

Lavsaltprodukter av fisk

Betydning av ulike salter på egenskapene til muskelproteiner

Ida Karoline Sivertsen

Bioteknologi (5 årig)

Hovedveileder: Turid Rustad, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi

Forord

Denne masteroppgaven har vært en del av den integrerte mastergradsutdanningen i bioteknologi (MBIOT5) ved NTNU. Arbeidet med oppgaven har foregått ved Institutt for bioteknologi ved NTNU samt ved Sintef Fiskeri og havbruk på Brattøra, og har vært en del av forskningsprosjektet “Low salt products”¹ som ledes av Sintef Fiskeri og havbruk.

Jeg vil rette en stor takk til hovedveileder professor Turid Rustad som har vært til uunnværlig hjelp og støtte gjennom hele prosessen. Uten hennes ekspertise på dette området ville det vært vanskelig å gjennomføre arbeidet med oppgaven, og jeg setter stor pris på alle konstruktive tilbakemeldinger jeg har fått. Videre vil jeg takke veileder og Ph.D.-kandidat Kirsti Greiff ved Sintef Fiskeri og havbruk for den kunnskap hun har bidratt med, samt for alle tips og tilbakemeldinger jeg har fått underveis. Medstudent Lise Merete Sitter Bersmo takkes for godt samarbeid, og for å ha latt meg benytte en del av hennes resultater. Jeg setter dessuten stor pris på de faglige diskusjonene og sosiale sammenkomstene vi har hatt sammen.

Irina Vodyanova takkes for opplæring i SDS-PAGE, samt hjelp knyttet til vurdering av gelene. I tillegg har hun svart på mange spørsmål underveis, og dette setter jeg stor pris på. Lisbeth Hultmann takkes for alle tips hun har kommet med underveis, samt for alle spørsmål hun har svart på. Kristine Taraldsvik takkes for praktisk hjelp på lab og hyggelige samtaler.

Jeg takker alle klassekamerater for et trivelig år og hyggelige lunsjer.

Tilslutt vil jeg rette en stor takk til kjæresten min Magnus for hans støtte og gode råd underveis, samt for uvurderlig hjelp knyttet til L^AT_EX, og for korrekturlesning.

Trondheim, mai 2012

Ida Karoline Sivertsen

¹prosjektnummer 185063/I10, støttet av Norges Forskningsråd.

Sammendrag

Prosessert mat utgjør en av de største kildene til natrium i vestlig kosthold. Et forhøyet inntak av natrium er forbundet med høyt blodtrykk, noe som øker risikoen for hjerte- og karsykdommer. Denne kunnskapen har økt interessen for kjøtt- og fiskeprodukter med lavere NaCl-innhold - såkalte lavsaltprodukter. Lavere natriuminnhold oppnås ved å redusere mengden NaCl og/eller tilsette salterstattere.

Formålet med denne studien var å undersøke hvordan ulike konsentrasjoner av NaCl, KCl og MgCl₂ påvirker proteinløselighet i fisk. Forskjeller mellom ferskt og fryst råstoff for filet og farse av sei, hyse, torsk og kvitlaks ble undersøkt for å finne ut om KCl og MgCl₂ kan brukes som salterstattere i farseprodukter av disse fiskeslagene. Målinger av proteinløselighet ble satt i sammenheng med målinger av pH og vannbindingsevne (VBE) i de ulike råstoffene. Påvirkning av Na-alginat, Na-alginat+NaCl og NaCl på proteinløselighet i farser av fersk og av fryst hyse ble undersøkt, og koblet opp mot de funksjonelle egenskapene til et varmebehandlet modellprodukt. Varmepåvirkning på VBE i farser med og uten tilsatt NaCl ble undersøkt.

Proteinløselighet var høyest i fersk filet og sank som en følge av frysing og kverning. For fersk filet ble det ikke funnet forskjeller mellom sei, hyse og torsk i mengde ekstrahert saltløselig protein (SLP). For fryst filet ble det generelt sett ekstrahert en større mengde SLP fra hyse enn fra sei og torsk. For fersk farse ble det ekstrahert mest SLP fra torsk, men for farse av fryst råstoff ble det ekstrahert mest SLP fra kvitlaks. Når mengde ekstrahert SLP og SDS-PAGE-profil ble tatt i betraktning, ble 0,6 M NaCl vurdert som den beste proteinekstraktanten. Tett etter 0,6 M NaCl fulgte 0,3 M MgCl₂ og 0,3 M NaCl. 0,3 M KCl, 0,6 M MgCl₂ og 0,6 M KCl ble vurdert som de dårligste proteinekstraktantene. Dette skyldtes i hovedsak at myosinets tunge kjede generelt ikke så ut til å bli ekstrahert med de to sistnevnte, noe som kan ha betydning for geldannings- og vannbindingsevnen til produktet. Ekstraksjon av myosinets tunge kjede med 0,3 M KCl så ut til å være råstoffavhengig. På grunnlag av dette ble 0,3 M MgCl₂ vurdert som den beste salterstatteren. Tilsetningsstoffer til farser av hyse, slik som Na-alginat, Na-alginat+NaCl og NaCl hadde alle en positiv effekt på proteinløselighet, og så ut til å kunne kompensere for bruk av en dårlig proteinekstraktant eller en proteinekstraktant med lav konsentrasjon. Varmebehandling av farser/puddinger med og uten tilsetninger viste at VBE nådde et minimum ved rundt 50°C, og at den økte ved høyere temperaturer, trolig som en følge av gelning av myosin. VBE var lavest i råstoff uten tilsetning, og økte ved tilsetning av NaCl, Na-alginat + NaCl og Na-alginat. Av tilsetningsstoffene hadde Na-alginat (med eller uten NaCl) best effekt, både på VBE, drypptap og tekstur.

pH varierte i sei, hyse, torsk og kvitlaks, og økte etter frysing. For ferskt råstoff viste VBE en svak positiv korrelasjon med pH (10% signifikansnivå), men for fryst råstoff var det ingen klar sammenheng. For torsk og hyse økte VBE litt som en følge av frysing (5% signifikansnivå), mens den sank for sei.

Abstract

Processed foods are one of the main sources of sodium in the western diet. An increased intake of sodium is connected to high blood pressure, which increases the risk of cardiovascular disease. This knowledge has led to increased interest in meat and fish products with a lower content of sodium – so-called low salt products. Reduced sodium content can be achieved by reducing the amount of added NaCl and/or by the use of salt replacers.

The aim of this study was to investigate the effects of different concentrations of NaCl, KCl and MgCl₂ on protein solubility in fresh and frozen pollock (*Pollachius Virens*), haddock (*Melanogrammus Aeglefinus*), great silver smelt (*Argentina Silus*) and cod (*Gadus Morhua*) in an attempt to find out if KCl and MgCl₂ could be used as salt replacers in these fish species. Measurements of protein solubility were linked to measurements of pH and water holding capacity (WHC) in these species. The influence of Na-alginate, Na-alginate+NaCl and NaCl on protein solubility in mince of fresh and of frozen haddock was investigated, and linked to the functional properties of a heat-treated model product. The effect of heating on WHC in mince with and without added NaCl was investigated.

Protein solubility was highest in fillets of fresh fish and was reduced due to freezing and mincing. For fresh fish, no differences in amount of extracted salt soluble proteins (SSP) were found between the different species studied. A larger amount of SSP was extracted from frozen fillet of haddock than from frozen fillet of pollock and cod. For mince of fresh fish, the largest amount of SSP was extracted from cod. For mince of frozen fish, the largest amount of SSP was extracted from great silver smelt. 0.6 M NaCl was judged as the best protein extractant when taking in to consideration the amount of extracted SSP and SDS-PAGE profile, and was followed by 0.3 M MgCl₂ and 0.3 M NaCl. 0.3 M KCl, 0.6 M MgCl₂ and 0.6 M KCl were judged as the poorest protein extractants. The reason for this was the general lack of the myosin heavy chain (MHC) in these extracts, which could influence the gelling capacity and WHC of the product. Extraction of MHC with 0.3 M KCl seemed to depend on the raw material. On the basis of this 0.3 M MgCl₂ was judged as the best salt replacer. The additives Na-alginate, Na-alginate+NaCl and NaCl all had a positive effect on protein solubility in mince of haddock and could compensate for use of a poor protein extractant or a protein extractant of low concentration. Heat-treatment of minces/puddings with and without additives showed that the WHC was lowest at 50°C and increased with increasing temperatures, probably due to the gelation of myosin. The WHC was lowest in the raw material without additives and increased with addition of NaCl, Na-alginate+NaCl and Na-alginate. The best effect on the WHC, drip loss and texture was obtained when Na-alginate (with or without NaCl) was added.

The pH varied in pollock, haddock, great silver smelt and cod, but increased during freezing. There was a weak positive correlation between WHC and pH in fresh fish (10% significance level), but not in frozen fish. The WHC of cod and haddock increased during freezing (5% significance level), while it was reduced in pollock.

Innhold

1	Innledning	1
2	Teori	3
2.1	Introduksjon	3
2.2	Muskelkjemi	3
2.2.1	Struktur	3
2.2.2	Myofibriller	5
2.2.3	Sarkoplasmaproteiner	8
2.2.4	Bindevev og stromale proteiner	8
2.2.5	Ulike muskelfibre	10
2.3	Funksjonelle egenskaper til muskelproteiner	10
2.3.1	Løselighet	11
2.3.2	Geldannelse	11
2.3.3	Vannbindingsevne	14
2.4	Post-mortale prosesser i muskelvev	15
2.4.1	Muskelsammentrekning	15
2.4.2	Biokjemiske reaksjoner post-mortem	16
2.4.3	Degradering av muskelproteiner	17
2.4.4	Vannbindingsevne post-mortem	18
2.5	Salt	18
2.5.1	Vannbindingsevne	19
2.5.2	Effekt av salt på termisk stabilitet av muskelproteiner	22
2.5.3	Saltreduksjon	22
2.6	Frysing og tining	24
2.6.1	Farse	26
2.7	Varmebehandling	26
2.8	Råstoff	28
3	Materialer og metoder	31
3.1	Materialer	31
3.2	Metoder	31
3.2.1	Proteinløselighet i fisk	31
3.2.2	Vannbindingsevne (VBE)	34
3.2.3	pH-måling i farse	34
3.2.4	Varmebehandling	34
4	Resultater og diskusjon	35
4.1	pH	35
4.2	Vannbindingsevne (VBE)	36
4.3	Proteinløselighet	39

4.3.1	Sei	39
4.3.2	Hyse	47
4.3.3	Kvitlaks	55
4.3.4	Torsk	58
4.4	Sammenligning	64
4.4.1	Likheter og forskjeller mellom salter	64
4.4.2	Likheter og forskjeller mellom ulike fiskeslag	67
4.5	Varmebehandling	68
4.5.1	Kvitlaks	68
4.5.2	Hyse	69
4.5.3	VBE i varmebehandlede farses av hyse	71
5	Konklusjon	73
	Bibliografi	75
	Vedlegg	A-1

Kapittel 1

Innledning

Salt, i form av NaCl, blir i stor grad tilsatt til mat for å gi smak, øke holdbarhet og å gi produkter ønskede teksturegenskaper. Særlig ferdigprodukter - supper, fiskeprodukter, kjøttfarsar og lignende - blir tilsatt NaCl. NaCl fremhever den karakteristiske smaken av muskelvev, samt løseliggjør saltløselige proteiner, noe som resulterer i dannelse av en ønskelig geltekstur ved oppvarming. Dette forbedrer vann- og fettbindingsegenskapene til muskelproduktene, og er viktig både for konsistens og smak, samt økonomi. Ved å senke vannaktiviteten øker NaCl den mikrobiologiske stabiliteten til produktet, slik at det får en lengre holdbarhet (Ruusunen & Puolanne 2005). Prosessert mat utgjør en av de største kildene til natrium i vestlig kosthold (Desmond 2006). Daglig får den vestlige befolkningen i seg omtrent dobbelt så mye natrium som anbefalt, og i Norge er det anslått at det gjennomsnittlige inntaket ligger på 10 g NaCl per dag for voksne. Et forhøyet inntak av natrium er forbundet med høyt blodtrykk, noe som øker risikoen for hjerte- og karsykdommer. Myndighetene anbefaler derfor at det daglige natriuminntaket bør være lavere enn 2,3 g, noe som tilsvarer 6 g NaCl (Helsedirektoratet 2011). Forskning har gjort produsenter og forbrukere mer bevisst på sammenhengen mellom natrium og forhøyet blodtrykk, og interessen for kjøtt- og fiskeprodukter med lavere NaCl-innhold - såkalte lavsaltprodukter - har dermed økt (Ruusunen & Puolanne 2005). Å utvikle produkter med lavere NaCl-innhold er allikevel ikke enkelt, på grunn av NaCl sin viktige rolle i slike produkter. Når saltinnholdet reduseres og det tilsettes salterstattere, påvirkes egenskapene til produktet. Derfor må produktutvikling rettet mot saltreduksjon undersøke den påvirkningen saltreduksjon og tilsats av salterstattere har både på smak og funksjonelle egenskaper til produktet, slik som vannbindingsevne, løselighet, fettbinding, tekstur, sensorikk, stabilitet og holdbarhet (Desmond 2006).

Formålet med denne oppgaven har vært å undersøke hvordan ulike konsentrasjoner av NaCl, KCl og MgCl₂ påvirker proteinløselighet i sei, hyse, kvitlaks og torsk, samt å undersøke forskjeller mellom ferskt og fryst råstoff, og mellom filet og farse. Hensikten har vært å undersøke om KCl og MgCl₂ kan brukes som salterstattere i disse fiskeslagene. Proteinekstraktene har blitt analysert med SDS-PAGE for å identifisere hvilke proteiner som er ekstrahert. Dette er satt i sammenheng med målinger av pH og vannbindingsevne i de ulike råstoffene. Det er også undersøkt hvordan varmebehandling fra 0-70°C påvirker vannbindingsevnen i farsar av fersk og fryst fisk, med og uten tilsatt NaCl. Forsøk med tilsetninger av blant annet alginat i farse av fersk og fryst hyse er gjort i samarbeid med Lise Merete Sitter Bersmo, og formålet har vært å undersøke hvordan tilsetningene påvirker proteinløseligheten, samt å koble dette opp mot VBE, drypptap og tekstur i det varmebehandlede modellproduktet.

Oppgaven har vært en del av forskningsprosjektet “Low salt products”¹ som ledes av SINTEF Fiskeri og havbruk. Formålet er å få bedre forståelse for hvordan saltinnholdet best kan reduseres i ulike næringsmidler, og SINTEF Materialer og kjemi og flere viktige næringsmiddelprodusenter i Norge (Mills, Nortura, Stabburet, SPIS-Grilstad, Finsbråten, Brødrene Remø og Berggren) deltar i prosjektet.

¹prosjektnummer 185063/I10, støttet av Norges Forskningsråd.

Kapittel 2

Teori

2.1 Introduksjon

For å kunne produsere fiskeprodukter av høy kvalitet, er det nødvendig å forstå hva som skjer med egenskapene til råstoffet før, under og etter slakting, og under prosessering (Eskin 1990). Dette inkluderer kunnskap om muskelkjemi, muskelproteiners funksjonelle egenskaper, og post-mortale prosesser – samt hvordan disse prosessene påvirker de funksjonelle egenskapene til muskelproteinene. Ulik behandling av råstoffet, som salting, frysing og varmebehandling vil ha stor påvirkning på egenskapene til produktet, og kunnskap om dette er viktig for å kunne produsere produkter med ønsket kvalitet. I de følgende avsnittene vil disse temaene bli gjennomgått.

2.2 Muskelkjemi

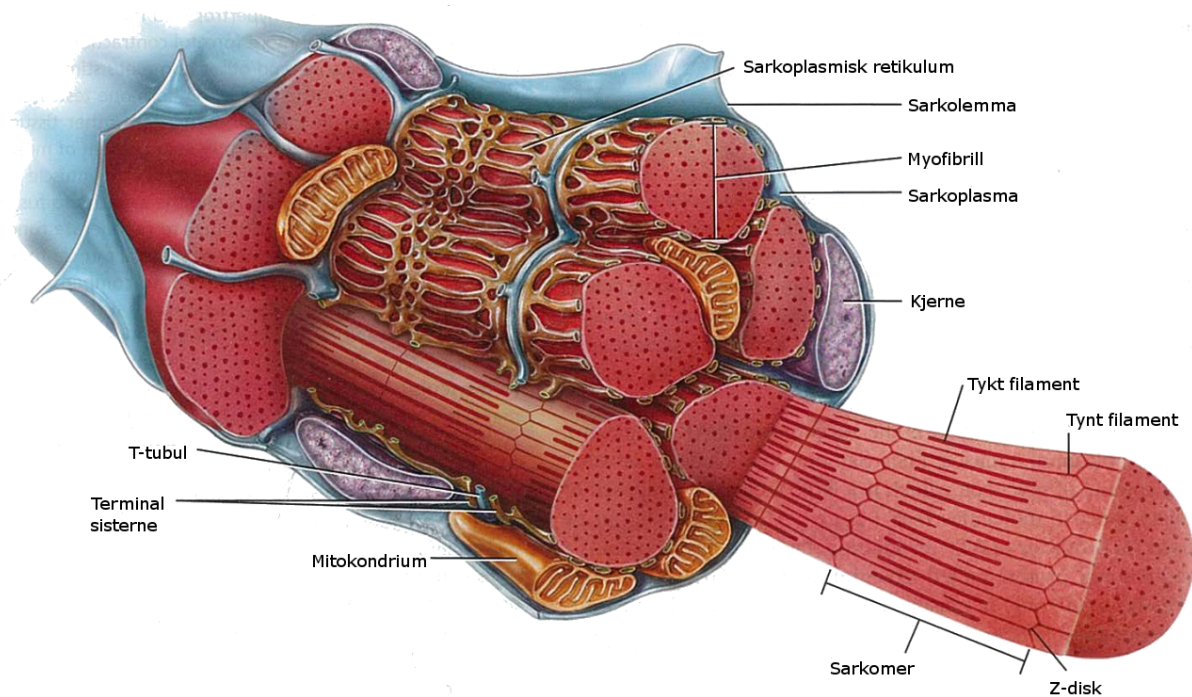
Muskelen består av et svært organisert system av proteiner (Rodger & Wilding 1990), og ulike aspekter av dette systemet vil bli gjennomgått nærmere i avsnitt 2.2.1 Struktur, 2.2.2 Myofibriller, 2.2.3 Sarkoplasmaproteiner, 2.2.4 Bindevev og stromale proteiner og 2.2.5 Ulike muskelfibre.

2.2.1 Struktur

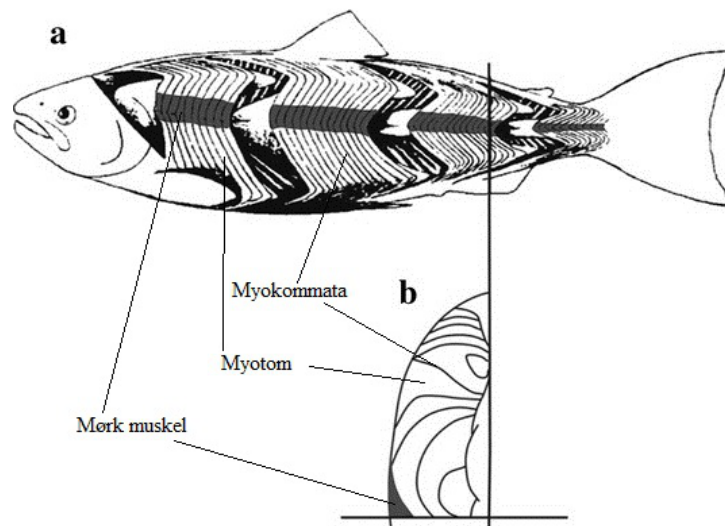
Grunnenheten i en muskel er muskelfiberen (figur 2.1), som er en multinukleær, sylindrisk celle omgitt av en yttermembran kalt sarkolemma (Eskin 1990). Hver enkelt fiber er omgitt av et tynt lag bindevev kalt endomysium. Fibrene er videre ordnet i bunter som omslutes av et lag bindevev kalt perimysium. I fisk er buntene av muskelfibre ordnet i myotomer. Myotomene er kjegleformede muskulære blokker, som skilles fra hverandre med en bindevevshinne kalt myokommata eller epimysium (figur 2.2) (Rodger & Wilding 1990). Myotomene er ordnet langs det midtre septum (figur 2.2a), og blir kortere mot sporden.

Proteinene i en muskelcelle kan deles inn i tre grupper: myofibriller, sarkoplasmaproteiner, og bindevev og stromale proteiner (Rodger & Wilding 1990). Myofibrillene er løselige i saltkonsentrasjoner over 0,5 M og utgjør 40-60%¹ av proteinene i fiskemuskel. Sarkoplasmaproteinene består av albuminer som er løselige i vann og i fortynnede saltløsninger. Innholdet av disse proteinene utgjør omtrent 30% av det totale proteininnholdet (Sikorski 1994). Den siste gruppen

¹I teorikapittelet blir prosentinnhold oppgitt i % av vekt, der annet ikke er eksplisitt oppgitt.



Figur 2.1: Skjematisk fremstilling av en muskelfiber (fritt etter Tortora & Derrickson (2006)).



Figur 2.2: a) Venstre side av kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*) der myotomer og myokommata, samt rød muskel (indikert av de grå områdene), er angitt. b) Tverrsnitt gjennom øvre venstre fjerdepart av haleregionen. Linjene representerer det midtre og vertikale septum som skiller myotomene (Videler 2011).

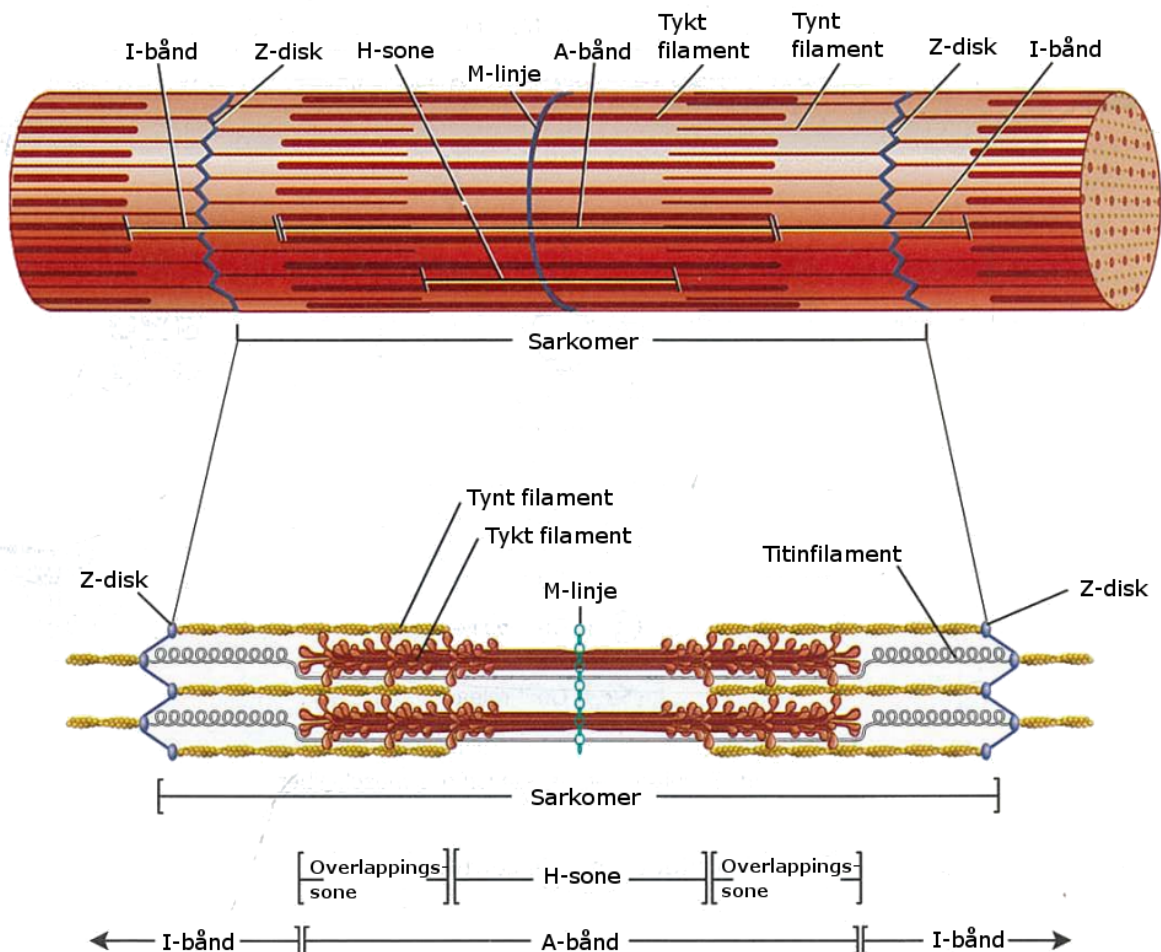
er bindevevs- og stromale proteiner, som er uløselige i nøytrale saltløsninger (Sikorski 1994). Disse utgjør opptil 3-10% av totalt muskelproteininnhold i fisk (Haard 1992).

2.2.2 Myofibriller

Myofibriller er filamentære strukturer med en diameter på omtrent 1 μm , og er like lange som fibercellen. De opptar omtrent 80% av muskelfibervolumet. I myofibrillene finner vi de kontraktile, regulatoriske og strukturelle proteinene (Rodger & Wilding 1990). Myofibrillproteinene er viktige for stivheten som oppstår i muskelvevet post-mortem (rigor mortis), og endringer i myofibrillproteinene fører senere til oppløsning av rigor. Under langvarig fryselagring kan de forårsake økt seighet i muskelvevet. Myofibrillproteinene er i hovedsak ansvarlig for vannbindingsevnen til fiskemuskel, for den karakteristiske teksturen til fiskeprodukter og for de funksjonelle egenskapene til fiskefarser og -homogenater, da særlig gelningsevne (Sikorski et al. 1990). En mer omfattende gjennomgang av disse egenskapene vil bli gitt i avsnitt 2.3.

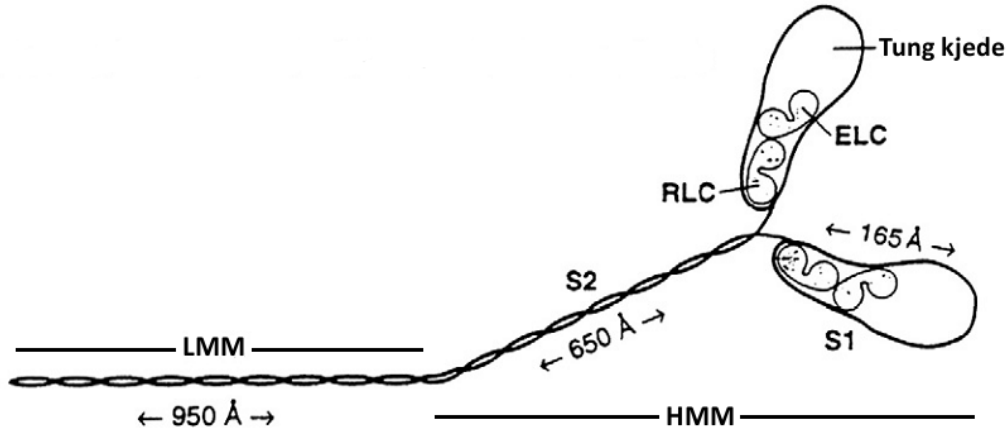
Kontraktile proteiner

Myosin (tykt filament) og aktin (tynt filament) utgjør 65% av myofibrillproteinene, og er fundamentet i den kontraktile enhet, også kjent som sarkomeren (figur 2.3). (Rodger & Wilding 1990).



Figur 2.3: Skjematiske fremstilling av en myofibrills oppbygning og struktur (fritt etter Tortora & Derrickson (2006)).

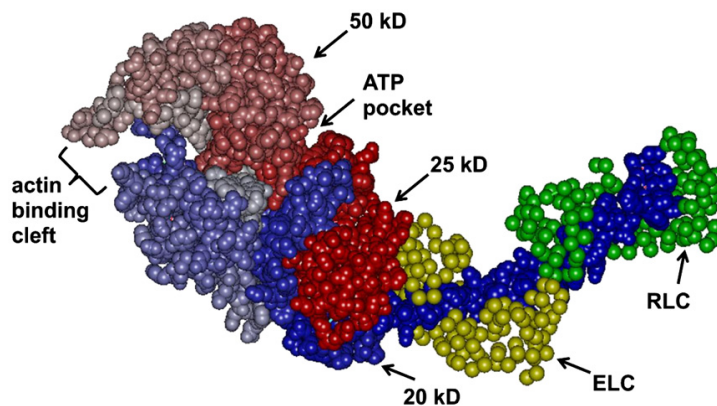
Myosin Myosin er det proteinet som forekommer mest i skjelettmuskel, og i myofibrillene utgjør den 45% av proteininnholdet. Myosinmolekylet ser ut som en stav med to globulære hoder i den ene enden, og har seks subenheter: to tunge kjeder ($M_r \sim 220$ kDa) og fire lette kjeder ($M_r = 16-20$ kDa) (Strasburg et al. 2008), som vist i figur 2.4. Tilsammen gir det en samlet vekt



Figur 2.4: Myosin (Rayment & Holden 1994, ikke sett – fritt etter Puolanne & Halonen 2010).

på ~ 500 kDa (Puolanne & Halonen 2010). De N-terminale endene av de tunge kjedene utgjør de to myosinhodene, mens de C-terminale endene danner to α -helikser, som tvinnes sammen til en stavlignende, viklet spiral (Strasburg et al. 2008). Staven har en høy tetthet av ladde aminosyrer på ytteroverflaten, og ved pH 6,5 har den en høy negativ ladning, som fortsatt er negativ ved pH 5,5 (Puolanne & Halonen 2010). To lette myosinkjeder binder til hvert myosinhode. De lette myosinkjedene kan deles inn i de essensielle lette kjedene (ELC) – som består av lett kjede 1 og 3 (LC1 ($M_r \sim 20,9$ kDa) og LC3 ($M_r \sim 16,6$ kDa)) – og såkalt regulatorisk lett kjede (RLC) – kjent som lett kjede 2 (LC2 ($M_r \sim 18$ kDa)). ELC kan ekstraheres med base, mens RLC kan ekstraheres med DTNB. En ELC og en RLC binder til hvert myosinhode.

Myosinhodet og myosinstaven har ulike oppgaver: myosinstaven danner det strukturelle fundamentet for dannelse av de tykke filamentene, som peker i to retninger fra M-linjen (figur 2.3), mens myosinhodene utgjør drivkraften for muskelsammentrekning (Strasburg et al. 2008). Det viktigste områdene i den forbindelse er S1, som består av tre subområder (figur 2.5).



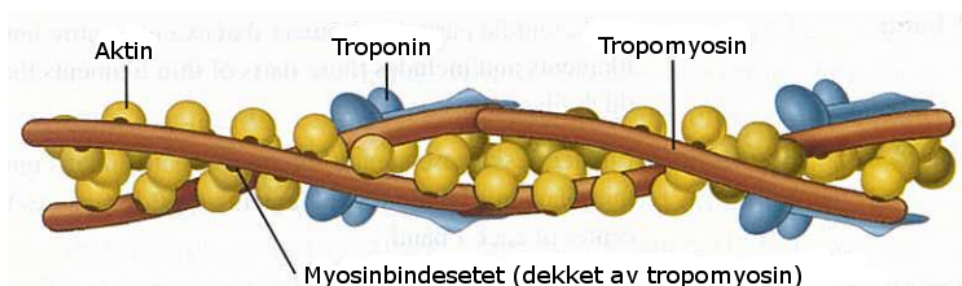
Figur 2.5: S1-området av myosin (Rayment et al. 1993).

Bindesetet for ATP finnes i det N-terminale subområdet (25 kDa) og har ATPase-aktivitet, mens bindesetet for aktin befinner seg i det sentrale området (50 kDa). Det siste området

kalles converter-domenet (20 kDa). Ladningen til S1 avhenger også av pH. Ved pH 6,5 er S1 nøytral, mens ved pH 5,5 har den en svak positiv ladning (Puolanne & Halonen 2010). Ved begrenset proteolyse av myosin produseres to enheter kalt “heavy meromyosin” (HMM) og “light meromyosin” (LMM). HMM består av S1 og et område kalt S2. S2 fungerer som en kobling mellom myosinhodet og LMM, som er den delen av staven som er involvert i filamentdannelsen (Strasburg et al. 2008).

Myosinfilamentet inneholder 200-300 myosinmolekyler som ligger midt i sarkomeren (figur 2.3). Midt på er det en naken sone uten noen myosinhoder, kalt H-sonen. Midt i H-sonen ligger M-linjen. I myosinfilamentet er de upolare aminosyrene orientert innover, mens de polare aminosyrene er orientert utover. Det er foreslått at vekselvirkningene mellom halene i myosinfilamentet både er elektrostatiske og hydrofobe (Puolanne & Halonen 2010). Myosinhodene peker radielt ut fra hvert tykke filament og rettes mot de tynne filamentene, og binder til aktin – hovedproteinene i de tynne filamentene – via bindesetet for aktin i S1 (Strasburg et al. 2008).

Aktin Aktin er det proteinet som finnes i størst mengde etter myosin og utgjør 20% av myofibrillene (Strasburg et al. 2008). Aktinmonomeren er en enkelt polypeptidkjede kalt G-aktin med molekylmasse 41-42 kDa (Puolanne & Halonen 2010). Molekylet er formet som et peanøttskall med to store domener delt inn i to mindre underdomener. G-aktin har et enkelt bindesete for myosin, som muliggjør aktin-myosinkryssbindinger under muskelsammentrekning. Aktin polymeriserer hode-til-hode ved fysiologisk ionestyrke (0,15 M) og tilstedeværelse av MgATP, og danner dobbelttrådede kveilede kveiler kalt filamentært aktin (F-aktin), som vist i figur 2.6. Hver ende av F-aktin er festet i Z-disken og peker mot M-linjen. Lengden av de tynne filamentene er omtrent $1 \mu\text{m}$. Nebulin, tropomodulin og CapZ (tabell 2.1) kontrollerer størrelsen til individuelle tynne filamenter. Under muskelsammentrekning binder aktin til myosin og danner kryssbindinger mellom de to filamentene. Dette aktiverer ATPasen til myosin, som drar de tynne filamentene langs de tykke filamentene slik at sarkomeren forkortes. I tillegg binder aktin de regulatoriske proteinene tropomyosin og troponin (Strasburg et al. 2008). Muskelsammentrekning blir nøyere gjennomgått i avsnitt 2.4.1.



Figur 2.6: F-aktin med de regulatoriske proteinene tropomyosin og troponin (Tortora & Derrickson 2006).

Regulatoriske proteiner

Tropomyosin og troponin utgjør de regulatoriske proteinene, og virker sammen som en bryter ved å slå muskelsammentrekning på eller av i sarkomeren (Strasburg et al. 2008).

Tropomyosin Tropomyosin består av to α -heliks-subenheter ($M_r \sim 37$ kDa) flettet sammen til en lang, stavlignende, viklet spiral med en molekylvekt på ~ 74 kDa. Et tropomyosinmolekyl er omtrent 42 nm langt og spenner over sju aktinmonomerer. Tropomyosin binder seg til spesifikke plasser på aktinmonomerene, og blokkerer på den måten myosinbindesetene når muskelen hviler. Det fins to ulike isoformer av tropomyosin-subenhetene, α - og β -tropomyosin. Disse kan kombineres og danne homodimere ($\alpha\alpha$ eller $\beta\beta$) eller heterodimere ($\alpha\beta$), avhengig av muskelfibertype, muskeltype og art (Strasburg et al. 2008).

Troponin Troponin er en heterotrimer bestående av troponin-C (TnC, $M_r \sim 18$ kDa), troponin-T (TnT, $M_r \sim 30$ kDa) og troponin-I (TnI, $M_r \sim 20$ kDa) (Puolanne & Halonen 2010), som binder til tropomyosin. Troponin utgjør omtrent 5% av den myofibrillære fraksjonen, og kontrollerer vekselvirkninger mellom aktin og myosin – sammentrekning eller avslapning av muskelen – ved å reagere på endringer i kalsiumkonsentrasjonen. TnT binder troponinkomplekset til tropomyosin, mens TnI inhiberer aktomyosin ATPase-aktivitet. Når et nevron initierer muskelsammentrekning, økes $[Ca^{2+}]_{sarkoplasma}$ til $> 10^{-5}$ M, noe som fører til binding av kalsium til TnC. Dette fører til en konformasjonsendring i TnC som overføres til de andre troponin-subenhetene og videre til tropomyosin. TnC er konsentrasjonsavhengig, og vil ikke forårsake en konformasjonsendring når $[Ca^{2+}]_{sarkoplasma} < 10^{-5}$ M (Strasburg et al. 2008).

Strukturelle proteiner

De strukturelle proteinene gir stabilitet og elastitet til myofibrillene, og det viktigste proteinet i denne sammenhengen er titin, som er det tredje mest forekommende proteinet etter myosin og aktin. Egenskapene til titin og andre strukturelle proteiner er vist i tabell 2.1.

2.2.3 Sarkoplasmaproteiner

Sarkoplasmaproteinene kjennetegnes ved at de er løselige i vann og fortynnede saltløsninger (ionestyrke $< 0,15$ M), og at de har lav vannbindingsevne. De danner ikke geler, og kan interferere med myosinkryssbindinger under dannelse av gelmatriks (Haard et al. 1994). Rollen til sarkoplasmaproteiner i geldanningsprosessen vil bli gjennomgått i avsnitt 2.3.2. I gruppen av fiskealbuminer fins det over hundre ulike proteiner (Sikorski et al. 1990), som inkluderer enzymer, pigmenter, parvalbuminer og antifryseproteiner (Haard et al. 1994).

2.2.4 Bindevev og stromale proteiner

I fiskemuskel omslutter bindevev de ulike muskelstrukturene, og fins i endomysium, perimysium og epimysium/myokommata. Hovedproteinet i bindevev er det fibrøse glykoprotein kollagen (Eskin 1990, Sikorski & Borderias 1994), og den danner sammen med grunnsubstansen en sterk matriks som er nødvendig for å opprettholde muskelfunksjon. I tillegg til kollagen, består grunnsubstansen av elastin, vann, proteoglykaner, glykoproteiner og ulike typer celler. Cellene har mange ulike metabolske funksjoner, blant annet syntese av kollagen og elastin (Strasburg et al. 2008).

Kollagen er bygget opp av kollagenmonomeren tropokollagen, som består av tre polypeptid- α -kjeder i en trippelheliks. Det finnes minst ti ulike α -kjeder som gir opphav til kollagen type I, II, III, IV og V (Eskin 1990). Type I er mest vanlig i fisk. I fisk består tropokollagen type I enten

Tabell 2.1: Strukturelle proteiner, deres størrelse og funksjon i muskelcellen. Fritt etter Strasburg et al. (2008).

Protein	M_w (kDa)	Kjennetegn
Titin (Connectin)	4200	Fleksibelt, elastisk og filamentært protein, med lengde 1 μm som spenner halvparten av en sarkomer. Festet i Z- og M-linjen, og fungerer som en molekylær fjær som opprettholder den strukturelle ordningen av aktin og myosin. Når muskelen slapper av, gjenoppretter titin muskelens hvilende sarkomerlengde.
Nebulin	800	Forbundet med de tynne filamentene. Uelastisk, fungerer som et mål på lengden til de tynne filamentene.
α -actinin	97	Hovedkomponent i Z-disken med evne til å kryssbinde aktin og titin-filamenter fra nabosarkomerer. Kan også vekselvirke med andre proteiner i Z-disken, og gir styrke og integritet til Z-disken.
CapZ (β -aktinin)	α : 36 β : 32	Et heterodimerisk kutteprotein involvert i kjernedannelse og stabilisering av aktinfilamenter.
Tropomodulin	40	Modifiserer lengden til de tynne filamentene ved å kutte de avrundede endene.
Desmin	55	Kryssbinder naboliggende myofibriller, og binder Z-diskene til sarkolemma.
Filamin (α , β , γ)	300	Lokalisert i periferien av Z-diskene, og er en viktig kobling mellom sarkolemma og det sarkomeriske cytoskjelettet.
C-protein H-protein	140 58	Myosinbindende proteiner lokalisert i A-båndene av de tykke filamentene. Binder og/eller retter inn de tykke filamentene i A-båndet.
Myomesin M-protein M-linjeproteiner	185 165	Fungerer som en plattform for binding av titin og myosin, og er viktig for strukturell integritet. Kreatin kinase er en annen del av M-linjen, og regenererer ATP.

2.3. FUNKSJONELLE EGENSKAPER TIL MUSKELPROTEINER KAPITTEL 2. TEORI

av $\alpha_1\alpha_2$, eller $\alpha_1\alpha_2\alpha_3$, avhengig av vevstype og område i vevet (Bremner 1992). En gjennomsnittlig α -polypeptidkjede består av omtrent tusen aminosyrer, der den dominerende sekvensen er $(\text{Gly-X-Y})_n$. X er ofte prolin og Y er ofte hydrokysprolin eller hydrokyslysin. Denne repeterende sekvensen gir opphav til en utstrakt polypeptid- α -kjede som danner en venstrehendt heliks, og går sammen med to andre α -kjeder til dannelse av en høyrehendt trippelheliks, tropokollagen (Strasburg et al. 2008). Kollagen i fiskemuskel og -skinn skiller seg fra kollagen i storfe ved at de har lavere innhold av hydrokysprolinenheter og et signifikant høyere innhold av essensielle aminosyrer (Sikorski et al. 1990).

Kollagenpolypeptidene syntetiseres som forløpere, kalt prokollagen, av cellene i grunnsubstan- sen. Disse skilles ut til den ekstracellulære matriks hvor proteinaser kløyver propeptidene i hver ende, slik at tropokollagen dannes. De N- og C-terminale endene i tropokollagenmolekylene – kalt teleopeptidområdene – mangler den karakteristiske Gly-X-Y-sekvensen, og det dannes dermed ikke en trippelheliks i disse områdene. Via teleopeptidområdene vil tropokollagenmono- merene automatisk danne divalente kryssbindinger med andre tropokollagenmonomere og danne en kollagenfibrill. Disse divalente kryssbindingene er reduserbare. I pattedyr omdannes de diva- lente kryssbindingene til mer stabile, ikke-reduserbare trivalente kryssbindinger når dyret eldes, og det dannes flere kryssbindinger, noe som medfører økt seighet (Strasburg et al. 2008).

