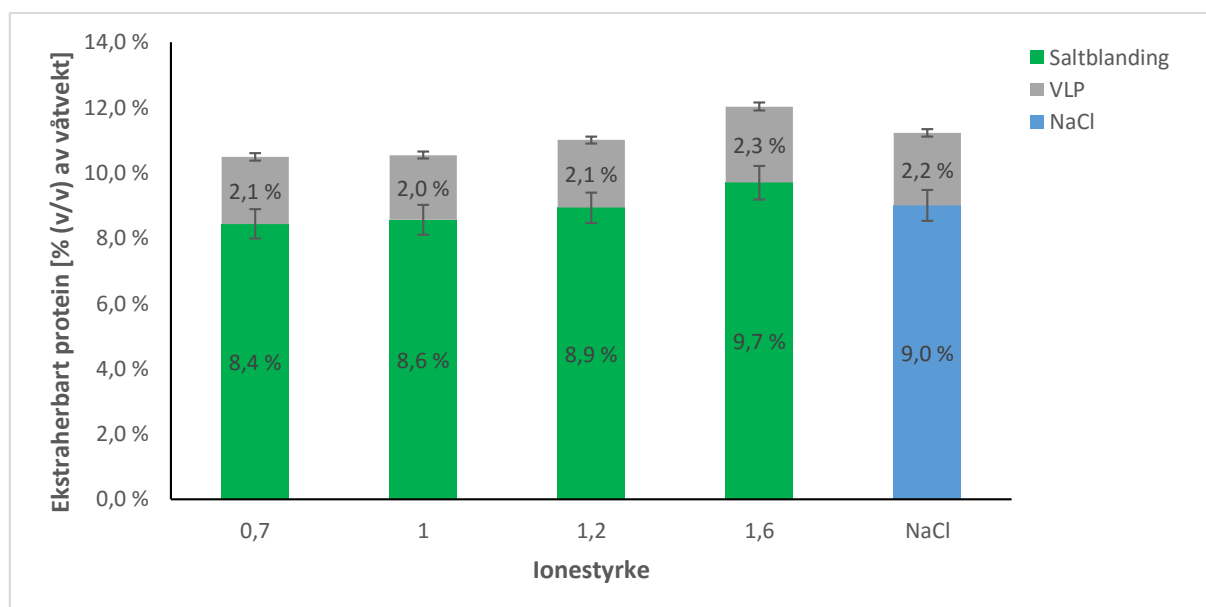
5.7 Sammenlikning av varmebehandlet torske- og laksefarse

Nedgang i mengde ekstrahert SLP var mest markant mellom ikke-varmebehandlet farse og farse varmebehandlet ved 30°C for begge råstoff. Forskjellen mellom ikke-varmebehandlet torskefarse og varmebehandlet torskefarse var imidlertid større enn tilsvarende forskjell mellom laksefarsene. Ekstraherbarheten synker fra 30°C til 40°C i begge råstoff. Ekstraherbarheten er derimot omtrent uendret fra 40°C til 50°C for torskefarsene, mens ekstraherbarheten synker noe fra 40°C til 50°C for laksefarsene. Disse resultatene kan tyde på endringene i proteinløselighet skjer ved noe høyere temperatur i laks enn i torsk. Generelt ligger ekstraherbarhetene lavere i torsk enn i laks, og resultatene fra SDS-PAGE viste at det generelt ble ekstrahert ut flere ulike typer proteiner med laksefarse, hvor denne forskjellen var mest fremtredende ved 30°C. For torskefarse var myosinbåndet forsvunnet ved 40°C, mens for laksefarse var myosinbåndet fortsatt (så vidt) synlig ved 50°C. Disse resultatene indikerer at SLP fra laks er mer varmestabile enn SLP fra torsk.

I begge råstoff ser det ut til at tilsats av salt i begge konsentrasjoner senket den termiske stabiliteten til SLP, hvor dette fenomenet var mest fremtredende ved 30°C. Det ser ut til at tilsats av salt har hatt noe større betydning for den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene fra lakse- enn torskefarse. I begge råstoff kan resultatene indikere at type salt tilsatt i høyst konsentrasjon har hatt innvirkning på mengde ekstrahert protein. Disse effektene ser imidlertid ut til å variere mellom råstoff, og også mellom de ulike temperaturene for samme råstoff. For begge råstoff viste resultatene fra SDS-PAGE at de samme proteinene ble ekstrahert ut i alle farsene. Ettersom det er vist forskjeller i ekstraherbarhet, trenger ikke dette nødvendigvis å indikere at type salt er ubetydelig. Hvor avgjørende type salt imidlertid har vært, har vært vanskelig å avgjøre ettersom ekstraksjonsbufferen, som var lik for alle farsene, mest sannsynlig har vært vel så avgjørende. Videre har også varierende ekstraherbarheter av VLP, hovedsakelig forårsaket av SLP i VLP-fraksjonen, bidratt til å komplisere tolkningen av saltenes innvirkning. Resultatene fra både proteinekstraksjon og SDS-PAGE ser likevel ut til å indikere mindre effekt av type salt i varmebehandlet råstoff, sammenliknet med ferskt råstoff.

5.8 Blandingsforsøk

Det var flere årsaker til at MgSO_4 ble benyttet i saltblandinger sammen med NaCl , fremfor MgCl_2 . For det første er dette et resultat av generelt høyere ekstraherbarhet med MgSO_4 sammenliknet med MgCl_2 ved de samme konsentrasjonene. Dette skyldes hovedsakelig høyere ionestyrke med MgSO_4 , og mest sannsynlig delvis utfolding av proteinene. Selv om MgSO_4 er et stabiliserende salt, som dermed er forventet å kunne gi aggregatdannelse av proteinene ved for høye ionestyrker, ser det ikke ut til at dette har gitt store konsekvenser for løseligheten innenfor ionestyrkeområdet benyttet i disse forsøkene. Det var derimot en stagnering i ekstraherbarheten fra 0,4 M til 0,6 M. Ettersom det altså ikke virket hensiktsmessig å øke konsentrasjonen over 0,4 M, ble det ikke benyttet høyere ionestyrker enn 1,6 i dette forsøket. SDS-PAGE-resultatene viser at MgSO_4 ekstraherer flere typer proteiner enn MgCl_2 , spesielt ved de høyeste ionestyrkene. Dette tatt i betraktning, fremstår MgSO_4 generelt som en bedre ekstraktant enn MgCl_2 . Resultatene for mengde ekstrahert VLP og SLP blandingsforsøket er vist i Figur 38. Separasjon med SDS-PAGE av ekstrahert SLP er vist i Tabell 22.

