

Kvalitet og holdbarhet til bearbejdede produkter fra marint råstoff.

Maria Helen Furnes Hansen

Bioteknologi (5 årig)

Innlevert: desember 2013

Hovedveileder: Turid Rustad, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi

Forord

Denne masteroppgaven har vært en del av masterutdanningen i bioteknologi (MBIOT5) ved NTNU. Arbeidet med oppgaven har foregått på instituttet for bioteknologi ved NTNU på næringsmiddelkjemilaboratoriet.

Oppgaven har vært veldig spennende å jobbe med og jeg vil sende en stor takk til veilederen min, Turid Rustad, som har hjulpet meg gjennom både det teoretiske og eksperimentelle med oppgaven. Jeg setter stor pris på alle tilbakemeldingene jeg har fått og alt jeg har lært. I tillegg vil jeg takke Trude Johansen som har hjulpet meg med alle instrumentene og metodene som ble brukt til arbeidet. Hun har spart meg for mange timer på laboratoriet med nyttige råd og tips for hvordan ting kan gjøres.

Til slutt vil jeg også takke familie og venner for all støtte og tålmodighet i løpet av arbeidet med masteroppgaven. Spesielt vil jeg takke samboeren min, Martin, for all hjelp og støtte med problemene som har dukket opp underveis. Og spesielt for korrekturlesingen som måtte gjøres til slutt.

Trondheim, desember 2013

Maria Helen Furnes Hansen

Sammendrag

Konsumering av marine produkter har vist å ha flere positive helseeffekter. For å gjøre folk mer interessert i å spise marine produkter er det behov for utvikle attraktive, stabile og velsmakende produkter. Det er blitt vist at produkter som ser attraktive ut, er de som blir solgt mest av. I tillegg må produktet ha godt holdbarhet etter åpning slik at det kan oppbevares i kjøleskap en stund. Utfordringen med et slikt produkt er at marine produkter harskner lett. Oksidering av lipider og proteiner skjer raskt i kontakt med oksygen. I dette forsøket ble det forsøkt å finne metoder for å forsinke oksidasjonsprosessen for å kunne få et velsmakende og holdbart lakseprodukt. Stekt røkelaks ble prøvd ut som eventuell topping, mens det ble brukt fersk SALMA laks som eventuelt påleggsprodukt.

Det ble observert at lipidinnholdet i stekt røkelaks holder seg relativt stabilt ved kjølelagring i 4 uker. Konsentrasjonene av primære- og sekundære oksidasjonsprodukter holdt seg også relativt stabile. For røkelaks oppdelt i skiver ble resultatene noe varierende. Dette viser at stekt røkelaks kan brukes til topping. Imidlertid bør det utføres flere analyser med hensyn på fettlekkasje og utseende etter oppbevaring.

Laksefarsen som ble varmebehandlet ved ulike temperaturer viser også gode resultater med hensyn på bruk i et mulig lakseprodukt. Ulike betingelser som tilsats av salt, reduksjon av pH og ulike varmebehandlingsbetingelser ble prøvd ut. Temperaturer over 35°C-40°C viste seg å gi redusert vannbindingsevne (VBE) i forhold til temperaturer mellom 4°C og 30°C. Ved lave temperaturer (4°C) var proteinløseligheten høyest for laksefarsen uten tilsetninger. Ved å tilsette salt i laksefarsen minket VBE bare med 15 % fra 4°C til 60°C. Nedjustert pH ga lavere VBE, og det ble observert at proteinene ble mer varmesensitive ved lavere pH.

Varmesensitive proteiner kan skape problemer hvis produktet må varmebehandles før salg. For løseligheten til proteinene ble det observert minkende løselighet med økende temperaturer (4°C-40°C) for de saltløselige proteinene, mens de vannløselige viste liten endring. Målingene av SH grupper og proteinløselighet viste at ved å senke pH i laksefarsen, vil mengden oksiderte proteiner være lavere enn ved tilsetning av salt eller uten tilsetninger. Ved å kjøre gel- elektroforese ble det observert at ved 30°C hadde alle prøvene ekstrahert ut myosin og aktin. Laksefarse uten tilsetninger inneholdt større konsentrasjon myosin og aktin. Mens ved 40°C ble det kun observert aktin i laksefarse uten tilsetninger og med salt.