I fisk er forholdet mer komplisert, da kollagenmengden i en art er sesongavhengig (Bremner 1992). Fiskemuskel inneholder vanligvis kun en tidel av mengden kollagen i rødt kjøtt (Eskin 1990). Dessuten er kollagen i fisk generelt mer løselig enn i pattedyr (Bremner 1992), så seighet er et mindre problem i fiskeforedling enn kjøttforedling (Eskin 1990). De mekaniske egenskapene til bindevev avhenger av størrelse, orientering og kryssbinding av kollagen- og elastinfibre i tillegg til sammensetning av alle de andre komponentene i bindevevet. I epi- og perimysium dominerer kollagen type I, mens i endomysium dominerer type III, IV og V (Eskin 1990).

2.2.5 Ulike muskelfibre

De fleste fiskearter har to ulike typer muskelvev: Røde fibre for langvarig rolig svømming, og hvite fibre for kortvarig, men rask svømming (figur 2.2b) (Videler 2011). I fisk utgjør den hvite muskelen størsteparten av muskelen. I tillegg til røde og hvite fibre fins en tredje fibertype som er en blanding av disse. De røde fibre er trege og aerobe og har god utholdenhet. De reagerer på enkeltstimuli, grunnet en høy tetthet av nerveender på fibre, mens de hvite fibre er raske og blir fort utslitte fordi de bruker anaerobe metabolske spor. Den hvite fargen skyldes et fravær av myoglobin, og muskelen inneholder få mitokondrier. Hvite fibre kan bli opp til 300 μm i diameter. De røde fibre befinner seg oftest rett under huden, og kan stå for opp til 15% av total muskel i aktiv fisk, for eksempel makrell. Rødfargen skyldes myoglobin og høye konsentrasjoner av mitokondrier. Røde fibre har en diameter på mellom 20 og 50% av hvite fibres diameter (Videler 2011).

2.3 Funksjonelle egenskaper til muskelproteiner

De funksjonelle egenskapene til muskelproteiner refererer til proteinenes fysiske og kjemiske egenskaper og hvordan disse påvirker oppførselen til proteinene i matsystemer under fored- ling, lagring, tilberedelse og konsum. Funksjonelle egenskaper til proteiner involverer løselighet, evne til vannbinding, geldanning, emulgering, skumdanning, binding av fett og smak/aroma,

kohesjon-adhesjon og elastitet (Damodaran 2008). I denne sammenhengen er de tre førstnevnte viktigst, og i de følgende avsnittene vil det derfor være fokus på disse.

2.3.1 Løselighet

Løselighet kan defineres som den prosentvise mengden protein som holdes i løsning eller i en kolloidal dispersjon under gitte forhold, og som ikke sedimenteres eller feller ut ved moderate sentrifugalkrefter. Løselighet påvirkes av miljømessige forhold, slik som pH, temperatur, salter og vekselvirkninger med andre matkomponenter. Minst løselighet observeres vanligvis i det isoelektriske området, men dette kan endres med salter (Skaara & Regenstein 1990). Hydrofobe vekselvirkninger øker protein-proteinvekselvirkninger og resulterer i redusert løselighet, mens ionevekselvirkninger øker protein-vannvekselvirkninger og øker løselighet (Kristinsson & Rasco 2000). Muskelproteiners løselighet er viktig for egenskapene til fiskeprodukter, fordi de påvirker produktets gelings- og vannbindingsevne – noe som er viktig både økonomisk og for produktets tekstur. Løselighet er også viktig for fortyknings-, skumdannings-, og emulgeringsevne til proteinene (Damodaran 2008). Salters påvirkning på løselighet og andre funksjonelle egenskaper vil bli gjennomgått i avsnitt 2.5.

Myosin ekstraheres vanligvis fra kvernet pre-rigorkjøtt med salt- og fosfatløsninger på 0,5 M og rundt pH 7. Under fysiologiske forhold vil den stavlignende halen til myosin vekselvirke med halene til andre myosinmolekyler, og vil i de pH-områder som vanligvis benyttes i mat være uløselig i vann og saltløsninger med lave ionestyrker. For å løse ut myosin, må vekselvirkningen mellom halene minimeres. Dette kan gjøres ved å benytte løsninger av salter og fosfater med høy ionestyrke, og/eller bruke saltløsninger med høy ionestyrke samtidig som pH økes. (Rodger & Wilding 1990). Ved ionestyrker $> 0,25$ M vil de tykke filamentene gradvis dissosiere til myosinmolekyler. Ved høye saltkonsentrasjoner ($> 0,6$ M) løses myosinfilamentene opp (Puolanne & Halonen 2010).

Aktin er mindre løselig enn myosin, og Puolanne & Halonen (2010) hevder at aktinfilamentet ikke løses ut selv i 2,7 M NaCl eller KCl ved romtemperatur. Hultmann & Rustad (2002) rapporterte derimot at myosin og aktin var de dominerende proteinene når saltløselige proteiner ble ekstrahert fra laks og torsk, med fosfatbuffer med KCl (0,05 M fosfat; 0,6 M KCl; 0,5% triton X-405; pH 7).

Aktomyosin har egenskaper som ofte svarer til egenskapene til myosin. Det kreves høyere ionestyrke for å ekstrahere aktomyosin enn myosin ved $\text{pH} > \text{pI}$ (Morley 2012, Rodger & Wilding 1990).

Kollagen er som tidligere nevnt praktisk talt uløselig, men ved ekstreme pH-verdier ($3 > \text{pH} > 9$) kan kollagen svulle og oppløses (Rodger & Wilding 1990).

2.3.2 Geldannelse

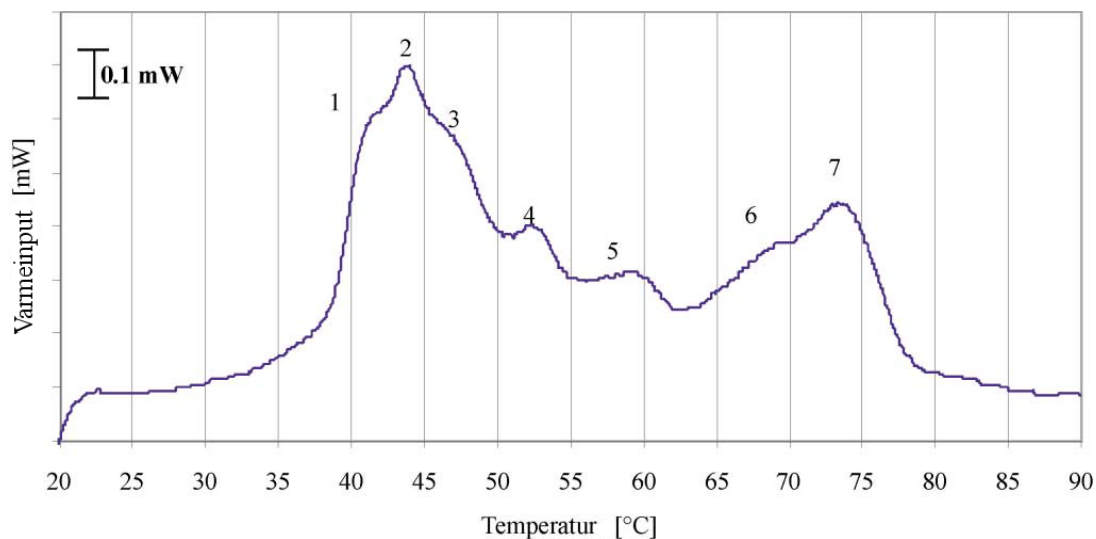
En gel er en tilstand mellom en væske og et fast stoff. Teknisk defineres en gel som et vesentlig fortynt system som ikke utviser noen steady-stateflyt (Damodaran 2008). Proteiners

2.3. FUNKSJONELLE EGENSKAPER TIL MUSKELPROTEINER KAPITTEL 2. TEORI

geldannelse er en fysiokjemisk prosess som foregår i restrukturerte og kvernedede fiskeprodukter. Geldannelse er viktig for adhesjon av muskelbiter og -partikler, men også for vann-, fett- og smak/aromabinding i varmebehandlede produkter. Geldannelse er i stor grad avhengig av delvis denaturering av proteiner, så det påfølgende underavsnittet vil omhandle proteindenaturering.

Denaturering

Denaturering kan defineres som en fysisk eller intramolekylær reorganisering som ikke involverer hydrolyse av kjemiske bindinger, men som innebærer en endring i molekylær form eller størrelse, nedgang i løselighet (i noen tilfeller økt), økning i kjemiske grupperes reaktivitet og tap av biologisk aktivitet (Lawrie & Ledward 2006). Entropi er den største drivkraften for proteindenaturering. Et fullt denaturert og hydrert protein i form av en tilfeldig kveil karakteriseres av en høy entropiverdi, mens det omliggende vannet har tilsvarende lav entropi. Det skyldes den ordnede strukturen vannmolekylene har når de hydrerer de polare gruppene på proteinet samt de svært organiserte vannstrukturene nært de hydrofobe gruppene. Dannelse av en α -heliks eller β -konformasjon senker entropien til proteinet betraktelig, og prosessen kan bare være spontan dersom entropien øker tilsvarende eller mer for vannmolekylene som frigis når det dannes hydrofobe bindinger, H-bindinger eller det skjer ionevekselvirkninger i proteinet (Sikorski et al. 1976). Det er rapportert at torskemyosin både denaturerer ved $43,5^{\circ}\text{C}$ (Thorarinsdottir et al. 2002) og ved $46 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Chan et al. 1992). Et DSC-termogram med oversikt over denaturering av torskemuskelproteiner er vist i figur 2.7.



Figur 2.7: DSC-termogram av muskelproteiner fra fersk torsk. Termiske overgangstilstander for torskemyosin er vist i toppene 1, 2 og 4, og overgangstilstanden til G-aktin er angitt av topp 7. Toppene merket med 3, 5, og 6 er termiske overgangstilstander for de sarkoplasmiske proteinene. Denatureringstemperaturer (T_{max}) for myosin, G-aktin og sarkoplasmiske proteiner er henholdsvis $43,5$, $73,6$ og $59,3$ °C (Thorarinsdottir et al. 2002).

Varmeindusert gelning av myosin

Geldanning er en sekvensiell prosess med tre overordnede steg (Strasburg et al. 2008). I første steg skjer en utfolding (denaturering) av individuelle molekyler til dannelse av en såkalt progel (Damodaran 2008). Dette etterfølges av aggregering, som i stor grad skjer gjennom hydrofobe

vekselvirkninger. I det siste steget kryssbindes små proteinaggater til fine tråder, som tilslutt vil føre til et kontinuerlig viskoelastisk nettverk (Strasburg et al. 2008). Proteingeler er svært hydrerte systemer, og kan inneholde opp til 98% vann (Damodaran 2008). Myofibrillproteinene er gode geldannere, og er viktige for å danne de ønskede teksturegenskapene til muskelmat. Av myofibrillproteinene er det i stor grad myosin (pre-rigor) og aktomyosin (post-rigor) som har geldanningsevne (Strasburg et al. 2008). G-aktin, som er globulært og en tiendedel av størrelsen til myosin, er en dårligere gelningskomponent. Den kan likevel forsterke myosingeler når myosin-aktinforholdet (v/v) er omtrent 24 (Strasburg et al. 2008). Rollen til G-aktin og F-aktin i gelningsprosessen er omdiskutert, men det er vist at F-aktin kan øke viskositeten og senke elastiteten til gelsystemet (F-aktin:myosin = 0,061) (Stone & Stanley 1992). For å kunne danne en gel, må myofibrillproteinene ekstraheres, og dette gjøres vanligvis med salter (Asghar & Samejima 1985).

Gelning av myosin begynner med utfolding av S1-området i HMM (Strasburg et al. 2008) (avsnitt 2.2.2). For torskemyosin skjer dette ved 33°C (Chan et al. 1992), og fører til hydrofobe bindinger mellom myosinmolekylene gjennom hode-til-hodevekselvirkninger og dannelse av oligomerer (Strasburg et al. 2008). Ved 42°C (Chan et al. 1992) koaleserer oligomerene og danner intermolekulære disulfidbindinger. Dette gir løsningen en elastisk karakter. Ved videre oppvarming vil det skje strukturendringer i stavområdet (LMM), som danner en åpen struktur som eksponerer hydrofobe områder og spesifikke sidekjeder. Myosinaggatene vil ved videre oppvarming bindes sammen via hale-til-halevekselvirkninger, og danne permanente tråder og filamentære gelnettverk med høy elastisitet og vannbindingsevne, som stabiliseres av disulfidbindinger (Strasburg et al. 2008). Egenskapene til gelen avhenger av saltkonsentrasjon og pH, og løsninger med pH nært myosinets pI vil danne geler som er ugjennomsiktig og ofte krymper og viser tegn til synerese. Ved konsentrasjoner som er høyere enn en kritisk myosinkonsentrasjon vil reologien til løsningen gradvis endres med tid, fra en viskøs væske til en gelliknende tilstand. Geldannelsen kan reverseres med skjærkraft (Rodger & Wilding 1990).

Kollagen og sarkoplasmiske proteiner

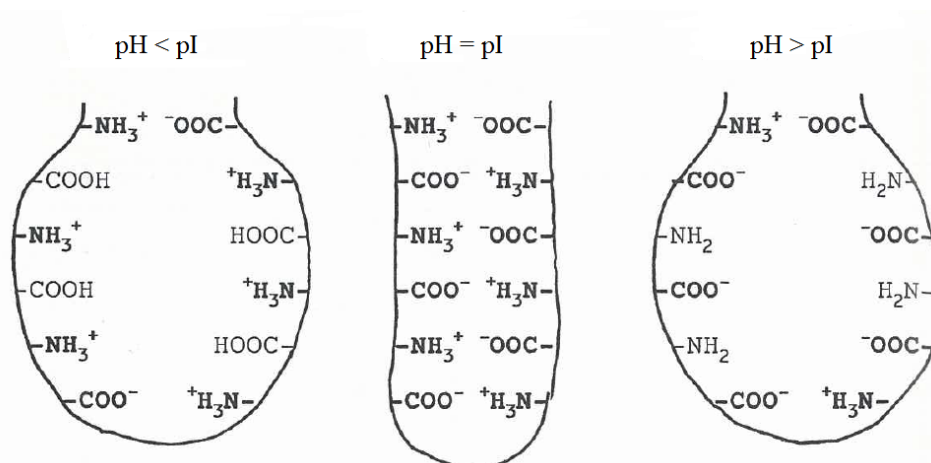
Bindevevsproteiner spiller en liten rolle i geldanningsprosessen i prosesserte kjøttprodukter, da dannelse av gelatin (denaturert kollagen) krever en lengre varmeperiode enn det som vanligvis benyttes i produksjon av muskelmat (Strasburg et al. 2008). Siden fisk generelt inneholder 1/10 av den mengden kollagen som fins i kjøtt, og kollagenet er mindre kryssbundet enn pattedyrkollagen, kan det dannes en signifikant mengde gelatin ved denatureringstemperaturen (kollagen fra myokommata i laks denaturerer ved 45°C) (Rodger & Wilding 1990). I industrielle produksjoner av for eksempel fiskepudding, hvor koketemperaturen kommer opp i mot 80°C i flere minutter, er det sannsynlig at det meste av kollagenet denatureres i løpet av koketiden. Gelatin er som kjent en svært god geldanner, og det forventes at gelatinet som dannes bidrar til gelegenskapene til produktet. Samtidig utgjør bindevevsproteiner kun 3-10% av det totale proteininnholdet i fisk, slik at dette bidraget uansett vil være lite, sammenlignet med bidraget fra myofibrillene. For sarkoplasmaproteiner er det hevdet at de bidrar lite til geldanningsprosessen, eller at de forstyrrer den. Dette skyldes at de koagulerer og ikke kan danne et ordnet funksjonelt nettverk (Strasburg et al. 2008, Kim et al. 2005). Også motsatte synspunkt er presentert. Kim et al. (2005) fant i sin studie ut at sarkoplasmiske proteiner bidrar til økt gelstyrke, mens Jafarpour & Gorczyca (2012) fant at effekten av sarkoplasmiske proteiner på geldanningsprosessen i surimi avhenger av vaskemetoden som blir brukt.

2.3.3 Vannbindingsevne

Vannbindingsevne (VBE) refererer til proteiners evne til å absorbere og holde på vann i en proteinmatriks, slik som fiskemuskel, som påvirkes av en ytre kraft. Dette vannet er summen av bundet vann, kapillært vann og fysisk fanget vann (Damodaran 2008). VBE er en av de viktigste sidene ved kvaliteten til kjøtt og fisk. VBE er tett knyttet til blant annet smak, mørhet, farge og tekstur. Endringer i VBE er dessuten en sensitiv indikator på endringer i ladninger og struktur til muskelproteiner. Fiskekjøtt inneholder opp til 80% vann, hvorav maksimum 4-5% er tett bundet til muskelproteinene (Hamm 1960). Dermed befinner hovedandelen av vann i muskel seg inne i myofibrillene mellom de tykke og de tynne filamentene. Det interfilamentære rommets størrelse er ikke konstant, men varierer med pH, sarkomerlengde, ionestyrke, osmotisk trykk og om muskelen er avslappet eller i rigor (Offer & Trinick 1983). Mengden tett bundet vann påvirkes lite av endringer i struktur og ladninger til proteiner, og endringer i VBE skyldes dermed ikke endringer i det fast bundne vannet. Endringer i muskelproteiners ladning og struktur påvirker bare det vannet som er fysisk fanget i proteinstrukturen. Dersom nettverket krymper, vil fysisk fanget vann presses ut, og dette vil senke VBE. Dersom nettverket sveller, vil det bli plass til mer vann og VBE øker (Hamm 1960).

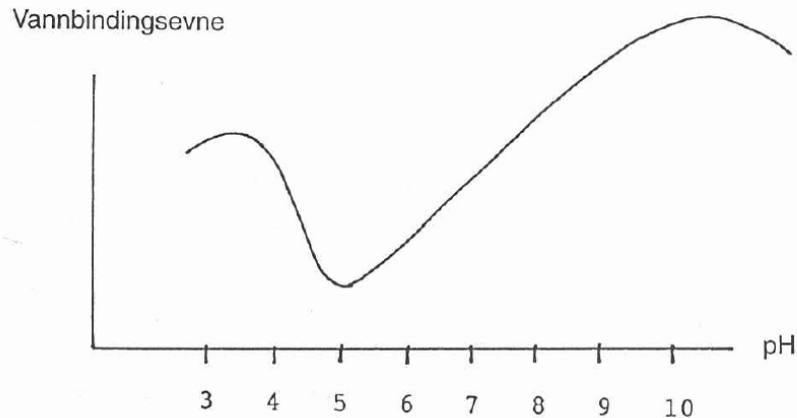
pH og proteinladning

Nettoladningen til et protein avhenger av pH i det omliggende miljøet, og kan bli positivt eller negativt ladd på grunn av tap eller opptak av hydrogenioner. Det isoelektriske punktet (pI) er den pH hvor proteinets nettoladning er 0. Ved $pH < pI$ vil de fleste karboksylgruppene være udisosierte og aminogruppene ioniserte, slik at proteinet bærer en netto positiv ladning. Ved $pH > pI$ er de fleste karboksylgruppene ioniserte mens aminogruppene er nøytrale, slik at proteinets nettoladning er negativ (figur 2.8). I begge tilfeller vil ladningsfrastøting føre til et



Figur 2.8: Innvirkning av pH på svelling av muskelfibre. Ved $pH < pI$, vil det være et netto antall positive ladninger, mens det ved $pH > pI$ vil være et netto antall negative ladninger (Lynum 1994).

svullet nettverk som kan holde mer vann. Lavest VBE i muskelvev oppnås nært pI til myosin, rundt pH 5 (Hamm 1960). Det skyldes at ved pI er ladningsfrastøtingen minimal, noe som medfører sterk protein-proteinvekselvirkning og et tett proteinnettverk, som har liten plass til å holde vann. pH har dermed en viktig betydning for VBE, og små endringer i muskel-pH kan gi store endringer i VBE (figur 2.9).



Figur 2.9: Vannbindingsevne (VBE) i muskelvev som en funksjon av pH. VBE er lavest nært det isoelektriske punktet til myosin (pH \sim 5) (Lynum 1994).

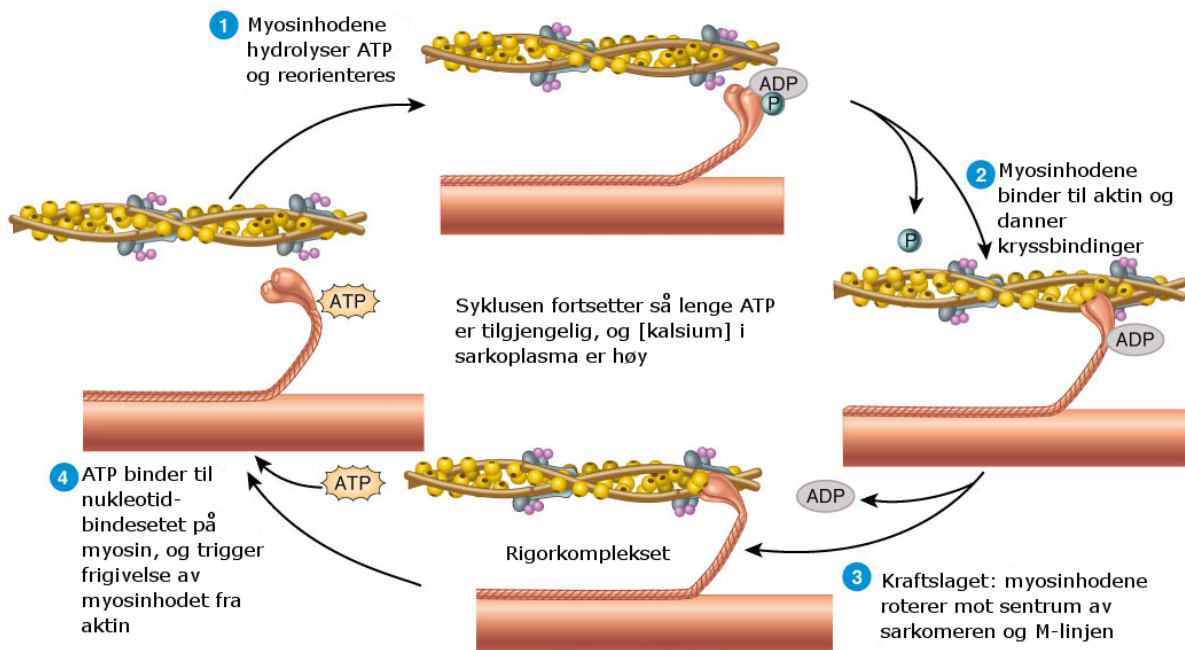
2.4 Post-mortale prosesser i muskelvev

Når en fisk slaktes, vil en rekke post-mortale reaksjoner foregå, blant annet muskelsammentrekning. Disse reaksjonene er viktig for kvaliteten til muskelvevet (Strasburg et al. 2008).

2.4.1 Muskelsammentrekning

En muskelcelle i hvile har en spenning over sarkolemma (SL) på -90 mV og en lav intracellulær Ca^{2+} -konsentrasjon ($<10^{-7}$ M). Tropomyosin forhindrer myosin-aktinkryssbindinger ved å dekke myosinbindesetet på aktinfilamentet (figur 2.6), slik at myosinhodene ikke kan binde. Når muskelcellen stimuleres av et motornevron, vil cellen depolariseres og endringen i membranpotensialet vil vandre langs SL. Det vil føre til at kalsiumkanaler i sarkoplasmisk retikulum (SR) åpnes, og kalsiumioner vil strømme fra innsiden av SR og ut til sarkoplasma. Ca^{2+} -konsentrasjon vil raskt stige til $>10^{-5}$ M. Ca^{2+} vil binde seg til TnC, som forårsaker en strukturendring i troponinkomplekset, som overføres til tropomyosin. Tropomyosin flytter seg dypere inn i aktinfilamentfordypningen, og myosinbindesetene på aktinmonomerene blir tilgjengelig, slik at aktin-myosinkryssbindinger kan dannes. I tillegg aktiverer Ca^{2+} myosinets ATPase, og ATP spaltes til $\text{ADP} + \text{P}_i$ omtrent samtidig med at myosin binder til aktin (figur 2.10). P_i frigis i det myosinhodet binder til aktin. Myosin er orientert i en vertikal stilling på dette tidspunktet, men frigivelse av P_i forårsaker en liten konformasjonsendring i myosinhodet, som forsterker bindingen av myosin til aktin. Dette etterfølges øyeblikkelig av en større konformasjonsendring i myosinhodet, som kalles kraftslaget. I kraftslaget drar myosinhodene aktinfilamentet langs det tykke filamentet, og myosinkryssbindingene roteres inn mot sentrum av sarkomeren og M-linjen. ADP frigis deretter fra myosinhodet, og ATP binder til det tomme nukleotidbindesetet og trigger frigivelse av myosinhodet fra aktin. Syklusen kan nå gjentas. For hver kontraksjonssyklus vil avstanden mellom Z-diskene bli kortere (Strasburg et al. 2008).

Så lenge stimuleringen av muskelnevronene opprettholdes, vil kontraksjonssyklusen med myosinbinding, kraftslag og myosinfrigivelse fortsette. Når stimuleringen opphører, vil Ca^{2+} -konsentrasjonen reduseres til hvilekonsentrasjon ved at en kalsiumpumpe pumper kalsium fra sarkoplasma tilbake til SR. TnC vil som en følge av den lave Ca^{2+} -konsentrasjonen gjennomgå en strukturell



Figur 2.10: Muskelkontraksjonssyklus (fritt etter Tortora & Derrickson (2006)).

endring tilbake til hviletilstanden, og dermed vil også tropomyosin gå tilbake til sin posisjon på aktinfilamentet, og dekke over myosinbindesetet på aktin. Dette fører til muskelavslapning (Strasburg et al. 2008).

2.4.2 Biokjemiske reaksjoner post-mortem

ATP og energireserver

Levende muskelvev har et godt utviklet metabolsk system egnet for å støtte de ulike muskelfunksjonene, samt å opprettholde cellulær homeostase. Blodsirkulasjonen til muskelvevet leverer oksygen og energisubstrater, og fjerner karbondioksid og avfallsprodukter, mens ATP virker som en kilde til kjemisk energi for omdannelse til mekanisk energi (Strasburg et al. 2008). Når fisken slaktes, er blodsirkulasjonen det første som stopper opp. Oksidasjon-reduksjonspotensialet vil dermed synke, og cytochromsystemet vil slutte å fungere, slik at resyntese av ATP fra denne kilden vil stoppe (Lawrie & Ledward 2006). Aerob metabolisme vil fortsette så lenge myoglobinbundet oksygen er tilgjengelig. Så lenge ATP-nivåene er høye vil de generelle fysiologiske kravene til muskelen tilfredsstilles, og i denne tidlige fasen (prerigorfasen) har muskelvevet egenskaper som ligner levende muskel (Strasburg et al. 2008). Når tilgjengelig oksygen er brukt opp, vil de ulike muskelvevene fortsette anaerob metabolisme – deriblant glykolyse. Muskelen vil ikke aktivt drive sammentrekning, men energi vil brukes til å opprettholde temperatur og strukturell integritet (Lawrie & Ledward 2006). Kreatin-fosfat (CrP) fungerer som en energireserve, og ved hjelp av kreatin kinase overføres en fosfatgruppe til ADP, og regenererer slik ATP. Noe ATP vil også regenereres av adenylat kinase, men nivåene av ATP vil etterhvert synke fordi glykolyse og energireservene ikke kan produsere nok ATP. I tillegg vil nedgang i ATP-nivåene føre til at kalsiumpumpens aktivitet blir begrenset. Nivået av Ca^{2+} i sarkoplasma vil dermed ikke kunne holdes i lave hvilekonsentrasjoner, noe som stimulerer muskelsammentrekning, og et enda raskere forbruk av ATP (Strasburg et al. 2008). Dette vil føre til at myosin ikke kan dissosiere fra

aktin, og rigorkomplekset aktomyosin (figur 2.10) vil dannes i takt med at ATP-nivåene blir lavere. Muskelvevet går inn i rigorfasen, og blir gradvis mer stivt (Lawrie & Ledward 2006). I fisk begynner rigorfasen 1-7 timer etter døden, og mange faktorer, slik som art, temperatur og fangstmetode, påvirker tiden det tar før rigor inntreffer, samt varigheten av den. Røff behandling av fisken vil føre til en kortere pre-rigorfase på grunn av at ATP forbrukes raskt (Sigholt et al. 1997). En høy kroppstemperatur vil føre til en kortere rigorfase. Dette skyldes at hastigheten til enzymatiske nedbrytingsreaksjoner vil øke med økende temperatur. En lang rigorfase gir lengre holdbarhet for fisken, og det er derfor viktig at fisken kjøles raskt ned til rundt 0°C (Eskin 1990).

Produksjon av melkesyre og pH-fall

Når glykogen brytes ned dannes melkesyre, noe som vil redusere pH i muskelvevet. Dessuten vil hydrolyse av ATP føre til akkumulering av hydrogenioner, som også vil redusere pH (Strasburg et al. 2008). Senket pH vil gjøre at muskelproteinene lettere denatureres, noe som fører til tap av VBE. Dessuten vil pH i muskelen gradvis nærme seg det isoelektriske punktet (pI) til myofibrillproteinene, som gjør muskelnettverket tettere og i mindre stand til å holde på vann. Dette har viktige økonomiske konsekvenser for produsentene. Nedbryting av proteiner til peptider og aminosyrer, og akkumulering av metabolitter fra den glykolytiske prosessen, vil være et rikt medium for bakterier. Selv om pH-fallet vil virke negativt på vekst av bakterier, vil det ikke lenger være noe immunsystem som forhindrer vekst (Lawrie & Ledward 2006). Hvor stort pH-fallet vil være og hva slutt-pH blir, avhenger av art og type muskel, og påvirkes i stor grad av behandling av fisken før slakting. Fisk som er stresset før slakting vil få et raskere pH-fall og ha lavere muskel-pH rett etter døden enn uthvilt fisk. Det skyldes at fisken vil benytte seg av anaerob metabolisme under stresspåvirkning og produserer melkesyre. H⁺-ioner genereres også som en følge av nedbryting av ATP, og dette vil bidra til lavere muskel-pH. Det har vært foreslått at glykogennivåene i det døde inntreffer vil bestemme slutt-pH til fisken (Sigholt et al. 1997), men den vil sjelden bli lavere enn 6 (Eskin 1990).

2.4.3 Degradering av muskelproteiner

Den siste post-mortemfasen er oppløsning av rigor. Varigheten av denne fasen varierer, og påvirkes av stress før slakting, prosess, temperatur og art. Gjennom oppløsningsfasen blir muskelvevet gradvis mer tøyelig og mer mørt. I hovedsak skyldes disse endringene proteolytisk ødeleggelse av strukturen til myofibrillene (Strasburg et al. 2008) og bindevevet, samt hydrolyse av fett (Delbarre-Ladrat et al. 2006), men ikke oppløsning av aktomyosin (Lawrie & Ledward 2006). Det er særlig Z-diskene som taper strukturell integritet (Strasburg et al. 2008). Under post-mortemforhold er proteiner mest utsatt for denaturering dersom pH senkes til lavere nivå enn *in vivo*-nivå, ved temperaturer over 25°C eller under 0°C, under tørking og ved ikke-fysiologiske saltkonsentrasjoner. Under lagringsprosessen frigis aktin fra Z-linjen (Lawrie & Ledward 2006), noe som skyldes aktiviteten til muskelproteasene μ -kalpain, *m*-kalpain og kalpain 3. Kalpainene aktiviseres av kalsium, og er mest aktive i nøytralt pH-område. I tillegg reguleres kalpainene av fosfolipider og kalpastatin – en kalpainspesifikk proteininhibitor. Kalpainene er konsentrert i Z-diskene, og når Ca²⁺-konsentrasjonen øker post-mortem, aktiveres i hovedsak μ -kalpain og *m*-kalpain, og initierer degradering av Z-diskassosierte muskelproteiner som troponin-T, titin, nebulin, C-protein, desmin, filamin, vinculin og synemin. Når Z-diskene er nesten helt ødelagt frigis aktin og myosin, samt andre proteiner fra sarkomerene, passivt og blir substrater for andre

proteolytiske enzymer (Strasburg et al. 2008). Katepsiner er lysosomale proteiner som er aktive ved sur pH ($> \text{pH } 6$ for noen), og virker antagelig synergistisk og komplementært sammen med kalpainene i myofibrilldegraderingsprosessen (Delbarre-Ladrat et al. 2006). Proteosomer degraderer de frigitte muskelproteinene (Strasburg et al. 2008).

Endringer i kollagen og bindevev

Teksturendringene som skjer post-mortem i muskelvevet til fisk påvirkes også av endringer i kollagen og bindevev. Muskelfibrene kobles av endomysiumet innen 24 timer etter slakting, og skyldes aktiviteten til kalpainer på cytoskjelettproteiner, og ikke degradering av bindevevet. Kollagenfibriller i perimysium ødelegges og blir uorganisert, slik at volumet mellom fibrene øker. Kollagen i overgangen mellom myokommata og muskelbuntene degraderes, slik at muskelbuntene løsner fra myokommata. Dette skjer etter omtrent 5 dagers lagring (Delbarre-Ladrat et al. 2006). Nedbrytingen av kollagen skyldes aktiviteten til enzymer. Kollagen i pattedyr degraderes av flere enzymer som virker sammen (Bremner 1992). En av disse er kollagenase, som er en matriks-metalloprotease (MMP) (Delbarre-Ladrat et al. 2006) som angriper udenaturerte kollagenmolekyler og bryter dem ned til mindre fragmenter, som andre enzymer virker på. Kollagenasene har en optimums-pH på 7-8. De aktiviseres av kalsiumioner og proteolytiske enzymer som trypsin og katepsin B, og sistnevnte frigis av ødelagte lysosomer post-mortem. Det er usikkert om disse mekanismene gjelder for fiskemuskelvev, og om enzymene er aktive ved post-mortem pH (Bremner 1992). Andre MMP'er kan bryte ned cytoskjelettproteiner som binder sarkolemma til den ekstracellulære matriks (Delbarre-Ladrat et al. 2006).

Degraderingsprosessen av muskelproteiner post-mortem påvirkes også av miljømessige faktorer. Under rigor mortis øker ionestyrken som en følge av endret osmotisk trykk, og kan bli høy nok til å svekke myofibrillstrukturen, slik at den blir mer utsatt for proteolyse. Produksjon av frie radikaler og nitrogenoksid kan gjøre komponenter i muskelen mer utsatt for proteaser og svekke den generelle myofibrillstrukturen (Delbarre-Ladrat et al. 2006).

2.4.4 Vannbindingsevne post-mortem

Like etter slakting vil VBE i muskelvevet være god. I det glykolysen begynner, vil pH begynne å synke og nærme seg pI for myosin. VBE vil synke i hele denne fasen i takt med at pH blir lavere, og når et minimum i rigorfasen. I rigorfasen er muskelvevet dessuten sammentrukket og tett, og dette vil også bidra til lav VBE. I oppløsningen av rigor vil degradering av muskelproteiner, da særlig i Z-disken, medføre et løsere muskelnettverk som kan holde mer vann, og VBE går opp. Slutt-pH er høyere i fisk enn i pattedyrmuskel, og fiskemuskel vil dermed ha en høyere VBE enn pattedyrmuskel (Strasburg et al. 2008, Eskin 1990). VBE kan økes ved tilsats av salt. Detaljer rundt dette fins i avsnitt 2.5.1.

2.5 Salt

Egenskapene til proteiner, slik som løselighet, stabilitet og biologisk aktivitet, påvirkes av salter – både av type salt og konsentrasjon (Arakawa & Timasheff 1984). Ved lave ionestyrker ($< 0,5 \text{ M}$) nøytraliserer ioner ladninger på overflaten til proteiner. Ionestyrken til en saltløsning defineres som

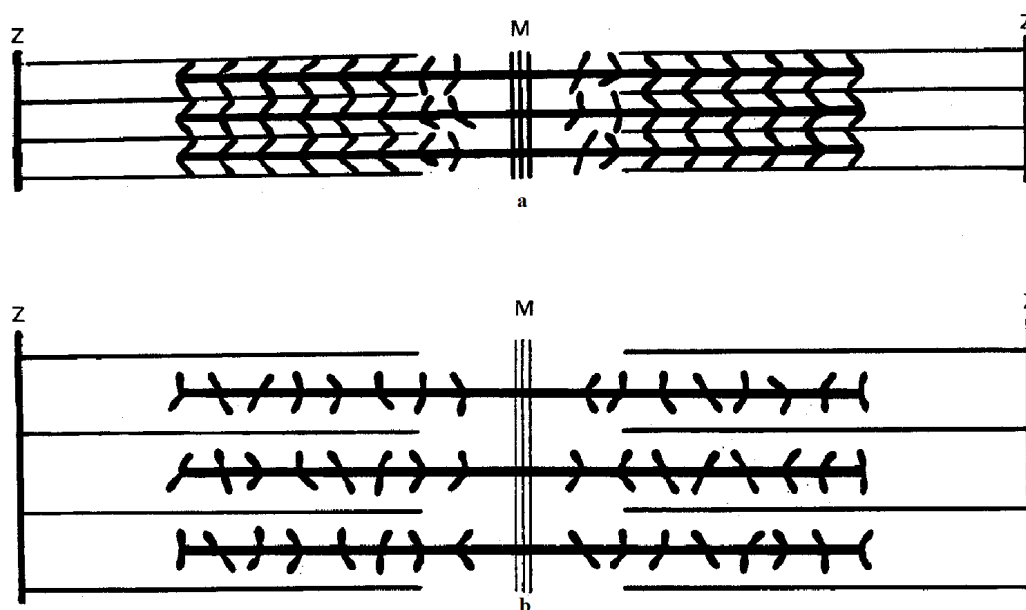
$$\mu = 0,5 \sum_i C_i Z_i^2, \quad (2.1)$$

hvor C_i er konsentrasjonen til ion i , og Z_i er valensen. Ladningsnøytraliserings påvirker løselighet på to måter, avhengig av egenskapene til proteinets overflate. Løseligheten synker for de proteinene som har mange upolare områder, mens den øker for de som ikke har det. Ved høye ionestyrker ($> 1,0$ M) har salter ionespesifikke effekter på proteinløselighet og stabilitet, som avhenger av type salt og konsentrasjon – i henhold til Hofmeisterserien (Zhang & Cremer 2006, Arakawa & Timasheff 1984, Damodaran 2008). Ved konstant ionestyrke vil anioner øke løselighet i rekkefølgen $\text{SO}_4^{2-} < \text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{ClO}_4^- < \text{SCN}^-$, mens kationene senker løseligheten i rekkefølgen $\text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$ (Damodaran 2008). Den ionespesifikke effekten er størst for anioner (Puolanne & Halonen 2010, Damodaran 2008). Anionene til venstre for Cl^- kalles kosmotrofe, og disse anionene senker løseligheten (utsalting), men øker stabiliteten til proteinet. Anioner til høyre for Cl^- er kaotrofe, og destabiliserer foldede proteiner og øker løseligheten (innsalting) (Zhang & Cremer 2006). Kationene til venstre er kaotrofe, mens kationene til høyre er kosmotrofe. Optimal stabilisering (minst løselighet) av et protein oppnås med et salt som består av et kosmotroft anion og et kaotroft kation, mens destabilisering (størst løselighet) oppnås med et kaotroft anion og et kosmotroft kation (Puolanne & Halonen 2010), slik som NaCl.

2.5.1 Vannbindingsevne

Det er kjent at tilsetning av salt i muskelvev øker VBE ved $\text{pH} > \text{pI}$. Denne effekten skyldes i hovedsak binding av Cl^- -ioner til myofilamentene, som vil øke den totale negative ladningen til filamentene (Offer & Trinick 1983). Cl^- er et lite, svakt hydrert kaotroft anion og danner ionepar med de positivt ladde kaotrofe gruppene arginin, histidin og lysin-enhetene i myosinfilamentet. Dessuten akkumulerer Cl^- i protein-vann-kontaktflaten, og gjør proteinet mer hydrofilt. Det er også mulig at Cl^- -ioner adsorberes til hydrofobe (leucin, valin, og alanin) og ikke-polare (arginin, histidin og lysin) aminosyresidekjeder på utsiden av myosinfilamentet, i tillegg til i den hydrofobe kjernen av myosinfilamentet. Dette skyldes at kaotrofe forbindelser frastøtes av vann, og at kaotrofe anioner kan adsorberes til ikke-polare overflater (Puolanne & Halonen 2010). Det vil dermed bli elektrostatisk frastøting mellom filamentene, som forårsaker svelling (Offer & Trinick 1983) (figur 2.11).

Natriumionenes rolle i svelling og vannbinding er ikke helt avklart, men det er foreslått (Offer & Knight 1988, ikke sett – sitert etter Puolanne & Halonen 2010, Ruusunen & Puolanne 2005) at elektrostatisk krefter trekker motionene (natriumionene) nært filamentoverflaten og skaper en ujevn fordeling av ioner i vannfasen. Dette skaper en osmoselignende kraft i filamentnettverket som trekker vann inn i systemet. Natriumionene binder til den N-terminale enden av F-aktin, som er svært negativ, mens anioner vil frastøtes. Natriumionene vil også kunne binde til de negativt ladde karboksylgruppene i myosinfilamentene, og vil dermed nøytralisere en del negative ladninger, og slik redusere frastøtingen i filamentnettverket. Kloridionenes bidrag vil likevel være størst, da de også kan binde til upolare og hydrofobe områder i myosinfilamentet (Puolanne & Halonen 2010). Sammen med den foreslåtte osmosekraften vil resultatet bli økt svelling og VBE. For en detaljert forståelse av de komplekse prosessene som foregår når kationer og anioner binder til muskelproteiner, er blant annet Hofmeisterserien viktig. En grundigere gjennomgang er gitt av Puolanne & Halonen (2010).