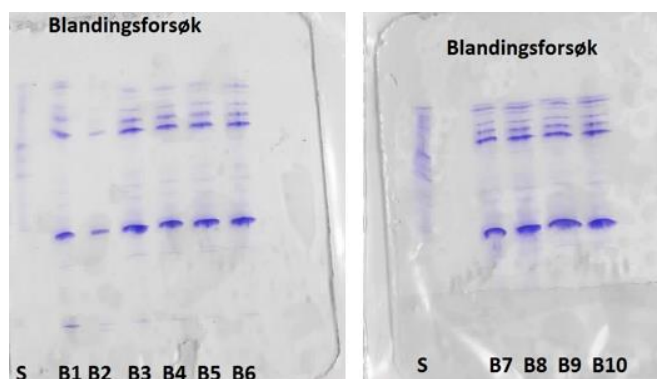


Figur 38: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt). De grønne søylene representerer SLP ekstrahert med ulike saltblandinger bestående av NaCl og MgSO_4 arrangert etter stigende ionestyrke - 0,7: 0,3 M NaCl og 0,1 M MgSO_4 , 1: 0,2 M NaCl og 0,2 M MgSO_4 , 1,2: 0,4 M NaCl og 0,2 M MgSO_4 og 1,6: 0,4 M NaCl og 0,3 M MgSO_4 . Den blå søylene representerer SLP ekstrahert med 0,6 M NaCl . Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene av SLP. Feilfeltene er oppgitt som \pm standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

Gjennomsnittlig ekstrahert mengde VLP ligger på 2,1%. Det var forventet en ekstraherbarhet rundt 6% for VLP (NIFES, 2013; Strasburg et al., 2008). Mengde ekstrahert VLP er derfor en del lavere enn forventet. En generelt lavere ekstraherbarhet kan blant annet skyldes råstoffet. Ekstrahert mengde SLP varierer fra 8,4% til 9,7%. Det var forventet en ekstraherbarhet rundt 10-12% for SLP (NIFES, 2013; Strasburg et al., 2008) med optimale ekstraksjonsforhold.

Det var ingen signifikante forskjeller mellom mengde ekstrahert SLP, selv om ionestyrkene varierte vesentlig. Det var altså ekstrahert omtrent samme mengde SLP fra prøvene ekstrahert med saltblandingen med ionestyrke 0,7 som for prøvene ekstrahert med ionestyrke 1,6. Dette

tyder på at økende ionestyrke har lite å si for ekstraherbarheten i dette tilfellet. Det er ingen tegn på denaturering eller aggregering, selv med de høyeste ionestyrkene. Dette var heller ikke å forvente, ettersom det ikke ble tilsatt mer enn 0,3 M MgSO₄. Det er også lite tenkelig at NaCl kunne forårsaket denaturering og aggregering ved disse konsentrasjonene. Det var ekstrahert omtrent samme mengde med saltblandingene som med 0,6 M NaCl. Med tanke på mengde ekstrahert SLP, ser disse saltblandingene ut til å være vel så gode ekstraktanter som 0,6 M NaCl.



Figur 39: SLP fra fersk torskefilet ekstrahert med en blanding av NaCl og MgSO₄, samt 0,6 M NaCl, separert med SDS-PAGE. Brønnene er markert med bokstaver og tall. Bokstaven «S» representerer standarden (HMW), mens bokstaven «B» står for SLP. Bokstavene og tallene fra B1 til B10 representerer SLP ekstrahert med følgende salt og konsentrasjon, samt ionestyrke (I); B1-B2: 0,3 M NaCl og 0,1 M MgSO₄ (I = 0,7), B3-B4: 0,2 M NaCl og 0,2 M MgSO₄ (I = 1,0), B5-B6: 0,4 M NaCl og 0,2 M MgSO₄ (I = 1,2), B7-B8: 0,6 M NaCl og B9-B10: 0,4 M NaCl og 0,3 M MgSO₄ (I = 1,6).

Tabell 22: Gelelektroforese (SDS-PAGE) av proteinene ekstrahert med en blanding av NaCl og MgSO₄, samt 0,6 M NaCl. Blandingene er oppgitt med ionestyrke. [«*»-tegnet indikerer usikkerhet i tentativt identifisert protein. Et bånd ble analysert til å ha en molekylvekt midt imellom de to markerte proteinene, og ettersom disse to proteinene har såpass lik molekylvekt, er det usikkert hvilket av de to proteinene det er.] Molekylvektene til proteinene er hentet fra Strasburg et al. (2008).

| Protein (kDa) | I 0,7 | I 1,0 | I 1,2 | I 1,5 | 0,6 M NaCl |
|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|---------------|
| Troponin-I (20)/LC1 (20,9) | x | x | x | - | - |
| Troponin-T (30) | - | - | - | x | x |
| Cap Z β (32) | x* | x* | x* | - | - |
| Cap Z α (36) | x* | x* | x* | - | - |
| Tropomyosin α-enhet | - | - | - | - | - |
| Tropomodulin (40) | x | x | x | x | x |
| G-aktin (42) | x | x | x | x | x |
| Myomesin (185) | - | - | - | - | - |
| Myosinets tunge kjede (220) | x | x | x | x | x |

Figur 39 viser omtrent like mange bånd for alle de påsatte prøvene, noe som stemmer godt overens med de jevne ekstraherbarhetene. Tabell 22 viser at det ble ekstrahert ut fem ulike proteiner for prøvene ekstrahert med de tre laveste ionestyrkene. For prøvene ekstrahert med den høyeste ionestyrken, samt 0,6 M NaCl, ble det ekstrahert ut fire ulike proteiner. Dette viser at det ble ekstrahert ut flere ulike typer proteiner med saltblandingene sammenliknet med 0,6 M NaCl, samt saltblandingen med høyest ionestyrke. Dette kan tyde på at det ikke er hensiktsmessig å øke ionestyrken fra 1,2 til 1,6. Mengde ekstrahert SLP og antall typer ekstraherte protein tatt i betraktning, indikerer at ekstraksjon med disse saltblandingene er vel så egnet som kun NaCl.

6 Konklusjon

Denne avhandlingen viste at det generelt ble ekstrahert ut en større mengde protein, og flere ulike typer SLP, fra fersk laks sammenliknet med fersk torsk. Ekstraksjonsresultatene viste at de sarkoplasmatiske proteinene fra både torsk og laks ble lite påvirket av frysingen. Ekstraksjons- og SDS-PAGE-resultatene viste at myofibrillproteinene fra torsk i stor grad ble påvirket av frysingen, mens myofibrillproteinene fra laks ble lite påvirket. Dette indikerer at myofibrillproteinene fra laks er mer kuldestabile enn myofibrillproteinene fra torsk. Ekstraksjonsresultatene viste svært lav ekstraherbarhet av SLP fra varmebehandlet torske- og laksefarse ved 30°C, og tyder på omfattende denaturering av myofibrillproteiner allerede ved denne temperaturen. Ekstraksjons- og SDS-PAGE-resultatene viste at ekstraherbarheten og antall bånd sank noe med økende temperatur. Resultatene fra SDS-PAGE viser at myofibrillproteinene fra laks er mindre varmemestabile enn myofibrillproteinene fra torsk.

Med ferskt råstoff viste resultatene fra proteinekstraksjonene at både type salt og konsentrasjon av salt var avgjørende for ekstraherbarheten av SLP. For fersk torsk ble det generelt ekstrahert mer SLP med Mg-saltene enn med NaCl. Denne trenden var derimot ikke like fremtredende med laks, hvor dette kun var tilfellet ved laveste konsentrasjon. Det ble generelt ekstrahert mer SLP med MgSO₄ enn med MgCl₂ ved de samme konsentrasjonene. Resultatene fra SDS-PAGE viste at NaCl og MgSO₄ ekstraherte ut flere typer SLP enn MgCl₂, spesielt ved de to høyeste konsentrasjonene. Ut fra både mengde ekstrahert SLP og antall ulike SLP ekstrahert, fremstår MgSO₄ som den beste salterstatteren, spesielt ved de laveste konsentrasjonene.