Ut fra resultatene som ble funnet i dette forsøket kan det se ut som at salt fungerer best som tilsetning for å forbedre holdbarheten i et lakseprodukt, spesielt hvis produktet må varmebehandles. Redusert pH hindrer proteinoksidasjon best, men det gjør også proteinene varmesensitive. I tillegg er det vist at stekt røkelaks har potensialet til å fungere som topping på et fiskeprodukt. Likevel er det vanskelig å si hva som må gjøres for å kunne lage et nytt produkt med god holdbarhet bare ved å se på disse resultatene. Videre analyser og prøver bør utføres, det kan også testes ut om det er mulig å kombinere salt og pH. I tillegg må det tas hensyn til det mikrobielle som også må prøves ut før produktet kan lages.

Abstract

The consumption of marine products has been shown to have several health benefits. To make people more interested in marine products, there is a need for developing attractive, stable and tasty products. If the products looks attractive, people are more likely to buy them. It is important that the product obtains a long shelf life, so it is possible to store an opened product in the refrigerator for an adequate time. The challenge to make such a product is that marine products become easily oxidized. Oxidation of lipids and proteins occur rapidly in contact with oxygen. In this experiment, different factors was tried out to find a way to reduce the oxidation process to get a tasty product. Fried smoked salmon were tested as a potential topping, while it was used fresh salmon from “SALMA” to make the main product.

It was observed that the lipid content in fried smoked salmon remain relatively stable after a storage time for 4 weeks (4°C). The concentrations of primary and secondary oxidation products remained relatively stable. This shows that the smoked salmon is possible to use as a topping. However, it should be performed several analyzes with respect to fat leakage and appearance after storage.

The results from the grounded salmon, heated at different temperatures, show a good possibility to use “SALMA” in a fish product. Various conditions in the salmon, addition of salt, reduced pH and various temperatures were tested. Temperatures above 35°C-40°C showed a reduced water holding capacity (WHC) compared to temperatures between 4°C and 30°C. At a low temperature (4°C), the protein solubility was high in salmon without additives. By adding salt to the grounded salmon the WHC had a 15% decrease from 4°C to 60°C. In salmon with lower pH it was observed that proteins were more sensitive for higher temperatures. Heat-sensitive proteins can cause problems if the product need to be preheated before sale. The protein solubility was decreased when the temperature increased (4°C-40°C) for the salt-soluble proteins, whereas the water soluble showed little change. The measurements of the SH groups in salmon with lower pH, showed a higher amount of SH groups (compared to addition of salt and no additives), so the proteins were less oxidized when pH was reduced. By running gel electrophoresis the results shows at 30 ° C all the samples contained myosin and actin. Salmon without additives contained a higher

concentration of myosin and actin. The results from 40°C showed that only in salmon without additives and salt contained actin.

Based on the results obtained in this experiment it would appear that the addition of salt improve the durability of a salmon product, especially if the product need heat treatment. Reduced pH prevents protein oxidation the best, but it also makes the proteins heat sensitive. In addition, it is shown that smoked salmon has the potential to be used as a topping in a fish product. Yet it is hard to say what needs to be done to create a new product with good durability just by looking at these results. Further analysis and tests should be performed; it can also be tested if it is possible to combine the salt and pH. In addition, consideration must be given to the microbial that also must be tested before the product can be made.

Innhold

Forord.....	
Sammendrag.....	
Abstract	
Innledning	1
2 Fisk og fiskeråstoff.....	2
2.1 Introduksjon	2
2.2 Kjemisk sammensetning.....	2
2.3 Muskelanatomi	3
2.4 Muskelproteiner	4
2.4.1 Myosin og aktin.....	9
2.4.2 Løseligheten til proteiner.....	10
2.4.3 Proteindenaturering	12
2.4.4 Geldannelse	14
2.4.5 Vannbindingsevne	15
2.4.6 Proteinoksidasjon	16
2.5 Lipider	16
2.5.1 Lipidoksidasjon	19
2.6 Biokjemiske reaksjoner post-mortem.....	22
2.7 Konserveringsmetoder.....	22
2.7.1 Røking	22
2.7.2 Salting.....	23
2.7.3 Varmebehandling av råstoff	24
2.8 Laks	25
2.8.1 Salma laks	25
3 Materialer og Metode	27
3.1 Materialer	27
3.1.1 Røkt laks.....	27
3.1.2 Fersk Salma laks.....	27
3.2 Metoder	28
3.2.1 Lipidekstrasjon	28
3.2.2 Bestemmelse av primære oksidasjonsprodukter, PV.....	28
3.2.3 Bestemmelse av sekundære oksidasjonsprodukter, TBARS	28