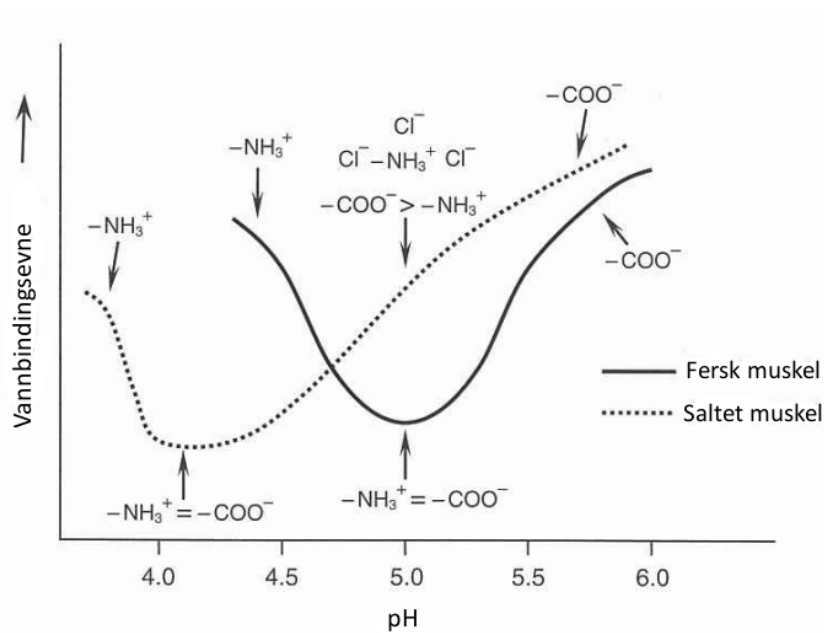


Figur 2.11: Skjematisk fremstilling av en sarkomer og kryssbindinger mellom aktin- og myosinfilamenter. a) Usvellet filamentnettverk i ubehandlet kjøtt. Kryssbindingene motstår sammen med M- og Z-linjene svelling. b) Svellet nettverk som følge av oppløsning av kryssbindinger ved høye salt- og fosfatkonsentrasjoner (Offer & Trinick 1983).

Kryssbindingene mellom de tynne og de tykke filamentene, samt Z- og M-linjene, begrenser svelingsgraden (Offer & Trinick 1983). Økende konsentrasjoner av NaCl vil forårsake depolymerisering av de tykke filamentene til myosinmolekyler, og vil forstyrre bindingen av myosinhodene til aktin (figur 2.11). Binding av myosinhodene til aktin stabiliseres dersom myosinstavene er polymerisert. Likeså vil oppløsningen av myosinstavene inhiberes dersom myosinhodene fortsatt er bundet til de tynne filamentene. Denne gjensidige avhengigheten gjør svelling til en kooperativ hendelse, slik at når kryssbindingene dissosierer, gjør de det samtidig. Når dette skjer, vil ryggraden til det tykke filamentet (M-linjen) destabiliseres og depolymerisering vil skje (Offer & Trinick 1983). Mengden vann som bindes er dermed avhengig av nettoladningen på proteinene, samt antall og styrke til kryssbindingene som forhindrer svelling (Ruusunen & Puolanne 2005). Selv om svelling i myofibriller kan foregå når kryssbindingene mellom aktin og myosin fjernes, vil maksimum svelling være avhengig av at Z-linjen også svekkes. NaCl-konsentrasjonen som er nødvendig for maksimal svelling og størst VBE er 1 M. Med pyrofosfat kreves bare 0,4 M NaCl, så pyrofosfat har en synergistisk effekt på vannbinding. Ved svært lave saltkonsentrasjoner (< 0,1 M) vil en økning i saltkonsentrasjonen føre til sammentrekning av filamentnettverket på grunn av ladningsnøytralisering (Offer & Trinick 1983). Høye ionestyrker vil redusere VBE på grunn av en utsaltingseffekt, som skyldes vannbinding av saltet og dehydrering av proteinet (Martínez-Alvarez et al. 2005). Over 9-10% NaCl vil proteiner kunne denaturere, noe som kan medføre sterkere protein-proteinvekselvirkninger, dehydrering og krymping av muskelen (Thorarinsdottir et al. 2002).

Effekten av salt på VBE er avhengig av både pH, som nevnt, og saltkonsentrasjon. Ved $\text{pH} < \text{pI}$ vil Cl^- -ionene nøytralisere aminogruppene, slik at ladningsfrastøtingen blir minimal og filamentnettverket tettere. Ved $\text{pH} > \text{pI}$ og ved høye konsentrasjoner av NaCl (> 2%) vil myosinets pI forflyttes til en lavere pH på grunn av Cl^- -ionenenes nøytralisering av positive ladninger, som illustrert i figur 2.12. Ved 2% NaCl er myosinets $\text{pI}=4$ (Ruusunen & Puolanne 2005). Dermed vil myosin bære flere ladninger ved de pH-verdier som er mest vanlig i muskel, og en høyere

VBE oppnås (Strasburg et al. 2008).



Figur 2.12: Skjematisk fremstilling av forholdet mellom pH og VBE i ferskt og saltet muskelvev. Ladningsnøytralisering av kloridionene på positive aminogrupper i myosin fører til en forflytning av myosinets pI (Strasburg et al. 2008).

Effekt av ulike typer salt med monovalente ioner

Det er vist at KCl kan senke proteinløselighet i fiskemuskel (Kolodziejska & Sikorski 1980, ikke sett – sitert etter Martínez-Alvarez et al. 2005), noe som sannsynligvis skyldes at KCl har en evne til å aggregere myosin (Thorarinsdottir et al. 2002). Martínez-Alvarez et al. (2005) har funnet en positiv korrelasjon mellom K^+ -innhold og muskelhardhet i lakesaltet (pH 8,5) torsk, og de antar at dette kan skyldes aggregeringseffekten av KCl. I tillegg viser deres resultater at en reduksjon av natrium til fordel for kalium gav et mer hydrert produkt (lavere tørrstoffinnhold) og en lavere mengde ekstrahert vannløselig protein når fisken ble saltet med en lake-pH på 8,5. Ved pH 6,5 hadde ikke KCl denne effekten. Ekstraksjonsevnen til ulike salter (NaCl, KCl og LiCl) av proteiner i fiskemuskel ble undersøkt av Munasinghe & Sakai (2003). Forskjellige ionestyrker og pH ble sammenlignet for å finne den beste ekstraktanten. Den optimale ionestyrken ved pH 7 for proteinekstraksjon med NaCl, KCl og LiCl var henholdsvis 0,8, 0,9 og 1,0. Ekstraksjon med KCl og LiCl krevde altså høyere ionestyrke enn med NaCl. Dessuten ekstraherte NaCl mer protein enn LiCl og KCl. For NaCl-ekstraktene ble det også oppnådd tydeligere bånd når proteinene ble analysert med SDS-PAGE, og bånd med bedre oppløsning enn de to andre saltene (Munasinghe & Sakai 2003).

Effekt av salt med divalente ioner

Divalente kationer, slik som kalsium og magnesium, binder sterkt til polare grupper i proteiner, og forsterker protein-proteinvekselvirkninger og aggregering ved pH 6,5. Aggregering vil øke med økende konsentrasjoner. Dette forhindrer inntrenging av kloridioner inn i muskelvevet, og

påvirker VBE negativt. Effekten er mindre fremtredende når pH er 8,5, noe som kan skyldes at proteinene foldes ut til en viss grad når pH beveger seg bort fra pI, slik at kloridionene lettere trenger inn i muskelvevet (Martínez-Alvarez et al. 2005).

2.5.2 Effekt av salt på termisk stabilitet av muskelproteiner

Det er vist i forsøk med lakesalting av torsk – der konsentrasjonen av NaCl i muskelen har nådd 7% – at høye konsentrasjoner av salt senker den termiske stabiliteten til myosin og aktin signifikant. Proteinene denaturerer ved signifikant lavere temperaturer, og det kreves også mindre energi enn i fersk, usaltet fisk. I en tidligere studie utført av Wu et al. (1985) (ikke sett – sitert etter Thorarinsdottir et al. (2002)) på fisken *Genyonemus lineatus* ble det vist at tilsats av 3% salt forflyttet denatureringstemperaturen i myosin, aktin og de sarkoplasmiske proteinene fra henholdsvis 43, 71 og 54°C, til 37, 66 og 51°C. I myosin er den tunge kjeden som er mest sårbar for denaturering ved høye saltkonsentrasjoner (Thorarinsdottir et al. 2002).

2.5.3 Saltreduksjon

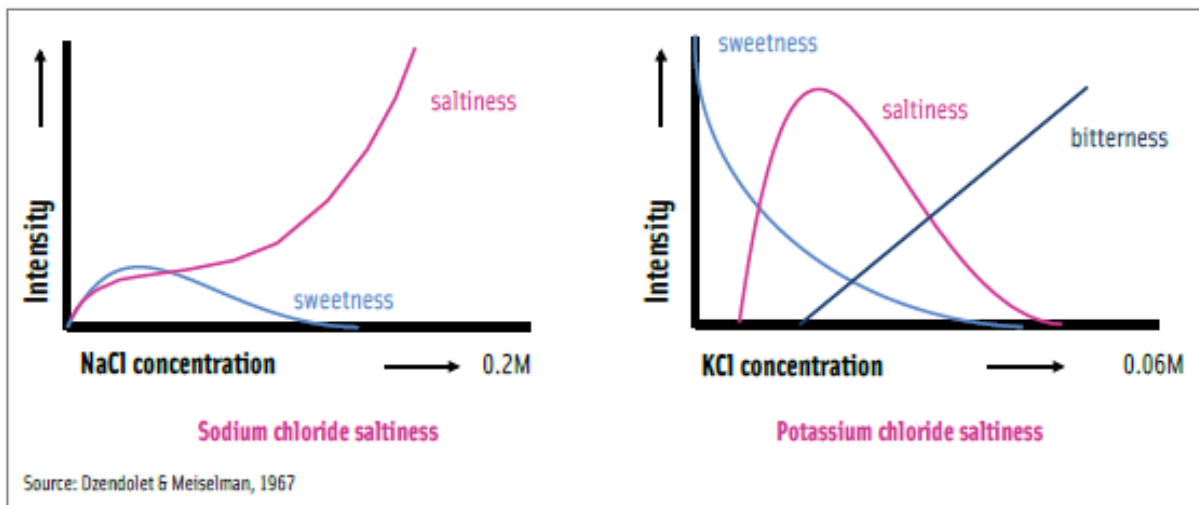
Når saltinnholdet i produkter reduseres, reduseres både den opplevde saltsmaken og intensiteten av den karakteristiske smaken til produktet. Derfor har produsenter innført alternativer til NaCl, eller har gradvis redusert NaCl-innholdet over flere år. Rettesnoren for lavsaltprodukter er egenskapene til normalsaltproduktet. Det vil si at de samme kravene til kvalitetsegenskaper gjelder for lavsaltproduktene som for det tilsvarende normalsaltproduktet. Egenskapene og smaksprofilene til lavsaltprodukter er nesten alltid annerledes, så dette er vanskelig å etterfølge (Ruusunen & Puolanne 2005). Produktutvikling rettet mot saltreduksjon må undersøke den påvirkningen saltreduksjon har på smak og funksjonelle egenskaper til produktet, slik som VBE, fettbinding, tekstur, sensorikk, stabilitet og holdbarhet (Desmond 2006). Salt vekselvirker med kjøttproteiner, særlig de myofibrillære proteinene, og ekstraherer dem slik at de kan binde vann som holdes i kjøttproduktet (Morley 2012). I prosesserte kjøtt- og fiskeprodukter vil de saltløselige proteinene danne et klebrig eksudat på overflaten, som binder muskelbitene sammen etter varmebehandling. Dette laget danner en matriks av varmekoagulerte proteiner som fanger fritt vann. I fint kvernete eller emulgerte produkter slik som pølse og fiskepudding, vil de løselige proteinene i den kontinuerlige fasen danne en proteinfilm rundt fettglobulene, og holder tilbake fett under tilberedning (Desmond 2006). En saltreduksjon vil derfor kunne gi produkter med andre teksturegenskaper, i tillegg til en annen smaksprofil, enn det opprinnelige produktet (Ruusunen & Puolanne 2005). Et annet viktig hinder for å ta i bruk salterstattere er at salt er en av de billigste matvareingredienser som er tilgjengelig (Desmond 2006).

Det fins flere måter å redusere saltmengden på: 1) Bruk av salterstattere og 2) saltforstærkere/smaksforstærkere, 3) optimere den fysiske formen til salt (Desmond 2006), 4) bruk av pre-rigorkjøtt, 5) mineralsaltblandinger (Ruusunen & Puolanne 2005) og 6) bindeforbindelser (Desmond 2006).

Salterstattere

Et av de mest vanlige alternativene til NaCl er såkalte salterstattere. De baserer seg ofte på en blanding av ingredienser hvor natriumkationet erstattes av kalium, ammoniakk, kalsium, magnesium og litium, og av fosfater og glutamat. LiCl og NH₄Cl gir salt smak, men brukes ikke

på grunn av stabilitet, lukt og høy toksisitet. De mest populære salterstatterene er KCl, kaliumlaktat og $MgSO_4$. Av disse er KCl sannsynligvis den mest anvendbare. Den har en ekvivalent antimikrobiell effekt på typiske bakterielle arter, men begrenses noe av sin bitre, kjemiske smak og ettersmak. Dette er illustrert i figur 2.13 (Morley 2012). Reduksjon av NaCl ned til lave konsentrasjoner kan medføre en søtlig smak, noe som ikke er ønskelig i kjøtt- og fiskeprodukter (Ruusunen & Puolanne 2005) (figur 2.13). Forskning viser at 25-40% erstatning er det området hvor det er minst påvirkning på smak (Desmond 2006). I kombinasjon med salterstatterer som KCl, er det vanlig å bruke maskerende forbindelser. Maskerende forbindelser, slik som adenosin 5'-monofosfat (AMP) (Beta™), virker eksempelvis ved å blokkere aktiveringen av et G-protein i en smaksreseptor, og maskerer den bitre smaken av KCl. En mer omfattende gjennomgang av slike forbindelser blir gitt av Desmond (2006).



Figur 2.13: Tid/intensitetsprofiler for NaCl og KCl (Morley 2012).

Fosfater brukes ofte i prosesserte kjøttprodukter for å ekstrahere protein og øke VBE (Morley 2012). Fosfater øker VBE i ferskt og konservert kjøtt ved å øke ionestyrken, noe som øker negativ frastøting i proteinfilamentene, slik at de kan binde mer vann (Desmond 2006), i tillegg til at de vekselvirker med myosinhodet på en lignende måte som ATP, og forårsaker partiell dissosiering av aktomyosin til myosin og aktin (Rodger & Wilding 1990). Natriumfosfater bidrar til natriuminnholdet i et produkt, men de kan redusere behovet for natriumklorid og dermed redusere det generelle natriuminnholdet i produktet (Morley 2012). Natriumpolyfosfat inneholder 31,24% Na, sammenlignet med 39,34% i NaCl. I tillegg brukes natriumpolyfosfat i konsentrasjoner rundt 0,5% istedet for 2-4% for salt. Salt og fosfater virker dessuten synergistiske sammen, og dermed trengs en mindre mengde for å oppnå samme effekt som rent NaCl. I stedet for natriumfosfater kan kalsiumfosfater brukes, og de er like effektive når VBE, geldannelse eller ionestyrke sammenlignes (Desmond 2006).

Saltforsterkere

Saltforsterkere er en annen måte å redusere natriuminnholdet på. Disse forbindelsene har ikke en saltsmak i seg selv, men forsterker saltsmaken når de brukes i kombinasjon med NaCl. Eksempler på saltforsterkere er aminosyrer, mono-sodium glutamat (MSG), laktater, gjærprodukter etc. Disse virker ved å aktivere reseptorer i munnen og i halsen, og hjelper til med å kompensere for saltreduksjonen, og forsterker smak. Derfor kalles de også smaksforsterkere (Morley 2012).

Optimering av saltstrukturen

Optimering av den fysiske formen eller strukturen til saltkrystallen kan senke terskelnivået for deteksjon av saltsmak, og dermed redusere behovet for salt. Ettersom salt oppfører seg likt i løsninger, uavhengig av opprinnelig krystallstruktur, gjelder dette i tilfeller hvor saltet tilsettes et produkt i fast form. Størrelsen på krystallene ser ut til å være av betydning. Det er funnet at små krystaller fører til en rask frigivelse og en høyere saltintensitet enn de store partiklene, men det er også rapportert at mat oppleves som mer salt dersom saltet er på utsiden av maten og hvis kornene er store (Morley 2012).

Pre-rigorkjøtt

Alternativ teknologi involverer bruk av pre-rigorkjøtt, fordi en lavere saltmengde vil kreves for å ekstrahere de myofibrillære proteinene, ettersom aktin og myosin ikke er bundet i rigorkomplekset i pre-rigorfasen. Sammenlignet med aktomyosin (post-rigor) er aktin og myosin mer effektive i å binde vann og innkapsle fett, noe som fører til forbedret smak og aroma i sluttproduktet (Morley 2012). Et problem med denne teknologien er at det har vist seg at det er lavere saltopptak i pre-rigorfileter enn i post-rigorfileter av laks (Lerfall et al. 2010).

Mineralsaltblandinger

Mineralsaltblandinger er gode alternativer for natriumreduksjon. Den samme opplevde saltsmaken kan oppnås med saltblandinger med lavere natriuminnhold (Ruusunen & Puolanne 2005, Desmond 2006). Eksempel på slike blandinger er Pansalt®, hvor halvparten av natriumet er erstattet med kaliumfosfat, magnesiumsulfat og *L*-lysin hydroklorid.

Bindeforbindelser

Andre ingredienser som er undersøkt brukt i lavsaltprodukter er bindestoffer, som i fravær av eller ved reduserte saltkonsentrasjoner erstatter saltløselige proteiner. Disse ingrediensene forsterker binding av muskeldeler i restrukturerte kjøtt- og fiskeprodukter og/eller øker VBE til sluttproduktet. De danner en gelmatriks som gir bindeevne gjennom en kombinasjon av proteinkoagulering og geldannelse heller enn direkte vekselvirkning med muskelproteinene. Slike ingredienser kan være funksjonelle proteiner, fiber, hydrokolloider (f.eks. alginat) og stivelsler. Det kan være nødvendig å tilsette slike bindestoffer i produkter med lavt saltinnhold og et høyt innhold av tilsatt vann – slik som fiskepudding – for å opprettholde og/eller øke VBE og gelningsevnen til produktet (Desmond 2006). Pérez-Mateos & Montero (2000) har rapportert at hydrokolloider har en bedre effekt på VBE og gelningsegenskaper i råstoff av dårlig kvalitet, enn i råstoff av god kvalitet.

2.6 Frysing og tining

Frysing er en av de mest effektive metodene for å konservere kjøtt og fisk. Under -10°C reduseres hastigheten til enzymreaksjoner og mikrobiell vekst betydelig, noe som minimerer kvalitetstap forbundet med mikrobiell og enzymatisk nedbrytelse. Egenskapene til fiskemuskel endrer seg under frysing og frysing, og kjennetegnes ofte av redusert proteinløselighet (Sikorski et al.

1976), noe som medfører tap av vannbindingsevne, gelningsegenskaper og en økning i hardhet av teksturen til produktet. Disse endringene er viktige fordi de påvirker spisekvaliteten til det frysede produktet (Badii & Howell 2001). De fysiske og kjemiske reaksjoner som ligger til grunn for endringene i funksjonelle egenskaper ved fryselagring, er fryseindusert proteindenaturering og -aggregering av myosin, misfarging og utvikling av oksidativ harskning (Strasburg et al. 2008). I mager fisk er proteindenaturering og -aggregering av myosin den viktigste årsaken (Badii & Howell 2002). Alle reaksjonene som foregår er avhengig av frysemetode, nedfrysingshastigheten, varigheten av fryselagringen samt lagringstemperatur og tining (Strasburg et al. 2008). Badii & Howell (2002) fant at ved fryselagring av torsk- og hysefileter, økte denaturering av muskelproteiner og hardhet av muskel med økt lagringstemperatur og varighet av fryselagringen. Disse endringene ble fulgt av en nedgang i proteinløselighet, en økning av hydrofobisitet og dannelse av ikke-kovalente og kovalente koblede aggregater. Aggregeringen øker med varigheten av fryselagringen, og total mengde ekstraherbart protein synker (Sikorski et al. 1976). Dannelse av formaldehyd under fryselagring av gadoide fiskearter har lenge vært foreslått som en årsak til proteinaggregering i disse artene, og i modellsystemer er det funnet at formaldehyd danner kryssbindinger med proteiner og forårsaker aggregering. Badii & Howell (2002) fant i sin studie derimot ingen store teksturforskjeller mellom torsk (som produserer signifikante mengder formaldehyd) og hyse (som produserer svært lite formaldehyd), noe som indikerer at formaldehyd ikke er en hovedårsak til økt hardhet av muskeltekstur i fryst fisk. Under fryselagring blir aktomyosin gradvis mindre løselig, og dette påvirker sannsynligvis også teksturen til produktet (Kristinsson & Rasco 2000).

Hovedårsakene til at proteiner denaturerer i fryst fisk kan være nedgang i mengde tilgjengelig vann for proteinene, økt konsentrasjon av oppløste forbindelser og mekanisk skade på muskelstrukturen forårsaket av iskrystaller (Sikorski et al. 1976). Isdannelse vil ikke skje før ved temperaturer på -1 til -5°C . Dette skyldes frysepunktsnedsenkningeffekten av oppløste cellulære forbindelser. Når det først dannes is, er påvirkningen på muskelstruktur og -proteiner i stor grad avhengig av nedkjølingshastigheten. Fryseindusert denaturering er mest utbredt dersom nedkjølingshastigheten er treg. Når nedkjølingen er treg, vil det dannes voksende iskrystaller i den ekstracellulære væsken, siden denne væsken kjøles ned raskere enn den intracellulære væsken. Dette fører til en oppkonsentrering av ekstracellulære salter, som trekker vann ut av cellene gjennom osmose. Dermed vil muskelcellene krympe og myofibrillproteinene vil bli oppkonsentrert og dehydrert i muskelfiberen, noe som kan føre til denaturering og påfølgende aggregering (Rodger & Wilding 1990). Er nedkjølingshastigheten rask vil det dannes mange små iskrystaller både intra- og ekstracellulært som fordeler seg jevnt. Dette gir mindre skade på vevet. (Sikorski et al. 1976, Strasburg et al. 2008). Dette skyldes at kjernedannelsen er raskere enn krystallveksten når nedkjølingshastigheten er rask, mens krystallveksten er raskere enn kjernedannelsen når nedkjølingshastigheten er lav. En relativt ny fryseteknologi kjent som trykkendringsfrysing (pressure-shift freezing), kjøler ned muskel til for eksempel -20°C , under høyt trykk. Det høye trykket gjør at muskelvevet ikke fryser, men i det trykket brått senkes, vil homogen mikrokrySTALLISERING skje i hele muskelvevet. Strukturen til muskelvevet endres minimalt, og proteindenatureringen reduseres, slik at produktkvaliteten påvirkes mindre (Strasburg et al. 2008). Under fryselagring vil iskrystallene vokse, noe som medfører tap av vann, denaturering av proteiner og mekanisk skade på muskelvevet. Dette gjør at enzymer og andre komponenter frigjøres og kan reagere. Også tinemetoden er viktig for påvirkningen på muskelvevet, og det er vist at rask tining gir bedre kvalitet enn treg tining. Gjentatte fryse-tinesykluser vil redusere proteinløseligheten, og dermed kvaliteten til produktet (Benjakul & Bauer 2000).

2.6.1 Farse

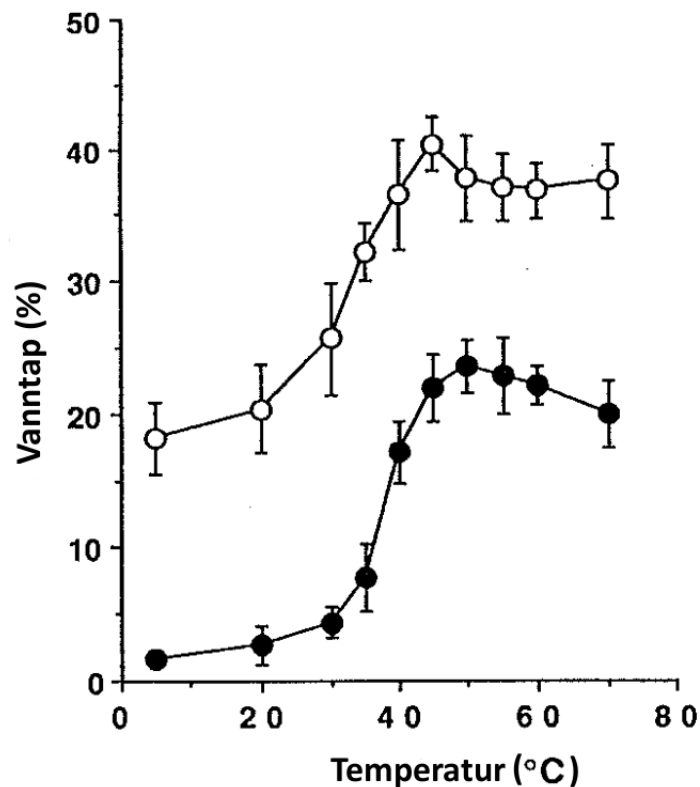
Problemer relatert til fryselagring av fiskefarse er forbundet med økt hardhet i magre arter, samt dårlig funksjonalitet (geldanningsevne og VBE), dårlig evne til å blande seg med andre ingredienser, misfarging, lipidoksidasjon og utvikling av fiskelukt. Økt hardhet og tørrhet i produktet skyldes tap av vann som følge av frysesynereose og krymping av muskelfibre. Dette problemet er mest utbredt i farser av magre torskearter, og i langt mindre grad i farser av pelagisk fisk. Kalsiumioner synes å ha en viktig rolle i teksturhardhet, da de kan øke dannelsen av ionekryssbindinger mellom polypeptidkjeder eller aktivisere transglutaminase. Tilsats av hydrokolloider, som alginat, kan forhindre økt hardhet, da den kompleksbinder kalsiumionene og forhindrer derfor dannelse av kryssbindinger (Lee 2011).

2.7 Varmebehandling

En av de viktigste aspektene ved produksjon av farseprodukter er å oppnå høy kokestabilitet, noe som innebærer å forhindre vann og fett i å skilles ut fra produktet under oppvarming. Muskelsystemer av kvernet fisk er svært komplekse, fordi egenskapene deres avhenger av den hierarkiske strukturen i det biologiske vevet, og av nye strukturer dannet i muskelen under prosessering. De funksjonelle egenskapene til slike produkter er summen av egenskapene til de gjenværende individuelle fibrene og nettverket. Forskjeller i den biologiske tilstanden til råstoffet kan gi opphav til forskjeller i tekstur og koketap, når det kvernes. (Ofstad et al. 1995).

Varmepåvirkning på VBE i oppdrettstorsk- og laks ble undersøkt av Ofstad et al. (1993). Som figur 2.14 viser, er vanntapet for begge fisker nesten konstant mellom 5 og 30°C. Etter dette øker vanntapet raskt som en funksjon av temperatur, og når et maksimum ved 45-50°C. Deretter reduseres vanntapet noe. For torsk starter vanntapet i hovedsak rundt 30°C, og for laks ved 35°C. Det største vanntapet ble observert ved lavere temperatur for torsk (45°C) enn for laks (50°C), noe som kan indikere at muskelproteinene i laks er mer stabile enn i torsk. Noe av forskjellen kan også forklares av ulikheter i pH mellom artene. Torsk hadde en pH som var nærmere pI enn laks, og vil dermed ha noe lavere VBE. I den samme studien ble også sammenhengen mellom varmebehandling og strukturendringer i torskemuskel undersøkt. Ved 20-30°C, samtidig med økningen i vanntap for torsk, sveller og aggregerer kollagenet i de pericellulære lagene (endomysiet). Ved 40°C var vanntapet signifikant for begge arter, og kollagenlaget hadde mistet sin opprinnelige struktur, noe som antagelig skyldes denaturering og smelting av kollagen. Ved denne temperaturen var det ikke observert store endringer i myofibrillstrukturen, men det ekstracellulære rommet hadde økt i volum. Dette kan indikere at endringer i bindevevet kan være en viktig årsak til vanntapet ved denne temperaturen (Ofstad et al. 1993). Påvirkningen på vanntap av endringer i bindevev som skjer ved temperaturer < 40°C, er i følge Ofstad et al. (1993) ikke fullt forstått.

Ved 45°C krymper myofibrillene kraftig, noe som korresponderer godt med maksimum vanntap og denaturering av myosin. Muskelcellene krymper i tverretningen, altså ikke i lengde, men i diameter. Vanntapet mellom 40 og 45°C kan derfor muligens forklares av en fortetning av muskelnettverket, noe som gjør at immobilisert cellulært vann lettere flyter ut ved lavt trykk. Ved 60°C kobles perifere myofibriller i muskelcellen av sarkolemma. En økning i koagulerende sarkoplasmiske proteiner ble observert ved økende temperaturer over 45°C. Dette samsvarer med overgangstilstandene til de sarkoplasmiske proteinene, som vist i figur 2.7 i avsnitt 2.3.2. Som nevnt minker vanntapet ved temperaturer > 45°C, noe som kan skyldes at aggregater av sarkoplasmiske proteiner og kollagen holder igjen vann under sentrifugering, ved å tette de



Figur 2.14: Vanntap (% av vekt) som en funksjon av oppvarmingstemperatur av grovt hakket muskel av oppdrettslaks (svarte sirkler) og -torsk (hvite sirkler). Usikkerhet er angitt som \pm standardavvik (Ofstad et al. 1993).

intercellulære kapillærene (Ofstad et al. 1993). En annen mulighet kan være at det dannes et gelnettverk som holder vann (jamfør avsnitt 2.3.2).

Tilsats av salt til farsen som skal varmebehandles vil øke vann- og fettbindingsevnen til produktet, slik at koketapet reduseres. NaCl øker bindeevnen til farsen, slik at fuktighet og fett holdes tilbake. Dette er positivt for teksturen til farsen. Initielt koketap er vist å reduseres kraftig når saltinnholdet økes fra 0 til 1%, og best bindeevne oppnås ved 4% NaCl (Ruusunen & Puolanne 2005). Årsaken til at bindeevnen øker ved tilsats av salt, er at når fisk kvernes, ødelegges mange muskelstrukturer, deriblant sarkolemma (Ofstad et al. 1996) og Z-diskene (Offer & Trinick 1983). En homogen proteinmatrise med få intakte fibre dannes fra de depolymeriserte myofibrillene, og under oppvarming vil det dermed kunne dannes en gel (jamfør avsnitt 2.3.2). De fysiske begrensningene for svelling er dessuten fjernet, noe som gjør at myofibrillene kan svulle ubegrenset ved tilsats av salt. Dette vil bidra til å øke VBE til farsen (Ofstad et al. 1996). Påvirkningen av salt på VBE vil være avhengig av pH, som forklart i avsnitt 2.5.1.

Som teoridelen viser, er fiskemuskel et komplekst system av proteiner. Myofibrillproteiner har en essensiell oppgave i levende fiskemuskel, men er også svært avgjørende for spisekvaliteten til fiskemuskel. De funksjonelle egenskapene til myofibrillproteinene, slik som VBE, løselighet og geldanningssevne, påvirkes i stor grad av miljøet rundt, slik som pH, ionestyrke, temperatur og post-mortale endringer. Egenskapene vil også variere noe fra art til art. Ytre påvirkninger, slik som frysing-tining, oppvarming og tilsats av ulike salter og tilsetningsstoffer vil ha ulik påvirkning på muskelproteinene, og vil føre til endringer i de funksjonelle egenskapene til muskelen. Formålet med denne oppgaven har derfor vært å undersøke hvordan ulike salter og konsentrasjo-

ner påvirker VBE og proteinløselighet i fisk, og om det er forskjeller mellom ulike typer råstoff og behandling av råstoffet. Fire fiskeslag ble valgt, og forskjeller mellom ferskt og fryst råstoff for både filet og farse (kvernet fiskemuskel, hvis ikke annet er oppgitt) ble undersøkt. Videre har det vært et mål å kunne identifisere proteinene i proteinekstraktene, for å kunne si noe om forskjeller mellom fiskeslag, salter og råstoffkvalitet på et molekylært nivå. Varmepåvirkning på VBE i farse av ferskt og fryst råstoff, med og uten tilsetninger, har også blitt undersøkt. Dette for å kunne si noe om hvordan tilsetninger påvirker kokestabiliteten til et modellprodukt. Et overordnet mål for denne oppgaven, som er en del av et større forskningsprosjekt der SINTEF Fiskeri og havbruk, SINTEF Materialer og kjemi og flere viktige næringsmiddelprodusenter i Norge (Mills, Nortura, Stabburet, SPIS-Grilstad, Finsbråten, Brødrene Remø og Berggren) deltar, har vært å bidra med kunnskap om hvordan NaCl-mengden i næringsmidler best kan reduseres. Før material- og metodedelene presenteres, vil litt teori om de ulike fiskeslagene som ble benyttet bli gjennomgått.

2.8 Råstoff

I denne oppgaven ble det benyttet fire ulike fiskeslag: kvitlaks, sei, hyse og torsk. De er alle magre fiskearter, men har noe ulike egenskaper. Sammensetning av makronæringsstoffer av disse fire fiskeslagene er vist i tabell 2.2.

Tabell 2.2: Næringsinnhold i ulike fiskeslag, utarbeidet av Fiskeridirektoratets ernæringsinstitutt (Lynum 1994). *Hentet fra Fitbit (2012).

	Sei	Hyse	Torsk	Kvitlaks
Tørrstoff	20	19,2	19,6	
Protein	16,5	16,6	18,1	19,1*
Fett	0,3-0,9	0,2	0,3	3,3 *
Glykogen	0,3	< 0,1	< 0,1	

Kvitlaks (*Argentina Silus*)

Kvitlaks kalles også vassild, og hører til vassildfamilien. I utseende ligner den silden, men kvitlaksen har en bredere rygg og store øyne som dekker halve hodet. Den lever pelagisk på dypt vann (200-600 meter) langs hele norskekysten og vest i Barentshavet, sør for Svalbard, hvor den spiser små blekkspruter, krepsdyr og pelagisk småfisk. Kvitlaks er en vanlig bifangst, men det bedrives også kommersielt fiske av kvitlaks til industriell produksjon (Holth et al. 2012*d*). Vanligvis fryses fisken direkte ombord i båten, men det lages også farse av den (Jónsson & Pálsson 2006, ikke sett – sitert etter Valtýsson 2012). Kvitlaksen har gode gelegenskaper, og kan brukes alene i en fiskefarse uten hjelp fra annen type fisk. Dette er den fisken Berggren bruker mest av i sin produksjon av fiskeprodukter (Berg 2012).

Sei (*Pollachius Virens*)

Sei er den mest aktive svømmeren av medlemmene i torskefamilien (*Gadidae*) og har den største andelen mørk muskel av disse artene, og fettinnholdet i seimuskel er dermed større enn for andre arter av torskefamilien (Dulavik et al. 1998). Seien lever på 0 til 300 meters dyp, og

spiser pelagiske krepsdyr, som krill, samt sild og brisling. Kommersielt sett er sei viktig, da muskelvevet er velsmakende. Den er godt egnet til fiskemat (Holth et al. 2012b), slik som grove seikarbonader. Sammenlignet med kvitlaks har den noe dårligere gelningsegenskaper, men kan brukes alene i fiskefarse. Det ferdige produktet vil da virke noe løsere i konsistensen (Berg 2012). Forskjeller i geldanningsevne til musklene av ulike arter skyldes ulik grad av kryssbinding av myosinets tunge kjede (Chan et al. 1992).

Hyse (*Melanogrammus Aeglefinus*)

Hyse hører til torskfamilien, og lever på 40 til 300 meters dyp på begge sider av Nord-Atlanteren, fra østsiden av Portugal til Island og i Barentshavet. Den spiser hovedsaklig bunnlevende organismer, slik som sjøstjerner, snegler, fisker og rogn. Hyse er en vanlig matfisk, og omsettes både fersk og fryst, og egner seg godt til foredlede fiskeprodukter slik som fiskepud- ding, -kaker og -boller. I tillegg benyttes den i fiske- og dyrefor. I motsetning til torsk, lar ikke hyse seg salte særlig godt, og den konserveres ofte ved tørking og røyking. Hyse er kommersielt viktig særlig i Europa og Nord-Amerika (Holth et al. 2012a). Berggren bruker hyse i tillegg til kvitlaks og/eller torsk i fiskefarser. Det skyldes at hyse ikke har fullt så gode gelegenskaper som kvitlaks (Berg 2012).

Torsk (*Gadus Morhua*)

Torsk hører til torskfamilien. Den er stort sett en bunnfisk, men opptrer også i de frie vannmasser. Kysttorsken er i hovedsak stasjonær og holder seg nært kysten og i fjordene, og spiser krepsdyr, børstemark og fisk som lever på bunnen. Skreien lever mer pelagisk og på dypere vann, og spiser pelagiske fiskearter som lodde og sild. Torsken er en matfisk med mange bruksområder (Holth et al. 2012c), deriblant foredles den til klippfisk, tørrfisk og lutefisk. Gelegenskapene til torsk er ikke fullt så gode som for kvitlaks, og torsk brukes derfor ofte i kombinasjon med kvitlaks og/eller hyse i farseprodukter, som nevnt over. Om fisken er fersk eller har vært fryst har også mye å si for hvor stor andel som kan være i farsen uten at den blir for løs (Berg 2012).

Kapittel 3

Materialer og metoder

3.1 Materialer

Ferskt råstoff til de ulike eksperimentene ble kjøpt på Fiskhallen¹, med unntak av torsk som ble kjøpt på Ravnkloa Fisk & Skalldyr². Innkjøpene ble stort sett gjort på mandag, og det ble oppgitt at fisken var fanget før helgen, altså var råstoffet under en uke gammelt. Råstoffet ble lagt på kjøll til eksperimentene ble utført, og deler av råstoffet ble fryst ned til senere bruk. Tabell 3.1 viser en oversikt over innkjøp av råstoff, samt når de ulike eksperimentene ble utført. Eksperimenter med fersk sei ble gjort tre ganger. I cellene for fersk sei står det derfor tre datoer, der den første datoen angir forsøk 1 og så videre. Det ble kun utført ett forsøk på fryst sei, av råstoff fra forsøk 2.

Målinger av proteinløselighet, VBE og pH ble utført på det samme råstoffet, men ikke på samme tidspunkt. Detaljer framgår av tabell 3.1. De samme målingene ble utført på råstoff som har vært fryst. Råstoffet ble lagt til tining på kjølerom dagen før første eksperiment ble utført. Kirsti Greiff skaffet kvitlaksfarse ved et besøk hos Berggren, og den fryste farsen ble fraktet i isoporkasse fra Berggren til Trondheim, hvor den ble fryst på nytt. Målinger av proteinløselighet i farse av hyse ble gjort med og uten tilsetninger. Farsene med tilsetning ble tilberedt av Lise Merete Sitter Bersmo på Sintef Fiskeri og havbruk, og fraktet på is til NTNU Gløshaugen, hvor analysene ble utført samme dag. Varmebehandlingsforsøket på hyse ble utført på ferskt råstoff, kjøpt dagen før eksperimentet. Det ble ikke gjort målinger av proteinløselighet, VBE og pH på dette råstoffet.

3.2 Metoder

3.2.1 Proteinløselighet i fisk

Vannløselige proteiner

Proteiner ble ekstrahert fra fiskemuskel ved en modifikasjon av metoden til Anderson & Ravasi (1968) og Licciardello et al. (1982), som beskrevet av Hultmann & Rustad (2002). Omtrent 4 g fisk ble veid ut for hver parallell og homogenisert med Ultra-Turrax i 80 mL BisTrisbuffer

¹Taraldsgårdsveita 11, 7010 Trondheim, +47 73 52 49 37.

²Munkegata 66, 7011 Trondheim, +47 73 52 55 21.

Tabell 3.1: Oversikt over innkjøp av fisk, samt når de ulike eksperimentene ble utført. *produsert av Bergren denne dato **eksperiment med farse med tilsetning ble utført 29.11.11 ***kjøpt 21.02.12.

	Sei		Hyse		Torsk		Kvitlaks	
	Fersk	Fryst	Fersk	Fryst	Fersk	Fryst	Fersk	Fryst
Kjøpt	28.8, 12.9, 17.10.11	-	25.10.11	-	11.12.11	-	27.5.11*	
Fryst ned	30.8, 12.9, 17.10.11	-	25.10.11	-	11.12.11	-	-	
Tint	-	19.9.11	-	8.11.11	-	1.1.12	6.12.11	
Proteinløselighet filet	30.8, 14.9, 19.10.11	21.9.11	26.10.11	10.11.11	13.12.11	3.1.12	-	
Proteinløselighet farse	31.8, 15.9, 2.10.11	22.9.11	27.10.11	11.11.11**	14.12.11	4.1.12	8.12.11	
VBE	29.8, 13.9, 18.10.11	20.9.11	25.10.11	9.11.11	12.12.11	2.1.12	7.12.11	
pH	29.8, 13.9, 18.10.11	20.9.11	25.10.11	9.11.11	12.12.11	2.1.12	7.12.11	
Varmebehandling	-	-	22.2.12***	-	-	-	8.2.12	

Tabell 3.2: Saltkonsentrasjon i ulike BisTris- og saltbuffere til ekstrahering av saltløselige proteiner.

Salt	Konsentrasjon (mol/L)	
KCl	0,3	0,6
NaCl	0,3	0,6
MgCl ₂	0,3	0,6

Tabell 3.3: Tillaging av standarder for standardkurve

Standard (mg/mL)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
BSA (μ L)	0	20	40	60	80	100
Vann (μ L)	100	80	60	40	20	0

(0,05 M BisTris; pH 7,0) i 30 sekunder og sentrifugert (avkjølt sentrifuge; $8000 \times g$; 4°C) i 20 minutter. Supernatanten ble filtrert gjennom glassull, og volumet justert til 100 mL med BisTrisbufferen. Dette var den vannløselige proteinfraksjonen. To paralleller ble tatt ut for hver analyse.

Saltløselige proteiner

Bunnfallet som ble igjen etter ekstraksjonen av de vannløselige proteinene ble homogenisert i 10 sekunder med 80 mL BisTrisbuffer (0,05M; pH 7) med salt. Type salt og saltkonsentrasjoner i henhold til tabell 3.2. Sentrifugert som over. Supernatanten ble filtrert gjennom glassull og volumet justert til 100 mL med BisTrisbuffer med salt. Dette var den saltløselige proteinfraksjonen. To paralleller for hvert salt og hver konsentrasjon ble analysert. Mengden protein i ekstraktet ble bestemt ved BioRad proteinanalyse.