Både resultatene fra ekstraksjon og SDS-PAGE viste at type salt var av mindre betydning i råstoffet som hadde vært fryst og varmebehandlet, og tydet på at tilstanden til råstoffet var mest avgjørende. Ekstraksjonsresultatene viste større forskjeller mellom saltene i fryst torsk sammenliknet med fryst laks. For laks viste resultatene fra SDS-PAGE imidlertid større variasjon i ulike ekstraherte proteiner mellom saltene, enn resultatene fra torsk viste. I varmebehandlingsforsøkene er det tenkelig at type salt tilsatt før varmebehandling er noe mer avgjørende enn det som fremgår av resultatene, ettersom ekstraksjon med samme buffer for alle farsene kan ha bidratt til å viske ut forskjellene. Små forskjeller mellom type salt kan derfor også indikere at type salt i ekstraksjonsbufferen var vel så avgjørende for løseligheten. Resultatene fra proteinekstraksjonen viste imidlertid at tilsats av både 1,75% og 3,50% salt var tilstrekkelig for å senke den termiske stabiliteten til myofibrillproteinene. Resultatene viste at tilsats av salt ved 30°C hadde størst konsekvens for termisk stabilitet.

I denne oppgaven ble det kun gjennomført et saltblandingsforsøk med NaCl og MgSO₄ med relativt høye ionestyrker, og det hadde derfor vært interessant å gjennomføre forsøk med et bredere ionestyrkespekter. Med tanke på videre arbeid burde det altså utføres flere saltblandingsforsøk med varierte ionestyrker og salter.

Referanser

- Albarracín, W., Sánchez, I. C., Grau, R., og Barat, J. M. (2011). Salt in food processing; usage and reduction: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(7), 1329-1336.
- Anderson, M. L., og Ravesi, E. M. (1968). Relation between protein extractability and free fatty acid production in cod muscle aged in ice. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 25(10), 2059-2069.
- Andreetta-Gorelkina, I. V., Greiff, K., Rustad, T., og Aursand, I. G. (2015). Reduction of salt in haddock mince: Effect of different salts on the solubility of proteins. *Journal of Aquatic Food Product Technology*(just-accepted).
- Arakawa, T., og Timasheff, S. N. (1984). Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry*, 23(25), 5912-5923.
- Barat, J. M., Pérez-Esteve, E., Aristoy, M. C., og Toldrá, F. (2013). Partial replacement of sodium in meat and fish products by using magnesium salts. A review. *An International Journal on Plant-Soil Relationships*, 368(1), 179-188.
- Benjakul, S., og Bauer, F. (2000). Physicochemical and enzymatic changes of cod muscle proteins subjected to different freeze-thaw cycles. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(8), 1143-1150.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.
- C.B.S. Scientific. (2015). Dual Cool Electrophoresis System - Mini-Vertical Slab Gel /Blotting System DCX-700. Hentet fra <http://www.cbsscientific.com/pdf/DCX-700IMNF.pdf>
- Damodaran, S. (2008). Amino Acids, Peptides, and Proteins. Fra S. Damodaran, K. L. Parkin, og O. R. Fennema (Red.), *Fennema's Food Chemistry* (4 ed., s. 217-330). USA: CRC Press. Merk: Denne kilden er et oversiktskapittel som refererer til en rekke andre verker. Disse er imidlertid ikke henviset til i denne oppgaven.
- Desmond, E. (2006). Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat science*, 74(1), 188-196.
- Doyle, M. E., og Glass, K. A. (2010). Sodium reduction and its effect on food safety, food quality, and human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 44-56.
- Duun, A. S., og Rustad, T. (2007). Quality changes during superchilled storage of cod (*Gadus morhua*) fillets. *Food chemistry*, 105(3), 1067-1075.
- Duun, A. S., og Rustad, T. (2008). Quality of superchilled vacuum packed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets stored at -1.4 and -3.6 C. *Food chemistry*, 106(1), 122-131.

- FAO. (2001). The Composition of Fish. Hentet fra <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x5916e01.htm#The>
- FAO. (2016a). Species fact sheet - Gadus morhua. Hentet fra <http://www.fao.org/fishery/species/2218/en>
- FAO. (2016b). Species fact sheet - Salmo salar. Hentet fra http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Salmo_salar/en
- GE Healthcare. (2006). Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis. Hentet fra http://www.blossombio.com/pdf/products/UG_17_0446_01.pdf
- Greiff, K., Staurem, C. J., Nordvi, B., og Rustad, T. (2015). Novel utilization of milk-based ingredients in salt reduced fish pudding. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 92-99.
- Helsedirektoratet. (2015, 12.11.2015). Næringsstoffanbefalinger – energi, karbohydrater, fett, protein, vitaminer, mineraler. Hentet fra <https://helsedirektoratet.no/folkehelse/kosthold-og-enering/neringsstoffanbefalinger-energi-karbohydrater-fett-protein-vitaminer-mineraler>
- Howell, B., Matthews, A., og Donnelly, A. (1991). Thermal stability of fish myofibrils: a differential scanning calorimetric study. *International Journal of Food Science & Technology*, 26(3), 283-295.
- Huff-Lonergan, E., og Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat science*, 71(1), 194-204.
- Hultmann, L., og Rustad, T. (2002). Textural changes during iced storage of salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 11(3-4), 105-123.
- Hultmann, L., Rørå, A. M. B., Steinsland, I., Skåra, T., og Rustad, T. (2004). Proteolytic activity and properties of proteins in smoked salmon (*Salmo salar*)—effects of smoking temperature. *Food chemistry*, 85(3), 377-387.
- Huss, H. H. (1988). *Fresh fish - Quality and quality changes: a training manual prepared for the FAO/DANIDA Training Programme on Fish Technology and Quality Control* (Vol. 29): Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Huss, H. H. (1995). *Quality and quality changes in fresh fish*: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Johnston, W. (1994). *Freezing and refrigerated storage in fisheries*: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Kinsella, J. (1982). Relationships between structure and functional properties of food proteins. *Food proteins*, 51-103.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
- Lawal, O. S. (2006). Kosmotropes and chaotropes as they affect functionality of a protein isolate. *Food chemistry*, 95(1), 101-107.
- Licciardello, J., Ravesi, E., Lundstrom, R., Wilhelm, K., Correia, F., og Allsup, M. (1982). Time-temperature tolerance and physical-chemical quality tests for frozen red hake. *Journal of Food Quality*, 5(3), 215-234.
- Martínez-Alvarez, O., Borderías, A. J., og Gómez-Guillén, M. (2005). Sodium replacement in the cod (*Gadus morhua*) muscle salting process. *Food chemistry*, 93(1), 125-133.
- NIFES. (2006, 07 05 2013). Sjømatdata - laks. Hentet fra http://www2.nifes.no/index.php?page_id=168
- NIFES. (2013, 07.05.2013). Sjømatdata - torskefilet (2005) og laksefilet (2006) fra oppdrett Hentet fra http://www2.nifes.no/index.php?page_id=168
- Ofstad, R., Kidman, S., Myklebust, R., Hermansson, A.-M., Wilding, P., Lampila, L., . . . Gill, T. (1993). Liquid holding capacity and structural changes during heating of fish muscle: cod (*Gadus morhua* L.) and salmon (*Salmo salar*). *Food structure*, 12(2), 163-174.
- Ofstad, R., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R. L., og Hermansson, A.-M. (1995). Liquid-holding capacity and structural changes in comminuted salmon (*Salmo salar*) muscle as influenced by pH, salt and temperature. *LWT-Food Science and Technology*, 28(3), 329-339.
- Pelegrine, D., og Gasparetto, C. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT-Food Science and Technology*, 38(1), 77-80.
- Perisic, N. (2012). *Vibrational spectroscopy analysis of interactions between proteins, salts, and water*. (PhD), Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- Perisic, N., Afseth, N. K., Ofstad, R., og Kohler, A. (2011). Monitoring protein structural changes and hydration in bovine meat tissue due to salt substitutes by Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(18), 10052-10061.
- Pharmacia LKB Biotechnology. (1990). PhastSystem™ Separation Technique File No. 130 - Native and SDS-PAGE of high molecular weight proteins using PhastGel Gradient 4-15. Uppsala, Sverige: Pharmacia LKB Biotechnology.
- Pharmacia LKB Biotechnology. (n.d.). PhastSystem™ Development Technique File No. 200 - Fast coomassie staining. Uppsala, Sverige.
- Puolanne, E., og Halonen, M. (2010). Theoretical aspects of water-holding in meat. *Meat science*, 86(1), 151-165.