3.2.4 pH- måling.....	29
3.2.5 Vannbindingsevne (VBE)	29
3.2.6 Protein ekstraksjon	29
3.2.7 BioRad metoden	30
3.2.8 Kvantifisering av SH- grupper	30
3.2.9 PhastGel elektroforese.....	30
4 Resultater og diskusjon	31
4.1 Lipidinnhold	31
4.2 Bestemmelse av primære oksidasjonsprodukter.....	34
4.3 Bestemmelse av sekundære oksidasjonsprodukter.....	37
Varmebehandling av laksemuskel.....	40
4.4 Vannbindingsevne.....	40
4.5 Endringer i proteinets løselighet.....	46
4.6 Kvantifisering av SH grupper.....	55
4.7 Phastgel elektroforese.....	60
5 Konklusjon	66
Kilder.....	67
Vedlegg	i
Vedlegg A	i
Vedlegg B.....	ii
Vedlegg C.....	iv
Vedlegg D	vii
Vedlegg E.....	x
Vedlegg F	xvi
Vedlegg G	xxvi
Vedlegg H	xxxv

Innledning

For å øke inntak av sjømat er det behov for utvikling av attraktive, stabile og velsmakende produkter. Det er også et ønske om å utnytte en større del av råstoffene til produkter til humant konsum. For å utvikle slike produkter er det nødvendig med mer kunnskap om råstoffene som skal inngå og hvordan disse påvirkes av prosess og lagring samt om hvordan prosessering og ingredienser påvirker holdbarhet.

I oppgaven vil det være fokus på råstoff fra laks. Fisk og marine råstoff har et høyt innhold av flerumettet fett, noe som gjør at produktene lett harskner. Harskningen skyldes oksidasjon av umettede fettsyrer, som i neste omgang kan føre til oksidasjon av proteiner og aminosyrer. Lipid- og proteinoksidasjon kan siden føre til at farge og tekstur endres i tillegg til utvikling av harsk lukt og smak.

For påleggsprodukter har det vist seg at ulike typer topping kan gjøre produktene mer attraktive og øke salget. Et viktig aspekt her er at toppingen må være stabil og ikke føre til at det dannes uønsket smak og lukt. En mulig topping på lakseprodukter er varmebehandlet røkelaks – et av målene med oppgaven var derfor å undersøke oksidativ stabilitet målt som endring i primære og sekundære harskningsprodukter.

Ved tillagning av påleggsprodukter av laks er det også viktig med mer kunnskap om endringer i proteiner og muskelstruktur under varmebehandling. Det andre målet med oppgaven var der for å undersøke endringer i proteinløselighet, vannbindingsevne og proteinoksidasjon i laks varmebehandlet ved ulike betingelser.

2 Fisk og fiskeråstoff

2.1 Introduksjon

Proteiner og lipider er viktige bestanddeler i marine produkter med tanke på bruk til human konsumering. Marine lipider og også proteiner, er kjent for at de lett oksideres slik at produktene begynner å lukte og endre farge og tekstur. For og prøve å redusere hastigheten på harskningsprosessen, er det viktig med gode kunnskaper om råstoffets protein og lipidinnhold og hvordan de endrer seg under prosessering.