Bio-Rad proteinanalyse for bestemmelse av mengde protein

En del Bio-Rad fargekonsentrat ble blandet med fire deler dest.vann og oppbevart på mørk flaske. Paralleller til standardkurve ble laget ut fra en stockløsning av Bovint serum albumin (BSA) (1 mg/mL) i henhold til tabell 3.3. De vannløselige og de saltløselige proteinfraksjonene ble fortynnet passende med henholdsvis dest.vann og BisTrisbuffer med salt. Tre paralleller à 100 μ L ble pipettert ut for hver standard og hver prøve og tilsatt fortynnet fargereagens (5,0 mL) og blandet med whirlmixer. Absorbans ved 595 nm ble lest av etter 5 minutter (Bradford 1976).

SDS-PAGE

Prøver fra den saltløselige proteinfraksjonen ble fortynnet 1:1 med SDS-buffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 5% SDS; 10% merkaptotanol; dest.vann; pH 8) og fryst ned. Før elektroforese ble prøvene kokt i 5 minutter. Sodium dodecyl sulfat-polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) ble utført på de saltløselige proteinene, i henhold til Laemmli (1970), på PhastSystem™ med PhastGel Gradient 4-15-geler og PhastGel SDS Buffer Strips. Gelene ble farget i utviklingskammeret med en løsning av Coomassie Blue eller sølvnitrat. Detaljer er beskrevet i produsentens manual (Pharmacia LKB Biotechnology).

3.2.2 Vannbindingsevne (VBE)

Tørrvekt og vanninnhold

Tørrvekt og vanninnhold i fiskefarsen ble bestemt gravimetrisk, ved at en fiskeprøve (omtrent 2 g) ble veid ut og tørket til konstant vekt ved 105°C. Det ble tatt to paralleller av hver prøve.

Vannbindingsevne (VBE)

Fiskefilet ble kvernet til farse i en kjøkkenkvern, og prøver til tørrvekt- og vanninnholdmålinger ble tatt ut. Deretter ble fire paralleller à 2 g for hver prøve veid ut i prøveholdere med polyestermembran. Prøveholderene ble plassert i sentrifugerør med glasskuler og sentrifugert i 5 minutter ved $210 \times g$. Etter sentrifugering ble prøvene veid. Vannbindingsevnen i fiskefarsen ble beregnet ved hjelp av resultatene fra tørrvekt- og vanninnholdmålingene (Eide et al. 1982). Fremgangsmåte for beregninger er vist i ligning (B.1)-(B.4) i vedlegg B.

3.2.3 pH-måling i farse

Fiskefarse og KCl (0,15 M) ble blandet i forholdet 1:1, til en jevn suspensjon. pH ble målt med pH-meter (Bendall 1973), som beskrevet av Rustad et al. (1993).

3.2.4 Varmebehandling

Kvernet fisk (50 g) med tilsetning (0,4% NaCl) og uten tilsetning ble overført til zip-lockposer. Hver pose ble klemt forsiktig, slik at fiskemassen fordelte seg jevnt og tynt. De ble varmet opp på vannbad til 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 og 70°C, og holdt på den gitte temperaturen i 10 minutter og avkjølt på is. En prøve (4°C) ble ikke varmebehandlet. Tørrstoffinnhold og VBE ble målt av samtlige prøver – henholdsvis to og fire paralleller. I de tilfellene der det fantes koketapsvann ble det tatt av prøver til SDS-PAGE og tørrstoffmålinger.

Kapittel 4

Resultater og diskusjon

4.1 pH

pH-målinger i farser av ulike fiskeslag ble utført i ferskt råstoff og i råstoff som har vært fryst, som beskrevet i avsnitt 3.2.3. Målingene ble utført to ganger – samme dag som farsen ble laget (dag 0) og dagen etter (dag 1). pH i ferskt og fryst råstoff er vist i tabell 4.1. pH ble målt en gang

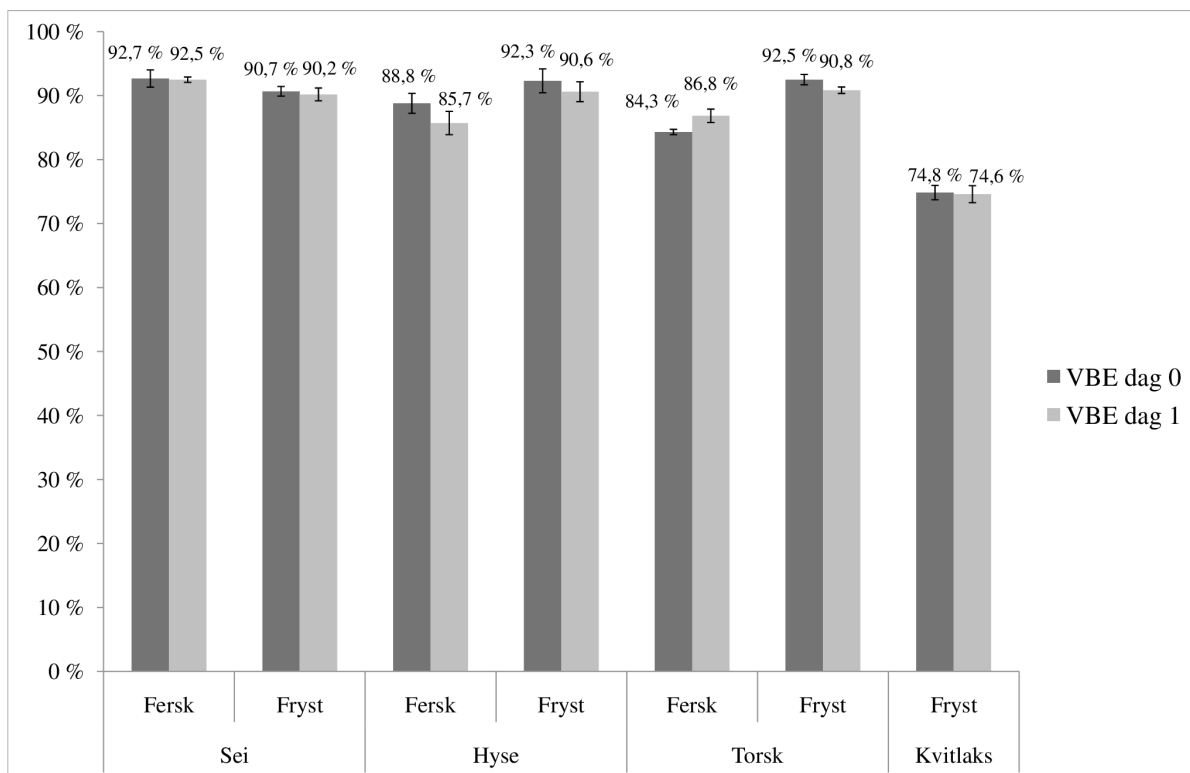
Tabell 4.1: pH i farser av fersk og fryst fisk. Målinger ble utført både samme dag som farsen ble laget (dag 0) og dagen etter (dag 1).

Fisk	Lagring (dager)	Fersk	Fryst
Sei	0	6,41	6,69
	1	6,42	6,66
Hyse	0	6,34	6,44
	1	6,38	6,49
Torsk	0	6,19	6,25
	1	6,23	6,24
Kvitlaks	0	-	6,49
	1	-	6,48

i hver fiskemasse, og det er derfor ikke mulig å si noe sikkert om de forskjellene som observeres. For alle fiskeslagene hvor fersk og fryst er sammenlignet, øker pH som en følge av frysing. Dette kan skyldes utfellinger av salter som har blitt supermettet under isdannelsen (Van Den Berg 1966), og endringer i bufferegenskapene til muskelvevet som følge av fryseprosessen (Kolhe et al. 2010). Når proteiner delvis denatureres, kan nye bindinger og strukturelle ordninger oppstå, slik at proteinets evne til å ta opp/gi fra seg hydrogenioner endres. For ferskt råstoff, er pH i sei > hyse > torsk, og for det fryste råstoffet er pH i sei > kvitlaks > hyse > torsk. Variasjoner i pH mellom de ulike fiskeslagene kan skyldes artsforskjeller, ulik behandling av fisken før slaktning og lagringstemperatur. For fersk hyse og torsk registreres små økninger i pH fra dag 0 til dag 1. For fryst sei synker pH fra dag 0 til dag 1, mens for fryst hyse registreres en økning. pH-endringenes betydning for egenskapene til muskelvevet blir tatt opp i avsnitt 4.2 og 4.4.

4.2 Vannbindingsevne (VBE)

Vanninnhold og VBE ble målt i farse av fersk fisk og i farse av fisk som har vært fryst, som beskrevet i avsnitt 3.2.2. Resultatene er vist i figur 4.1. Det ble laget farse av den ferske fileten samme dag som fisken ble kjøpt, og noe av fileten ble fryst ned. Farse av fryst fisk ble laget dagen etter den var lagt på kjølerommet for tining. Målingene ble utført både samme dag (dag 0), og på daggammel farse (dag 1). Resultatene for fersk sei er basert på tre forsøk, og de enkelte verdiene er vist i vedlegg B, tabell B.1. Vanninnhold samt VBE for de enkelte fiskeslagene er vist i tabell B.2 og B.3.



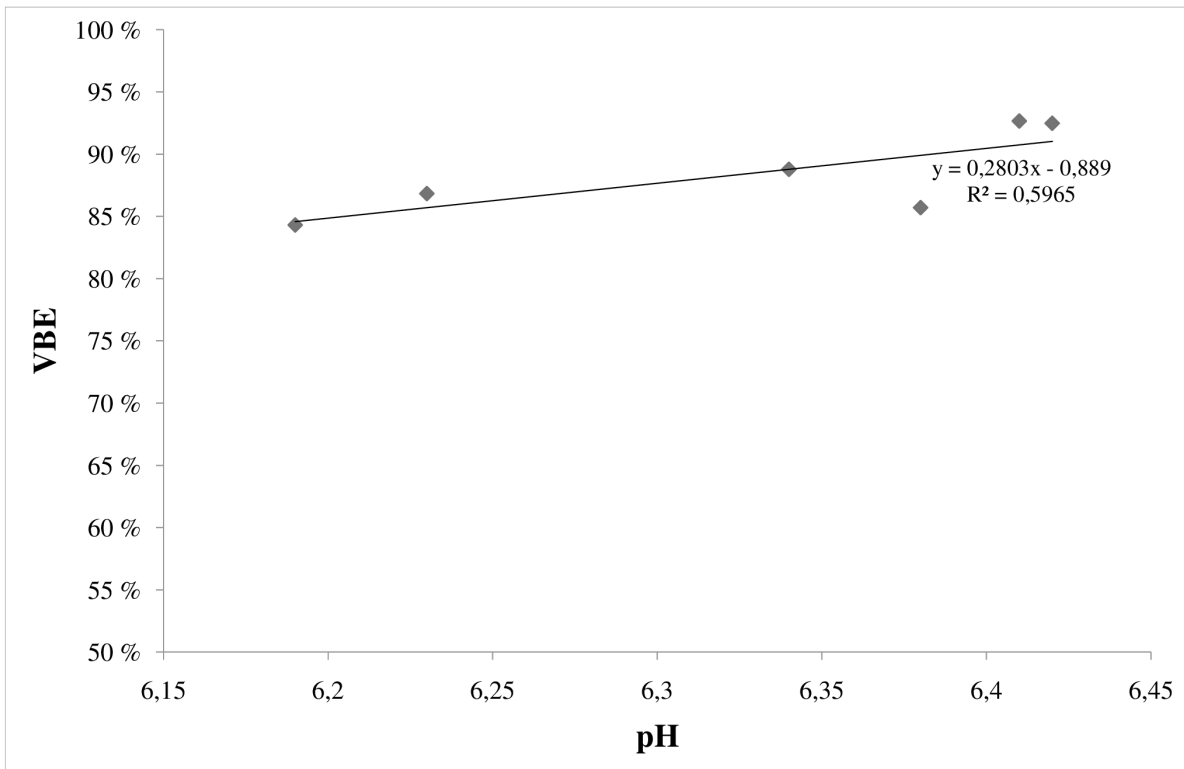
Figur 4.1: Vannbindingsevne i farser av fersk og fryst fisk. Usikkerhet basert på 4 paralleller er oppgitt som standardavvik.

Det ble undersøkt om forskjellene mellom VBE dag 0 og dag 1, samt mellom fersk og fryst, var signifikante (5% signifikansnivå), ved hjelp av t-verdien beregnet med ligning B.5 i vedlegg B. Det er en signifikant forskjell mellom VBE dag 0 og dag 1 for fersk torsk, men ikke for de andre. På 10% signifikansnivå er også forskjellen i VBE mellom dag 0 og dag 1 for fryst torsk signifikant. Det er dessuten en signifikant forskjell mellom fersk og fryst torsk. I beregning av VBE for fryst råstoff er det korrigert for at noe vann tapes som smeltevann ved tining. Dette kan gi en høyere beregnet VBE enn faktisk VBE, fordi VBE regnes i % av opprinnelig vann i prøven. Eksempel på utregning er vist i vedlegg B.3. For hyse er det en liten, men signifikant økning i VBE i fryst råstoff dag 1 sammenlignet med ferskt råstoff dag 1, og for torsk er det en signifikant økning for begge dager. Etter frysing er det, som forklart i avsnitt 2.6, forventet at VBE synker som en følge av redusert proteinløselighet. Som vist i tabell 4.1 (avsnitt 4.1) øker pH for hyse etter fryselagring, noe som innebærer en større avstand fra myosinets pI. Som forklart i teoridelen (avsnitt 2.3.3) øker VBE når pH beveger seg bort fra pI, så økningen i VBE etter fryselagring kan derfor skyldes den økte pH i råstoffet. Figur 4.3 viser derimot at det

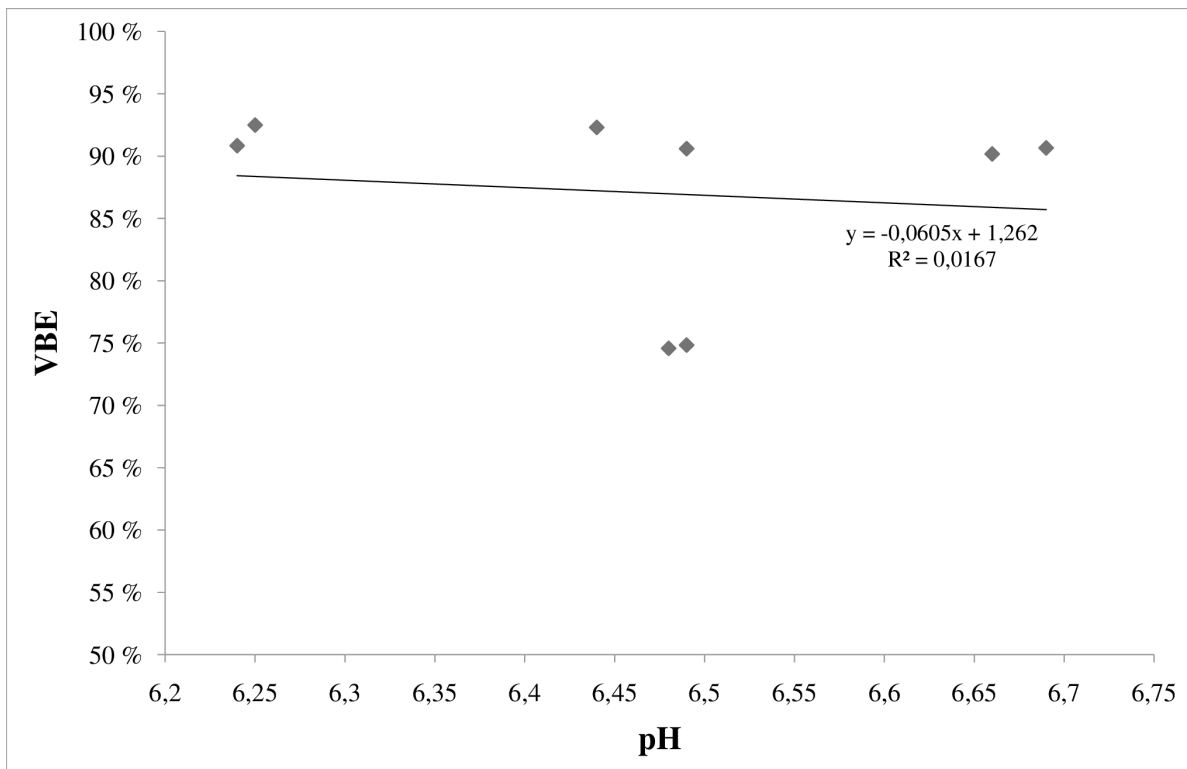
ikke er noen sammenheng mellom pH og VBE i fryst råstoff, så pH-økningen er antagelig ikke årsaken til økningen i VBE for hyse og torsk etter frysing. Det virker derfor nærliggende å anta at det er ulikheter i stabiliteten til muskelvevene under fryselagring, samt forskjellig påvirkning av kverning på muskelvevet, som er årsak til at fryse-tineprosessen påvirker VBE ulikt i de forskjellige fiskeslagene. Andre årsaker til at VBE varierer mellom fiskeslagene kan være artsforskjeller, prosessering, tid siden fangst, grad av muskelproteindegradering, lagringstemperatur under frakt med mer. For sei ble det observert en signifikant nedgang i VBE fra ferskt til fryst råstoff for dag 1.

Fryst kvitlaks utpeker seg i forhold til de andre fryste fiskeslagene med en signifikant lavere VBE, på omtrent 75% mot over 90% for fryst sei, hyse og torsk. Kvitlaksproteiner har vanligvis høy VBE og god frysestabilitet, så en mulig forklaring på at VBE er såpass lav kan være en kombinasjon av tre fryse-tine-sykluser, og at den ble produsert 27. mai 2011, og dermed har vært lagret i fryser i omtrent sju måneder. Effekten av fryselagring over tid er, som nevnt i avsnitt 2.6, en økende grad av proteindenaturering og skade på muskelvevet. De andre fiskeslagene har kun vært lagret i opp til tre uker i fryser, så mindre endringer i muskelvevet for disse er forventet. Fersk sei har signifikant høyere VBE enn fersk torsk og hyse (på 10% signifikansnivå for dag 1). Dette samsvarer med at fersk sei hadde høyest pH. For fryst råstoff er det ingen signifikante forskjeller mellom disse tre fiskeslagene i VBE. Figur 4.2 og 4.3 viser VBE som en funksjon av pH i henholdsvis ferskt og fryst råstoff. Korrelasjonskoeffisienten (r) for ferskt råstoff er på 0,77, og er signifikant på 10% signifikansnivå. Dette indikerer at det er en viss sammenheng mellom VBE og pH for det ferske råstoffet, og at VBE øker med økende pH. Dette er som forventet. For fryst råstoff (figur 4.3) er det ingen klar sammenheng mellom pH og VBE. Det skyldes nok at endringer i muskelvevet som følge av frysing påvirker VBE mer enn det pH gjør. Det er viktig å merke seg at grunnlaget for figur 4.2 og 4.3 er pH-målingene i tabell 4.1 og VBE-målingene i figur 4.1. Det vil si at hvert fiskeslag bidrar med kun to målepunkter hver. For å kunne vurdere påvirkning av pH på VBE mer sikkert, hadde det vært ideelt med flere målepunkter for hvert fiskeslag.

Av resultatene presentert i dette avsnittet kan det oppsummeres med at VBE varierer noe for de ulike fiskeslagene, og at fryseprosessen påvirker VBE ulikt for fiskeslagene. Vanligvis forventes en nedgang i VBE etter frysing, men for torsk og hyse ble det registrert en økning. VBE i ferskt råstoff ser ut til å øke noe med økende pH, som forventet. VBE i fryst råstoff korrelerer dårligere med pH, noe som skyldes at fryseprosessen dominerer påvirkningen på VBE.



Figur 4.2: Vannbindingsevne som en funksjon av pH for ferskt råstoff.



Figur 4.3: Vannbindingsevne som en funksjon av pH for fryst råstoff.

4.3 Proteinløselighet

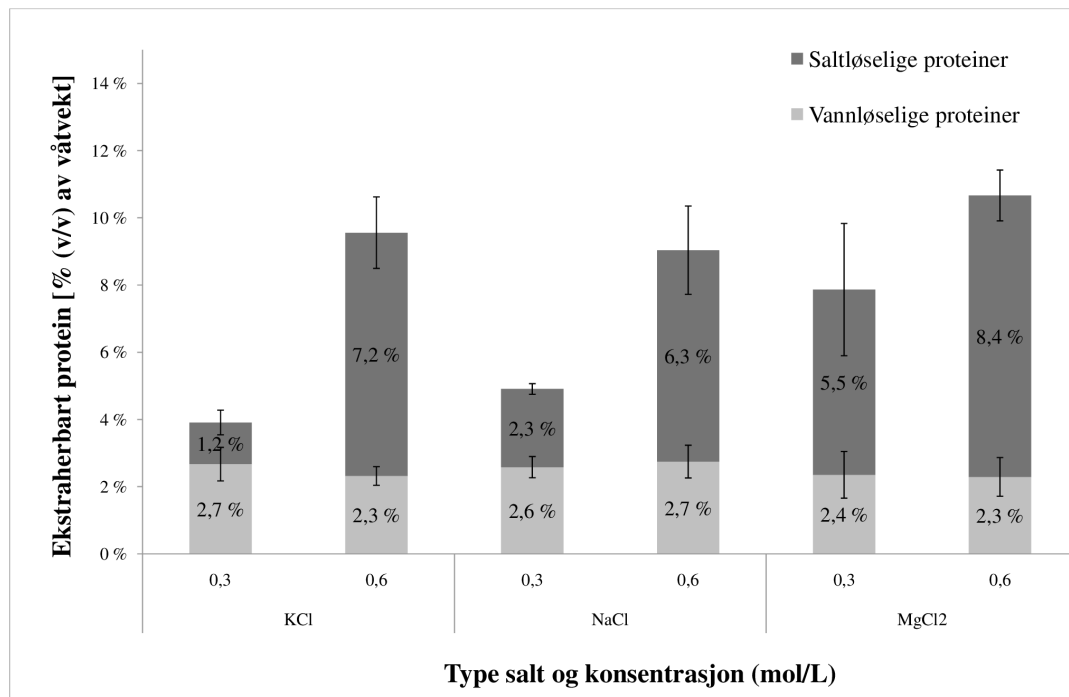
I de følgende avsnittene vil resultater fra ekstraksjon av vann- og saltløselige proteiner fra sei, hyse, kvitlaks og torsk bli presentert. Proteinene ble ekstrahert som beskrevet i avsnitt 3.2.1 og konsentrasjon bestemt med BioRad. Signifikante forskjeller mellom ulike salter og ulike konsentrasjoner, samt mellom forskjellige råstoff, ble undersøkt med et signifikansnivå på 5%. Eksempel på utregning er vist i vedlegg B.2. Proteinene ble separert ved hjelp av SDS-PAGE, og hensikten har vært å få en oversikt over hvilke proteiner som er tilstede etter ekstraksjon med de ulike saltene og konsentrasjonene, og om mønsteret endrer seg mellom de ulike råstoffene. Noe ulik intensitet i båndene på gelene forventes, da konsentrasjonen av proteinene ekstrahert med de ulike saltene vil være forskjellig. Alle prøver er fortynnet 1:1 med SDS-buffer, så protein-konsentrasjonen som er påsatt gelen vil være halvparten av det som presenteres i figurene med resultater for proteinløselighet. De ulike myofibrillproteinene ble bestemt ved hjelp av kunnskap om molekylvektene deres, som beskrevet i avsnitt 2.2.2. Metoden er noe usikker, men kan gi kvalitativ informasjon om forskjeller mellom råstoffene. Myofibrillære systemer består av mange proteiner, og flere av disse har mer enn en subenhet. Det gjør at det dukker opp uidentifiserte bånd på gelen etter separasjon med SDS-PAGE, som øker i antall med økende kompleksitet av proteinekstraktet som undersøkes. I tillegg har subenhetene av mange myofibrillære proteiner svært like molekylvekter, noe som gjør analysen av gelen vanskeligere (Gordon & Barbut 1992). Siden mange av gelene har nokså lik SDS-PAGE-profil er det valgt å vise et utvalg her, og resten fins i vedlegg i A. I de følgende avsnittene vil det bli benyttet tre forkortelser, og disse er som følger:

- VLP – vannløselig protein
- SLP – saltløselig protein
- MHC – myosinets tunge kjede (myosin heavy chain)

4.3.1 Sei

Fersk sei

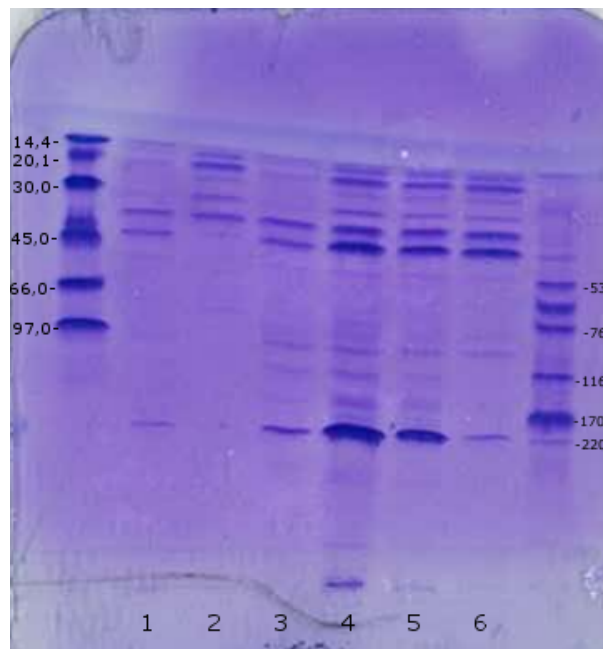
Filet VLP og SLP ble ekstrahert fra fersk seifilet. Resultatene er vist i figur 4.4. Hver søyle viser gjennomsnittet av tre forsøk med to paralleller hver. Dette gjelder med unntak av begge parallellene ekstrahert med 0,6 M KCl i forsøk 1. Som vist i figur A.1 (vedlegg A.1) ekstraheres opp mot 18% tilsammen av VLP og SLP. Dette kan skyldes unøyaktighet i metoden. Disse parallellene er derfor utelatt fra beregning av gjennomsnittet. Det er ingen signifikante forskjeller i mengde ekstrahert SLP mellom høye konsentrasjoner (0,6 M) av KCl, NaCl og MgCl₂. Det er heller ingen signifikante forskjeller i mengde ekstrahert SLP mellom høy og lav konsentrasjon av MgCl₂. 0,3 M MgCl₂ og 0,3 M NaCl ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,3 M KCl. Ionestyrken til en MgCl₂-løsning på 0,3 M og 0,6 M er henholdsvis 0,9 M og 1,8 M, og det forventes at MgCl₂ ville kunne ekstrahere en signifikant større mengde SLP enn NaCl og KCl ved samme konsentrasjon, ettersom konsentrasjonen av Cl⁻-ioner er to ganger så stor som for NaCl og KCl. Ved 0,6 M konsentrasjon er ikke dette tilfelle, men 0,3 M MgCl₂ ekstraherer omtrent dobbelt så mye som 0,3 M KCl. Årsaken til at MgCl₂ ekstraherer mindre SLP enn forventet, kan være – som beskrevet i avsnitt 2.5.1 – at divalente ioner binder til polare grupper i proteiner og forsterker protein-proteinvekselvirkningene, som fremmer aggregering av proteinene. Det gjør at en større andel av proteiner blir uløselige, og ikke ekstraheres ut. Effekten



Figur 4.4: Mengde ekstrahert VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra fersk seifilet. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller og tre forsøk, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.

øker ved økende konsentrasjon, og dermed ekstraheres en mindre mengde proteiner enn forventet ved høye konsentrasjoner av divalente salt.

Proteiner fra en parallell for hvert salt og hver konsentrasjon fra forsøk 3 ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Separasjon av ulike proteiner samt standarder er vist i figur 4.5, mens identifiserte proteiner er vist i tabell 4.2. Av figur 4.5 observeres det at forskjellige salter og konsentrasjoner har ulik SDS-PAGE-profil (ekstraherer ulike typer proteiner og i ulike mengder). 0,6 M NaCl (bane 4) gir sterkest bånd og flest proteiner. Båndet ved 220 kDa bestemmes til MHC, i samsvar med teori, og er synlig i alle baner unntatt bane 2 (0,6 M KCl). G-aktin har en molekylvekt på 42 kDa og fins rett ved båndet til 45 kDa-standarden. Heller ikke dette båndet er synlig for 0,6 M KCl. Hos NaCl og MgCl₂ (begge konsentrasjoner, bane 3-6) fins et svakt bånd ved 97 kDa. Dette kan være α -actinin. I bane 1, 4, 5 og 6 (0,3 M KCl, 0,6 M NaCl, 0,3 og 0,6 M MgCl₂) synes et bånd som ligger nært LMW-standarden 14,4 kDa. Dette kan være et av myosinets lette kjeder, LC3 (16,6 kDa). Mellom 14,4 kDa- og 20,1 kDa-standarden synes et bånd som kan være LC2 (18 kDa) og/eller troponin-C (18 kDa). Ved 20,1 kDa synes et bånd med sterkere intensitet. Dette kan være troponin-I (20 kDa) og/eller LC1 (20,9 kDa). Det er ikke mulig å bestemme disse båndene sikkert, da vandringslengden til proteiner under 30 kDa ikke nødvendigvis er lineært proporsjonal med deres log (M_w) (Pharmacia LKB Biotechnology). Videre har 0,6 M KCl, 0,6 M NaCl og 0,3 og 0,6 M MgCl₂ et bånd som samsvarer med proteinstandarden på 30 kDa. Dette kan være troponin-T (30 kDa) og/eller CapZ β (32 kDa). Mellom LMW-standarden på 30 og 45 kDa synes et bånd i alle baner som kan være CapZ α (36 kDa) og/eller tropomyosin α -enhet (37 kDa). For 0,3 M og 0,6 M NaCl, samt 0,3 M MgCl₂, synes et svakt bånd ved 170 kDa, som muligens kan være M-linjeproteinet myomesin (185 kDa). I brønn 4 ser det ut til at det står igjen noe protein. Dette kan være høymolekulære proteiner som titin og nebulin, som er for store til å passere gjennom porene i gelen (Munasinghe & Sakai 2003).



Figur 4.5: Proteiner fra fersk seifilet separert med SDS-PAGE. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M NaCl; 4 = 0,6 M NaCl; 5 = 0,3 M MgCl₂; 6 = 0,6 M MgCl₂.

For NaCl øker båndstyrken fra lav til høy konsentrasjon, noe som korrelerer godt med mengden ekstrahert SLP (figur 4.4). For KCl og MgCl₂ er trenden ikke den samme. For KCl forsvinner G-aktin og MHC, fra lav til høy konsentrasjon, og båndstyrken øker ikke. Dette samsvarer ikke helt med den relativt store mengden ekstrahert SLP med 0,6 M KCl. En mulig forklaring på dette kan være aggregeringseffekten av KCl, som ble beskrevet i avsnitt 2.5.1. Dersom det dannes aggregater av proteiner, vil disse bli for store til å vandre gjennom porene i gelen. Det kan også ha sammenheng med at størst løselighet for proteiner oppnås med et kaotroft anion og et kosmotroft kation (Puolanne & Halonen 2010), slik som NaCl (avsnitt 2.5). KCl består av et kaotroft kation og et kaotroft anion, og vil dermed ikke ha like god evne til løseliggjøring som NaCl. Etttersom det ikke var noen signifikant forskjell mellom 0,6 M NaCl og 0,6 M KCl i mengde ekstrahert SLP (figur 4.4), virker det ikke som at sistnevnte teori er årsaken til at det er færre bånd og bånd med lavere intensitet, for proteiner ekstrahert med KCl.

Det er liten forskjell mellom 0,3 og 0,6 M MgCl₂ i båndstyrke. Mengden ekstrahert SLP var noe større for 0,6 M MgCl₂ enn for 0,3 M MgCl₂, så en noe sterkere båndstyrke vil vært forventet. En årsak til at mengde ekstrahert SLP og antall bånd samt båndintensitet ikke alltid samsvarer, kan være at de ulike saltene ekstraherer forskjellige typer proteiner. Dersom KCl ekstraherer en større mengde av proteiner som er for store til å vandre gjennom gelen (for eksempel aktomyosin), enn NaCl, vil det på gelen kunne se ut som NaCl ekstraherer flere og større mengder protein enn KCl. Som beskrevet i avsnitt 2.5.1, ble evne til proteinekstraksjon av NaCl, KCl og LiCl i fiskemuskel undersøkt av Munasinghe & Sakai (2003). De fant ikke en signifikant forskjell mellom de ulike saltene i forhold til hvor mange bånd på gelen som kunne bestemmes, men det ble observert en høyere klarhet og intensitet i båndene fra NaCl-ekstraktene. Videre ble det konstatert at NaCl gav den største mengden ekstrahert protein (sammenlignet med KCl og LiCl), og at KCl ekstraherte mindre myosin enn de to andre saltene. I en annen studie (Gordon & Barbut (1992)) ekstraherte NaCl og LiCl signifikant mer protein fra kvernet kjøtt enn KCl ($P < 0,01$). Disse resultatene samsvarer med observasjonen av at NaCl

Tabell 4.2: Identifiserte proteiner fra filet av fersk sei, separert med SDS-PAGE. Molekylvekter (kDa) til de ulike proteinene er oppgitt i parentes. Proteiner med like eller tilnærmet like molekylvekter bli listet sammen, da sikker identifikasjon av de enkelte proteinene er vanskelig. *På grunn av lav oppløsning, kan ikke identiteten til båndene fastsettes med sikkerhet.

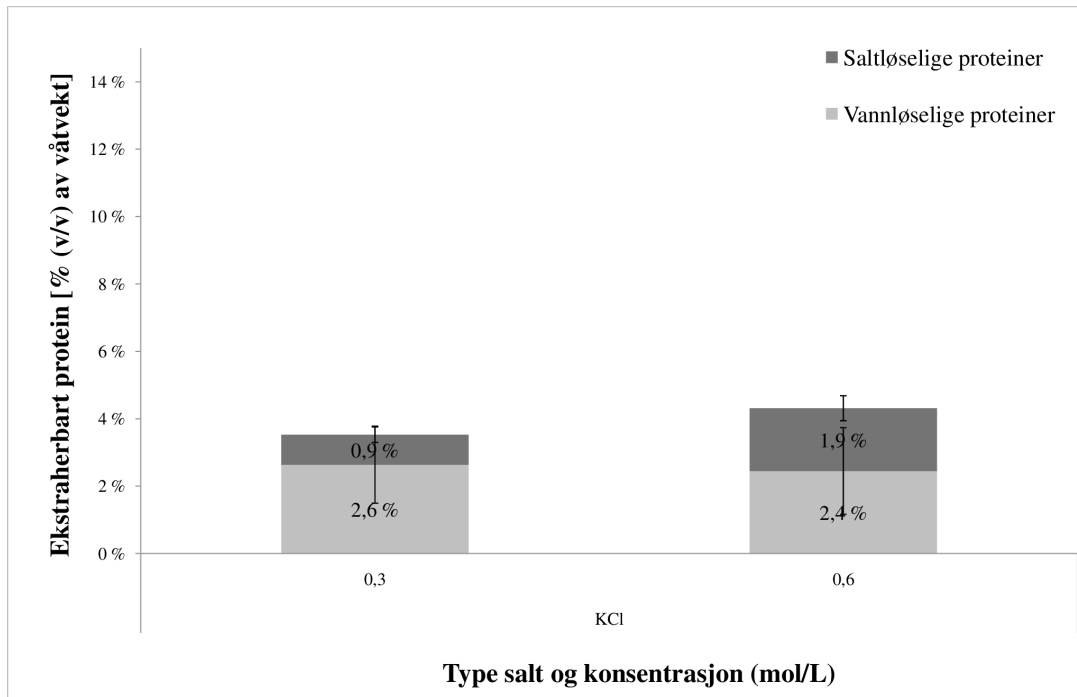
Protein (kDa)	KCl (M)		NaCl (M)		MgCl ₂ (M)	
	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6
LC3 (16,6)	x	-	-	x	x	x
LC2 (18)/Troponin-C (18)	-	x*	-	x*	x*	x*
Troponin-I (20)/LC1 (20,9)	-	x*	-	x*	x*	x*
Troponin-T (30)/CapZ β (32)	-	x	-	x	x	x
CapZ α (36)/Tropomyosin α -enhet (37)	x	x	x	x	x	x
Tropomodulin (40)	-	-	-	-	-	-
G-aktin (42)	x	-	x	x	x	x
α -actinin (97)	-	-	x	x	x	x
C-protein (140)	-	-	-	-	-	-
Myomesin (185)	-	-	x	x	x	-
Myosinets tunge kjede (220)	x	-	x	x	x	x

har sterkere og flere bånd enn KCl, og at KCl 0,6 M ikke ser ut til å ekstrahere MHC. Det kan likevel ikke forklare at 0,3 M KCl ekstraherer MHC. Det ansees som sannsynlig at aggregering foregår ved høye konsentrasjoner av KCl, og at effekten ikke er like fremtredende ved lavere konsentrasjoner. Hvis dette stemmer, kan det være årsaken til at 0,3 M KCl ekstraherer MHC, og at 0,6 M KCl ikke gjør det.

Det viktigste for gelegenskapene til fiskeprodukter er at MHC er løselig, ettersom det i hovedsak er den som danner gel. Her peker altså 0,6 M NaCl seg ut som den beste ekstraktanten, etterfulgt av 0,3 M MgCl₂.

Farse Resultater for ekstrahering av proteiner fra farse av fersk sei er vist i figur 4.6. Forsøket ble utført tre ganger med to paralleller for hver konsentrasjon og hvert salt. Kun KCl (0,3 og 0,6 M) ble benyttet, og forskjellen mellom disse er signifikant. Sammenlignes det med filet av sei er det en signifikant forskjell i mengde ekstrahert SLP med 0,6 M KCl. Kverningsprosessen forårsaker altså en nedgang i mengde ekstrahert SLP med 0,6 M KCl. Når fiskemuskel kvernes, ødelegges muskelstrukturen, slik at proteiner kan komme i tettere kontakt med hverandre og nye bindinger kan oppstå. Dette kan føre til aggregering og redusert løselighet av muskelproteinene. En årsak til at det ikke er noen signifikant nedgang i proteinløselighet for 0,3 M KCl, kan være at det i utgangspunktet ble ekstrahert lite SLP fra filet, og at kverningsprosessen derfor ikke gir en markant nedgang i mengden ekstraherbart protein.

Proteiner fra en parallell for hvert salt og hver konsentrasjon ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Identifiserte proteiner er vist i tabell 4.3. Grunnlaget for denne tabellen er figur A.2 (to paralleller for hvert salt og hver konsentrasjon), A.3 (bane 1-2), og A.6 i vedlegg A.1. I dette avsnittet diskuteres kun resultatene for farse av fersk sei, mens resultatene for farse av fryst sei diskuteres i avsnitt 4.3.1. MHC og G-aktin er kun synlig for 0,3 M KCl. Dette samsvarer med resultatet for seifilet (tabell 4.2). CapZ α (36 kDa) og/eller tropomyosin α -enhet (37 kDa) fins for begge konsentrasjoner – også i samsvar med resultater for seifilet. Trenden er at lavmolekylære myofibrillproteiner dominerer, mens det er et fravær av høymolekylære proteiner – som også stemmer for KCl-ekstraktene for filet (bane 1-2 i figur 4.5). På gelen i figur A.2 ble SLP fra



Figur 4.6: Mengde ekstraherbart VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra farse av fersk seifilet. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller og tre forsøk, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.

to paralleller for hver konsentrasjon separert, og viser forskjeller mellom parallellene i antall proteiner som ble ekstrahert med 0,3 M KCl (bane 1-2). MHC er synlig i bane 1, men ikke i bane 2. Dette kan skyldes usikkerhet i ekstraksjonen, og derfor kan det bli noen forskjeller selv for de prøver som er ekstrahert med samme salt og konsentrasjon.

Frossen sei

Filet VLP og SLP ble ekstrahert fra fileten av sei som har vært fryst, og resultatene er vist i figur 4.7. For alle salter og konsentrasjoner er det en signifikant nedgang i mengde ekstrahert SLP i det frysede råstoffet sammenlignet med det ferske (figur 4.4). Dette skyldes, som beskrevet i avsnitt 2.6, fryseindusert denaturering og -aggregering av myosin. 0,3 M $MgCl_2$ ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn KCl og NaCl ved samme konsentrasjon, men ved 0,6 M er ikke forskjellen signifikant. 0,6 M NaCl ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,6 M KCl.