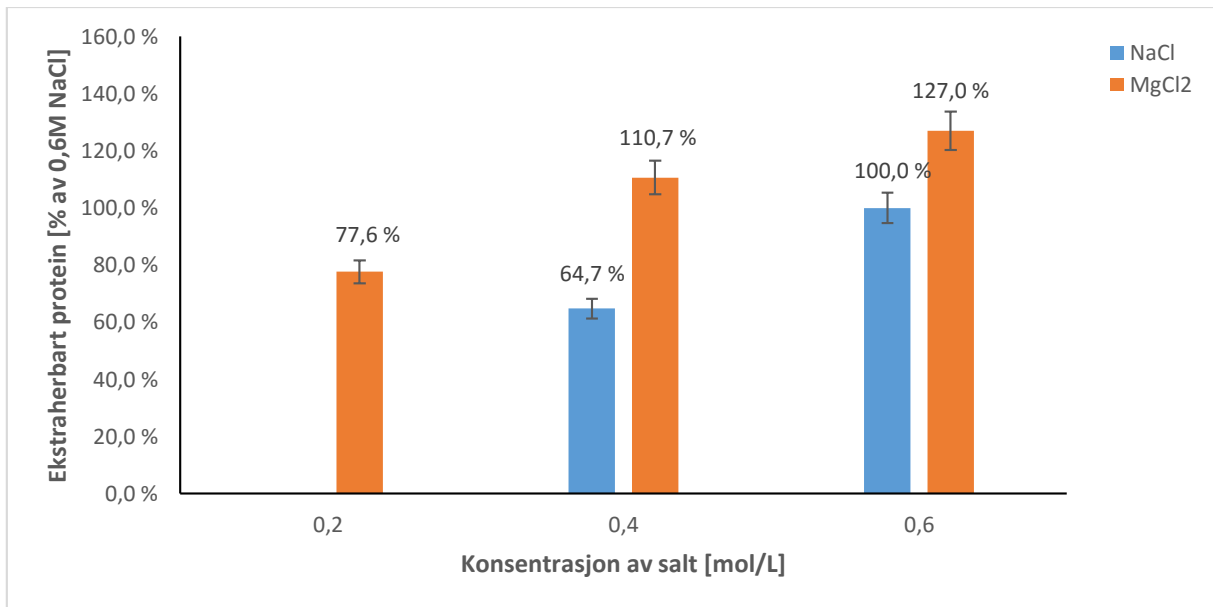
- Ragnarsson, K., og Regenstien, J. M. (1989). Changes in Electrophoretic Patterns of Gadoid and Non-gadoid Fish Muscle during Frozen Storage. *Journal of food science*, 54(4), 819-823.
- Rodger, G. W., og Wilding, P. (1990). Muscle Proteins. Fra P. Harris (Ed.), *Food Gels* (s. 361-400). London and New York: Elsevier Applied Science
- Rustad, T. (1998). *Muscle Tissue of Meat and Fish*. NTNU - Institutt for Bioteknologi. Its learning - TBT4125 Næringsmiddelkjemi.
- Ruusunen, M., og Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat science*, 70(3), 531-541.
- Ruusunen, M., Vainionpää, J., Lyly, M., Lähteenmäki, L., Niemistö, M., Ahvenainen, R., og Puolanne, E. (2005). Reducing the sodium content in meat products: the effect of the formulation in low-sodium ground meat patties. *Meat science*, 69(1), 53-60.
- Scopes, R. K. (2013). *Protein purification: principles and practice*: Springer Science & Business Media.
- Shenouda, S. Y. (1980). Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. *Advances in food research*, 26(275), 275-311.
- Shier, D. N., Butler, J. L., og Lewis, R. (2008). *Hole's Essentials of Human Anatomy and Physiology* (10 ed.): McGraw-Hill Education.
- Sikorski, Z., Sun Pan, B., og Shahidi, F. (1994). *Seafood proteins*. New York and London: Chapman & Hall.
- Skaara, T., og Regenstien, J. (1990). The structure and properties of myofibrillar proteins in beef, poultry, and fish. *Journal of Muscle Foods*, 1(4), 269-291.
- Skipnes, D. (2011). *Optimisation of thermal processing of fresh farmed cod*. (PhD), Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- Store medisinske leksikon. (2015, 11.02.2016). Musklene. *Store norske leksikon*. Hentet fra <https://sml.snl.no/musklene>
- Store norske leksikon. (2009, 14.02.2009). Laks. Hentet fra <https://www.snl.no/laks>
- Strasburg, G., Xion, Y. L., og Chiang, W. (2008). Physiology and Chemistry of Edible Muscle Tissues. Fra S. Damodaran, K. L. Parkin, og O. R. Fennema (Red.), *Fennema's Food Chemistry* (4 ed., s. 923-974). USA: CRC Press. Merk: Denne kilden er et oversiktskapittel som refererer til en rekke andre verker. Disse er imidlertid ikke henvist til i denne oppgaven.

- Thorarinsdottir, K. A., Arason, S., Geirsdottir, M., Bogason, S. G., og Kristbergsson, K. (2002). Changes in myofibrillar proteins during processing of salted cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry. *Food chemistry*, 77(3), 377-385.
- Weinberg, Z., Regenstein, J. M., og Lilljord, P. J. (1984). Research note the effects of salts on thermal transition curves of cod muscle. *Journal of food Biochemistry*, 8(4), 335-339.
- Wu, M., Akahane, T., Lanier, T., og Hamann, O. (1985). Thermal transitions of actomyosin and surimi prepared from Atlantic croaker as studied by differential scanning calorimetry. *Journal of food science*, 50(1), 10-13.
- Zayas, J. F. (1997). Water holding capacity of proteins *Functionality of proteins in food* (s. 76-133): Springer