2.2 Kjemisk sammensetning

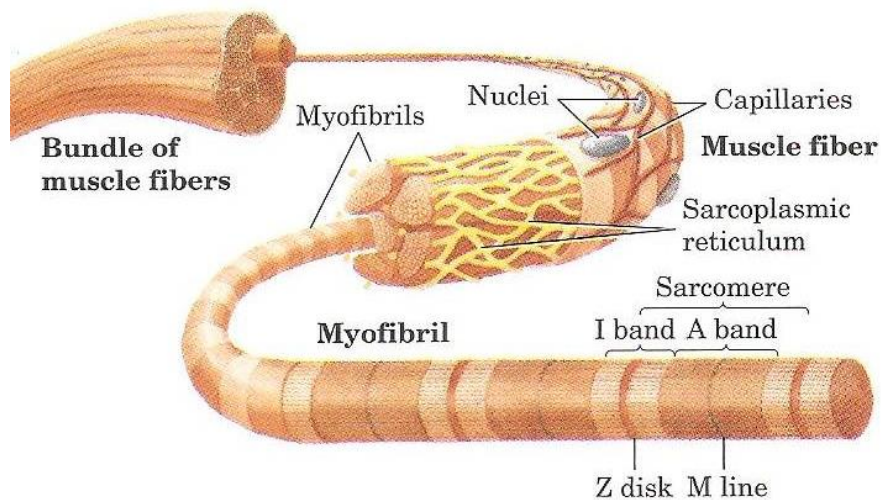
Den kjemiske sammensetningen i fisk har stor variasjon mellom arter, kjønn, alder, miljø og sesong. Fisken har perioder hvor den sulter, som ved gyting eller migrasjon. Under disse periodene bruker fisken energilagre i form av lipider. Når fisken igjen begynner å spise, vil lipidinnholdet få en kraftig økning. Lipidinnholdet er også den komponenten som variere mest. I tabellen under (tabell 2.2.1) er bestanddelen i fiskemuskel sammenlignet med innholdet i storfekjøtt-muskelen (FAO 1988).

Tabell 2.2.1: Prosentinnhold av de ulike komponentene i en fiskemuskel og isolert muskel fra storfekjøtt (FAO 1988).

Komponent	Fiskefilet			Storfekjøtt (isolert muskel)
	Min	Normal variasjon	Max	
Protein	6	16-21	28	20
Lipid	0,1	0,2-25	67	3
Karbohydrat		<0,5		1
Aske	0,4	1,2-1,5	105	1
Vann	28	66-81	96	75

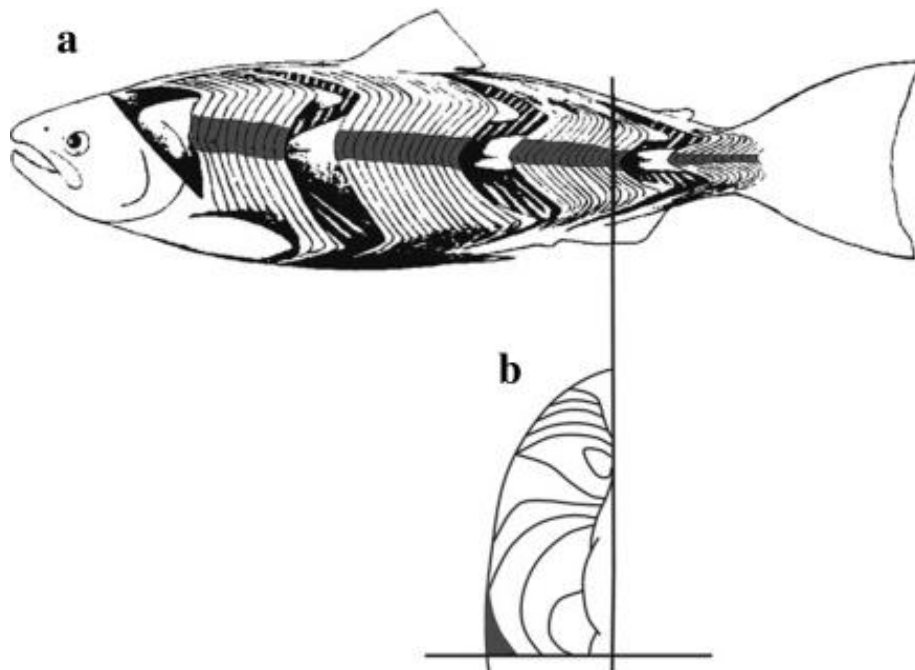
2.3 Muskelanatomi

I fiskemuskel ligger muskelceller, kalt myotomer, parallelt og holdes sammen av bindevev, kalt myosepter (myocomata), som er ankret til skjellettet og skinnet. Den funksjonelle enheten i muskelcellen består av sarkoplasma som inneholder kjerner, glykogen, mitokondria etc, og opptil 1000 myofibriller. Cellene har en yttermembran, kalt sarkolemma, som er en type bindevev. Myofibrillene består av sammentrekbare proteiner, slik som aktin og myosin, som blir beskrevet senere (FAO 1988). En skjematisk oversikt over muskelfibrene er gitt i figur 2.3.1 nedenfor.