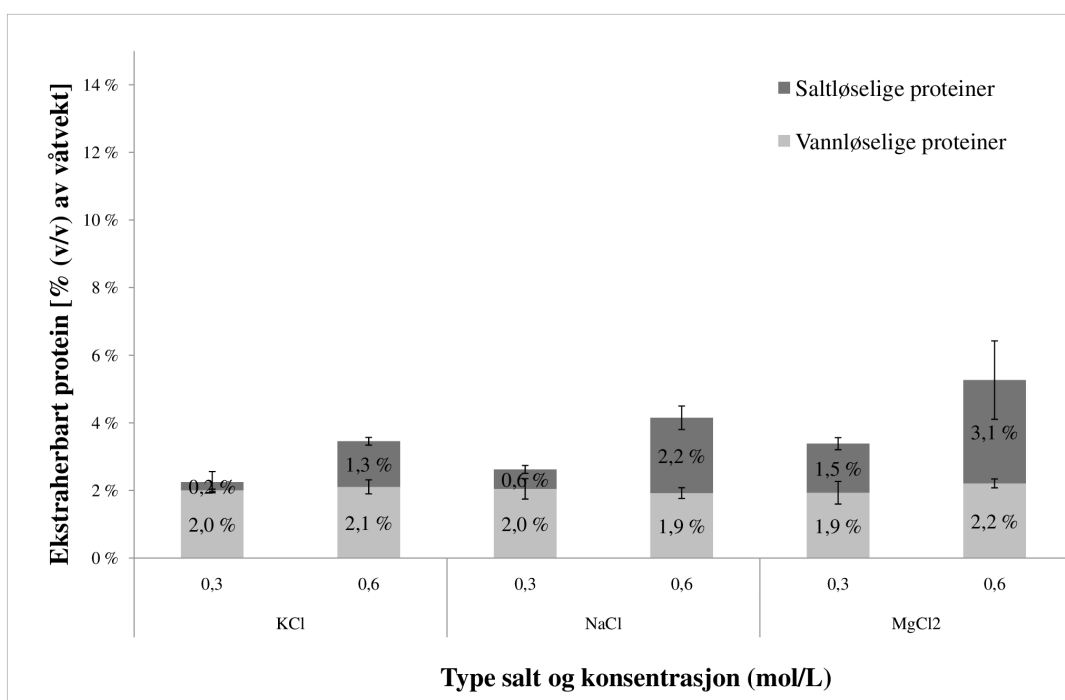
SLP fra en parallell for hvert salt og hver konsentrasjon ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. De identifiserte proteinene er vist i tabell 4.4. Separasjon av ulike proteiner samt standarder er vist i figur A.4 (farget med Coomassie Blue) og figur A.5 (farget med sølv) i vedlegg A.1. På samme måte som mengden ekstrahert protein reduseres ved frysing reduseres også antall identifiserbare bånd på gelen. Igjen gir 0,6 M NaCl flest og sterkest bånd. MHC er synlig i banene for begge konsentrasjoner av NaCl og 0,3 M $MgCl_2$. Som for fileten av fersk sei, er G-aktin synlig i alle baner med unntak av 0,3 M KCl. CapZ α og/eller tropomyosin α -enhet er synlig i alle baner.

Tabell 4.3: Identifiserte proteiner fra farse av fersk og fryst sei ekstrahert med 0,3 og 0,6 M KCl. Molekylvekter (kDa) til de ulike proteinene er oppgitt i parentes. Proteiner med like eller tilnærmet like molekulvekter bli listet sammen, da sikker identifikasjon av de enkelte proteinene er vanskelig. *På grunn av lav oppløsning, kan ikke identiteten til båndene fastsettes med sikkerhet.

Protein (kDa)	Fersk		Fryst	
	0,3	0,6	0,3	0,6
LC3 (16,6)	x	x	x	x
LC2 (18)/Troponin-C (18)	x*	x*	x*	x*
Troponin-I (20)/LC1 (20,9)	x*	x*	x*	x*
Troponin-T (30)/CapZ β (32)	x	x	x	x
CapZ α (36)/Tropomyosin α -enhet (37)	x	x	x	x
Tropomodulin (40)	-	-	-	-
G-aktin (42)	x	-	x	x
α -actinin (97)	-	-	-	-
C-protein (140)	-	-	-	-
Myomesin (185)	-	-	-	-
Myosinets tunge kjede (220)	x	-	-	-

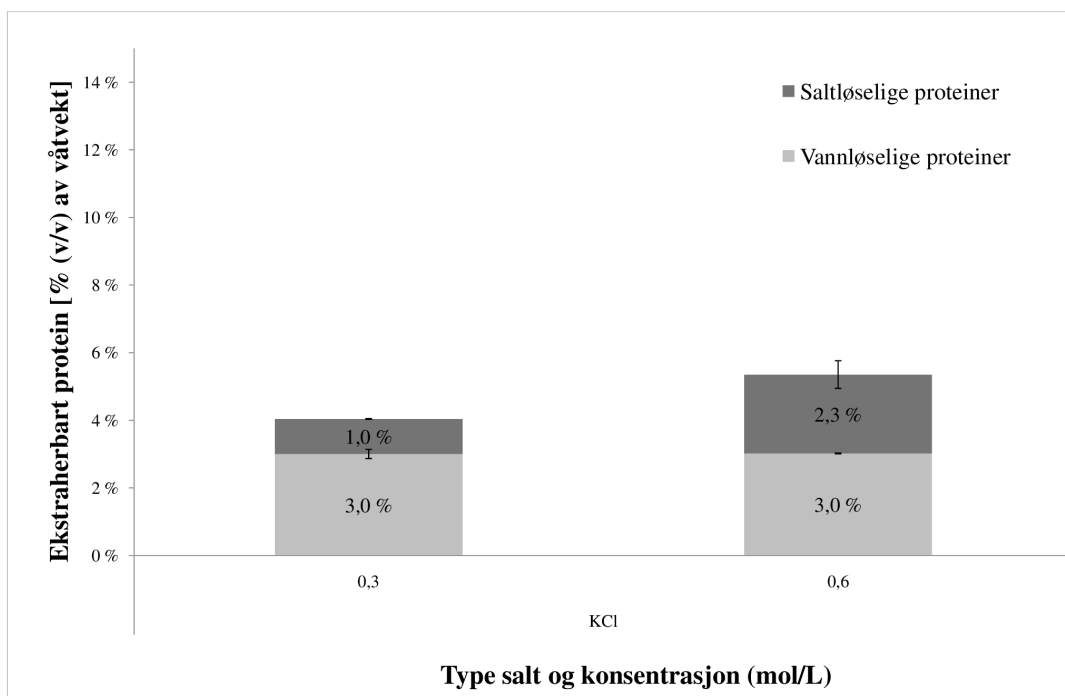
Tabell 4.4: Identifiserte proteiner fra filet av sei som har vært fryst, separert med SDS-PAGE. Molekylvekter (kDa) til de ulike proteinene er oppgitt i parentes. Proteiner med like eller tilnærmet like molekulvekter bli listet sammen, da sikker identifikasjon av de enkelte proteinene er vanskelig. *På grunn av lav oppløsning, kan ikke identiteten til båndene fastsettes med sikkerhet.

Protein (kDa)	KCl (M)		NaCl (M)		MgCl ₂ (M)	
	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6
LC3 (16,6)	x*	x*	x*	x*	x*	x*
LC2 (18)/Troponin-C (18)	-	-	x*	x*	x*	x*
Troponin-I (20)/LC1 (20,9)	-	-	-	x*	x*	x*
Troponin-T (30)/CapZ β (32)	-	-	x	x	x	x
CapZ α (36)/Tropomyosin α -enhet (37)	x	x	x	x	x	x
Tropomodulin (40)	-	-	-	-	-	-
G-aktin (42)	x	-	x	x	x	x
α -actinin (97)	-	-	x	x	x	-
C-protein (140)	-	-	-	-	-	-
Myomesin (185)	-	-	x	x	x	-
Myosinets tunge kjede (220)	-	-	x	x	x	-



Figur 4.7: Mengde ekstraherbart VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra seifilet som har vært fryst. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.

Farse VLP og SLP ble ekstrahert fra farse av sei som har vært fryst, og resultatene er vist i figur 4.8. Det ekstraheres en signifikant større mengde SLP med 0,6 M KCl enn med 0,3 M



Figur 4.8: Mengde ekstraherbart VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra farse av sei som har vært fryst. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.

KCl. Sammenlignes det med resultatene for filet av sei som har vært fryst (figur 4.7), observeres det at det ekstraheres en signifikant større mengde VLP og SLP for farse av fryst sei, enn fra filet av fryst sei. Det er motsatt av det som ble observert for det ferske råstoffet. Det ble ekstrahert en signifikant større mengde SLP fra filet av fersk sei, enn fra farse av fersk sei, men det var ingen forskjeller i mengde ekstrahert VLP. Generelt er det forventet at sarkoplasmaproteiner (vannløselige) er relativt frysestabile. Årsaken til at løseligheten til de VLP øker fra filet av fryst sei, til farse av fryst sei, er kanskje at enzymer og substrater som har blitt frigitt i kverningsprosessen har fått tid til å reagere, og fører til degradering og økt løseliggjøring av sarkoplasmaproteinene.

SLP fra en parallell for hvert salt og hver konsentrasjon ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Separasjon av ulike proteiner samt standarder er vist i figur A.6 og A.3 (brønn 3-4) i vedlegg A.1. Identifiserte proteiner er vist i tabell 4.3. Som for farse av fersk sei, dominerer lavmolekylære myofibrillproteiner, mens det er et fravær av høymolekylære proteiner. Til forskjell fra farse av fersk sei, er G-aktin synlig for begge konsentrasjoner av KCl, mens MHC er fraværende for begge konsentrasjoner. Sammenlignes det med filet av fryst sei (tabell 4.4), er antall identifiserbare bånd for KCl-ekstraktene større for farse av fryst sei. Dette samsvarer med at mengden ekstrahert SLP fra farse var høyere enn for filet av fryst sei.

Oppsummering sei

- For **filet av fersk sei** (figur 4.4) er det ingen signifikante forskjeller i mengde ekstrahert SLP mellom høye konsentrasjoner (0,6 M) av KCl, NaCl og MgCl₂, og heller ikke mellom høy og lav konsentrasjon av MgCl₂. 0,6 M KCl og NaCl ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn henholdsvis 0,3 M KCl og NaCl. 0,3 M MgCl₂ og NaCl ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,3 M KCl.

Analyse av proteinekstraktene ved SDS-PAGE (figur 4.5 og tabell 4.2) indikerer at 0,6 M NaCl er den beste ekstraktanten, etterfulgt av 0,3 M MgCl₂. Dette baserer seg på antall bånd som er identifiserbare, samt intensiteten til båndene. Alle ekstraktanter, unntatt 0,6 M KCl, ekstraherer G-aktin og MHC. På grunnlag av dette vurderes 0,6 M KCl som en dårligere ekstraktant enn de andre.

- For **farse av fersk sei** (figur 4.6) ekstraheres en signifikant større mengde SLP med 0,6 M KCl enn med 0,3 M KCl. Det er en signifikant reduksjon i mengde ekstrahert SLP fra farse ekstrahert med 0,6 M KCl, sammenlignet med filet.

Analyse av proteinekstraktene ved SDS-PAGE (tabell 4.3) viser at lavmolekylære proteiner dominerer, mens det er et generelt fravær av høymolekylære proteiner, noe som også er trenden for KCl-ekstraktene fra filet. MHC fins kun for 0,3 M KCl.

- For **filet av sei som har vært fryst** (figur 4.7) er det en signifikant nedgang i mengde ekstrahert SLP for alle salter og konsentrasjoner, sammenlignet med fersk filet. 0,3 M MgCl₂ ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,3 M KCl og NaCl, men ved 0,6 M er ikke forskjellen signifikant. 0,6 M NaCl ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,6 M KCl.

Analyse av proteinekstraktene ved SDS-PAGE (tabell 4.4) viser at antall synlige bånd reduseres noe sammenlignet med fersk seifilet, men at trenden ellers er den samme.

- For **farse av sei som har vært fryst** (figur 4.8) ekstraheres en signifikant større mengde SLP med 0,6 M KCl enn med 0,3 M KCl. Det er dessuten en signifikant økning i mengde

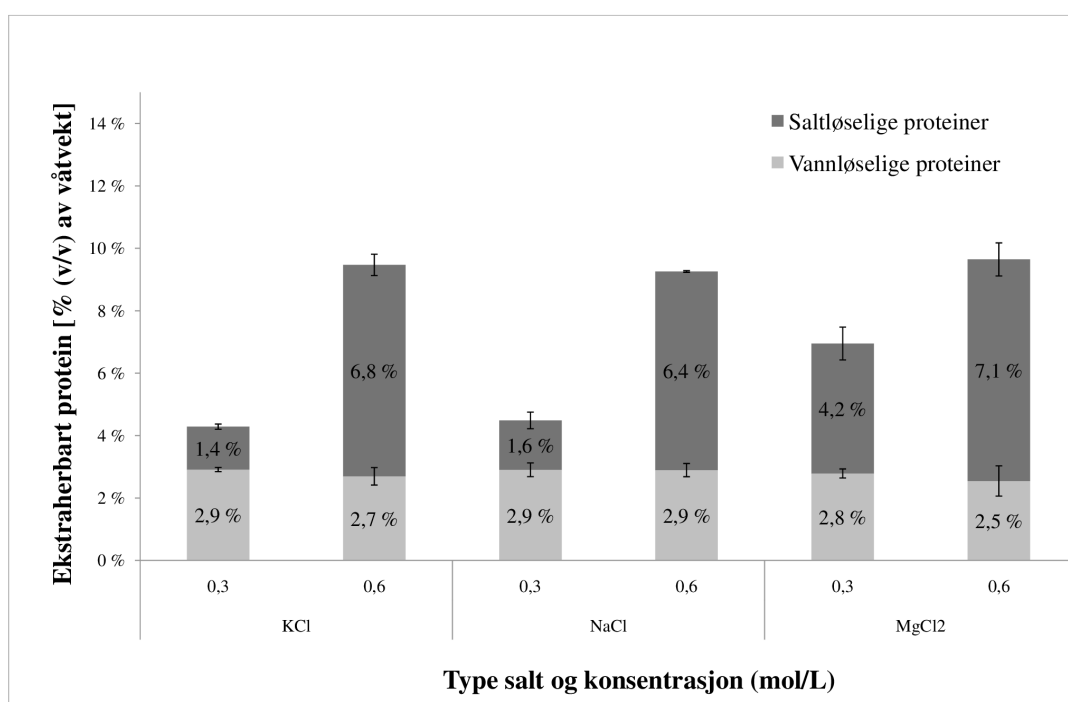
ekstrahert SLP for farse av sei som har vært fryst, sammenlignet med filet av sei som har vært fryst.

Analyse av proteinekstraktene ved SDS-PAGE (tabell 4.3) viser at antall synlige bånd følger den samme trenden som for farse av fersk sei.

4.3.2 Hyse

Fersk hyse

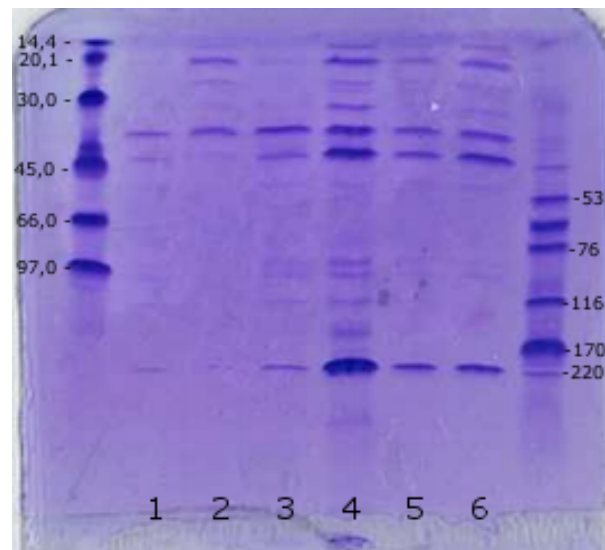
Filet VLP og SLP ble ekstrahert fra filet av hyse. Resultatene er vist i figur 4.9. Forskjellen



Figur 4.9: Mengde ekstraherbart VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra filet av fersk hyse. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.

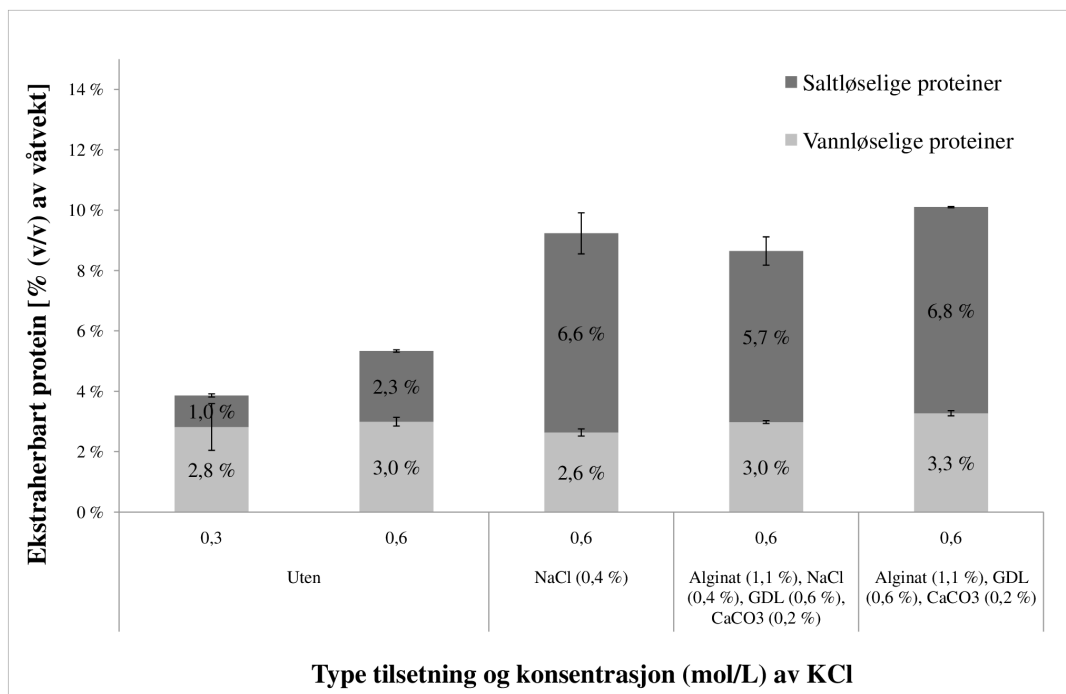
mellom de ulike saltene ved 0,6 M konsentrasjon er ikke signifikant, mens 0,3 M MgCl₂ ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,3 M NaCl og KCl. Forskjellene i mengde ekstrahert SLP mellom høy og lav konsentrasjon er signifikante for alle saltene, men forskjellen mellom 0,3 M og 0,6 M MgCl₂ er mindre enn for de to andre. 0,6 M NaCl og KCl ekstraherer over dobbelt så mye SLP som henholdsvis 0,3 M NaCl og KCl. Dette er i samsvar med det som ble funnet for sei i avsnitt 4.3.1.

Proteiner fra en parallell for hvert salt og hver konsentrasjon ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Separasjon av ulike proteiner samt standarder er vist i figur 4.10. Det samme mønsteret og tendensen som for filet av fersk sei gjenspeiles her, og identifiserte proteiner er vist i tabell 4.5. 0,6 M NaCl har sterkest og flest bånd, og MHC er synlig i alle baner – unntatt bane 2 (0,6 M KCl). Resultatene samsvarer godt med at mengden ekstrahert SLP fra filet av fersk hyse og fersk sei var nokså lik (kun signifikante forskjeller for 0,3 M NaCl og MgCl₂).



Figur 4.10: Proteiner fra filet av fersk hyse separert med SDS-PAGE. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M NaCl ; 4 = 0,6 M NaCl ; 5 = 0,3 M MgCl₂; 6 = 0,6 M MgCl₂.

Farse Farse med og uten tilsetninger ble laget av fersk hyse, og proteiner ekstrahert med KCl. De ulike tilsetningene er vist i tabell 4.6, og resultatene for proteinekstraksjon er vist i figur 4.11. For farse uten tilsetning ble både 0,3 og 0,6 M KCl benyttet, mens for farsene med tilsetninger ble kun 0,6 M KCl benyttet.



Figur 4.11: Mengde ekstraherbart VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra farse av fersk hyse. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.

GDL (glucono δ -lactone) og CaCO₃ er hjelpetilsetningsstoffer som bidrar til gelning av Na-alginat. I beregningene av proteinløselighet er det korrigert for at tilsetninger (+ vann) utgjør

Tabell 4.5: Identifiserte proteiner fra filet av fersk hyse, separert med SDS-PAGE. Molekylvekter (kDa) til de ulike proteinene er oppgitt i parentes. Proteiner med like eller tilnærmet like molekylvekter bli listet sammen, da sikker identifikasjon av de enkelte proteinene er vanskelig. *På grunn av lav oppløsning, kan ikke identiteten til båndene fastsettes med sikkerhet. **Kun antydning til bånd.

Protein (kDa)	KCl (M)		NaCl (M)		MgCl ₂ (M)	
	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6
LC3 (16,6)	-	-	-	x	x	x
LC2 (18)/Troponin-C (18)	-	x*	-	x*	x*	x*
Troponin-I (20)/LC1 (20,9)	-	x*	-	x*	x*	x*
Troponin-T (30)/CapZ β (32)	-	-	-	x	-	x
CapZ α (36)/Tropomyosin α -enhet (37)	x	x	x	x	x	x
Tropomodulin (40)	-	-	-	-	-	-
G-aktin (42)	x	-	x	x	x	x
α -actinin (97)	-	-	x**	x	x**	x**
C-protein (140)	-	-	-	-	-	-
Myomesin (185)	-	-	-	x	x	-
Myosinets tunge kjede (220)	x	-	x	x	x	x

Tabell 4.6: Tilsetningsstoffer i farse av hyse. GDL = Glucono δ -lactone.

Tilsetninger

NaCl (0,4%)

Na-alginat (1,1%) + NaCl (0,4%) + GDL (0,6%) + CaCO₃ (0,2%)

Na-alginat (1,1%) + GDL (0,6%) + CaCO₃ (0,2%)

omtrent 40% av vekten. For farsene uten tilsetning er det en signifikant forskjell mellom høy og lav konsentrasjon, hvor 0,6 M KCl ekstraherer mer SLP enn 0,3 M KCl. Sammenlignes mengden ekstrahert SLP fra farse med filet, er det ingen signifikant forskjell for 0,3 M KCl, men for 0,6 M KCl ekstraheres en signifikant mindre mengde SLP fra farse enn fra filet. Dette er i samsvar med resultatene for sei.

For farsene med tilsetning (figur 4.11) er mengden ekstrahert SLP med 0,6 M KCl samlet sett omtrent lik for alle farsene (kun en liten signifikant forskjell mellom Na-alginat+NaCl, og Na-alginat), men det ekstraheres en signifikant større mengde enn fra farsen uten tilsetning. Dette tyder på at tilsetningene løser ut de saltløselige proteinene, og gjør dem enklere å ekstrahere. Siden salt løser og ekstraherer ut myofibrillproteiner, er det forventet at en større mengde SLP ekstraheres fra farsen med salt enn farsen uten salt. Hong & Chin (2010) undersøkte effekten av Na-alginat og GDL på geldannelse (kaldsetting) av myofibrillproteiner fra svin. De foreslo at myofibrillproteinene blir suspendert i alginatløsningen, og at de blir fanget i alginatnettverket. Dette kan føre til at de blir enklere å ekstrahere. SDS-PAGE-analyse av myofibrillproteinene viste at Na-alginat- og GDL-nivåene ikke påvirket SDS-PAGE-profilene til myofibrillproteinene, noe som indikerer at kaldsetting av geler med Na-alginat ikke i hovedsak skyldes vekselvirkninger mellom Na-alginat og myofibrillproteinene, men Na-alginatsystemet i seg selv. Dette støttes av at Na-alginat er et polyanion som vil frastøtes av myofibrillproteinene ved $\text{pH} > \text{pI}$ (Hong & Chin 2010). Eppersom NaCl og Na-alginat hver for seg har en positiv effekt på mengde ekstrahert SLP, ville det kanskje vært forventet at de ville hatt en synergistisk effekt sammen. Av figur 4.11 observeres det at dette ikke er tilfelle. Det virker derfor sannsynlig at tilsetningsstoffene bare kan øke proteinløseligheten opp til et visst nivå, slik at man ikke får en ytterligere økning i proteinløselighet ved tilsats av både Na-alginat og NaCl.

I dette forsøket ekstraheres det med 0,6 M KCl en signifikant større mengde SLP fra farser med tilsetninger, enn fra farsen uten. Tilsetningsstoffene ser ut til å kunne kompensere for en dårlig proteinekstraktant ved å øke mengden SLP som kan ekstraheres med det aktuelle saltet. Det virker sannsynlig at en tilsvarende effekt ville vært observert for lavere konsentrasjoner av KCl, og for andre salter. Dette impliserer at lavere konsentrasjoner av salt kan benyttes for å oppnå samme mengde ekstrahert SLP som med en høyere konsentrasjon, dersom det benyttes tilsetningsstoffer i tillegg.

Proteiner fra en parallell for hver tilsetning ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Separasjon av ulike proteiner samt standarder er vist i figur A.7 (farget med Coomassie Blue) og A.8 (farget med sølv) i vedlegg A.2. Identifiserte proteiner er vist i tabell 4.7. CapZ α (36 kDa) og/eller tropomyosin α -enhet (37 kDa) er synlig i alle brønner. I figur A.8 er det antydning til tegn av G-aktin særlig i brønn 1 og 2 (farser uten tilsetning), men også noe i brønn 3-5 (fra farser med tilsetning). I den samme figuren synes et bånd rundt 20,1 kDa, i alle brønner. Et bånd mellom 20,1 og 30 kDa er synlig i brønn 2-5 (farser med tilsetning samt farsen uten tilsetning, ekstrahert med 0,6 M KCl.) I figur A.7 er det i tillegg noen veldig svake bånd mellom 14,4 og 20,1 kDa. Det er antydning til MHC i alle baner unntatt 0,3 M KCl. Båndene på gelene er relativt svake i forhold til den relativt store mengden SLP som ble ekstrahert. Noe svakere bånd for farsene med tilsetning er forventet, da farsen inneholdt omtrent 60% muskelvev og resten var vann og tilsetninger. Båndene fra farsene uten tilsetninger var imidlertid like svake. Av tabell 4.7 observeres det at SDS-PAGE-profilene til farsene med og uten tilsetninger er nokså like, noe som samsvarer med resultatene til Hong & Chin (2010). Hvis alginat hadde vekselvirket direkte med myofibrillproteinene – for eksempel ved å binde seg direkte til proteinene – ville det vært forventet at færre bånd hadde dukket opp på gelen, da disse kompleksene ville vært for store til å vandre gjennom porene i gelen. Dette er altså ikke tilfelle. Årsaken til at båndintensiteten

Tabell 4.7: Identifiserte proteiner fra farse av fersk hyse, med og uten tilsetninger. 1 = KCl 0,3 M; 2 = KCl 0,6 M; 3 = NaCl (0,4%); 4 = Alginat (1,1%), NaCl (0,4%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%); 5 = Alginat (1,1%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%). Proteiner fra farsene med tilsetning ble ekstrahert med KCl 0,6 M. Molekylvekter (kDa) til de ulike proteinene er oppgitt i parentes. Proteiner med like eller tilnærmet like molekylvekter bli listet sammen, da sikker identifikasjon av de enkelte proteinene er vanskelig. *Kun antydning til bånd.

Protein (kDa)	1	2	3	4	5
LC3 (16,6)	x*	-	-	x*	x*
LC2 (18)/Troponin-C (18)	-	-	-	-	-
Troponin-I (20)/LC1 (20,9)	x	x	x	x	x
Troponin-T (30)/CapZ β (32)	-	-	-	-	-
CapZ α (36)/Tropomyosin α -enhet (37)	x	x	x	x	x
Tropomodulin (40)	-	-	-	-	-
G-aktin (42)	x	x	x	x	x
α -actinin (97)	-	-	-	-	-
C-protein (140)	-	-	-	-	-
Myomesin (185)	-	-	-	-	-
Myosinets tunge kjede (220)	-	x*	x*	x*	x*

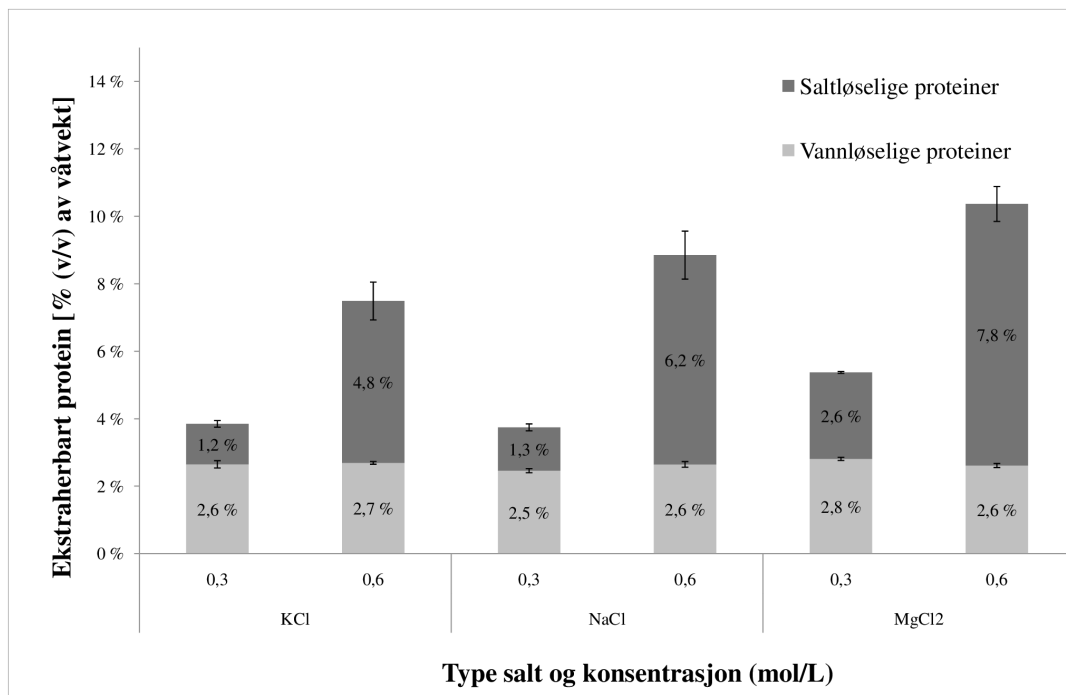
ikke samsvarer helt med mengden ekstrahert SLP kan også skyldes usikkerhet i metoden.

Frossen hyse

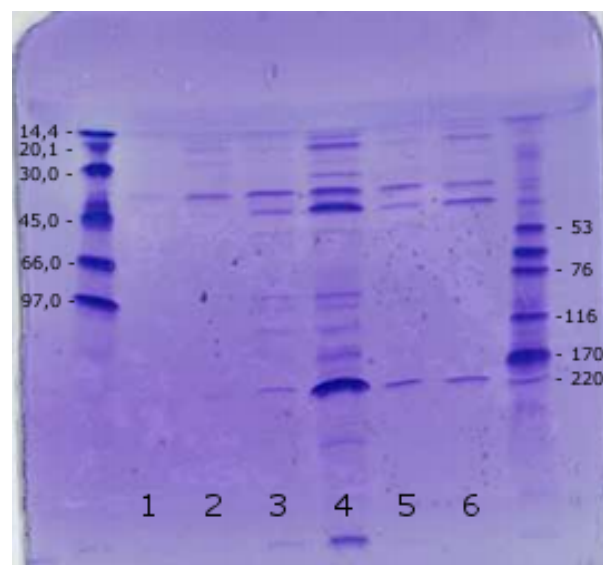
Filet VLP og SLP ble ekstrahert fra filet og farse av hyse som har vært fryst. Resultatene er vist i figur 4.12. Det er signifikante forskjeller mellom høy og lav konsentrasjon, for alle salter. 0,6 M MgCl₂ ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,6 M KCl, og det samme gjelder for lav konsentrasjon, både sammenlignet med KCl og NaCl. Det er ikke signifikante forskjeller mellom 0,3 M KCl og NaCl. Mellom fileten av fersk og fryst hyse er det en signifikant nedgang i mengde SLP ekstrahert av 0,6 M KCl og 0,3 M MgCl₂.

Proteiner fra en parallell for hvert salt og hver konsentrasjon ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Separasjon av ulike proteiner samt standarder er vist i figur 4.13 (farget med Coomassie Blue) og figur A.9 (farget med sølv) i vedlegg A.2. Identifiserte proteiner er vist i tabell 4.8. Igjen er båndene flest og sterkest for NaCl, mens de er færrest og svakest for KCl. MHC er synlig for alle salter og konsentrasjoner, men for begge konsentrasjoner av KCl er båndet svakt. Det samme gjelder for G-aktin. Det ble tatt av smeltevann fra hysefileten, og separasjon av proteiner fra vannet er vist i figur A.10 (vedlegg A.2). Gelen viser mange tydelige bånd, men særlig G-aktin har et sterkt bånd. Dessuten står det igjen noe protein i brønnen. Det tyder på at en del proteiner tapes i smeltevannet som oppstår i tiningsprosessen. Muskelstrukturer ødelegges i fryseprosessen, og dermed kan proteiner lekke ut når muskelvevet tines. Som kjent er G-aktin et SLP, så det er ikke bare VLP som tapes i denne prosessen. MHC ser ikke ut til å tapes.

Farse Farse med og uten tilsetninger ble laget av hyse som har vært fryst, og proteiner ekstrahert med KCl. Resultatet er vist i figur 4.14. De samme tilsetningene som for fersk hyse (tabell 4.6) ble benyttet. Som for farse av fersk hyse ekstraherer 0,6 M KCl en signifikant større mengde SLP enn 0,3 M KCl, fra farsene uten tilsetning. Det er liten forskjell i mengde ekstrahert protein



Figur 4.12: Mengde ekstraherbart VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra filet av hyse som har vært fryst. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.

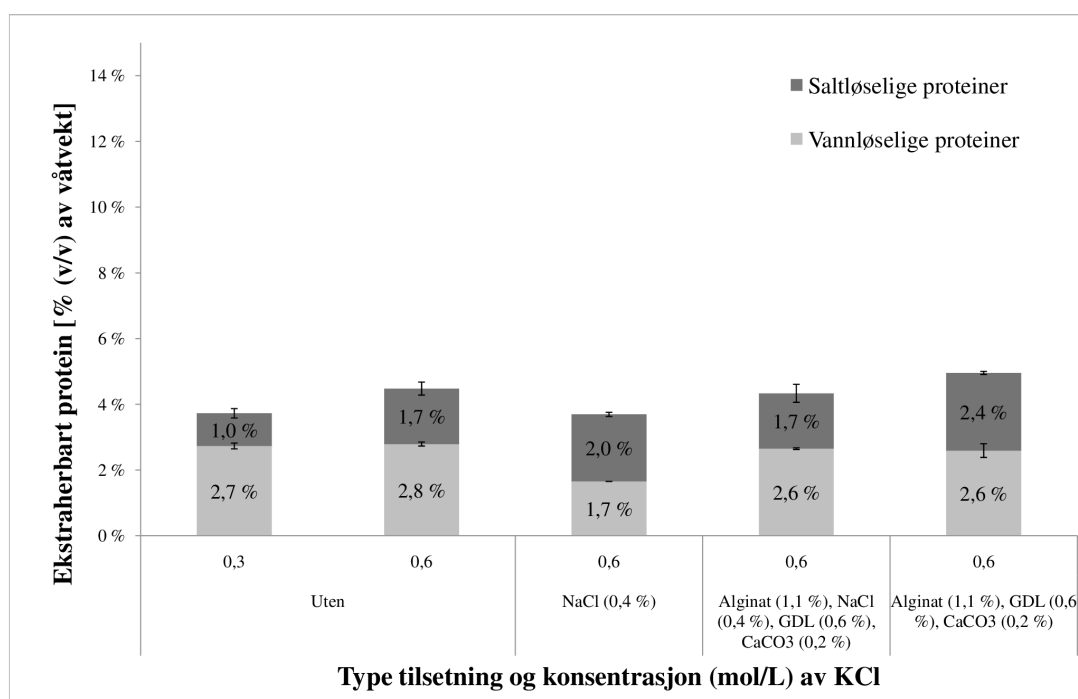


Figur 4.13: Proteiner fra filet av hyse som har vært fryst, separert med SDS-PAGE. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M NaCl; 4 = 0,6 M NaCl; 5 = 0,3 M MgCl₂; 6 = 0,6 M MgCl₂.

mellom de ulike farsene, men det ekstraheres en signifikant større mengde SLP fra farsen med kun Na-alginat enn fra de andre farsene. Mellom farse av fersk og fryst hyse er det signifikante forskjeller for alle tilsetningsstoffer, og for farsen uten tilsetning ekstrahert med 0,6 M KCl, men ikke for farsen ekstrahert med 0,3 M KCl. Mengden SLP er redusert i farsen av det fryste råstoffet, sammenlignet med det ferske. Effekten av tilsetningsstoffer er ikke like fremtredende for farse av fryst hyse som for farse av fersk hyse.

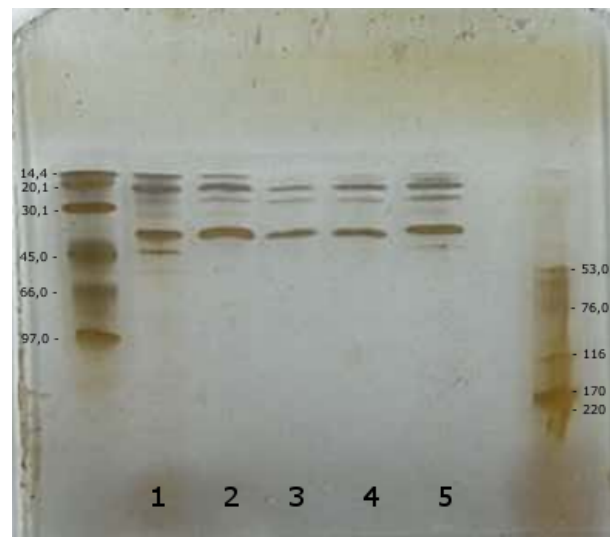
Tabell 4.8: Identifiserte proteiner fra filet av hyse som har vært fryst, separert med SDS-PAGE. Molekylvekter (kDa) til de ulike proteinene er oppgitt i parentes. Proteiner med like eller tilnærmet like molekulvekter bli listet sammen, da sikker identifikasjon av de enkelte proteinene er vanskelig. S = Smeltevann. *Kun antydning til bånd.

Protein (kDa)	KCl (M)		NaCl (M)		MgCl ₂ (M)		S
	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	
LC3 (16,6)	x	x	x	x	x	x	x
LC2 (18)/Troponin-C (18)	-	x	-	x	x	x	x
Troponin-I (20)/LC1 (20,9)	-	x	-	x	x	x	x
Troponin-T (30)/CapZ β (32)	-	-	-	x	-	-	x
CapZ 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
α -actinin (97)	-	-	x	x	x	x	x
C-protein (140)	-	-	-	-	-	-	-
Myomesin (185)	-	-	x	x	x	-	-
Myosinets tunge kjede (220)	-	x*	x	x	x	x*	-



Figur 4.14: Mengde ekstraherbart VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra farse av hyse som har vært fryst. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.

Proteiner fra en parallell for hver tilsetning ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Separasjon av ulike proteiner samt standarder er vist i figur 4.15 og figur A.10 (vedlegg A.2). Identifiserte proteiner er vist i tabell 4.9. G-aktin er synlig kun for farsen uten tilsetning, ekstrahert med 0,3 M KCl, og for farsen med Na-alginat. Høymolekylære proteiner er ikke synlige på gelen. For farsene med tilsetning er ikke LC3 (16,6 kDa) synlig.



Figur 4.15: Proteiner fra farse av hyse som har vært fryst, separert med SDS-PAGE og sølvfarget. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = Uten tilsetning, 0,3 M KCl; 2 = Uten tilsetning, 0,6 M KCl; 3 = NaCl (0,4%); 4 = Alginat (1,1%), NaCl (0,4%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%); 5 = Alginat (1,1%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%). Proteiner fra farsene med tilsetning ble ekstrahert med 0,6 M KCl.

Oppsummering hyse

- For **filet av fersk hyse** (figur 4.9) er forskjellen i mengde ekstrahert SLP mellom de ulike saltene ved 0,6 M konsentrasjon ikke signifikant, mens 0,3 M MgCl₂ ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,3 M NaCl og KCl. Forskjellene i mengde ekstrahert SLP mellom høy og lav konsentrasjon er signifikante for alle saltene, men forskjellen mellom 0,3 M og 0,6 M MgCl₂ er mindre enn for de to andre.

Analyse av proteinekstraktene ved SDS-PAGE (figur 4.10 og tabell 4.2) indikerer at 0,6 M NaCl er den beste ekstraktanten, etterfulgt av 0,3 M MgCl₂. Dette baserer seg på antall bånd som er identifiserbare, samt intensiteten til båndene. Alle ekstraktanter, unntatt 0,6 M KCl, ekstraherer G-aktin og MHC. På grunnlag av dette vurderes 0,6 M KCl som en dårligere ekstraktant enn de andre.

- Fra **farse av fersk hyse** (figur 4.11) ekstraherer 0,6 M KCl en signifikant større mengde SLP fra farsene med tilsetning enn fra farsen uten tilsetning, noe som kan tyde på at tilsetningene løser ut de saltløselige proteinene, og gjør dem enklere å ekstrahere. Det antas at alginat ikke direkte vekselvirker med myofibrillproteinene, men at gelnettverket gjør proteinene mer løselig. Det er en signifikant reduksjon i mengde SLP fra farse ekstrahert med 0,6 M KCl sammenlignet med fileten.

Analyse av proteinekstraktene ved SDS-PAGE (tabell 4.7) viser at SDS-PAGE-profilen til farsene med og uten tilsetninger er nokså like, noe som forsterker teorien om at alginat ikke direkte vekselvirker med myofibrillproteinene. Lavmolekylære proteiner dominerer, mens det er et generelt fravær av høymolekylære proteiner. Det er tegn til MHC for alle farsere, med unntak av farsen uten tilsetning ekstrahert med 0,3 M KCl.

- For **filet av hyse som har vært fryst** (figur 4.12) er det signifikante forskjeller mellom høy og lav konsentrasjon, for alle salter. 0,6 M MgCl₂ ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,6 M KCl, og det samme gjelder for lav konsentrasjon, både sammen-

Tabell 4.9: Identifiserte proteiner fra farse av fryst hyse, med og uten tilsetninger. 1 = KCl 0,3 M; 2 = KCl 0,6 M; 3 = NaCl (0,4%); 4 = Alginat (1,1%), NaCl (0,4%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%); 5 = Alginat (1,1%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%). Proteiner fra farsene med tilsetning ble ekstrahert med KCl 0,6 M. Molekylvekter (kDa) til de ulike proteinene er oppgitt i parentes. Proteiner med like eller tilnærmet like molekylvekter bli listet sammen, da sikker identifikasjon av de enkelte proteinene er vanskelig. *På grunn av lav oppløsning, kan ikke identiteten til båndene fastsettes med sikkerhet. **Kun antydning til bånd.