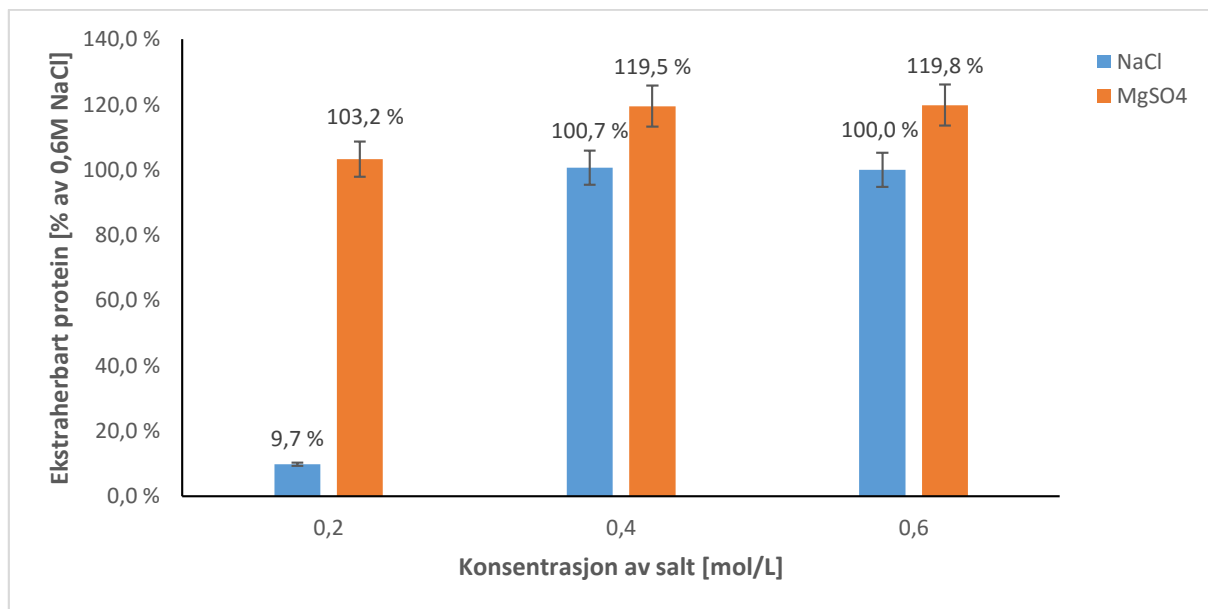
Vedlegg A: Proteinekstraksjon

Figur 40, Figur 41, Figur 42, Figur 43, Figur 44, Figur 45, Figur 46 og Figur 47 viser til ekstraksjonsforsøkene utført med fersk og fryst torske- og laksefilet ekstrahert med saltene NaCl, MgCl₂/MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Mengde ekstrahert SLP med MgCl₂ og MgSO₄ er satt i sammenheng med mengde ekstrahert SLP med 0,6 M NaCl. Mengde ekstrahert SLP med 0,6 M NaCl er i dette tilfellet satt til 100%, og de andre ekstraherbarhetene er regnet ut i forhold til dette. Dette vil gi ekstraherbarheter både over og under 100%, avhengig av om det er ekstrahert mer eller mindre SLP med MgCl₂ og MgSO₄, enn det er gjort med 0,6 M NaCl.

Proteinekstraksjon - fersk torskefilet

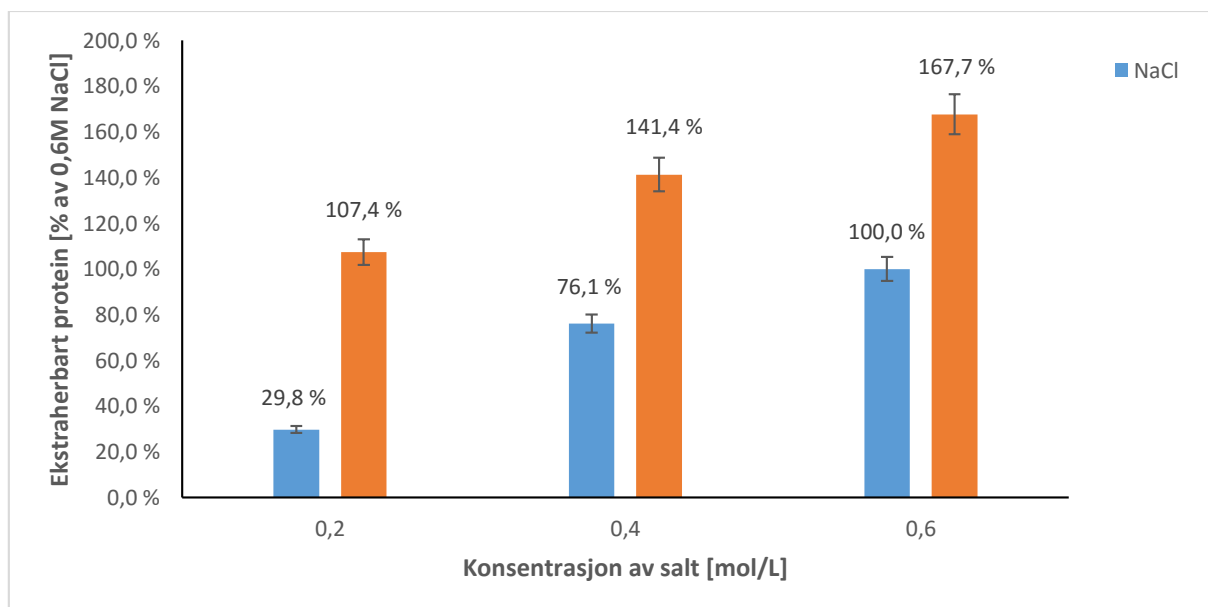


Figur 40: Ekstrahert mengde SLP (i % av våtvekt) i forhold til standard (0,6 M NaCl satt til 100%). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgCl₂ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

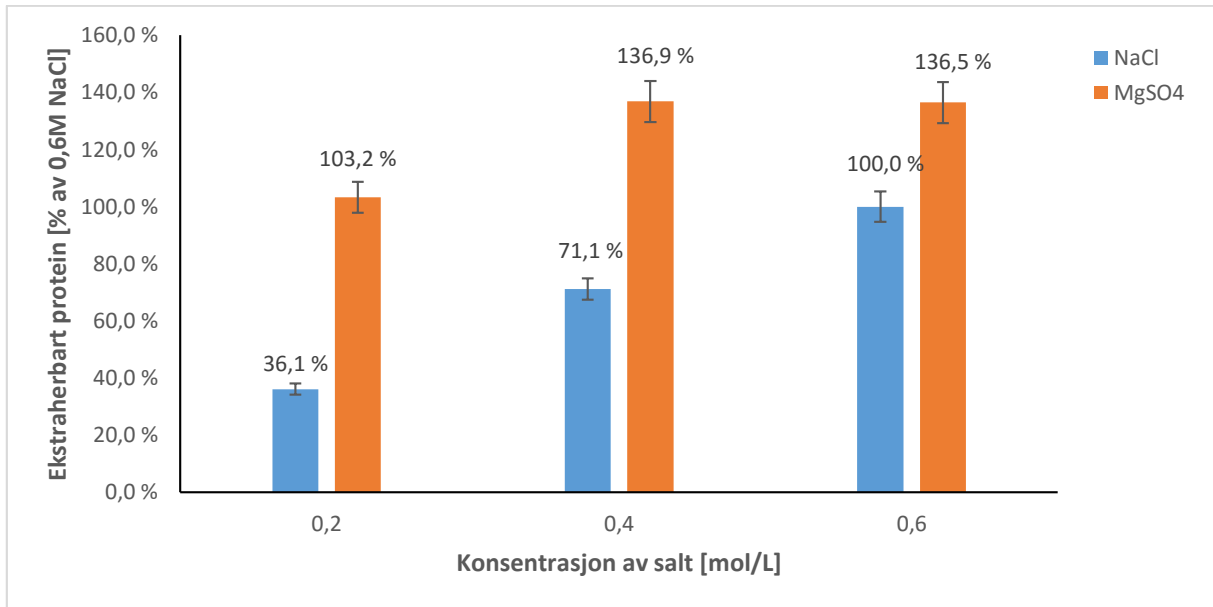


Figur 41: Ekstrahert mengde SLP (i % av våtvekt) i forhold til standard (0,6 M NaCl satt til 100%). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