Figur 2.3.1: Skjematisk oversikt over muskelfiber. Muskelfiberen består av flere myofibriller og omsluttet av sarkoplasma retikulum. Under kontraksjon vil I båndet (I band) trekke seg sammen og blir kortere, slik at A båndet og Z disken kommer tettere (Nelson et al. 2008)

Hoveddelen av vevet i fiskemuskel er lyst, avhengig av arten, men en del av muskelen er mørk hos en del arter. Den mørke muskelen ligger langs siden på fisken under skinnet, se figur 2.3.2. Hos fiskearter som er veldig aktive, vil andel mørk muskel være større enn hos fiskearter som er mindre aktive. Kjemiske bestanddeler og oppbygning er ganske forskjellig mellom mørk og lys muskel, som for eksempel er det et mye høyere innhold av lipider og myoglobin i den mørke muskelen (FAO 1988).



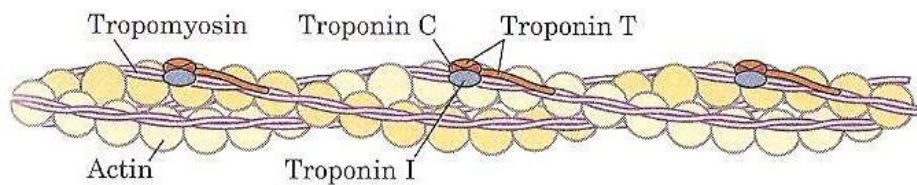
Figur 2.3.2: a) Myotomer og myosepter på venstre side av en kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*). Myotomer har blitt fjernet på fire steder for å vise den komplekse konfigurasjonen til de laterale musklene. De grå områdene markerer det mørke muskelvevet. b) Et tverrsnitt av øvre kvadrat av halepartiet til lasken. De mørke muskelfibrene ligger i det grå feltet langs utsiden. Linjene som er tegnet på viser hvor myoseptene binder sammen myotomene (Videler 2011).

2.4 Muskelproteiner

I fiskemuskelen spiller proteinene en viktig rolle. Blant annet er det proteiner som får muskelen til å trekke seg sammen og slappe av.

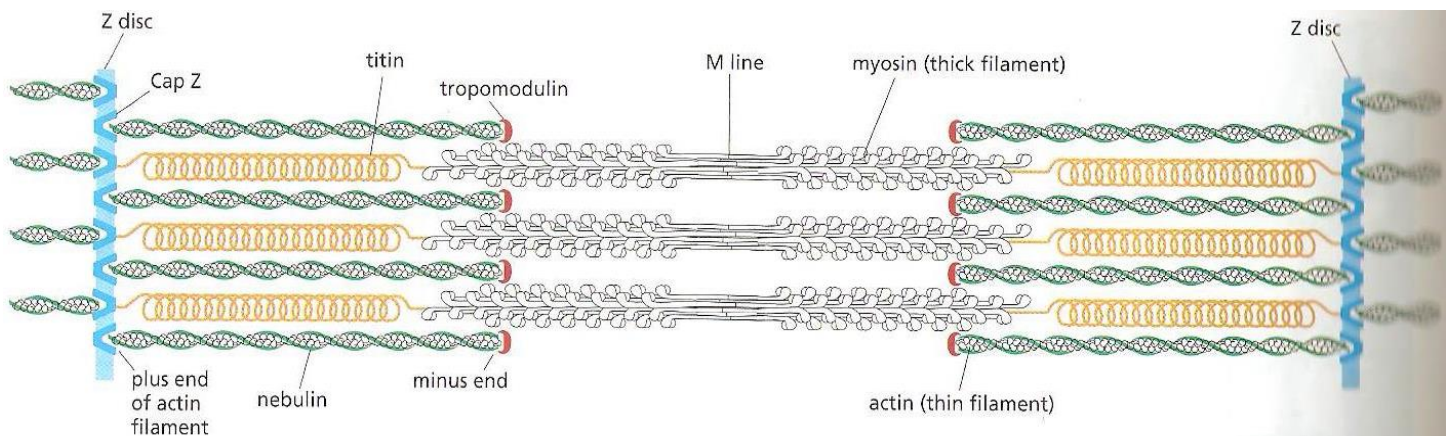
Proteinene i fiskemuskelen kan deles inn i tre grupper: myofibrillproteiner, sarkoplasmproteiner og bindevevsproteiner. Strukturen til proteinene kan endres på ved å endre miljøet. Høyere saltkonsentrasjon eller varme kan føre til denaturering (FAO 1988).