Protein (kDa)	1	2	3	4	5
LC3 (16,6)	x	x	-	-	x**
LC2 (18)/Troponin-C (18)	x*	x*	x*	x*	x*
Troponin-I (20)/LC1 (20,9)	x*	x*	x*	x*	x*
Troponin-T (30)/CapZ β (32)	-	-	-	-	-
CapZ α (36)/Tropomyosin α -enhet (37)	x	x	x	x	x
Tropomodulin (40)	-	-	-	-	-
G-aktin (42)	x	-	-	-	x
α -actinin (97)	-	-	-	-	-
C-protein (140)	-	-	-	-	-
Myomesin (185)	-	-	-	-	-
Myosinets tunge kjede (220)	-	-	-	-	-

lignet med KCl og NaCl. Det er ikke signifikante forskjeller mellom 0,3 M KCl og NaCl. Mellom filet av fersk og fryst hyse er det en signifikant nedgang i mengde SLP ekstrahert av 0,6 M KCl og 0,3 M MgCl₂.

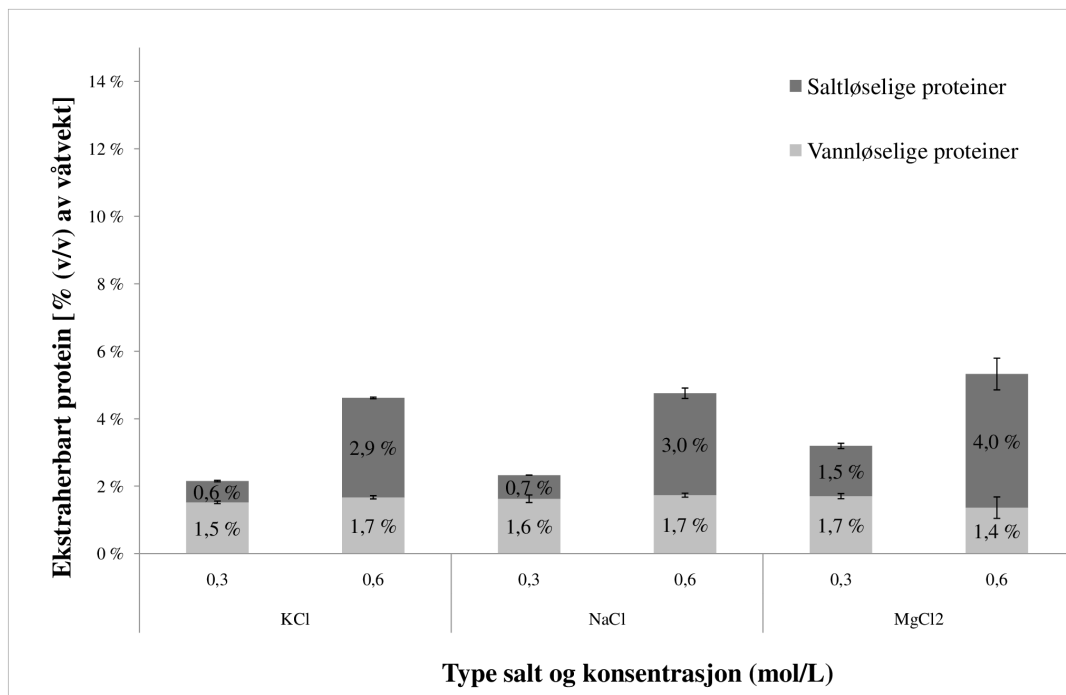
Analyse av proteinekstraktene ved SDS-PAGE (tabell 4.8) viser at antall synlige bånd reduseres noe sammenlignet med fersk hysefilet, men at SDS-PAGE-profilen ellers er den samme. En liten forskjell som observeres, er at MHC er synlig for 0,6 M KCl, men ikke for 0,3 M KCl.

- For farse av hyse som har vært fryst (figur 4.14) ekstraheres en signifikant større mengde SLP med 0,6 M KCl enn med 0,3 M KCl. Det er en signifikant nedgang i mengde ekstrahert SLP fra farse av fryst hyse sammenlignet med farse av fersk hyse, for alle farsene ekstrahert med 0,6 M KCl, men ikke for 0,3 M KCl. Fra farsen tilsatt alginat ekstraheres en signifikant større mengde SLP enn fra de andre farsene. Effekten av tilsetningsstoffene er mindre fremtredende sammenlignet med farse av fersk hyse.

Analyse av proteinekstraktene ved SDS-PAGE (tabell 4.9) viser at den samme trenden som for farse av fersk hyse følges, men med et fravær av MHC.

4.3.3 Kvitlaks

VLP og SLP ble ekstrahert fra kvitlaksfarse som har vært fryst. Resultatene er vist i figur 4.16. Farsen ble laget av Berggren, og ble delvis tint under frakt før den ble fryst ned igjen. Det ekstraheres en signifikant mindre mengde VLP enn fra farsene av de tre andre fiskeslagene, og dette kan skyldes at råstoffet var av dårlig kvalitet, etter å ha blitt delvis tint og deretter fryst igjen. En del VLP kan ha blitt tapt i smeltevannet fra farsen. Som for de andre fiskeslagene som har vært fryst, er mengde ekstrahert SLP lav. Særlig for de laveste saltkonsentrasjonene. Men økningen i mengde ekstrahert SLP for de høye konsentrasjonene sammenlignet med de lave konsentrasjonene, er signifikant høyere en økningen som observeres for sei, hyse og torsk. At det



Figur 4.16: Mengde ekstraherbart VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra farse av kvitlaks som har vært fryst. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.

var stor forskjell i mengde ekstrahert SLP mellom 0,3 M og 0,6 M salt for fryst kvitlaksfarse kan skyldes at løseliggjøring først skjer over en kritisk saltkonsentrasjon. Som beskrevet i teoridelen (avsnitt 2.5.1) vil oppløsning av kryssbindinger mellom myofibrillene være en kooperativ hendelse, slik at dissosieringen skjer samtidig. Det kan derfor medføre et plutselig hopp i mengde ekstrahert SLP når den kritiske saltkonsentrasjonen nås. Hvilken konsentrasjon dette skjer ved, vil antagelig være avhengig av råstoffet. Muskelstrukturene i dette råstoffet var sannsynligvis såpass degradert og ødelagt at mye SLP kunne bli ekstrahert. 0,6 M MgCl₂ ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,6 M KCl, og 0,3 M MgCl₂ ekstraherer omtrent dobbelt så mye som 0,3 M KCl og NaCl.

Proteiner fra en parallell for hvert salt og hver konsentrasjon ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Separasjon av ulike proteiner samt standarder er vist i figur A.11 og A.12 i vedlegg A.3. Identifiserte proteiner er vist i tabell 4.10. MHC er synlig kun for 0,6 M NaCl (bane 4). CapZ α (36 kDa) og/eller tropomyosin α -enhet (37 kDa) er synlig i alle brønner (figur A.12), men kun i bane 6 er det et intensivt bånd. G-aktin er synlig for alle salter og konsentrasjoner unntatt 0,6 M KCl (figur A.11). Ellers fins det antydning til bånd mellom 14,4 og 30,0 kDa på begge geler, men identifikasjon av disse er ikke mulig på grunn av lav skarphet. Få tydelige bånd på gelen samsvarer med en relativt lav mengde ekstrahert SLP.

På grunnlag på de ovenfornevnte resultatene, vurderes NaCl 0,6 M som den beste ekstraktanten, og KCl 0,6 M som den dårligste.

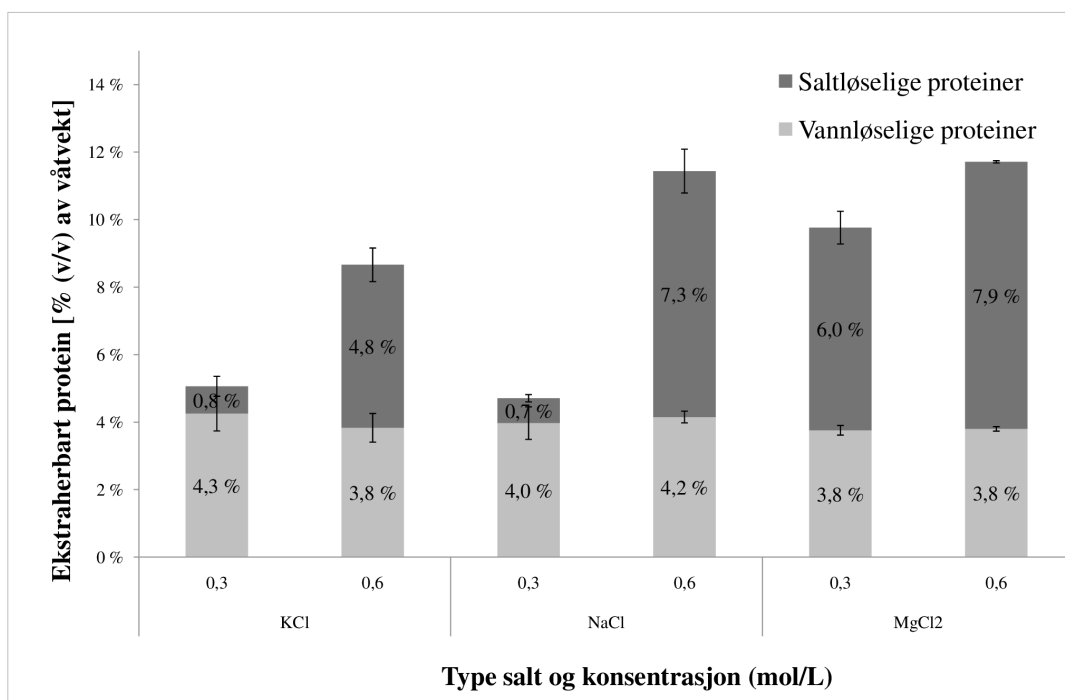
Tabell 4.10: Identifiserte proteiner fra kvitlaksfarse, separert med SDS-PAGE. Molekylvekter (kDa) til de ulike proteinene er oppgitt i parentes. Proteiner med like eller tilnærmet like molekulvekter bli listet sammen, da sikker identifikasjon av de enkelte proteinene er vanskelig. *På grunn av lav oppløsning, kan ikke identiteten til båndene fastsettes med sikkerhet. Det var et bånd ved 20,1 kDa-standard, og det kan altså være enten LC2 (18)/Troponin-C (18) eller Troponin-T (30)/CapZ β (32). En annen mulighet er at det er to bånd, som ser ut som ett.

Protein (kDa)	KCl (M)		NaCl (M)		MgCl ₂ (M)	
	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6
LC3 (16,6)	-	-	-	x	-	-
LC2 (18)/Troponin-C (18)	-	-	-	x*	-	-
Troponin-I (20)/LC1 (20,9)	-	-	-	x*	-	-
Troponin-T (30)/CapZ β (32)	-	-	-	x	-	-
CapZ α (36)/Tropomyosin α -enhet (37)	x	x	x	x	x	x
Tropomodulin (40)	-	-	-	-	-	-
G-aktin (42)	x	-	x	x	x	-
α -actinin (97)	-	-	-	-	-	-
C-protein (140)	-	-	-	-	-	-
Myomesin (185)	-	-	-	-	-	-
Myosinets tunge kjede (220)	-	-	-	x	-	-

4.3.4 Torsk

Fersk torsk

Filet VLP og SLP ble ekstrahert fra filet og farse av fersk torsk. Resultatet for filet er vist i figur 4.17. Sammenlignes mengden ekstrahert VLP fra filet av fersk torsk med mengden som



Figur 4.17: Mengde ekstraherbart VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra filet av fersk torsk. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.

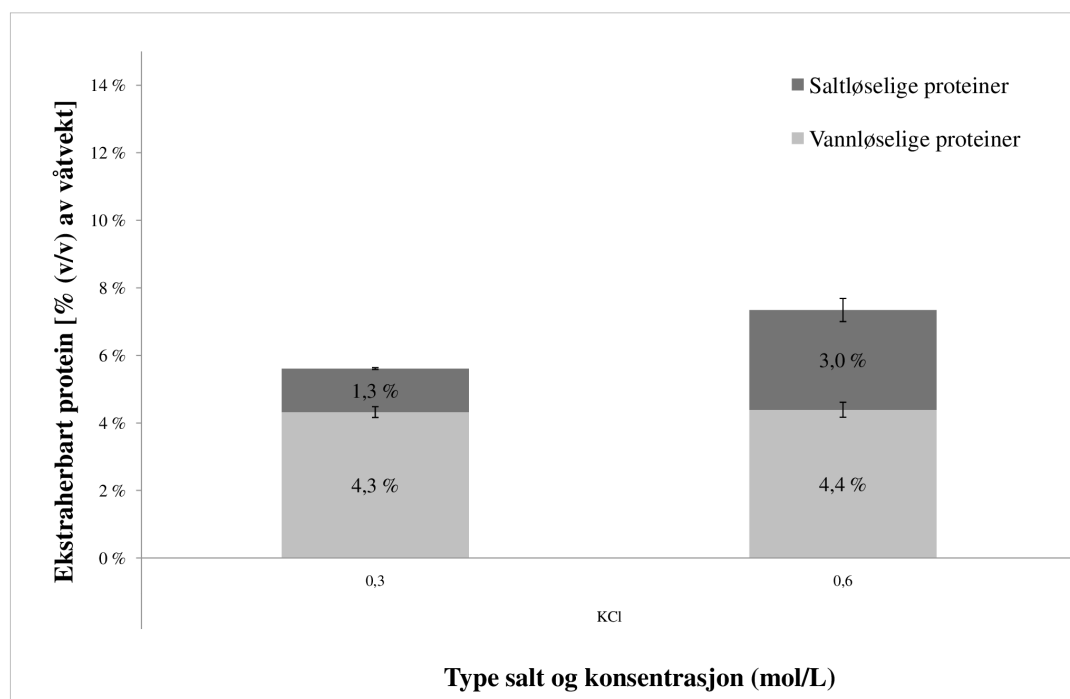
ekstraheres fra de andre ferske fiskefiletene (sei – figur 4.4 – og hyse – figur 4.9), observeres det at for torsk ligger mengden ekstrahert VLP på mellom 3,8 og 4,3%, mens den for de andre fiskeslagene ligger på mellom 2,3 og 2,9%. En del myofibrillproteiner fra torsk er løselige i vann og i saltløsninger med svært lave ionestyrker ($< 0,025$ M) (Stefansson & Hultin 1994), men BisTris-bufferen de vannløselige proteinene ble ekstrahert med her var 0,05 M. Det virker derfor ikke sannsynlig at dette er årsaken til den høye mengden ekstrahert VLP. En mulig årsak til forskjellen mellom torsk og de andre fiskeslagene kan være at sarkoplasmaproteinene i torsk var mer degraderte og dermed var lettere å ekstrahere. 0,3 M MgCl₂ ekstraherer signifikant mer SLP enn KCl og NaCl ved samme konsentrasjon. Når konsentrasjonen av MgCl₂ dobles til 0,6 M registreres kun en liten signifikant økning i mengde ekstrahert SLP, en trend som har blitt bekreftet av alle de foregående forsøkene. 0,6 M MgCl₂ og NaCl ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,6 M KCl.

Proteiner fra en parallell for hvert salt og hver konsentrasjon ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Separasjon av ulike proteiner samt standarder er vist i figur A.13 (farget med Coomassie Blue) og A.14 (farget med sølv) i vedlegg A.4. Identifiserte proteiner er vist i tabell 4.11. Den samme trenden som for filet av fersk sei (avsnitt 4.3.1) og hyse (avsnitt 4.3.2), registreres her. NaCl gir sterkest og flest bånd, mens KCl gir færrest og svakest bånd. 0,3 M MgCl₂ gir flere bånd enn 0,6 M MgCl₂.

Tabell 4.11: Identifiserte proteiner fra filet av fersk torsk, separert med SDS-PAGE. Molekylvekter (kDa) til de ulike proteinene er oppgitt i parentes. Proteiner med like eller tilnærmet like molekylvekter bli listet sammen, da sikker identifikasjon av de enkelte proteinene er vanskelig. *På grunn av lav oppløsning, kan ikke identiteten til båndene fastsettes med sikkerhet. **Kun antydning til bånd.

Protein (kDa)	KCl (M)		NaCl (M)		MgCl ₂ (M)	
	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6
LC3 (16,6)	x	x	x	x	x	x
LC2 (18)/Troponin-C (18)	x*	x*	x*	x*	x*	x*
Troponin-I (20)/LC1 (20,9)	x*	x*	x*	x*	x*	x*
Troponin-T (30)/CapZ β (32)	-	-	x	x	x	x
CapZ α (36)/Tropomyosin α -enhet (37)	x	x	x	x	x	x
Tropomodulin (40)	-	-	-	-	-	-
G-aktin (42)	x**	x**	x	x	x	x
α -actinin (97)	-	-	x	x	x	x
C-protein (140)	-	-	x	x	x	-
Myomesin (185)	-	-	-	-	-	-
Myosinets tunge kjede (220)	-	x**	x	x	x	-

Farse VLP og SLP ble ekstrahert fra farse av fersk torsk. Resultatet for filet er vist i figur 4.18. Mengden ekstrahert VLP ligger på omtrent det samme som for filet. 0,6 M KCl ekstraherer en



Figur 4.18: Mengde ekstrahert VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra farse av fersk torsk. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.

signifikant større mengde SLP enn 0,3 M KCl. Det er en signifikant nedgang i mengde ekstrahert SLP fra farse ekstrahert med 0,6 M KCl sammenlignet med filet av fersk torsk. For 0,3 M KCl er ikke forskjellen signifikant. Proteiner fra en parallell for hvert salt og hver konsentrasjon ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Separasjon av ulike proteiner samt standarder er vist i figur

A.15 samt i figur A.16 i vedlegg A.4. Identifiserte proteiner er vist i tabell 4.12. Som for farsere av sei og hyse, dominerer lavmolekylære proteiner. G-aktin og MHC er ikke synlig for 0,6 M KCl. SDS-PAGE-profilen er nokså lik som for KCl-ekstraktene fra filet.

Tabell 4.12: Identifiserte proteiner fra farse av fersk og fryst torsk, ekstrahert med ulike konsentrasjoner av KCl og separert med SDS-PAGE. Molekylvekter (kDa) til de ulike proteinene er oppgitt i parentes. Proteiner med like eller tilnærmet like molekylvekter bli listet sammen, da sikker identifikasjon av de enkelte proteinene er vanskelig. *Kun antydning til bånd.

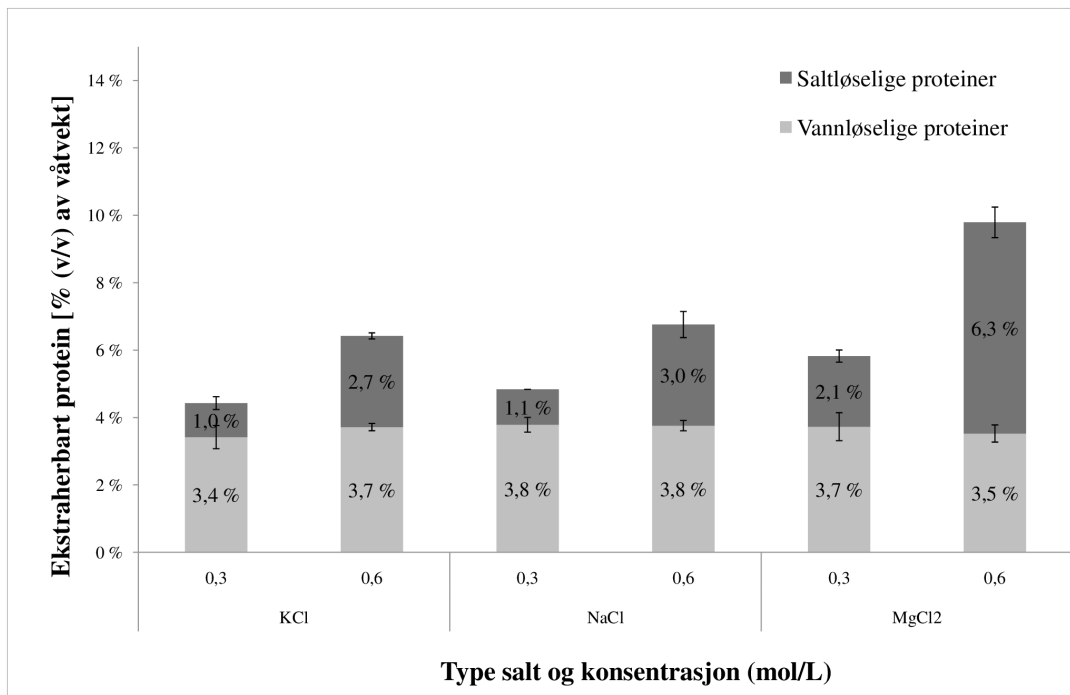
Protein (kDa)	Fersk		Fryst	
	0,3	0,6	0,3	0,6
LC3 (16,6)	x	x	x	x
LC2 (18)/Troponin-C (18)	x	x	x	x
Troponin-I (20)/LC1 (20,9)	x	x	x	x
Troponin-T (30)/CapZ β (32)	-	-	-	-
CapZ α (36)/Tropomyosin α -enhet (37)	x	x	x	x
Tropomodulin (40)	-	-	-	-
G-aktin (42)	x	-	x	x*
α -actinin (97)	-	-	x*	-
C-protein (140)	-	-	-	-
Myomesin (185)	-	-	-	-
Myosinets tunge kjede (220)	x*	-	x	x*

Frossen torsk

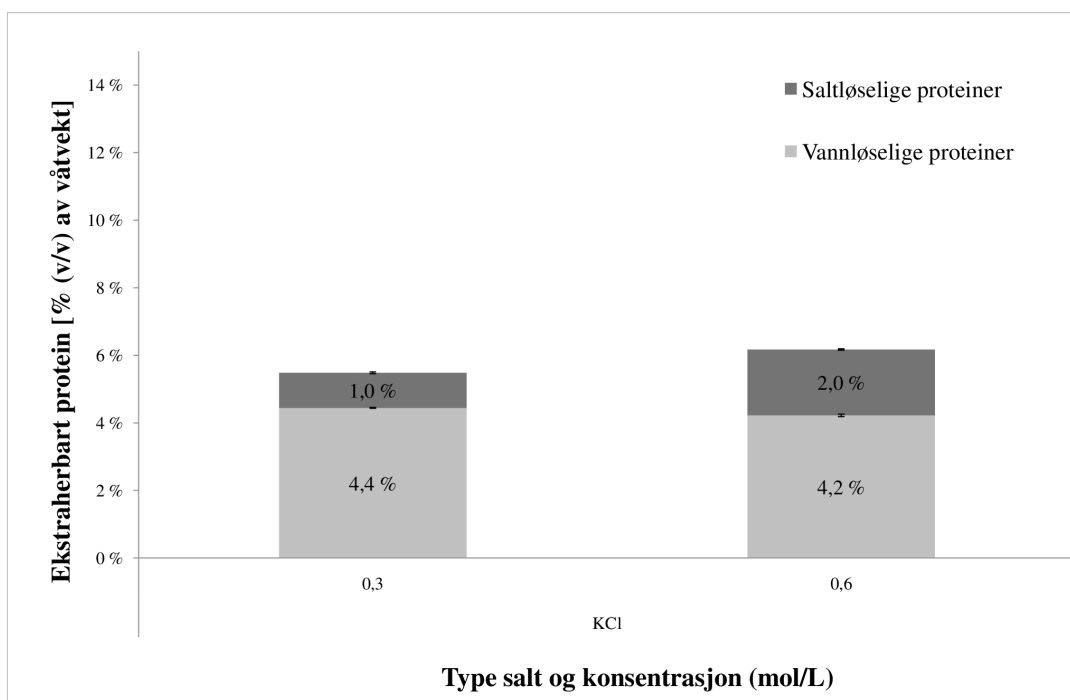
Filet VLP og SLP ble ekstrahert fra filet og farse av torsk som har vært fryst. Resultatene for filet er vist i figur 4.19. Høye konsentrasjoner ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn lave konsentrasjoner. $MgCl_2$ ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn KCl og NaCl ved begge konsentrasjoner. Sammenlignet med filet av fersk torsk (figur 4.17), er det en signifikant nedgang for alle salter og konsentrasjoner, med unntak av 0,3 M KCl og 0,3 M NaCl. For sistnevnte registreres en liten økning.

Proteiner fra en parallell for hvert salt og hver konsentrasjon ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Separasjon av ulike proteiner samt standarder er vist i figur A.17 (farget med Coomassie Blue) og A.18 (farget med sølv) i vedlegg A.4. Identifiserte proteiner er vist i tabell 4.13. Antall identifiserbare bånd er noe redusert i forhold til fersk filet, og trenden er den samme som for fryst seifilet og fryst hysefilet (tabell 4.4 og 4.8), men med sterkere bånd enn for fryst seifilet. Det samsvarer med at det ble ekstrahert en større mengde SLP fra fryst torskefilet enn fra fryst seifilet. MHC er synlig for 0,3 og 0,6 M NaCl og 0,3 M $MgCl_2$. G-aktin er synlig i alle baner, med unntak av for 0,6 M KCl. Det ble tatt av smeltevann fra fileten etter tining, og proteiner fra smeltevannet er markert med S i tabell 4.13. Separasjon av proteinene er vist i figur A.19 i vedlegg A.4. Som for fryst hyse, lekker en del proteiner ut i tineprosessen, deriblant G-aktin.

Farse Resultater fra ekstrahering av proteiner fra farse av torsk som har vært fryst, er vist i figur 4.20. 0,6 M KCl ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,3 M KCl. Sammenlignet med filet av fryst torsk, ekstraheres en signifikant større mengde VLP for farse av fryst torsk. Mengden er sammenlignbar med resultatene for filet og farse av fersk torsk (figur 4.17 og 4.18). Mengden ekstrahert SLP er redusert sammenlignet med filet av fryst torsk.



Figur 4.19: Mengde ekstraherbart VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra filet av torsk som har vært fryst. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.



Figur 4.20: Mengde ekstraherbart VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra farse av torsk som har vært fryst. Hver søyle er et gjennomsnitt av to paralleller, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket.

Proteiner ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Separasjon av ulike proteiner samt standarder er vist i figur A.19 (farget med Coomassie Blue) og A.16 (farget med sølv, brønn 3-4) i vedlegg A.4. Identifiserte proteiner er vist i tabell 4.12. Trenden er den samme som for farse av

Tabell 4.13: Identifiserte proteiner fra filet av fryst torsk, separert med SDS-PAGE. Molekylvekter (kDa) til de ulike proteinene er oppgitt i parentes. Proteiner med like eller tilnærmet like molekulvekter bli listet sammen, da sikker identifikasjon av de enkelte proteinene er vanskelig. S = Smeltevann. *På grunn av lav oppløsning, kan ikke identiteten til båndene fastsettes med sikkerhet.

Protein (kDa)	KCl (M)		NaCl (M)		MgCl ₂ (M)		S
	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	
LC3 (16,6)	x	x	x	x	x	x	x
LC2 (18)/Troponin-C (18)	x*	x*	x*	x*	x*	x*	x*
Troponin-I (20)/LC1 (20,9)	x*	x*	x*	x*	x*	x*	x*
Troponin-T (30)/CapZ β (32)	-	-	x	x	x	x	-
CapZ α (36)/Tropomyosin α -enhet (37)	x	x	x	x	x	x	x
Tropomodulin (40)	-	-	-	-	-	-	x
G-aktin (42)	x	-	x	x	x	x	x
α -actinin (97)	-	-	x	x	x	-	x
C-protein (140)	-	-	x	x	x	-	-
Myomesin (185)	-	-	-	-	-	-	-
Myosinets tunge kjede (220)	-	-	x	x	x	-	-

fersk torsk. G-aktin og MHC er synlig for både 0,3 og 0,6 M KCl, men for 0,6 M KCl er det kun antydning til bånd. Til forskjell fra filet av fryst torsk, ekstraheres altså MHC for begge konsentrasjoner av KCl.

Oppsummering torsk

- For **filet av fersk torsk** (figur 4.17) ble det ekstrahert en signifikant større mengde VLP enn fra fersk sei og hyse. 0,3 M MgCl₂ ekstraherer signifikant mer SLP enn ved samme konsentrasjon av KCl og NaCl. 0,6 M MgCl₂ og NaCl ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn 0,6 M KCl.

Analyse av proteinekstraktene ved SDS-PAGE (tabell 4.11) indikerer at NaCl gir sterkest og flest bånd, mens KCl gir færrest og svakest bånd. 0,3 M MgCl₂ gir flere bånd enn 0,6 M MgCl₂.

- Fra **farse av fersk torsk** (figur 4.18) ekstraherer 0,6 M KCl en signifikant større mengde SLP enn 0,3 M KCl. Det er en signifikant nedgang i mengde ekstrahert SLP fra farse ekstrahert med 0,6 M KCl sammenlignet med filet av fersk torsk. For 0,3 M KCl er ikke denne forskjellen signifikant.

Analyse av proteinekstraktene ved SDS-PAGE (tabell 4.12) viser at lavmolekylære proteiner dominerer. G-aktin og MHC er ikke synlig for 0,6 M KCl.

- For **filet av torsk som har vært fryst** (figur 4.19) registreres det at høye konsentrasjoner ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn lave konsentrasjoner. MgCl₂ ekstraherer en signifikant større mengde SLP enn KCl og NaCl ved begge konsentrasjoner. Sammenlignet med filet av fersk torsk, er det en signifikant nedgang i ekstrahert SLP for alle salter og konsentrasjoner, med unntak av 0,3 M KCl og 0,3 M NaCl. For sistnevnte registreres en liten økning.

Analyse av proteinekstraktene ved SDS-PAGE (tabell 4.13) viser at antall identifiserbare

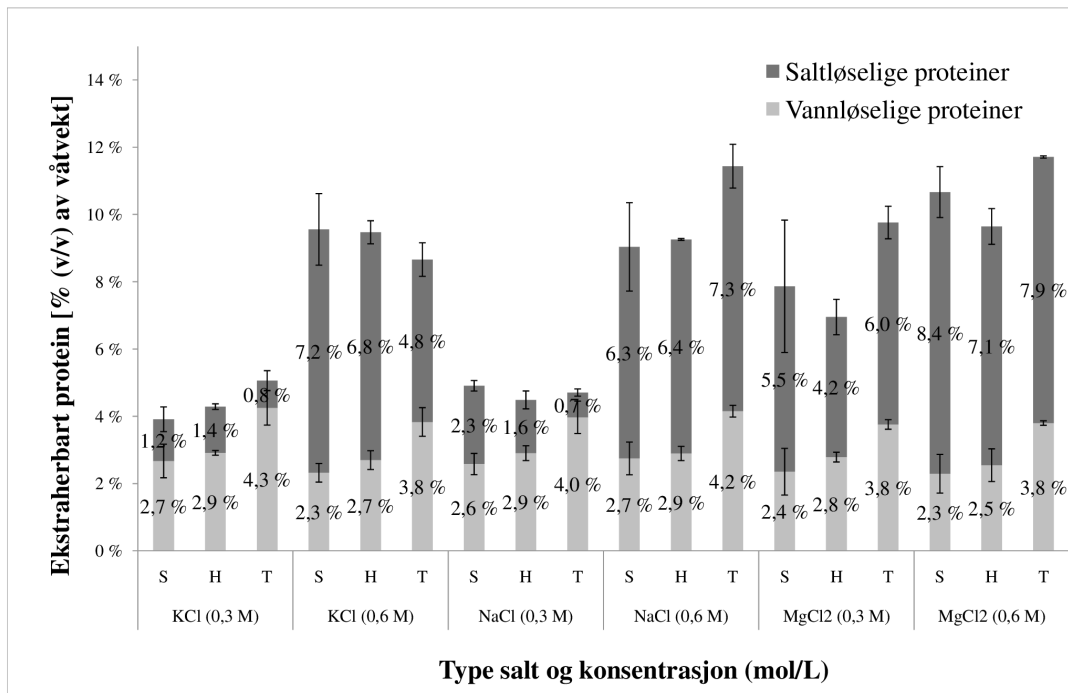
bånd reduseres noe i forhold til fersk filet, og at MHC kun er synlig for 0,3 og 0,6 M NaCl og 0,3 M MgCl₂. G-aktin er synlig i alle baner, med unntak av 0,6 M KCl.

- For **farse av torsk som har vært fryst** (figur 4.20) ekstraherer 0,6 M KCl en signifikant større mengde SLP enn 0,3 M KCl. Sammenlignet med filet av fryst torsk ekstraheres en signifikant større mengde VLP for farse. Mengden ekstrahert SLP er redusert sammenlignet med filet av fryst torsk.

Analyse av proteinekstraktene ved SDS-PAGE (tabell 4.12) viser at trenden er den samme som for farse av fersk torsk. Til forskjell fra filet av torsk som har vært fryst, er G-aktin og MHC synlig for både 0,3 og 0,6 M KCl.

4.4 Sammenligning

Figurene 4.21, 4.22, 4.23, og 4.24 viser en sammenligning av proteinløselighet for henholdsvis filet av ferskt råstoff, farse av ferskt råstoff, filet av fryst råstoff og farse av fryst råstoff. De ulike fiskeslagene er angitt som følger: S = sei, H = hyse, T = torsk og K = kvitlaks.



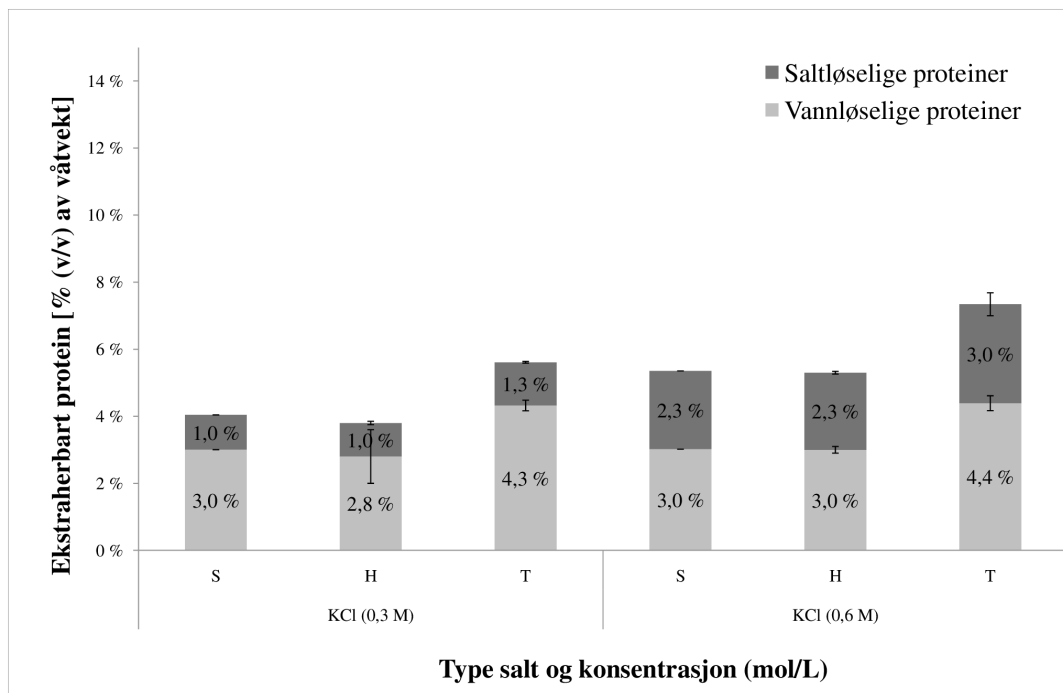
Figur 4.21: Sammenligning av proteinløselighet for filet av ferskt råstoff, med ulike typer salt og konsentrasjoner. S = sei, H = hyse og T = torsk.

4.4.1 Likheter og forskjeller mellom salter

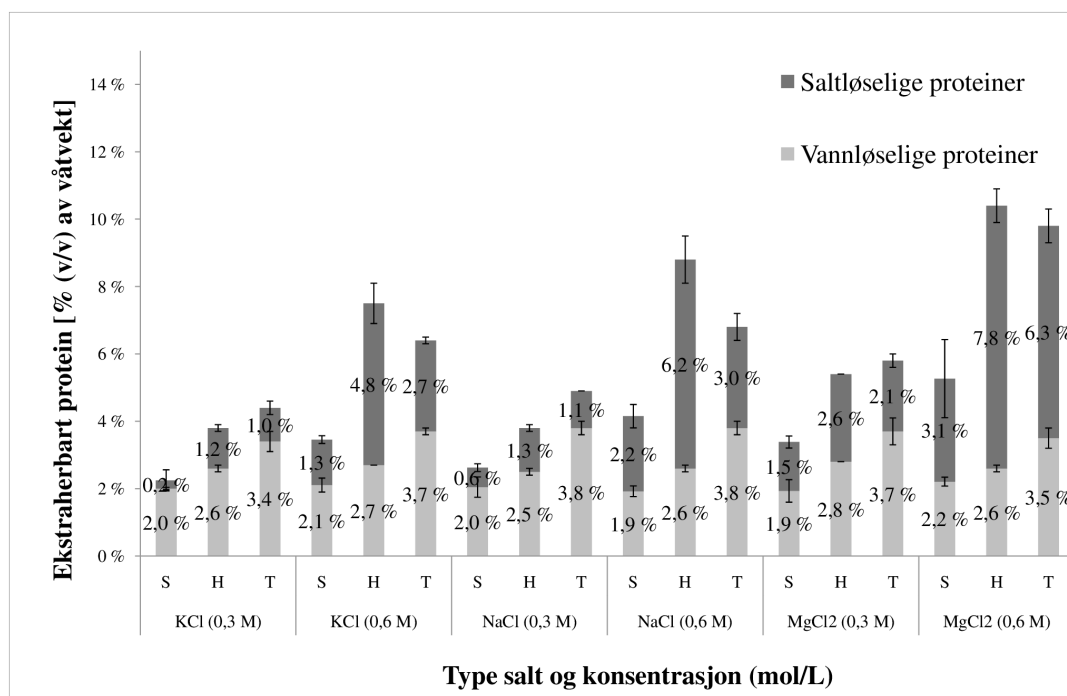
Proteinløselighet

- Det er en signifikant nedgang i proteinløselighet fra ferskt råstoff (figur 4.21) til fryst råstoff (figur 4.23) for alle salter og konsentrasjoner for sei, for 0,6 M KCl og 0,3 M MgCl₂ for hyse, og for nesten alle salter og konsentrasjoner for torsk. Unntakene er 0,3 M KCl og 0,3 M NaCl.
- For farse er det en signifikant nedgang i mengde ekstrahert SLP med 0,6 M KCl, sammenlignet med filet (både ferskt og fryst råstoff). For 0,3 M KCl er ikke forskjellen mellom farse og filet signifikant¹.
- For både fersk og fryst filet (figur 4.21 og 4.23) av alle fiskeslagene ekstraherer 0,6 M KCl og 0,6 M NaCl en signifikant større mengde SLP enn henholdsvis 0,3 M KCl og 0,3 M NaCl. For farser (figur 4.22 og 4.24) var også mengden ekstrahert SLP med 0,6 M KCl større enn med 0,3 M KCl.

¹med unntak av for farse av fryst sei, hvor det registreres en signifikant økning i forhold til fryst filet.

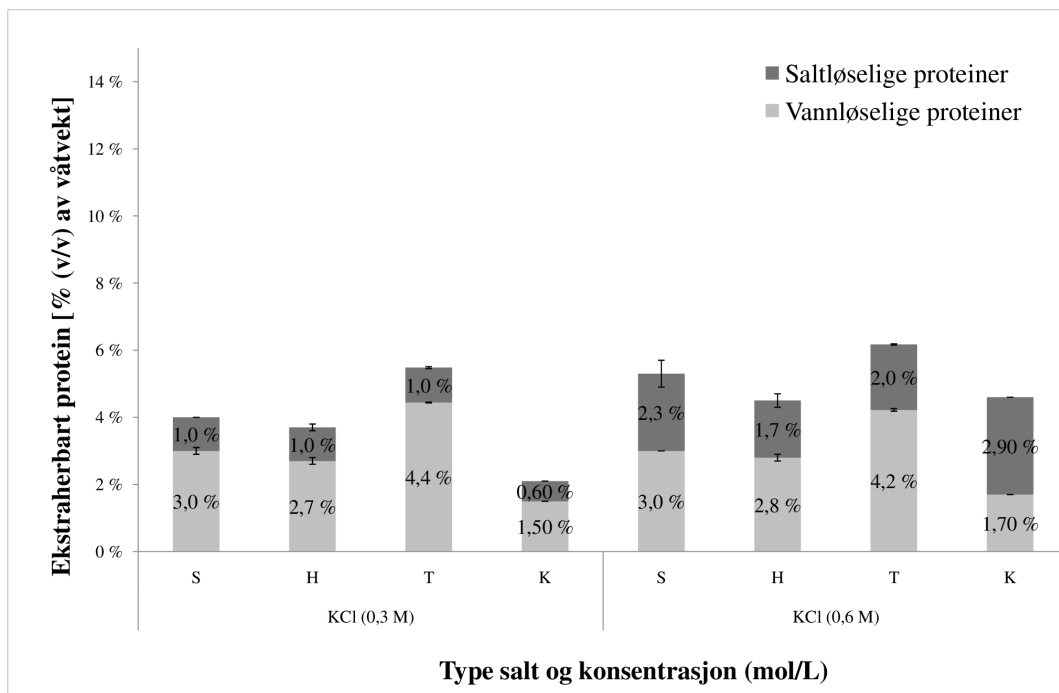


Figur 4.22: Sammenligning av proteinløselighet for farse av ferskt råstoff, med ulike typer salt og konsentrasjoner. S = sei, H = hyse og T = torsk.



Figur 4.23: Sammenligning av proteinløselighet for filet av fryst råstoff, med ulike typer salt og konsentrasjoner. S = sei, H = hyse og T = torsk.

- 0,3 M MgCl₂ ekstraherer mer SLP enn 0,3 M KCl og NaCl. Med 0,6 M MgCl₂ er ikke forskjellen like stor. NaCl og KCl (begge konsentrasjoner) ekstraherer samme mengde



Figur 4.24: Sammenligning av proteinløselighet for farse av fryst råstoff, med ulike typer salt og konsentrasjoner. S = sei, H = hyse, T = torsk og K = kvitlaks.

SLP².

SDS-PAGE-profil

- 0,6 M NaCl gir sterkest og flest bånd, etterfulgt av 0,3 M MgCl₂ 0,3 M NaCl, 0,6 M MgCl₂ 0,3 M KCl og tilslutt 0,6 M KCl.
- For de fleste prøvene³ ekstrahert med 0,6 M KCl, er MHC ikke synlig på gelen. For 0,3 M KCl er MHC synlig for filet og farse av fersk sei, filet av fersk hyse, og farse av fersk og fryst torsk.
- Lav konsentrasjon av MgCl₂ gir flere synlige bånd på gelene enn ved høy konsentrasjon.
- For høye konsentrasjoner av KCl og MgCl₂ observeres det altså at mengden ekstrahert protein ikke stemmer overens med antall synlige bånd på gelen og intensiteten av båndene.