Proteinekstraksjon - fryst torskefilet

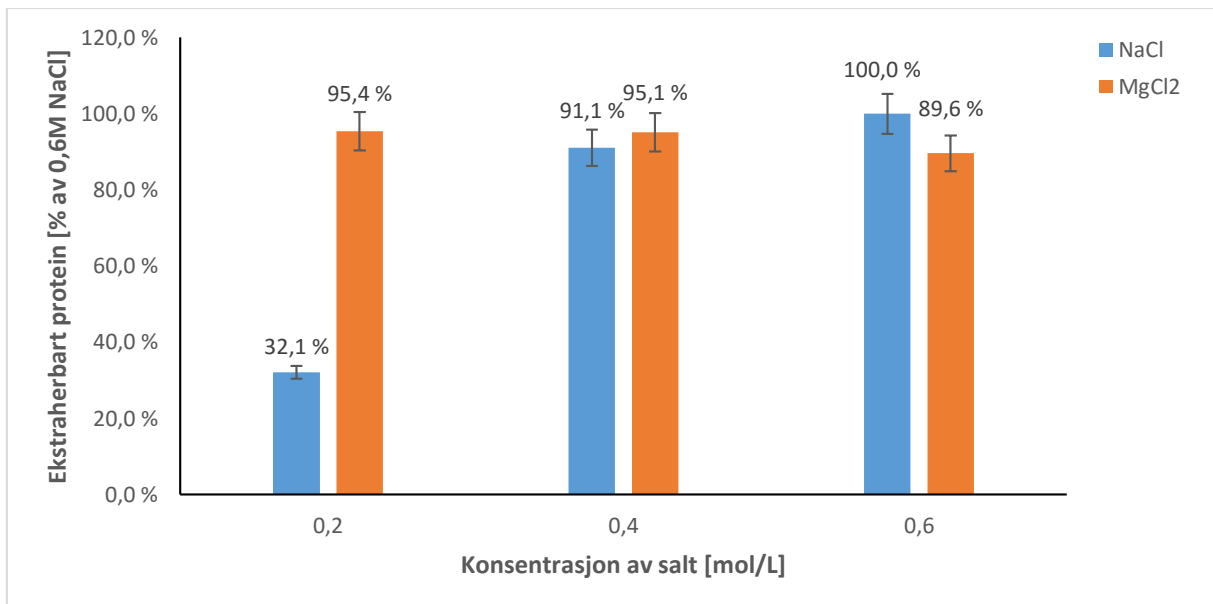


Figur 42: Ekstrahert mengde SLP (i % av våtvekt) i forhold til standard (0,6 M NaCl satt til 100%). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgCl₂ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

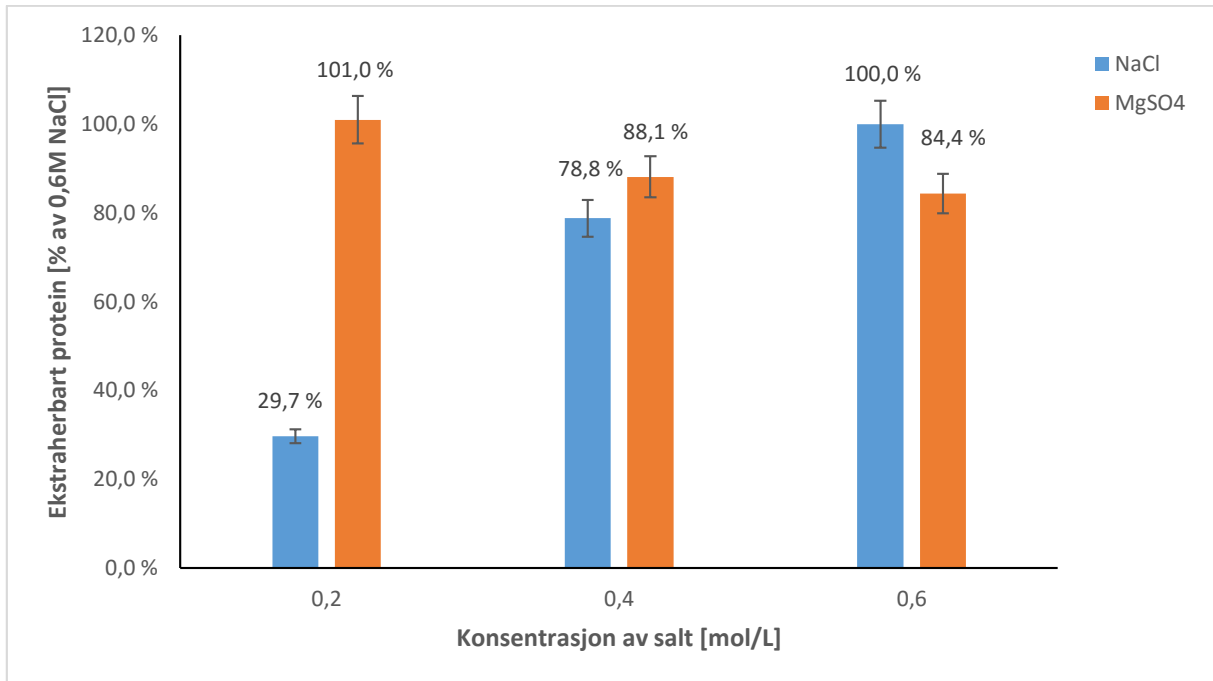


Figur 43: Ekstrahert mengde SLP (i % av våtvekt) i forhold til standard (0,6 M NaCl satt til 100%). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

Proteinekstraksjon fersk laksefilet

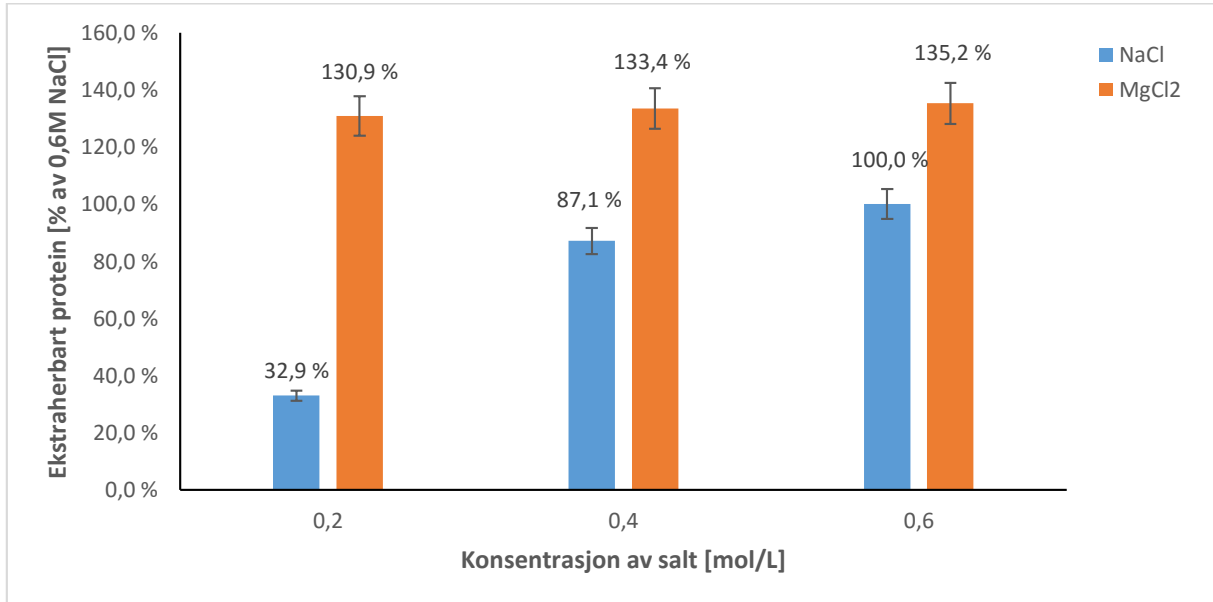


Figur 44: Ekstrahert mengde SLP (i % av våtvekt) i forhold til standard (0,6 M NaCl satt til 100%). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgCl₂ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

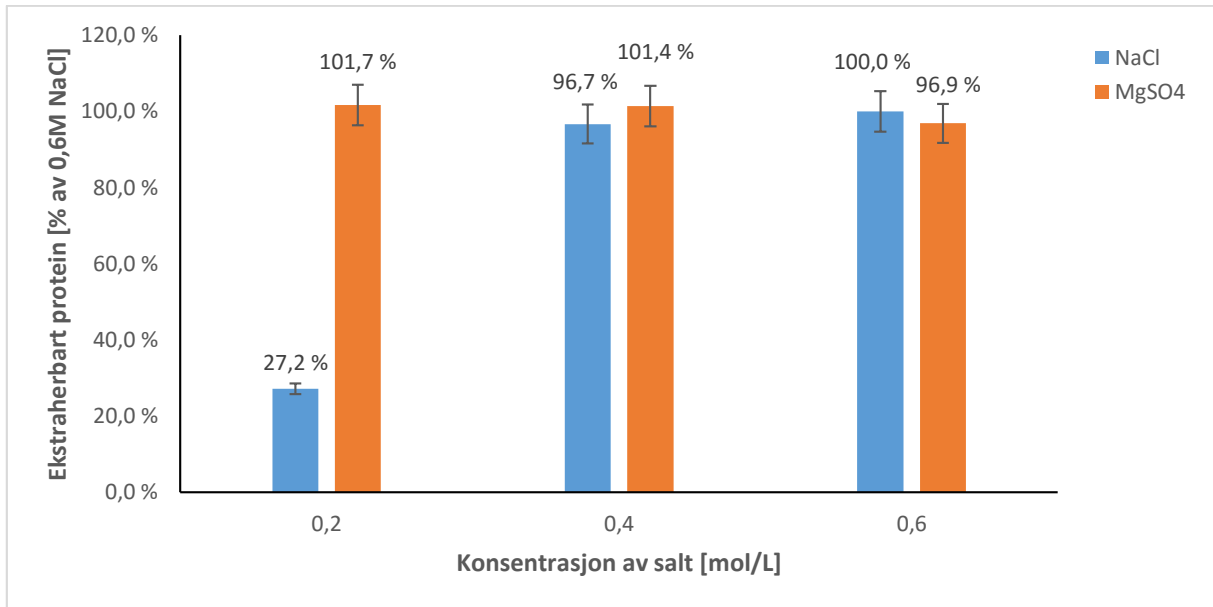


Figur 45: Ekstrahert mengde SLP (i % av våtvekt) i forhold til standard (0,6 M NaCl satt til 100%). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som \pm standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

Proteinekstraksjon fryst laksefilet



Figur 46: Ekstrahert mengde SLP (i % av våtvekt) i forhold til standard (0,6 M NaCl satt til 100%). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgCl₂ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som \pm standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

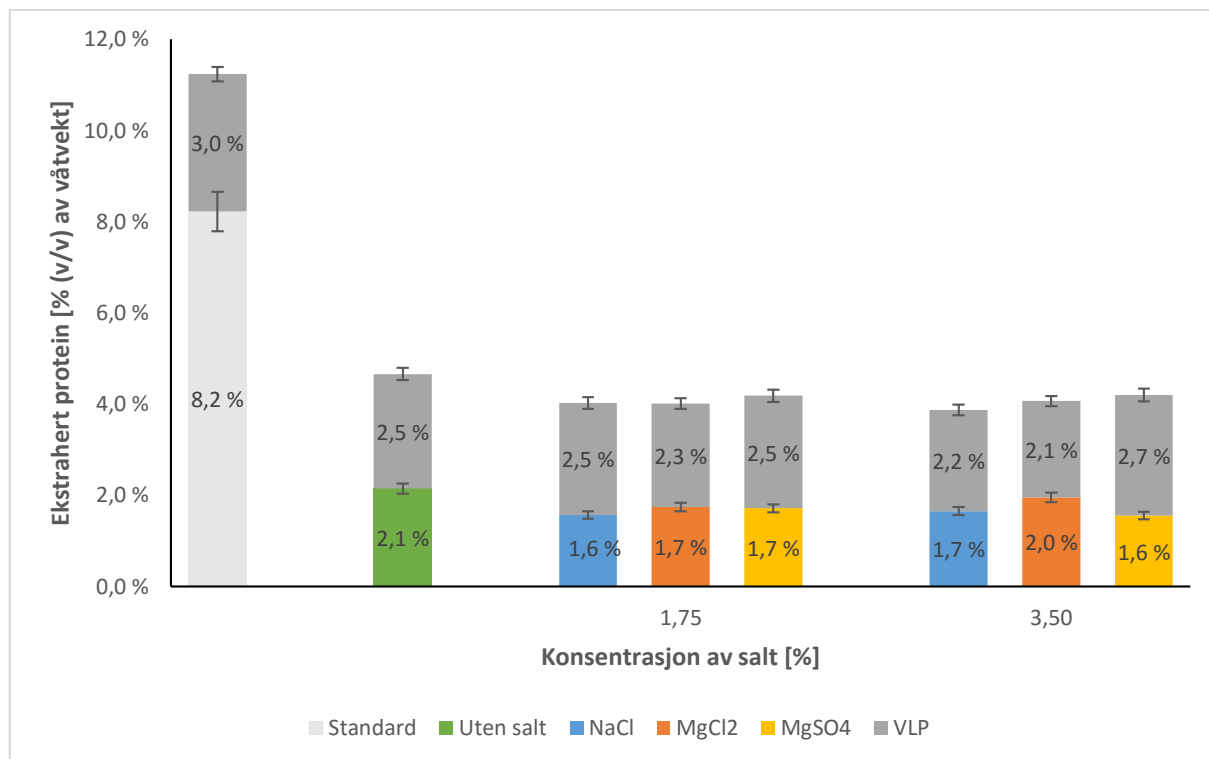


Figur 47: Ekstrahert mengde SLP (i % av våtvekt) i forhold til standard (0,6 M NaCl satt til 100%). De blå og oransje søylene representerer SLP ekstrahert med henholdsvis NaCl og MgSO₄ i ulike konsentrasjoner. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som \pm standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