Basert på disse observasjonene vurderes 0,6 M NaCl som den beste proteinekstraktanten, etterfulgt av 0,3 M MgCl₂ og 0,3 M NaCl. Dette skyldes at 0,6 M NaCl ekstraherer en relativt stor mengde SLP, og at SDS-PAGE-profilen er gjennomgående bedre enn for de andre saltene og konsentrasjonene som er sammenlignet. Tilstedeværelse av MHC er viktig for VBE, geldanningsevne og dermed teksturen til produktet. 0,3 M MgCl₂ er også en god proteinekstraktant, og har en tilsvarende SDS-PAGE-profil som 0,6 M NaCl, men med svakere bånd. Den dårligste ekstraktanten vurderes som 0,6 M KCl. Ut i fra resultatene som er presentert i denne oppgaven,

²med unntak av filet av fersk torsk og filet av fryst sei ekstrahert med 0,6 M salt, samt filet av fersk sei ekstrahert med 0,3 M salt. I disse tilfellene ekstraherer NaCl mer enn KCl.

³med unntak av farse av fersk hyse, filet av fryst hyse, filet av fersk torsk og farse av fryst torsk. For disse er det kun *antydning* til bånd.

er det vanskelig å si noe sikkert om KCl som salterstatter, men det vil generelt være bedre å bruke 0,3 M KCl som erstatter enn 0,6 M KCl, da MHC oftere er tilstede i ekstraktene for førstnevnte, enn sistnevnte. 0,6 M MgCl₂ har en dårligere SDS-PAGE-profil enn 0,3 M MgCl₂, med fravær av MHC. Med tanke på å erstatte noe NaCl i fiskeprodukter vil det anbefales å benytte lav konsentrasjon av MgCl₂ heller en høy. Av 0,3 M KCl og 0,3 M MgCl₂ anbefales sistnevnte. Dette skyldes at MHC er synlig på alle geler hvor 0,3 M MgCl₂ er benyttet⁴, mens for 0,3 M KCl er det vanskelig å se noen klar trend for når MHC dukker opp og ikke. Ekstraksjon av MHC med 0,3 M KCl ser til en viss grad ut til å være råstoffavhengig (se punktlisten over). I produksjonssammenheng hvor 0,3 M KCl ønskes brukt som salterstatter, ville det være anbefalt å undersøke om MHC ekstraheres for det aktuelle råstoffet.

4.4.2 Likheter og forskjeller mellom ulike fiskeslag

Proteinløselighet

- Det ekstraheres en større mengde VLP fra torsk enn fra hyse, sei og kvitlaks (figur 4.21, 4.22, 4.23, og 4.24).
- For fersk filet (figur 4.21) er det vanskelig å se en markant tendens når det gjelder forskjeller i mengde ekstrahert SLP mellom sei, hyse og torsk.
- For fryst filet (figur 4.23) er det tydeligere forskjeller i mengde ekstrahert SLP mellom fiskeslagene. Fra filet av fryst hyse ekstraheres det en signifikant større mengde SLP enn fra filet av fryst sei og torsk⁵. Dette kan tyde på at hyse er mer frysestabil enn torsk og sei, noe som samsvarer med høy VBE i hyse som har vært fryst.
- Det ekstraheres signifikant mer SLP fra torsk som har vært fryst enn fra sei som har vært fryst⁶.
- For farse (både av ferskt og fryst råstoff) er det ingen signifikante forskjeller mellom de ulike fiskeslagene i mengde ekstrahert SLP med 0,3 M KCl⁷. For fersk farse ekstraheres en signifikant større mengde SLP med 0,6 M KCl fra torsk enn fra hyse og sei. For fryst farse ekstraheres en signifikant større mengde SLP med 0,6 M KCl fra kvitlaks enn fra hyse, sei og torsk.
- For farse av hyse (fersk og fryst) har tilsetningene Na-alginat, Na-alginat+NaCl, og NaCl en positiv effekt på mengden SLP som ekstraheres med 0,6 M KCl.

VBE og pH

Sammenlignes VBE dag 1 for ferskt råstoff (avsnitt 4.2) har sei en signifikant større VBE enn hyse og torsk. Selv om forskjellen er nokså liten, ville det være forventet at det ble ekstrahert en større mengde SLP fra sei enn fra hyse og torsk, da VBE er positivt korrelert med proteinløselighet. Sammenlignet med hyse, ekstraheres det kun med 0,3 M NaCl en signifikant større mengde SLP fra sei, mens det sammenlignet med torsk ekstraheres signifikant mer med 0,3 M NaCl og 0,6 M KCl og MgCl₂. VBE ble plottet mot proteinløselighet i farse (resultater er ikke

⁴med unntak for kvitlaksfarse

⁵med unntak av for 0,3 M KCl og 0,6 M MgCl₂, hvor det ikke var noen forskjell.

⁶med unntak av for 0,6 M NaCl.

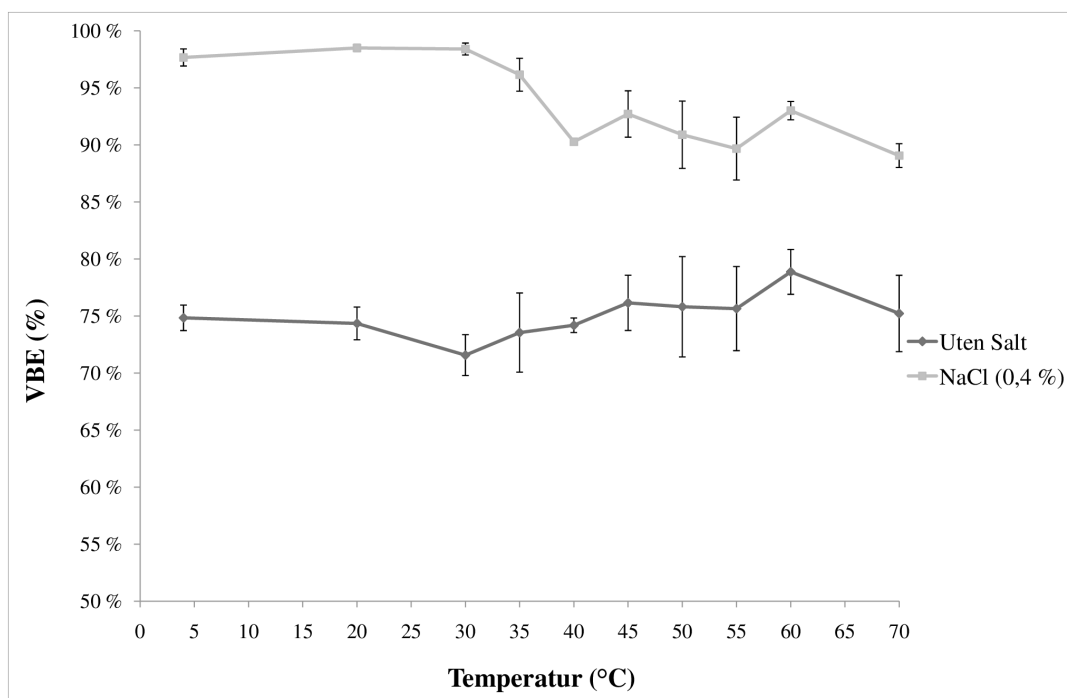
⁷med unntak av fryst kvitlaksfarse, hvor mengden ekstrahert SLP er lavere.

vist), men på grunn av få målepunkter for hvert fiskeslag, er det vanskelig å si noe om korrelasjonen mellom proteinløselighet og VBE ut i fra disse plottene. Sannsynligvis er forskjellen i proteinløselighet mellom de ulike fiskeslagene for liten til at det gir utslag som store forskjeller i VBE. Proteinløseligheten er også avhengig av andre råstoffkarakteristikker, slik som pH. For ferskt råstoff var pH i sei > hyse > torsk. Proteinløselighet i farse ble plottet mot pH (resultater er ikke vist), men som for VBE er antall målepunkter for hvert fiskeslag for få til at det kan sies noe sikkert om korrelasjonen mellom pH og proteinløselighet. I teorien vil høyere pH, når $pH > pI$, gi et mer svellet nettverk, slik at Cl^- -ioner kan trekke lengre inn i muskelnettverket og ekstrahere en større mengde saltløselige proteiner. Ettersom sei hadde høyest pH kunne det derfor vært forventet at det ble ekstrahert mer SLP fra sei. I resultatene presentert her, blir ikke dette observert. Det virker derfor sannsynlig at pH-forskjellene mellom de ulike fiskeslagene var for små til å gi direkte utslag i mengde ekstrahert SLP. Sannsynligvis skyldes ulikhetene i proteinløselighet som er registrert for de ulike fiskeslagene artsforskjeller, tilstanden til råstoffet, lagringsforhold, kverningsgrad og hvor lenge siden fisken ble fanget. I tillegg kan en del forskjeller skyldes usikkerhet i ekstraksjonen.

4.5 Varmebehandling

4.5.1 Kvitlaks

Farser av frossen kvitlaks tilsatt 0,4% NaCl og farser uten tilsetning ble varmet på vannbad ved temperaturer mellom 4 og 70°C, som beskrevet i avsnitt 3.2.4. VBE som funksjon av oppvarmingstemperatur er vist i figur 4.25. Det er stor forskjell i VBE på farsen uten salt og



Figur 4.25: VBE som en funksjon av oppvarmingstemperatur for frossen kvitlaks uten tilsetning og tilsatt 0,4% NaCl.

den med. Ved 4°C (ikke varmebehandlet) ligger initiell VBE til farsen uten salt på $74,8 \pm 1,1\%$

mens farsen tilsatt 0,4% NaCl har en initiell VBE på $97,7 \pm 0,8\%$. Tilsats av salt øker altså initiell VBE med over 20 prosentpoeng. At VBE øker såpass mye ved tilsats av 0,4% NaCl skyldes at myofibrillene sveller ved tilsats av salt. Dette vil bidra til å øke VBE. Dessuten kan frysedenatureringen ha gjort saltsvellingen enklere.

Det er vanskelig å se klare endringer i VBE gjennom varmebehandlingsprosessen for hverken farsen med eller farsen uten tilsatt NaCl. Som nevnt tidligere, var råstoffet tint og fryst flere ganger, og som forklart fører dette blant annet til proteindenaturering. Hvis en andel av proteinene er delvis denaturerte, er det mulig at de begynner å gele ved lavere temperaturer enn vanlig (33°C, teoridel avsnitt 2.3.2), slik at vann holdes i nettverket og VBE blir høy. I løpet av varmebehandlingsprosessen er begge farsene relativt stabile opp til 30°C, deretter varierer VBE litt for begge farsene. For farsen med salt registreres et markant fall i VBE ved 40°C, noe som kan skyldes denaturering av myosin. For begge farsene er det svingninger i VBE opp til 60°C, mens det mellom 60 og 70°C skjer et fall i VBE. Rådata for farsen med og uten salt er vist i vedlegg C i henholdsvis tabell C.1 og C.2. Selv om det er vanskelig å se en klar trend når det gjelder endringer i VBE, ble det under eksperimentet observert store kvalitative endringer i farsen ved de ulike temperaturene, både i farge og tekstur. Ved rundt 40°C begynte farsen å bli mer hvit, og konsistensen ble hardere. Denne trenden ble forsterket ved høyere temperaturer. Ved temperaturer på 50-70°C vil en muskelfiber raskt krympe til halvparten av originalvolumet. Krympehastigheten starter sakte ved rundt 40°C, og er raskest ved 60°C. Dette skyldes at myofibrillene krymper som en konsekvens av denaturering av myosin – som skjer ved temperaturer over 40°C – og vil medføre koketap (Offer & Trinick 1983).

Det ble tatt av koketapsvann i de prøvene der det fantes, og dette gjelder prøver varmet til 55, 60 og 70°C, uten salt. Tørrstoffinnhold er vist i tabell 4.14. Det var ikke noen forskjell i tørrstoffinnhold mellom de tre ulike prøvene. Koketapsvannet ble analysert ved SDS-PAGE, og figur C.1 (vedlegg C) viser separerte proteiner. De identifiserte proteinene er presentert i tabell 4.15. Relativt få proteiner synes på gelen, men troponin-I (20 kDa) og/eller LC1 (20,9 kDa), samt CapZ α (36 kDa) og/eller tropomyosin α -enhet (37 kDa) er synlige for alle prøvene fra kvitlaks. G-aktin fins i koketapsvannet fra 55°C-prøven. MHC er ikke synlig. Det er sannsynlig at koketapsvannet inneholder en del proteinaggregater, som ikke kan vandre gjennom gelen.

Tabell 4.14: Tørrstoffinnhold i koketapsvann fra varmebehandlede farser uten salt.

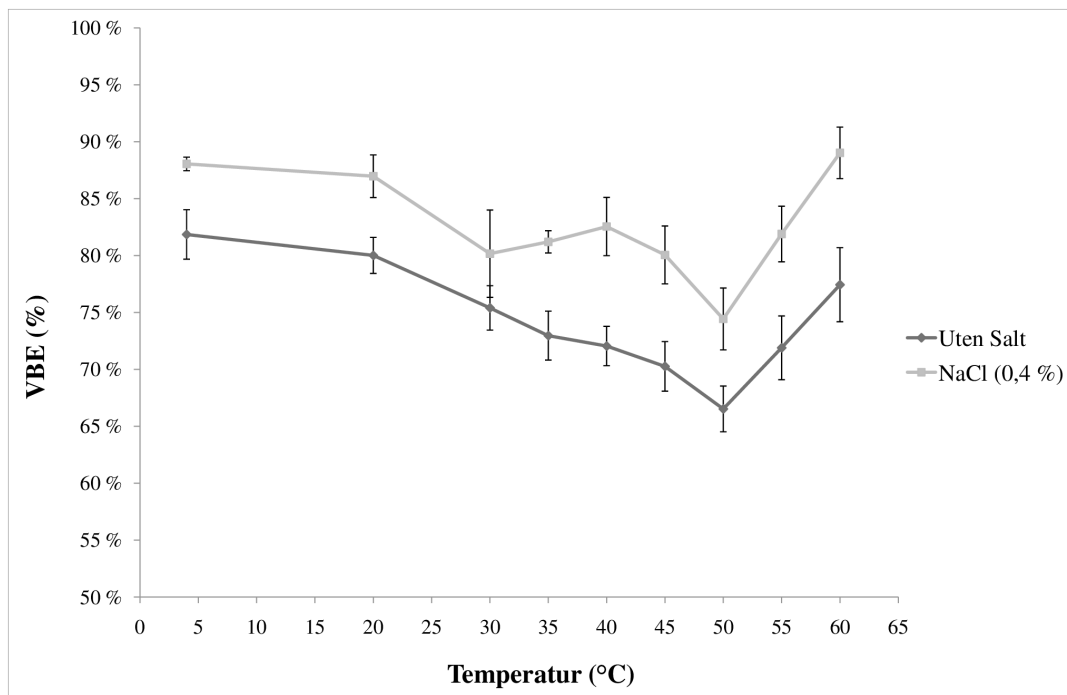
Grader (°C)	Tørrstoffinnhold (%)	σ (%)
55	6,0	0,1
60	6,0	0,2
70	5,4	1,0

4.5.2 Hyse

Farsen av fersk hyse tilsatt 0,4% NaCl og farsen uten tilsetning ble varmet på vannbad ved temperaturer mellom 4 og 60°C, som beskrevet i avsnitt 3.2.4. VBE som funksjon av oppvarmingstemperatur er vist i figur 4.26. Initiell VBE for farsen uten salt er $81,9 \pm 2,2\%$, mens den er $88,0 \pm 0,6\%$ for farsen med salt. Tilsats av salt øker altså VBE med omtrent 10 prosentpoeng. pH i råstoffet var i utgangspunktet 6,87 (gjennomsnitt av 6, målinger utført av Irina Vodyanova). For begge farsene er det en svak nedgang i VBE fra 4 til 20°C. VBE for farsen uten salt synker jevnt fram til et minimum ved 50°C på $66,0 \pm 2,0\%$, noe som samsvarer med denaturering av myosin. Deretter øker den bratt og ved 60°C er den på $77,4 \pm 3,3\%$. VBE

Tabell 4.15: Identifiserte proteiner fra koketapsvann fra varmebehandlet kvitlaks og hyse. 1-3 = kvitlaks ved henholdsvis 55, 60 og 70°C. 4 = hyse ved 40°C. Molekylvekter (kDa) til de ulike proteinene er oppgitt i parentes. Proteiner med like eller tilnærmet like molekulvekter bli listet sammen, da sikker identifikasjon av de enkelte proteinene er vanskelig.

Protein (kDa)	1	2	3	4
LC3 (16,6)	-	-	-	-
LC2 (18)/Troponin-C (18)	-	-	-	-
Troponin-I (20)/LC1 (20,9)	x	x	x	x
Troponin-T (30)/CapZ β (32)	-	-	-	-
CapZ α (36)/Tropomyosin α -enhet (37)	x	x	x	-
Tropomodulin (40)	-	-	-	-
G-aktin (42)	x	-	-	x
α -actinin (97)	-	-	-	x
C-protein (140)	-	-	-	-
Myomesin (185)	-	-	-	-
Myosinets tunge kjede (220)	-	-	-	-



Figur 4.26: VBE som en funksjon av oppvarmingstemperatur for fersk hyse uten tilsetning og tilsatt 0,4% NaCl.

for farsen med salt synker ikke like jevnt, og ser ut til å øke litt ved 40°C før den også når et minimum ved 50°C, på $74,4 \pm 2,7\%$. Som farsen uten salt øker VBE deretter bratt og ved 60°C er den på $89,0 \pm 2,3\%$.

Ofstad et al. (1993) fant at vanntapet i oppdrettstorsk var maksimalt ved 45°C. Ved høyere temperaturer ble det observert en nedgang i vanntapet på 2-3%, altså at VBE økte med 2-3% (figur 2.14, avsnitt 2.7). De foreslo at nedgangen i vanntap skyldtes at aggregater av sarkoplasmiske proteiner og kollagen – som dannes under oppvarmingen – holder igjen vann under

sentrifugering, ved å tette de intercellulære kapillærene. I resultatene presentert her ble det også observert at VBE økte etter et minimum (50°C). Økningen var på $11,4 \pm 5,3\%$ for farsen uten salt. I tillegg til at aggregater av sarkoplasmiske proteiner og kollagen holder igjen vann under sentrifugering, kan en forklaring på økningen i VBE være varmeindusert gelning av myosin, som beskrevet i avsnitt 2.3.2. Rådata for farsen med og uten salt er vist i vedlegg C i henholdsvis tabell C.3 og C.4.

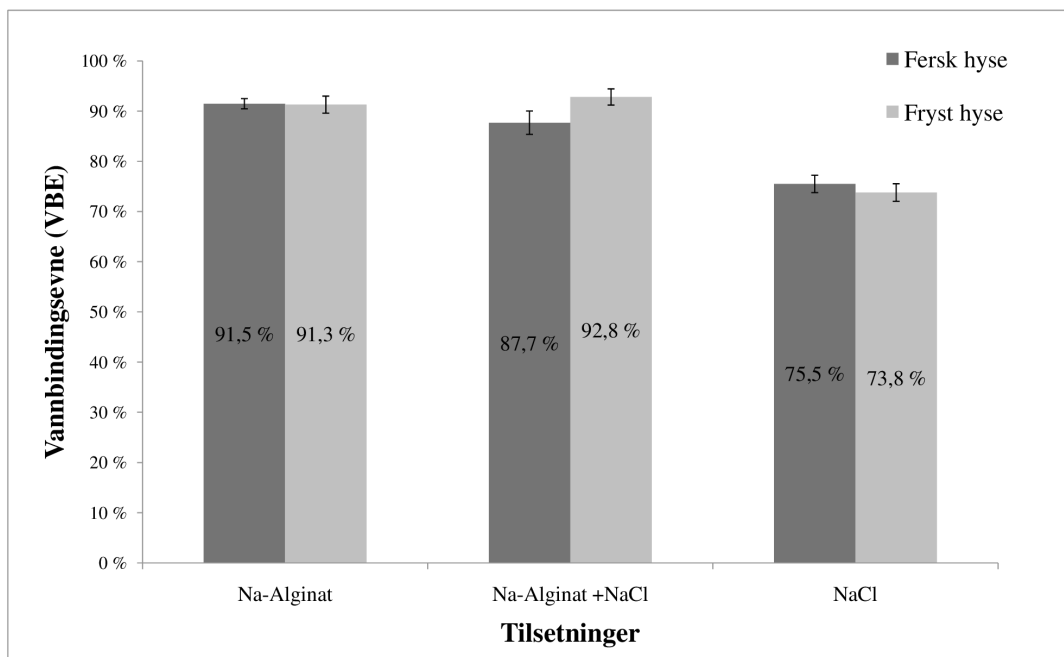
Det ble tatt av koketapsvann i de prøvene der det fantes, for fersk hyse var det kokevann kun i prøven ved 40°C uten salt. Der var tørrstoffinnholdet $9,1\%$. Identifiserte proteiner er presentert i tabell 4.15. Noe G-aktin, α -actinin og troponin-I og/eller LC1 lekker ut. Som for kvitlaks er det sannsynlig at koketapsvannet inneholder en del proteinaggregater, som ikke kan vandre gjennom gelen.

Sammenlignes VBE for råstoffet som har vært fryst (kvitlaks, figur 4.25) og det ferske råstoffet (hyse, figur 4.26), og påvirkning av salt på VBE, observeres det for det første at initiell VBE for det fryste råstoffet ligger på omtrent 75% , mens det ligger på omtrent 82% for det ferske råstoffet. Egenskapene til fiskemuskel endrer seg under frysing og fryselagring, og kjennetegnes ofte av tap av vannbindingsevne (Rodger & Wilding 1990) og redusert proteinløselighet (Sikorski et al. 1976) (se avsnitt 2.6), så en nedgang i VBE er forventet. Noe av forskjellen i VBE mellom hyse og kvitlaks kan også skyldes artsforskjeller. I utgangspunktet er det forventet at fersk kvitlaks har bedre funksjonelle egenskaper (geldanningsevne/VBE) enn fersk hyse. For det andre observeres det at tilsats av salt gir over en dobbelt så stor prosentpoengøkning i VBE for fryst råstoff (kvitlaks) enn for ferskt råstoff (hyse). Forskjellen kan skyldes at VBE i det ferske råstoffet allerede var nokså høy, slik at en like stor økning ved tilsats av salt ville vært usannsynlig. Dessuten var antagelig muskelstrukturen i kvitlaksfarsen mer degradert, slik at en større grad av svelling kunne foregå enn for farsen av hyse. Som nevnt i teoridelen (avsnitt 2.5.3) rapporterte Pérez-Mateos & Montero (2000) at tilsetningsstoffer (hydrokolloider) har en bedre effekt på VBE og andre funksjonelle egenskaper i råstoff av dårlig kvalitet, enn i råstoff av god kvalitet, noe som samsvarer godt med disse resultatene.

Ut i fra resultatene presentert her, vil det i en varmebehandlingsprosess være fordelaktig å varme farsen opp til minst 60°C , for å unngå stort tap i VBE. VBE er lavest ved 50°C . Tilsetning av $0,4\%$ NaCl vil være fordelaktig for VBE til farsen uansett om råstoffet har god VBE i utgangspunktet, eller om den er lav. Størst effekt av tilsatt salt vil oppnås dersom VBE i utgangspunktet var lav.

4.5.3 VBE i varmebehandlede farser av hyse

Det ble laget et modellprodukt, i form av fiskepudding, med råstoff av fersk og fryst hyse, tilsatt 3 ulike tilsetninger som beskrevet i tabell 4.6. VBE i de ulike puddingene etter varmebehandling er vist i figur 4.27. Puddingene ble varmet opp til kjernen holdt $> 80^{\circ}\text{C}$, og deretter avkjølt. Det ble gjort tre forsøk à fire paralleller, så hvert datapunkt er et gjennomsnitt av tolv paralleller. Usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket. Forsøket ble utført av Lise Merete Sitter Bersmo, og i beregning av VBE er det korrigert for at vann + tilsetninger utgjør omtrent 40% av puddingen. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom VBE i pudding av ferskt og fryst råstoff på 5% signifikansnivå, men på 10% signifikansnivå ble det funnet en signifikant forskjell mellom ferskt og fryst råstoff for farsen tilsatt Na-alginat+NaCl. For pudding av både fersk og fryst hyse ble det funnet at VBE i puddingen med Na-alginat og puddingen med Na-alginat+NaCl var signifikant høyere enn VBE i puddingen kun tilsatt NaCl. Mellom puddingen med Na-alginat og puddingen med Na-alginat+NaCl ble det ikke funnet signifikante forskjeller,



Figur 4.27: VBE i varmebehandlede fiskepuddinger av fersk og fryst hyse. Hvert datapunkt er et gjennomsnitt av tre forsøk à fire paralleller, og usikkerheten er oppgitt som \pm standardavviket. Forsøket ble utført av Lise Merete Sitter Bersmo.

hverken mellom ferskt eller fryst råstoff. Sammenlignes det med resultatene fra proteinløselighet for farse av fersk hyse (råstoffet til puddingen, figur 4.11) ble det ikke ekstrahert signifikant mer SLP fra farsene tilsatt henholdsvis Na-alginat+NaCl og Na-alginat enn fra farsen tilsatt kun NaCl, noe som indikerer at det er tilsetning av Na-alginat, heller enn mengde ekstrahert SLP som gjør at VBE i puddingene blir høy. Dette samsvarer med at puddingen tilsatt kun NaCl har signifikant lavere VBE enn de to andre. For farse av fryst hyse (figur 4.14) ble det ekstrahert en signifikant lavere mengde SLP enn fra farse av fersk hyse. Ettersom nedgangen i VBE for pudding av ferskt og fryst råstoff ikke var signifikant, støtter dette teorien om at det er på grunn av Na-alginat at VBE holdes høy. Dette er i samsvar med teori, da Na-alginat danner en gel som kan holde mye vann, selv i råstoff av dårligere kvalitet – slik som fryst fiskefarse. Sammenlignes det med resultatene for varmebehandling av farse av hyse, med og uten NaCl (figur 4.26) observeres det at VBE etter varmebehandling for farsen tilsatt NaCl er høyere ($89,0 \pm 2,3\%$) enn for puddingen tilsatt NaCl ($75,5 \pm 1,7\%$). Dette kan for det første skyldes at puddingen ble varmet opp til over 80°C , mens farsen ble varmet til 60°C , slik at noe mer vann tapes for puddingen. For det andre ble puddingen kokt i 45 minutter, mens farsen ble holdt ved 60°C i 10 minutter. At vanntapet øker ved vedvarende varming er naturlig.

Basert på resultatene presentert i dette avsnittet, viser Na-alginat og Na-alginat+NaCl best evne til å opprettholde VBE i en pudding etter oppvarming. Pudding tilsatt kun NaCl har lavere VBE enn de to andre, og dessuten større drypptap (resultater er vist i masteroppgaven til Lise Merete Sitter Bersmo) enn puddingen tilsatt kun Na-alginat. Drypptapet er mengde vann tapt (i prosent) av startvekten til den varmebehandlede puddingen. Dette samsvarer med teksturmålinger i puddingene, hvor puddingen tilsatt kun Na-alginat har høyest gelstyrke, og puddingen tilsatt NaCl har lavest gelstyrke (kraft ved 60% nedtrykk, målt med teksturmåler). Resultater er vist i masteroppgaven til Lise Merete Sitter Bersmo.

Kapittel 5

Konklusjon

Denne studien har vist at proteinløselighet er høyest i fersk filet og synker som en følge av frysing og kverning. For fersk filet ble det ikke funnet forskjeller mellom sei, hyse og torsk i mengde ekstrahert SLP. For fryst filet ble det generelt sett ekstrahert en større mengde SLP fra hyse enn fra sei og torsk. For fersk farse ble det ekstrahert mest SLP fra torsk, men for farse av fryst råstoff ble det ekstrahert mest SLP fra kvitlaks. Når mengde ekstrahert SLP og SDS-PAGE-profil tas i betraktning, vurderes 0,6 M NaCl som den beste proteinekstraktanten. Tett etter 0,6 M NaCl følger 0,3 M MgCl₂ og 0,3 M NaCl. 0,3 M KCl, 0,6 M MgCl₂ og 0,6 M KCl vurderes som de dårligste proteinekstraktantene. Dette skyldes i hovedsak at MHC generelt ikke ser ut til å ekstraheres med de to sistnevnte, noe som kan ha betydning for geldannings- og vannbindingsevnen til produktet. Ekstraksjon av MHC med 0,3 M KCl ser ut til å være råstoffavhengig. På grunnlag av dette vurderes 0,3 M MgCl₂ som den beste salterstatteren.

Tilsetningsstoffer til farser av hyse, slik som Na-alginat, Na-alginat+NaCl og NaCl har alle en positiv effekt på proteinløselighet, og ser ut til å kunne kompensere for bruk av en dårlig proteinekstraktant eller en proteinekstraktant med lav konsentrasjon. Varmebehandling av farser/puddinger med og uten tilsetninger har vist at VBE når et minimum ved rundt 50°C, og at den øker ved høyere temperaturer, trolig som en følge av gelning av myosin. VBE er lavest i råstoff uten tilsetning, og øker ved tilsetning av NaCl, Na-alginat + NaCl og Na-alginat. Av tilsetningsstoffene har Na-alginat (med og uten NaCl) best effekt, både på VBE, drypptap og tekstur.

pH varierer i sei, hyse, torsk og kvitlaks, og øker etter frysing. For ferskt råstoff viser VBE en svak positiv korrelasjon med pH (10% signifikansnivå), men for fryst råstoff er det ingen klar sammenheng. For torsk og hyse økte VBE litt som en følge av frysing (5% signifikansnivå), mens den sank for sei.

Denne oppgaven har ikke vist noe om hvordan proteinløselighet påvirkes av endringer i pH over tid, samt i hvilken grad endringer i proteinløselighet påvirker VBE over tid. I framtidige studier ville det derfor vært interessant å undersøke hvordan proteinløselighet endrer seg over tid i forskjellige råstoff, tilsatt ulike salter og ulike konsentrasjoner av salter, og om dette har sammenheng med endringer i pH og VBE i det samme tidsrommet. Det kunne også vært interessant å se om ulike tilsetninger – slik som Na-alginat – påvirker forholdet mellom dem. Dette kunne videre vært knyttet opp til varmestabilitet og gelstyrke i råstoffene tilsatt Na-alginat, og hvordan disse endrer seg over tid. Det hadde også vært interessant å undersøke hvordan saltblandinger med forskjellige kombinasjoner av salter og konsentrasjoner av NaCl, MgCl₂ og KCl påvirker proteinløselighet.

Bibliografi

- Anderson, M. L. & Ravesi, E. M. (1968), 'Relation between protein extractability and free fatty acid production in cod muscle aged in ice', *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **25**(10), 2059–2069.
- Arakawa, T. & 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.
- Asghar, A. & Samejima, K. Yasui, T. (1985), 'Functionality of muscle proteins in gelation mechanisms of structured meat products', *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **22**, 27–106.
- Badii, F. & Howell, N. K. (2001), 'A comparison of biochemical changes in cod (*Gadus Morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) fillets during frozen storage', *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**, 87–97.
- Badii, F. & Howell, N. K. (2002), 'Changes in the texture and structure of cod and haddock fillets during frozen storage', *Food Hydrocolloids* **16**, 313–319.
- Bendall, J. (1973), *The structure and function of muscle*, Vol. 2, 2 edn, Academic Press, New York.
- Benjakul, S. & 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.
- Berg, F. (2012), 'Om bruk av ulike fiskeslag i industrien'. Personlig e-postkommunikasjon med Freddy Berg (freddy@berggren.no), Berggren.
- Bradford, 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**, 248–254.
- Bremner (1992), Fish flesh structure and the role of collagen - its post-mortem aspects and implications for fish processing, in H. H. Huss, M. Jakobsen & J. Liston, eds, 'Quality Assurance in the Fish Industry', Developments in Food Science, Elsevier Science Publishers, pp. 39–57.
- Chan, J. K., Gill, T. A. & Paulson, A. T. (1992), 'The dynamics of thermal denaturation of fish myosins', *Food Research International* **25**, 117–123.
- Damodaran, S. (2008), *Fennema's Food Chemistry*, 4 edn, CRC Press, chapter 5: Amino Acids, Peptides, and Proteins, pp. 217–329.
- Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R. & Verrez-Bagnis, V. (2006), 'Trends in postmortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **46**(5), 409–421.

- Desmond, E. (2006), 'Reducing salt: A challenge for the meat industry', *Meat Science* **74**, 188–196.
- Dulavik, B., Sørensen, N., Barstad, H., Horvli, O. & Olsen, R. L. (1998), 'Oxidative stability of frozen light and dark muscle of saithe (*Pollachius Virens L.*)', *Journal of Food Lipids* **5**, 233–245.
- Eide, O., Børresen, T. & Strøm, T. (1982), 'Minced fish production from capelin (*Mallotus villosus*). a new method for gutting, skinning and removal of fat from small fatty fish species', *Journal of Food Science* **47**, 347–350.
- Eskin, N. (1990), *Biochemistry of Foods*, Academic Press, chapter 1: Biochemical Changes in Raw Foods: Meat and Fish, pp. 3–67.
- Fitbit (2012), 'Nutritional information, diet info and calories in great silver smelt, fillet, raw'. Lastet ned 4.4.2012.
URL: <http://www.fitbit.com/foods/Great+Silver+Smelt+Fillet+Raw/23530>
- Gordon, A. & Barbut, S. (1992), 'Effect of chloride salts on protein extraction and interfacial protein film formation in meat batters', *J Sci Food Agric* **58**, 227–238.
- Haard, N. F. (1992), 'Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish', *Food Research International* **25**, 289–307.
- Haard, N. F., Simpson, B. K. & Pan, B. S. (1994), *Seafood Proteins*, Chapman & Hall, chapter 3: Sarcoplasmic Proteins and other nitrogenous compounds, pp. 13–39.
- Hamm, R. (1960), 'Biochemistry of meat hydration', *Advances in Food Research* **10**, 355–463.
- Helsedirektoratet (2011), Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer - metodologi og vitenskapelig kunnskapsgrunnlag, Rapport IS-1881, Nasjonalt råd for ernæring.
- Holth, T. O., Lynghammar, A. & Kilde, I. (2012a), 'Hyse'. Lastet ned 4.4.2012.
URL: <http://fiskipedia.no/Arter/hyse.html>
- Holth, T. O., Lynghammar, A. & Kilde, I. (2012b), 'Sei'. Lastet ned 4.4.2012.
URL: <http://fiskipedia.no/Arter/sei.html>
- Holth, T. O., Lynghammar, A. & Kilde, I. (2012c), 'Torsk'. Lastet ned 4.4.2012.
URL: <http://fiskipedia.no/Arter/torsk.html>
- Holth, T. O., Lynghammar, A. & Kilde, I. (2012d), 'Vassild'. Lastet ned 4.4.2012.
URL: <http://fiskipedia.no/Arter/vassild.html>
- Hong, P. G. & Chin, K. B. (2010), 'Evaluation of sodium alginate and glucono- δ -lactone levels on the cold-set gelation of porcine myofibrillar proteins at different salt concentrations', *Meat Science* **85**, 201–209.
- Hultmann, L. & 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.
- Jafarpour, A. & Gorczyca, M. (2012), 'Contribution of sarcoplasmic proteins to myofibrillar proteins gelation', *Journal of Food Science* **77(2)**, R73–81.
- Jónsson, G. & Pálsson, J. (2006), *Íslenskir fiskar (Icelandic fishes)*, Reykjavík, Island.

- Kim, Y. S., Yongsawatdigul, J., Park, J. W. & Thawornchinsombut, S. (2005), 'Characteristics of sarcoplasmic proteins and their interaction with myofibrillar proteins', *Journal of Food Biochemistry* **29**(5), 517–532.
- Kolhe, P., Amend, E. & Singh, S. K. (2010), 'Impact of freezing on pH of buffered solutions and consequences for monoclonal antibody aggregation', *Biotechnology Progress* **26**(3), 727–733.
- Kolodziejska, I. & Sikorski, Z. E. (1980), 'Inorganic salts and extractability of fresh and frozen fish products', *International Journal of Refrigeration* **3**(3), 151–155.
- Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. (2000), 'Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **40**(1), 43–81.
- Laemmli, U. K. (1970), 'Cleavage and structural proteins during assembly of the head of bacteriophage t_4 ', *Nature* **227**, 680–685.
- Lawrie, R. A. & Ledward, D. (2006), *Lawrie's Meat Science*, 7 edn, Woodhead Publishing, chapter 5: The conversion of muscle to meat, pp. 128–156.
- Lee, C. M. (2011), *Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications*, Blackwell Publishing Ltd, chapter 13: Fish mince: cryostabilization and product formulation, pp. 156–170.
- Lerfall, J., Akse, L., Østerlie, M. & Birkeland, S. (2010), Salt uptake and astaxanthin retention in early processed (pre-rigor) cold-smoked atlantic salmon, in '40th ANNUAL WEFTA MEETING', Ege University, Faculty of Fisheries, Turkey.
- Licciardello, J., Ravesi, E. M., Lundstrom, R., Wilhelm, K., Correia, F. & Alsup, M. (1982), 'Time-temperature tolerance and physical-chemical quality tests for frozen and red hake', *Journal of Food Quality* **5**, 215–234.
- Lynum, L. (1994), *Fisk som råstoff*, Tapir Akademisk Forlag.
- Martínez-Alvarez, O., Borderías, J. A. & Goómez-Guillén, M. C. (2005), 'Sodium replacement in the cod (*Gadus morhua*) muscle salting process', *Food Chemistry* **93**, 125–133.
- Morley, W. (2012), 'Novel strategies for reducing sodium', *Food Technology* **1**, 53–62.
- Munasinghe, D. & Sakai, T. (2003), 'Sodium chloride (0,8 m) as a better protein extractant for fish meat quality assessments', *Journal of Food Science* **68**(3), 1059–1062.
- Offer, G. & Knight, P. (1988), *Developments in meat science*, Elsevier Applied Science, chapter 4: The structural basis of water-holding in meat, pp. 173–243.
- Offer, G. & Trinick, J. (1983), 'On the mechanism of water holding in meat: the swelling and shrinking of myofibrils', *Meat Science* **8**, 245–181.
- Ofstad, R., Kidman, S., Myklebust, R. & Hermansson, A. M. (1993), 'Liquid holding capacity and structural changes during heating of fish muscle: cod (*Gadus morhua* l.) and salmon (*Salmo salar*)', *Food Structure* **12**, 163–174.
- Ofstad, R., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R. L. & Hermansson, A. M. (1995), 'Liquid-holding capacity and structural changes in comminuted salmon (*Salmo salar*) muscle as influenced by pH, salt and temperature', *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **28**, 329–339.
- Ofstad, R., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R. L. & Hermansson, A. M. (1996), 'Factors

- influencing liquid-holding capacity and structural changes during heating of comminuted cod (*Gadus morhua* l.) muscle', *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **29**, 173–183.
- Pharmacia (1990), *PhastSystem™ Separation Technique File No. 130 - Native and SDS-PAGE of high molecular weight proteins using PhastGel Gradient 4-15*, Pharmacia LKB Biotechnology, S-751 82 Uppsala, Sverige.
- Pharmacia (n.d.), *PhastSystem™ Development Technique File No. 200 - Fast coomassie staining*, Pharmacia LKB Biotechnology, S-751 82 Uppsala, Sverige.
- Pérez-Mateos, M. & Montero, P. (2000), 'Contribution of hydrocolloids to gelling properties of blue whiting muscle', *European Food Research and Technology* **210**, 383–390.
- Puolanne, E. & Halonen, M. (2010), 'Theoretical aspects of water-holding in meat', *Meat Science* **86**, 151–165.
- Rayment, I. & Holden, H. M. (1994), 'The three-dimensional structure of a molecular motor', *Trends in Biochemical Sciences* **19**, 129–134.
- Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Bäse, K., Smith, R., Tomchick, D. R. & Benning, M. M. (1993), 'Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor', *Science* **261**, 50–58.
- Rodger, G. & Wilding, P. (1990), *Food Gels*, Elsevier Applied Science, chapter 9: Muscle Proteins, pp. 361–400.
- Rustad, T., Padget, E. & Halvorsen, J. (1993), Vannbinding i fiskemuskel, Forskningsprosjekt 1902-301.033, Norges Fiskeriforskningsråd, Trondheim: NTNU, Institutt for bioteknologi.
- Ruusunen, M. & Puolanne, E. (2005), 'Reducing sodium intake from meat products', *Meat Science* **70**, 531–541.
- Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, S., Nordtvedt, T. S. & Seland, A. (1997), 'Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised atlantic salmon (*Salmo Salar*)', *Journal of Food Science* **62**, 898–905.
- Sikorski, Z. E. (1994), *Seafood Proteins*, Chapman & Hall, chapter 2: The contents of proteins and other nitrogenous compounds in marine animals, pp. 2–12.
- Sikorski, Z. E. & Borderias, J. A. (1994), *Seafood Proteins*, Chapman & Hall, chapter 5: Collagen in the muscle and skin of marine animals, pp. 58–70.
- Sikorski, Z. E., Kolakowska, A. & Pan, B. S. (1990), *Seafood: Resources, nutritional composition, and preservation*, 2 edn, CRC Press, Florida, chapter 3: The Nutritive Composition of the Major Groups of Marine Food Organisms, pp. 29–54.
- Sikorski, Z. E., Olley, J. & Kostuch, S. (1976), 'Protein changes in frozen fish', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* pp. 97–129.
- Skaara, T. & Regenstein, J. M. (1990), 'The structure and properties of myofibrillar proteins in beef, poultry, and fish', *Journal of Muscle Foods* **1**, 269–291.
- Stefansson, G. & Hultin, H. O. (1994), 'On the solubility of cod muscle proteins in water', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**(12), 2656–2664.
- Stone, A. P. & Stanley, D. W. (1992), 'Mechanisms of fish muscle gelation', *Food Research International* **25**, 381–388.