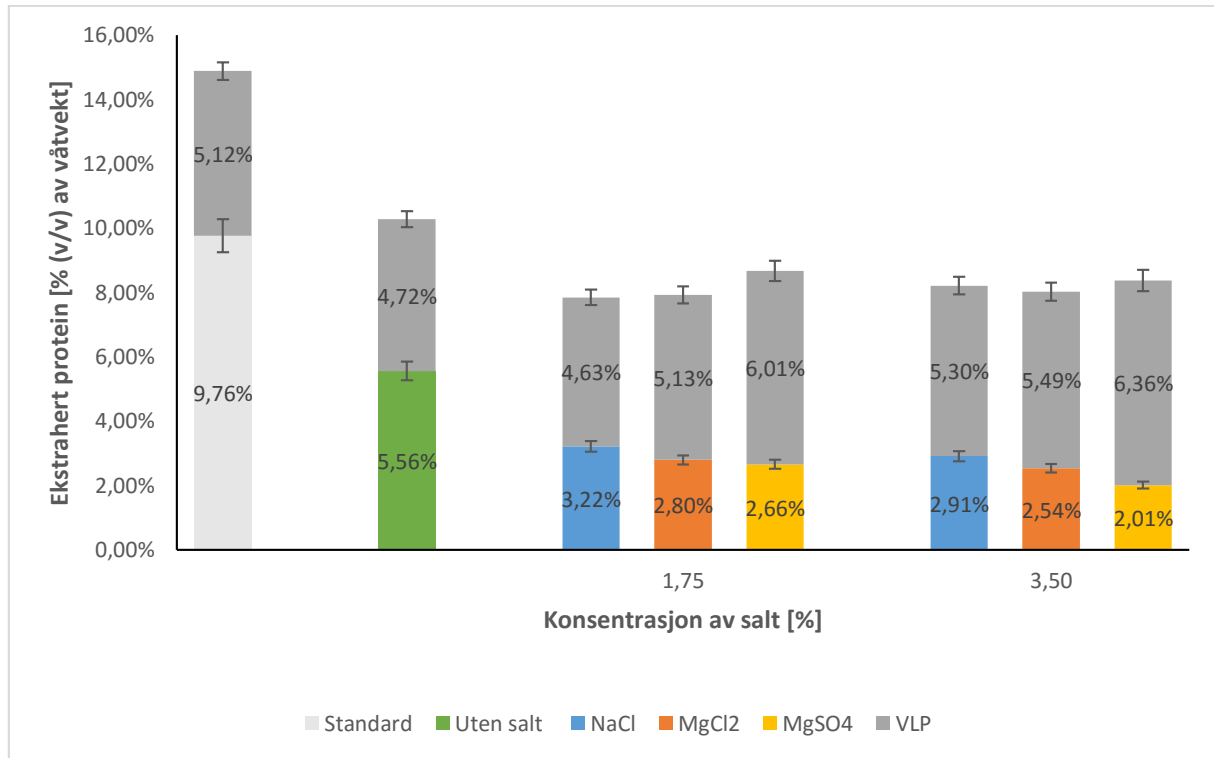
Vedlegg B: Varmebehandling

Torske- og laksefarse varmebehandlet ved 30°C

Figur 48 og Figur 49 viser mengde ekstrahert VLP og SLP fra henholdsvis varmebehandlet torske- og laksefarse ved 30°C. Disse figurene viser forholdet mellom en ikke-varmebehandlet farse og de varmebehandlede farsene. De ikke-varmebehandlede farsene, som heller ikke var tilsatt salt, ble brukt som et sammenlikningsgrunnlag for farsene varmebehandlet ved 30°C.



Figur 48: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt) fra torskefarse varmebehandlet ved 30°C. Den lysegrå søylen representerer ikke-varmebehandlet og ikke-saltet torskefarse (standard). Den grønne søylen representerer ekstrahert mengde SLP fra ikke-saltet farse, mens de blå, oransje og gule søylene representerer ekstrahert SLP fra farsene tilsatt henholdsvis NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike - konsentrasjoner. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).



Figur 49: Ekstrahert mengde VLP og SLP (i % av våtvekt) fra laksefarse varmebehandlet ved 30°C. Den lysegrå søylen representerer ikke-varmebehandlet og ikke-saltet laksefarse (standard). Den grønne søylen representerer ekstrahert mengde SLP fra ikke-saltet farse, mens de blå, oransje og gule søylene representerer ekstrahert SLP fra farsene tilsatt henholdsvis NaCl, MgCl₂ og MgSO₄ i to ulike - konsentrasjoner. De grå søylene representerer ekstrahert VLP tilhørende de ulike ekstraherte mengdene SLP. Hver søyle er oppgitt som gjennomsnittet av de to parallellene. Feilfeltene er oppgitt som ± standardavviket (usikkerhet i metoden – 5,3%).

Utrekning av saltkonsentrasjon og ionestyrke for mengde tilsatt salt i farsene

Utrekning av saltkonsentrasjon, for mengde salt tilsatt farsene før varmebehandling, er regnet ut på grunnlag av vann i fiskefarsen. For mengde vann (%) i torsk og laks ble verdiene oppgitt i teoridel 2.4 benyttet. Disse verdiene ble benyttet til å regne ut volum av vann i torske- og laksefarsen, slik at konsentrasjon av salt i vannfasen i torske- og laksefarse kunne beregnes. De tilhørende ionestyrkene ble også kalkulert. Verdiene benyttet til utregning av volum vann i de to fiskeartene er vist i Tabell 23. Verdiene benyttet til utregning av konsentrasjon av de ulike saltene, samt tilhørende ionestyrker er vist i Tabell 24.

Tabell 23: Verdier benyttet til utregning av volum av vann i torske- og laksefarse.

| Fisk | Vann (%) | Vekt av farse (g) | Vann (mL) |
|-------|----------|-------------------|-----------|
| Torsk | 79,0 | 20,0 | 15,8 |
| Laks | 66,0 | 20,0 | 13,2 |

Tabell 24: Verdier benyttet til utregning av konsentrasjon av salt i vannfasen til torske- og laksefarsene, samt tilhørende ionestyrker.

| Fisk | Salt (%) | Salt (g) | Molar masse (g/mol) | Mol | Konsentrasjon (mol/L) | Ionestyrke |
|--------------|------------------------|-----------------|----------------------------|------------|------------------------------|-------------------|
| Torsk | 1,75 NaCl | 0,35 | 58,44 | 0,006 | 0,38 | 0,38 |
| Laks | | | | | 0,45 | 0,45 |
| Torsk | 3,50 NaCl | 0,70 | 58,44 | 0,012 | 0,76 | 0,76 |
| Laks | | | | | 0,91 | 0,91 |
| Torsk | 1,75 MgCl ₂ | 0,35 | 203,30 | 0,002 | 0,11 | 0,33 |
| Laks | | | | | 0,13 | 0,39 |
| Torsk | 3,50 MgCl ₂ | 0,70 | 203,30 | 0,003 | 0,22 | 0,65 |
| Laks | | | | | 0,26 | 0,78 |
| Torsk | 1,75 MgSO ₄ | 0,35 | 246,47 | 0,001 | 0,09 | 0,36 |
| Laks | | | | | 0,11 | 0,43 |
| Torsk | 3,50 MgSO ₄ | 0,70 | 246,47 | 0,003 | 0,18 | 0,72 |
| Laks | | | | | 0,22 | 0,86 |

Regneeksempel med torskefarse tilsatt 0,35 g NaCl

$$\frac{20 \text{ g} \times 79}{100} = 15,8 \text{ g} = 15,8 \text{ mL}$$

$$\frac{0,35 \text{ g}}{58,44 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0,006 \text{ mol}$$

$$\left(\frac{0,006 \text{ mol}}{15,8 \text{ mL}} \right) \times 1000 = 0,38 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Vedlegg C: pH i fiskemuskel

Tabell 25: Oversikt over pH-målinger i råstoffene i de ulike forsøkene.

| Forsøksnummer | Råstoff | pH |
|----------------------|--|-----------|
| 1 | Fersk torskefilet | 6,70 |
| 2 | Fersk torskefilet | 6,68 |
| 3 | Fryst torskefilet | 6,71 |
| 4 | Fryst torskefilet | 6,78 |
| 5 | Varmebehandlet torskefarse | 6,90 |
| 6 | Varmebehandlet torskefarse | 6,90 |
| 7 | Varmebehandlet torskefarse | 6,88 |
| 8 | Fersk laksefilet | 6,10 |
| 9 | Fersk laksefilet | 6,10 |
| 10 | Fryst laksefilet | 6,39 |
| 11 | Fryst laksefilet | 6,39 |
| 12 | Varmebehandlet laksefilet | 6,14 |
| 13 | Varmebehandlet laksefilet | 6,18 |
| 14 | Varmebehandlet laksefilet | 6,18 |
| 15 | Fersk torskefilet - saltblandingsforsøk | 6,68 |