- Strasburg, G., Xiong, Y. L. & Chiang, W. (2008), *Fennema's Food Chemistry*, 4 edn, CRC Press, chapter 16: Physiology and Chemistry of Edible muscle tissues, pp. 923–973.
- Taylor, J. R. (1997), *An Introduction To Error Analysis - The study of uncertainties in physical measurements*, 2 edn, University Science Books, chapter Appendix A: Normal Error Integral, I, pp. 286–287.
- Thorarinsdottir, K. A., Arason, S., Geirsdottir, M., Bogason, S. & 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**, 377–385.
- Tortora, G. J. & Derrickson, B. (2006), *Principles of Anatomy and Physiology*, John Wiley and Sons.
- Valtýsson, H. . (2012), 'Great silver smelt'. Lastet ned 4.4.2012.
URL: <http://www.fisheries.is/main-species/other-demersal-fishes/great-silver-smelt/>
- Van Den Berg, L. (1966), 'ph changes in buffers and foods during freezing and subsequent storage', *Cryobiology* **3**(3), 263–242.
- Videler, J. J. (2011), 'An opinion paper: emphasis on white muscle development and growth to improve farmed fish flesh quality', *Fish Physiology and Biochemistry* **37**, 337–343.
- Wu, M. C., Akahane, T., Lanier, T. C. & Hamann, D. D. (1985), 'Thermal transitions of actomyosin and surimi prepared from atlantic croaker as studied by differential scanning calorimetry', *Journal of Food Science* **50**, 10–13.
- Zhang, Y. & Cremer, P. S. (2006), 'Interactions between macromolecules and ions: the hofmeister series', *Current Opinion in Chemical Biology* **10**, 658–663.

Vedlegg

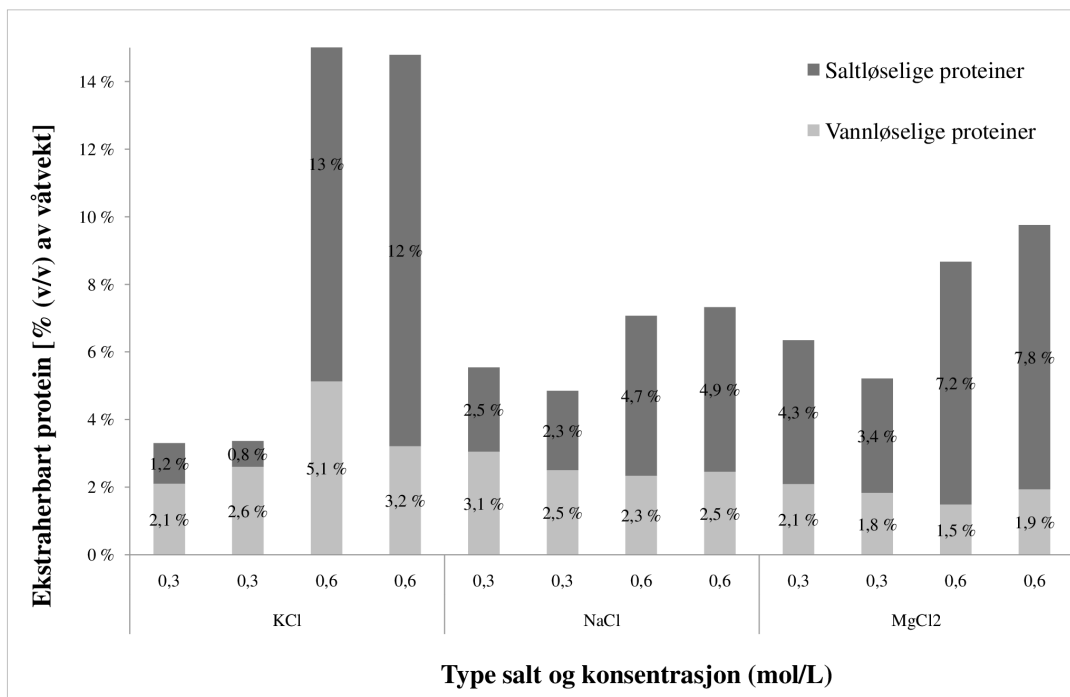
Vedlegg A	Proteinløselighet	A-3
A.1	Sei	A-3
A.2	Hyse	A-7
A.3	Kvitlaks	A-9
A.4	Torsk	A-10
Vedlegg B	Vannbindingsevne	A-15
B.1	Beregning av VBE	A-15
B.2	Rådata VBE	A-15
B.3	Justering av beregnet VBE	A-17
Vedlegg C	Varmebehandling	A-19

Vedlegg A

Proteinløselighet

A.1 Sei

Figur A.1 viser mengde ekstrahert VLP og SLP fra filet av fersk sei fra forsøk 1.

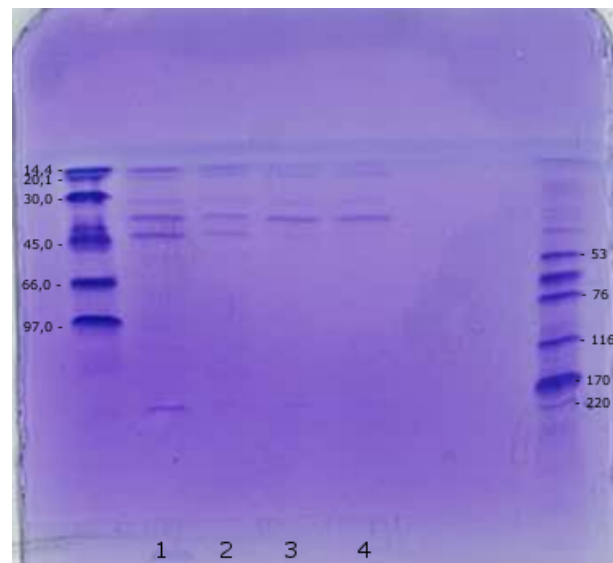


Figur A.1: Mengde ekstraherbart VLP og SLP (% (v/v) av våtvekt) fra fersk seifilet. Forsøk 1.

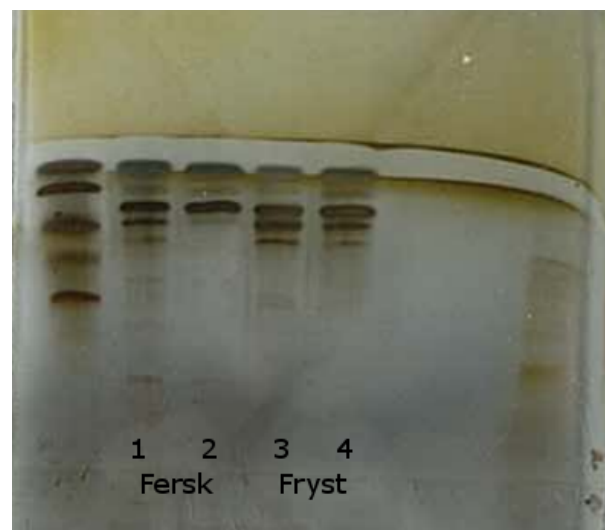
Figur A.2 og figur A.3 viser SLP fra farse av fersk sei, separert med SDS-PAGE, og farget med henholdsvis Coomassie Blue og sølv.

Figur A.4 og A.5 viser SLP fra filet av sei som har vært fryst, separert med SDS-PAGE, og farget med henholdsvis Coomassie Blue og sølv.

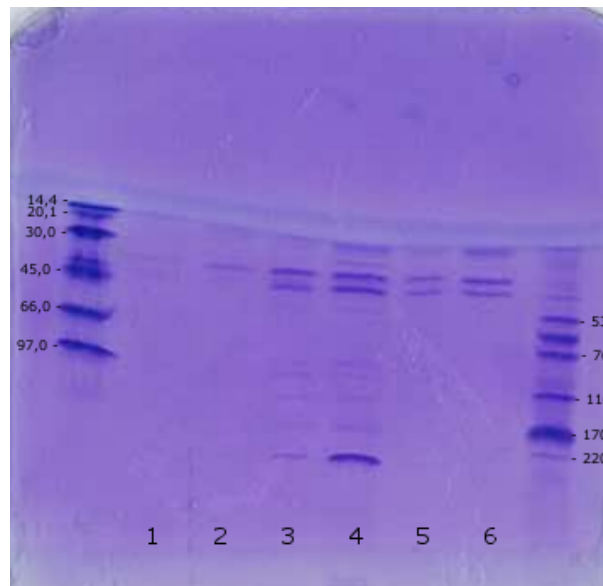
Figur A.6 viser SLP fra farse av fryst sei, mens A.3 viser SLP fra farse av fersk og fryst sei, separert med SDS-PAGE, og farget med henholdsvis Coomassie Blue og sølv.



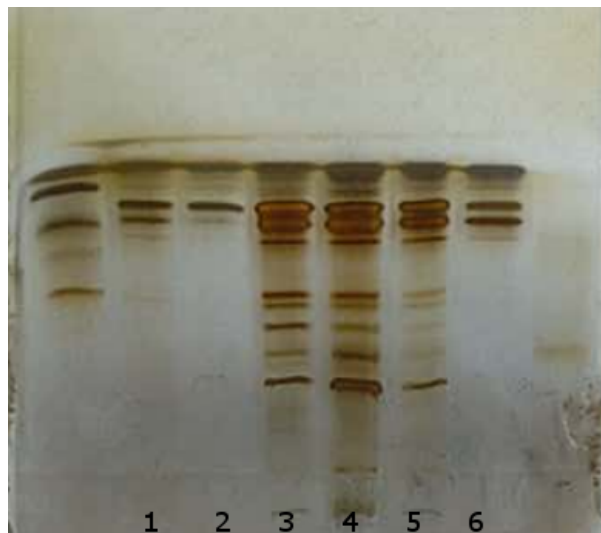
Figur A.2: Proteiner fra farse av fersk seifilet, separert med SDS-PAGE og farget med Coomassie Blue. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,3 M KCl; 3 = 0,6 M KCl; 4 = 0,6 M KCl



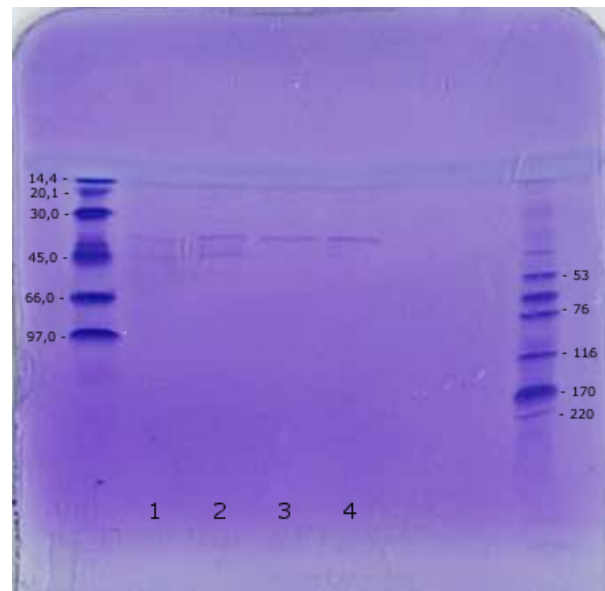
Figur A.3: Proteiner fra farse av fersk sei og av sei som har vært fryst, separert med SDS-PAGE og sølvfarget. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M KCl; 4 = 0,6 M KCl.



Figur A.4: Proteiner fra filet av sei som har vært fryst, separert med SDS-PAGE og farget med Coomassie Blue. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M NaCl; 4 = 0,6 M NaCl; 5 = 0,3 M MgCl₂; 6 = 0,6 M MgCl₂.



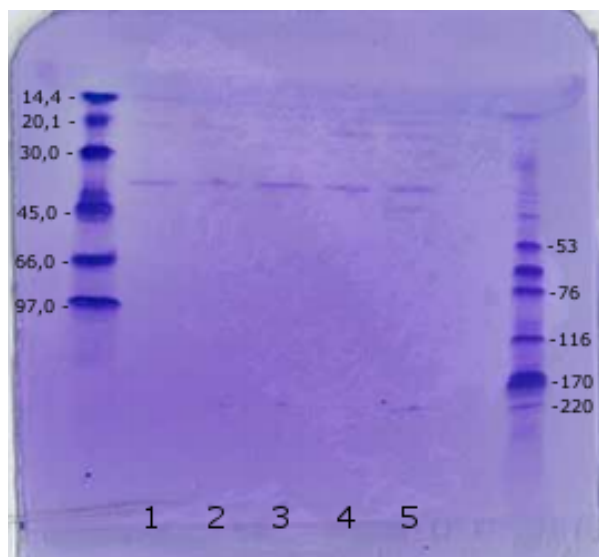
Figur A.5: Proteiner fra filet av sei som har vært fryst, separert med SDS-PAGE og sølvfarget. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M NaCl; 4 = 0,6 M NaCl; 5 = 0,3 M MgCl₂; 6 = 0,6 M MgCl₂.



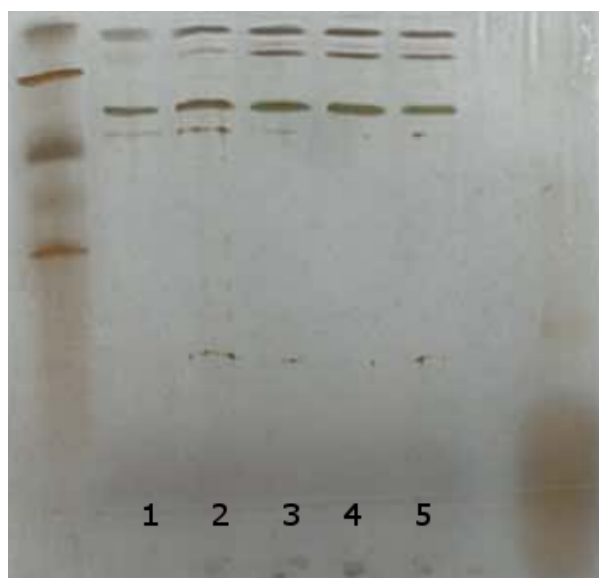
Figur A.6: Proteiner fra farse av sei som har vært fryst, separert med SDS-PAGE og farget med Coomassie Blue. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,3 M KCl; 3 = 0,6 M KCl; 4 = 0,6 M KCl.

A.2 Hyse

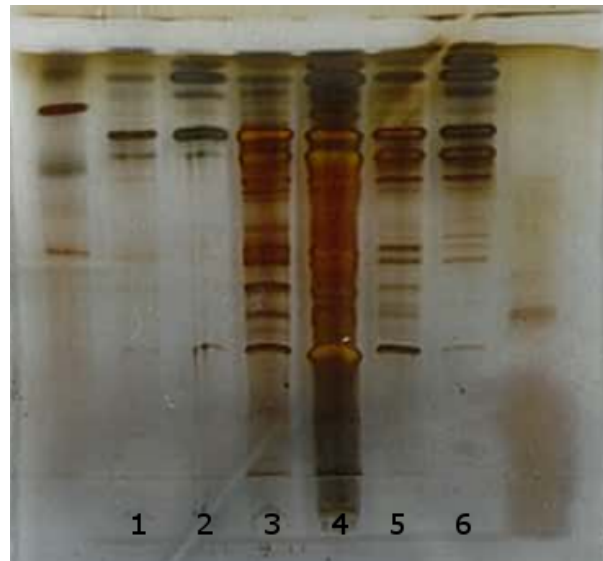
Figur A.7 og A.8 viser SLP fra farse av fersk hyse, separert med SDS-PAGE og farget med henholdsvis Coomassie Blue og sølv. Figur A.9 og A.10 viser SLP fra henholdsvis fryst hysefilet (sølvfarget) og farse av fryst hyse (farget med Coomassie Blue). Sistnevnte viser i tillegg til proteiner fra smeltevann (merket med S på gelen).



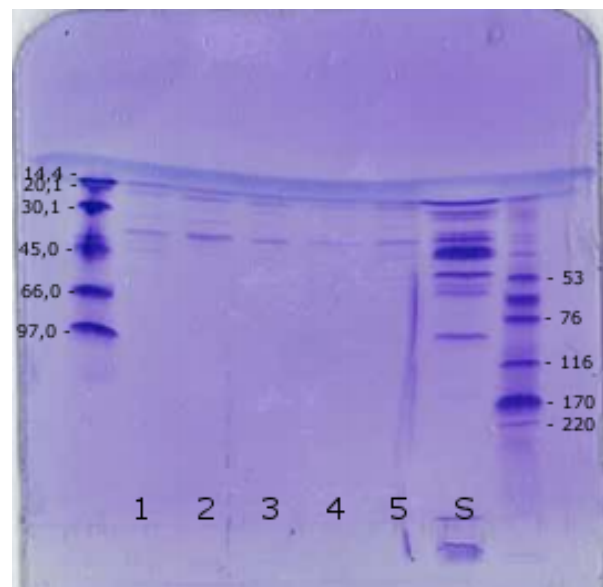
Figur A.7: Proteiner fra farse av fersk hyse, separert med SDS-PAGE og farget med Coomassie Blue. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = Uten tilsetning, 0,3 M KCl; 2 = Uten tilsetning, 0,6 M KCl; 3 = NaCl (0,4%); 4 = Alginat (1,1%), NaCl (0,4%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%); 5 = Alginat (1,1%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%). Proteiner fra farsene med tilsetning ble ekstrahert med 0,6 M KCl.



Figur A.8: Proteiner fra farse av fersk hyse separert med SDS-PAGE, og farget med sølv. De ulike brønnene er nummererte. 1 = Uten tilsetning, 0,3 M KCl; 2 = Uten tilsetning, 0,6 M KCl; 3 = NaCl (0,4%); 4 = Alginat (1,1%), NaCl (0,4%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%); 5 = Alginat (1,1%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%). Proteiner fra farsene med tilsetning ble ekstrahert med 0,6 M KCl.



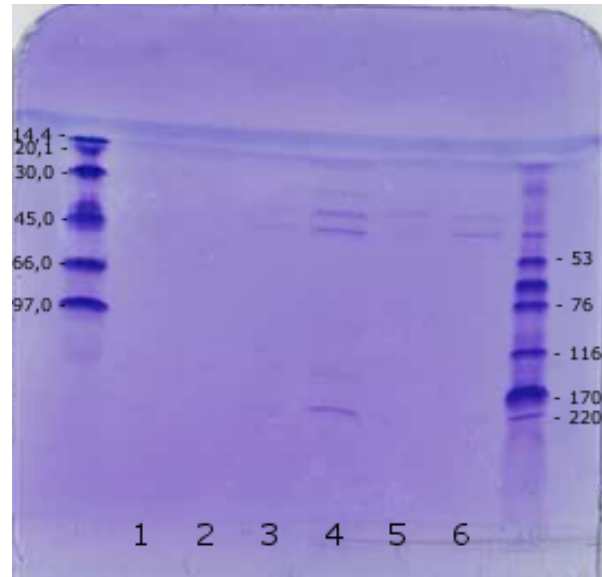
Figur A.9: Proteiner fra hysefilet som har vært fryst, separert med SDS-PAGE og sølvfarget. De ulike brønnene er nummererte. 1 = Uten tilsetning, 0,3 M KCl; 2 = Uten tilsetning, 0,6 M KCl; 3 = NaCl (0,4%); 4 = Alginat (1,1%), NaCl (0,4%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%); 5 = Alginat (1,1%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%). Proteiner fra farsene med tilsetning ble ekstrahert med 0,6 M KCl.



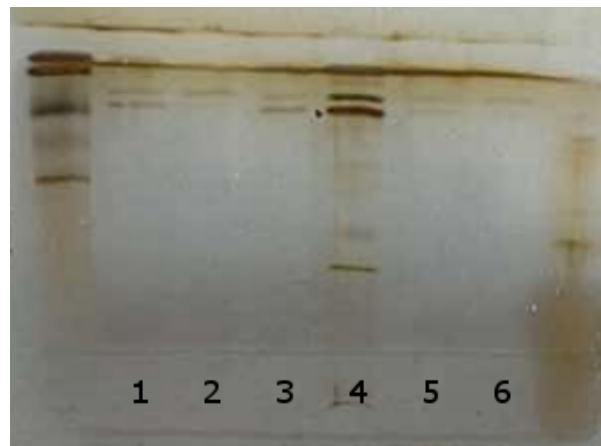
Figur A.10: Proteiner fra farse av hyse som har vært fryst, separert med SDS-PAGE og farget med Coomassie Blue. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = Uten tilsetning, 0,3 M KCl; 2 = Uten tilsetning, 0,6 M KCl; 3 = NaCl (0,4%); 4 = Alginat (1,1%), NaCl (0,4%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%); 5 = Alginat (1,1%), GDL (0,6%), CaCO₃ (0,2%); S = smeltevann fra hysefilet som har vært fryst. Proteiner fra farsene med tilsetning ble ekstrahert med 0,6 M KCl.

A.3 Kvitlaks

Figur A.11 viser SLP fra fryst kvitlaksfarse separert med SDS-PAGE.



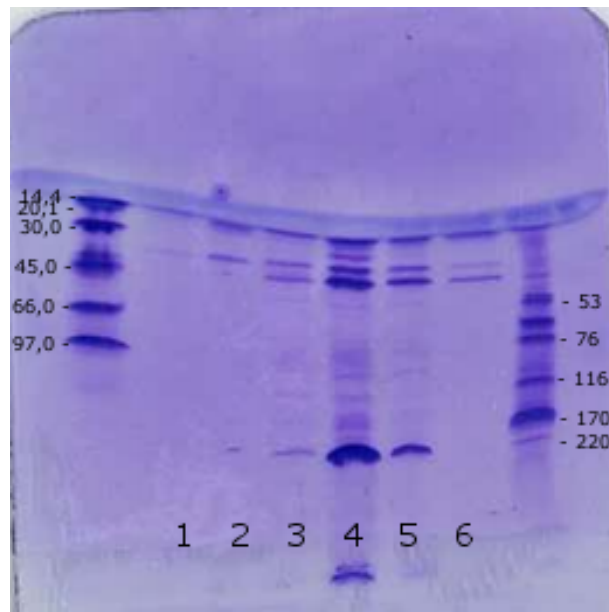
Figur A.11: Proteiner fra fryst kvitlaksfarse, separert med SDS-PAGE og farget med Coomassie Blue. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M NaCl; 4 = 0,6 M NaCl; 5 = 0,3 M MgCl₂; 6 = 0,6 M MgCl₂.



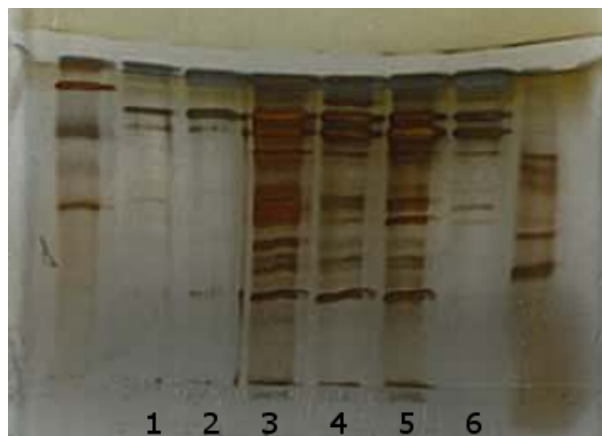
Figur A.12: Proteiner fra fryst kvitlaksfarse, separert med SDS-PAGE og farget med sølv. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M NaCl; 4 = 0,6 M NaCl; 5 = 0,3 M MgCl₂; 6 = 0,6 M MgCl₂.

A.4 Torsk

Figur A.13 og A.14 viser SLP fra filet av fersk torsk, separert med SDS-PAGE og farget med henholdsvis Coomassie Blue og sølv. Figur A.15 viser SLP fra farse av fersk torsk, separert med SDS-PAGE og farget med Coomassie Blue. Figur A.16 viser SLP fra farse av fersk torsk (brønn 1-2) og farse av fryst torsk (brønn 3-4), separert med SDS-PAGE og farget med sølv

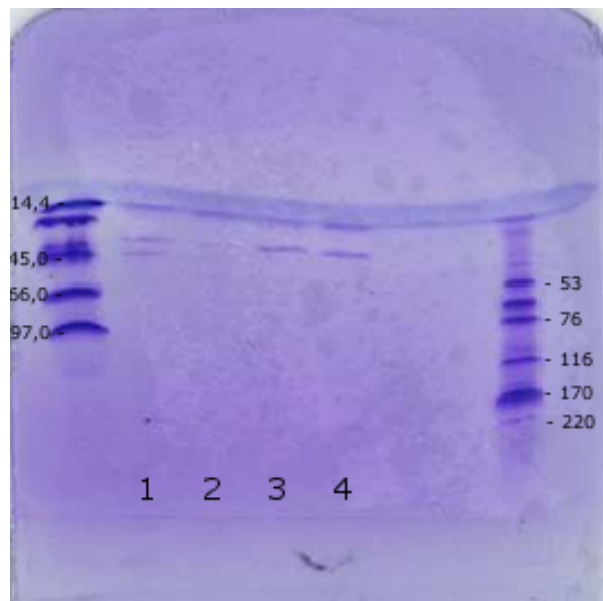


Figur A.13: Proteiner fra filet av fersk torsk, separert med SDS-PAGE og farget med Coomassie Blue. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M NaCl; 4 = 0,6 M NaCl; 5 = 0,3 M MgCl₂; 6 = 0,6 M MgCl₂.

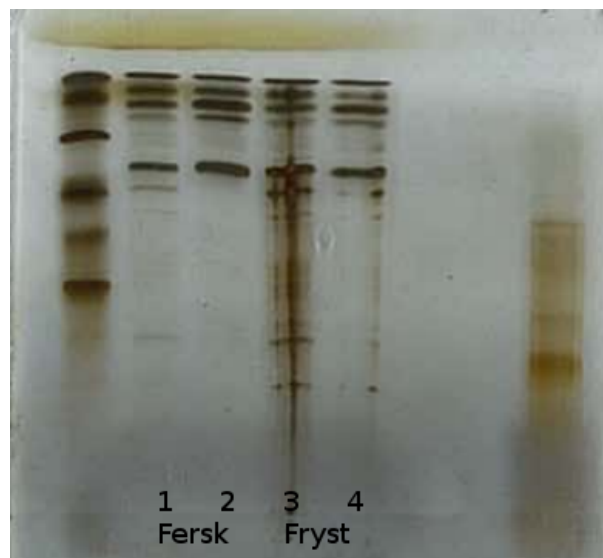


Figur A.14: Proteiner fra filet av fersk torsk, separert med SDS-PAGE og farget med sølv. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M NaCl; 4 = 0,6 M NaCl; 5 = 0,3 M MgCl₂; 6 = 0,6 M MgCl₂.

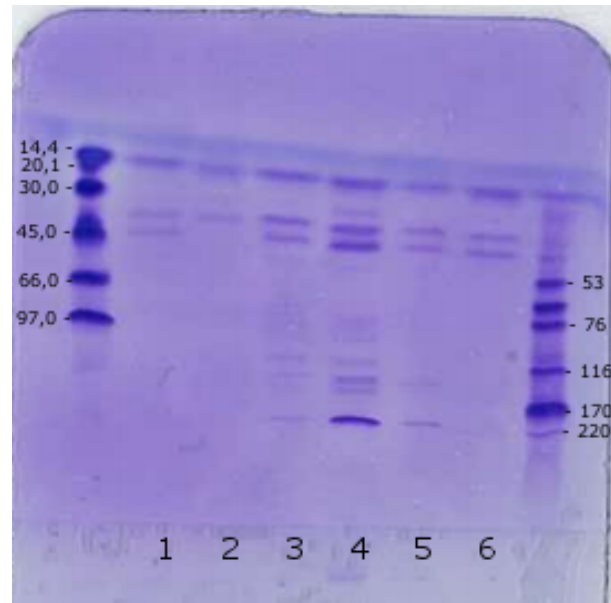
Figur A.17 og A.18 viser SLP fra filet av fryst torsk, separert med SDS-PAGE og farget med henholdsvis Coomassie Blue og sølv. Figur A.19 viser SLP fra farse av fryst torsk, separert med SDS-PAGE og farget med Coomassie Blue.



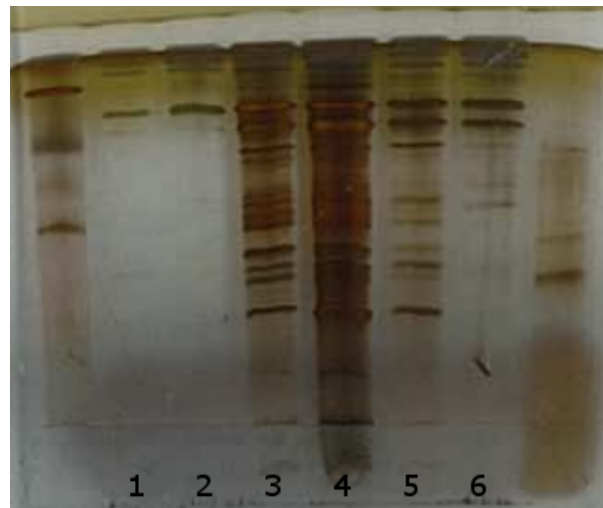
Figur A.15: Proteiner fra farse av fersk torsk separert med SDS-PAGE. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,3 M KCl; 3 = 0,6 M KCl; 4 = 0,6 M KCl.



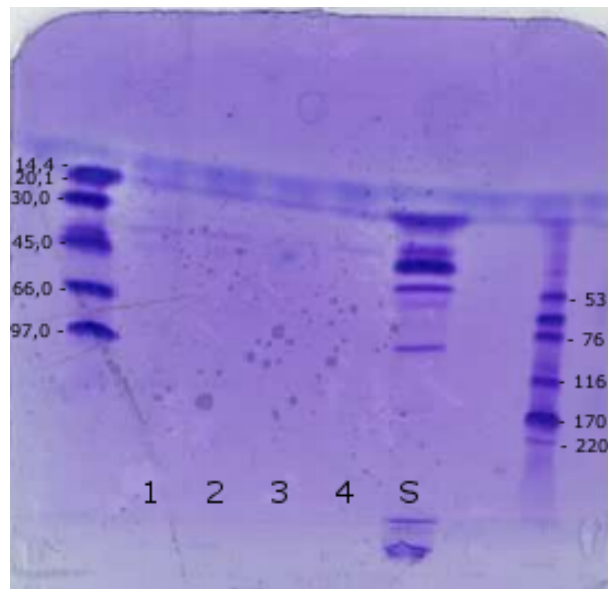
Figur A.16: Proteiner fra farse av fersk og fryst torsk, separert med SDS-PAGE og farget med sølv. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M KCl; 4 = 0,6 M KCl.



Figur A.17: Proteiner fra torskefilet som har vært fryst, separert med SDS-PAGE og farget med Coomassie Blue. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M NaCl; 4 = 0,6 M NaCl; 5 = 0,3 M MgCl₂; 6 = 0,6 M MgCl₂.



Figur A.18: Proteiner fra torskefilet som har vært fryst, separert med SDS-PAGE og farget med sølv. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,6 M KCl; 3 = 0,3 M NaCl; 4 = 0,6 M NaCl; 5 = 0,3 M MgCl₂; 6 = 0,6 M MgCl₂.



Figur A.19: Proteiner fra farse torskefilet som har vært fryst, separert med SDS-PAGE og farget med Coomassie Blue. LMW- og HMW-standardproteiner er markert med molekylvekt i kDa. De ulike brønnene er nummererte. 1 = 0,3 M KCl; 2 = 0,3 M KCl; 3 = 0,6 M KCl; 4 = 0,6 M KCl; S = Smeltevann fra torskefilet som har vært fryst.

Vedlegg B

Vannbindingsevne

B.1 Beregning av VBE

For mager fisk kan vanninnhold i prøven før sentrifugering, w_1 , bestemmes med

$$w_1 = \frac{v_1}{100 - v_1} \cdot g \text{ H}_2\text{O}/g \text{ tørrstoff}, \quad (\text{B.1})$$

hvor v_1 er vannprosent i prøve før sentrifugering. Vanninnhold i prøven etter sentrifugering, w_2 , kan bestemmes med

$$w_2 = \frac{v_1 - \Delta_r}{100 - v_1} \cdot g \text{ H}_2\text{O}/g \text{ tørrstoff}, \quad (\text{B.2})$$

hvor Δ_r er prosentvis vekttap ved sentrifugering.

Vannbindingsevne som prosent av vanninnhold i prøven før sentrifugering, $W_\%$, kan bestemmes med

$$W_\% = \frac{w_2}{w_1} \cdot 100\% = \frac{v_1 - \Delta_r}{v_1} \cdot 100\%. \quad (\text{B.3})$$

Videre kan vannprosent i prøven etter sentrifugering, v_2 , beregnes med

$$v_2 = \frac{v_1 - \Delta_r}{100 - \Delta_r} \cdot 100\% = \frac{100 \cdot w_2}{1 + w_2} \%. \quad (\text{B.4})$$

(Eide et al. 1982)

B.2 Rådata VBE

Resultatene for vanninnhold og vannbindingsevne i farse av sei for forsøk 1-3 er vist i tabell B.1.

Vanninnhold, VBE og standardavvik for fersk og fryst fisk er vist i henholdsvis tabell B.2 og B.3

Tabell B.1: Vanninnhold og vannbindingsevne (VBE) i farse av fersk sei for forsøk 1-3. Angitt er gjennomsnittsverdi (\bar{x}) og standardavvik (σ) av fire paralleller.

Lagring (dager)	Forsøk	Vanninnhold (%)		VBE (%)	
		\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
0	1	80,5	0,0	88,5	1,6
	2	79,9	0,1	86,5	1,0
	3	79,8	0,1	92,7	1,3
1	1	80,4	0,5	88,5	1,1
	2	79,4	0,3	85,6	1,5
	3	79,7	0,1	92,5	0,4

Tabell B.2: Vanninnhold og vannbindingsevne i farser av fersk fisk. Usikkerhet er oppgitt som standardavvik.

Fisk	Lagring (dager)	Vanninnhold (%)	σ (%)	VBE (%)	σ (%)
Sei	0	79,8	0,1	92,7	1,3
	1	79,7	0,1	92,5	0,4
Hyse	0	81,4	0,1	88,8	1,6
	1	81,2	0,1	85,7	1,8
Torsk	0	78,2	0,1	84,3	0,4
	1	77,9	0,0	86,8	1,1

Tabell B.3: Vanninnhold og vannbindingsevne i farser av fisk som har vært fryst. Usikkerhet er oppgitt som standardavvik.

Fisk	Lagring (dager)	Vanninnhold (%)	σ (%)	VBE (%)	σ (%)
Sei	0	79,7	0,0	90,7	0,8
	1	79,6	0,0	90,2	1,0
Hyse	0	80,4	0,0	92,3	1,9
	1	80,5	0,1	90,6	1,5
Torsk	0	77,8	0,0	92,5	0,8
	1	77,7	0,2	90,8	0,5
Kvitlaks	0	80,8	0,1	66,1	2,0
	1	82,0	2,6	84,9	1,1

Ved test av signifikans av forskjellen mellom gjennomsnittlig VBE dag 0 (A) og gjennomsnittlig VBE dag 1 (B), ble ligning B.5 benyttet.

$$t = \frac{|A - B|}{\sqrt{a^2 + b^2}} \quad (\text{B.5})$$

$|A - B|$ angir avviket mellom to målinger. a er det empiriske standardavviket for VBE dag 0, mens b er det empiriske standardavviket for VBE dag 1. Dermed er usikkerheten i avviket $\sqrt{a^2 + b^2}$. Sammenlignes det med normalfeilintegralet (normal error integral) finner man sannsynligheten (i prosent) for at forskjellen ligger innenfor t standardavvik. Det ble valgt et signifikansnivå på 5%, og dermed må sannsynligheten for at målingen ligger innenfor t standardavvik være $\geq 95\%$ for at det skal være signifikant forskjell mellom målingene. t -verdier ble sammenlignet med tabell A i appendix A i “An Introduction to Error Analysis” av Taylor (1997).

B.3 Justering av beregnet VBE

For sei, hyse og torsk ble fileter fra det samme råstoffet benyttet til målinger av fersk og fryst fisk – det vil si at noe av fileten av den ferske fisken ble fryst, og tint ved et senere tidspunkt. Dermed burde vanninnholdet i det ferske og fryste råstoffet være det samme, ettersom det er samme råstoff. Dette er ikke tilfelle. Forskjellen mellom vanninnhold i fersk og fryst hyse er vist i tabell B.4. Når hysen fryses og deretter tines tapes 1,23% av vannet fra fersk hyse, ved sammenligning av dag 0. Ved dag 1 er forskjellen ikke like stor.

Tabell B.4: Vanninnhold i farser av det samme råstoffet fra hyse, ferskt og fryst.

Lagring (dager)	Fersk (%)	Fryst (%)	Tapt vann (%)
0	81,4	80,4	1,23
1	81,0	80,5	0,617

Δ_r er prosentvis vekttap ved sentrifugering. Ved å multiplisere Δ_r for det fryste råstoffet med justeringsfaktoren $(1 + \text{tapt vann})$ oppnås Δ_r' , og vanntapet som følge av frysing/tining vil bli korrigert for i beregning av VBE. Et eksempel som viser forskjell mellom justert og ikke-justert VBE for 1 parallell for dag 0 og dag 1 for hyse er vist i tabell B.5. Som tabellen viser har dette liten påvirkning på VBE-verdiene, og justert VBE er kun 0,1 prosentpoeng lavere enn ikke-justert VBE.

Tabell B.5: Eksempel på hvordan VBE for farse av fryst råstoff kan justeres for å korrigere for vann tapt i fryse-/tineprosessen.

Dag	Justert		Ikke justert	
	0	1	0	1
Vanninnhold (%)	80,4	80,5	80,4	80,5
Holder (g)	15,5929	15,9627	15,5929	15,9627
Holder m/prøve (g)	17,6138	18,0297	17,6138	18,0297
Holder m/prøve e. sentr. (g)	17,4981	17,8845	17,4981	17,8845
Δ_r (%)	5,7	7,0	5,7	7,0
Justeringsfaktor	1,01229	1,00617	-	-
Δ_r' (%)	5,8	7,1	-	-
VBE (%)	92,8	91,2	92,9	91,3

Vedlegg C

Varmebehandling

Tabell C.1 og C.2 viser vanninnhold samt VBE i varmebehandlet farse av fryst kvitlaks, henholdsvis uten tilsetning og tilsatt 0,4% NaCl.

Tabell C.1: Vanninnhold samt VBE i varmebehandlet farse av fryst kvitlaks.

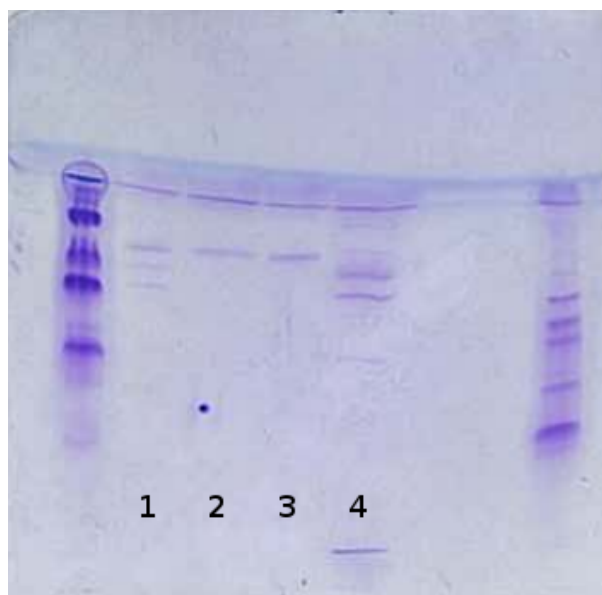
Grader	Vanninnhold (%)	σ (%)	VBE (%)	σ (%)
4	81,1	0,0	74,8	1,1
20	81,4	0,3	74,3	1,4
30	81,2	0,2	71,6	1,8
35	80,9	0,1	73,5	3,5
40	80,4	0,3	74,2	0,6
45	81,3	0,7	76,2	2,4
50	80,6	0,7	75,8	4,4
55	79,8	0,1	75,6	3,7
60	79,9	0,4	78,9	2,0
70	79,8	0,9	75,2	3,3

Tabell C.2: Vanninnhold samt VBE i varmebehandlet farse av fryst kvitlaks tilsatt 0,4% NaCl.

Grader (°C)	Vanninnhold (%)	σ (%)	VBE (%)	σ (%)
4	80,6	0,0	97,7	0,8
20	80,6	0,2	98,5	0,3
30	81,0	0,0	98,4	0,5
35	80,7	0,1	96,1	1,4
40	80,7	0,1	90,3	0,3
45	81,3	0,2	92,7	2,0
50	80,6	0,1	90,9	3,0
55	79,8	0,1	89,7	2,8
60	80,6	0,4	93,0	0,8
70	80,5	0,3	89,1	1,0

Figur C.1 viser separerte proteiner fra koketapsvann fra varmebehandlet kvitlaks og hyse.

Tabell C.3 og C.4 viser vanninnhold samt VBE i varmebehandlet farse av fersk hyse, henholdsvis



Figur C.1: Proteiner fra koketapsvann fra varmebehandlet kvitlaks og hyse, separert med SDS-PAGE og farget med Coomassie Blue. 1-3 = kvitlaks ved henholdsvis 55, 60 og 70°C. 4 = hyse ved 40°C.

uten tilsetning og tilsatt 0,4% NaCl.

Tabell C.3: Vanninnhold samt VBE i varmebehandlet farse av fersk hyse.

Grader (°C)	Vanninnhold (%)	σ (%)	VBE (%)	σ (%)
4	79,5	0,4	81,9	2,2
20	79,1	0,1	80,0	1,6
30	79,4	0,2	75,4	1,9
35	79,2	0,3	73,0	2,1
40	79,4	1,0	72,0	1,7
45	78,7	0,1	70,3	2,2
50	78,6	0,2	66,5	2,0
55	78,8	0,1	71,9	2,8
60	79,3	0,1	77,4	3,3

Tabell C.4: Vanninnhold samt VBE i varmebehandlet farse av fersk hyse tilsatt 0,4% NaCl.

Grader (°C)	Vanninnhold (%)	σ (%)	VBE (%)	σ (%)
4	79,3	0,2	88,0	0,6
20	79,0	0,1	87,0	1,9
30	78,8	0,0	80,2	3,8
35	78,8	0,1	81,2	1,0
40	79,2	0,3	82,5	2,6
45	78,7	0,2	80,0	2,5
50	78,6	0,3	74,4	2,7
55	78,8	0,1	81,9	2,4
60	78,7	0,3	89,0	2,3