Myofibrillproteiner består i hovedsak av aktin, myosin, tropomyosin og aktomyosin, se figur 2.4.1. Gruppen utgjør 70-80% av det totale proteininnholdet og er løselige i nøytrale saltløsninger med høy ionestyrke ($>0,5M$). Proteinenes oppgave er å bevege musklene. Det isoelektriske punktet (pI) ligger på pH 4,5-5,5, det er også ved denne pH at proteinene har lavest løselighet (FAO 1988).



Figur 2.4.1: Skjematisk oversikt over reguleringen i muskelen ved en muskelkontraksjon. Troponin og tropomyosin er bundet til F-aktin i det tynne filamentet (Nelson et al. 2008).

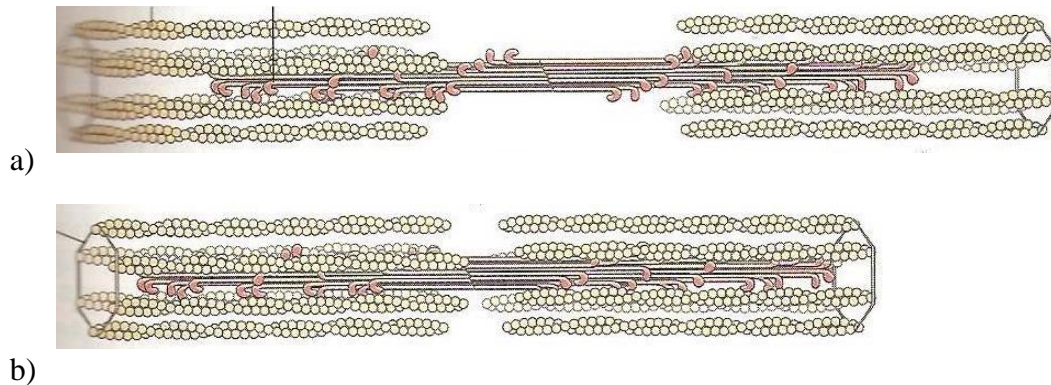
Myofibrillene er sylinderformet og har en diameter på 1-2 μm . Den består av en lang kjede av repeterende, små kontraktile enheter som kalles sarkomerer. Hver sarkomer dannes av tynne og tykke filamenter som ligger parallelt og overlapper hverandre. De tynne filamentene består av aktin og regulatoriske proteiner, og er bundet til den positive delen av en Z disk (som består av α -aktinin og CapZ) på hver side av sarkomerer. Den negative enden av aktin filamentet strekker seg til midten av sarkomerer og overlapper med de tykke filamentene, myosin. Z disken dekker filamentene for å unngå depolymerisering. Lengden for de tynne filamentene bestemmes av et protein, kalt nebulin, som består av en lang, repeterende kjede. Nebulin går fra Z disk til den negative enden av hvert tynne filament. Den negative enden av filamentet blir stabilisert av tropomodulin (Alberts et al. 2008), se figur 2.4.2 for en



skjematisk oversikt.

Figur 2.4.2: Skjematisk oversikt over de ulike proteinene i sarkomerer (Alberts et al. 2008).

Under muskelkontrasjon blir sarkomeren kortere ved at myosin filamentene glir over aktin filamentene, uten at filamentene endrer lengde, se figur 2.4.3. For at muskelen skal komme seg etter eventuelle stressituasjoner, har de tykke filamentene et protein som heter titin. Titin gjør at de tykke filamentene holder seg på plass i midten av sarkomeren (Alberts et al. 2008).



Figur 2.4.3: a) En muskel i avslappet tilstand. De røde trådene er de tykke filamentene (myosin), mens de gule sirklene er de tynne filamentene (aktin) og sirkelen i hver ende er Z disken. b) Figuren viser hva som skjer ved en muskelkontraksjon. De tynne og de tykke filamentene «glir» mot hverandre og blir trukket tetter sammen.

Muskelkontraksjon starter med at nerveimpulsene sender ut Ca^{2+} fra sarkoplasma retikulum til myofibrillene. Når konsentrasjonene av Ca^{2+} øker ved den aktive enzymenden på myosinfilamentet, vil enzymet, ATP-ase, aktiveres. ATP-asen splitter ATP, som befinner seg mellom aktin og myosinfilamentene, og omdannes til energi. Det meste av energien brukes til å få aktinfilamentet til å bevege seg mellom myosinfilamentet slik at muskelfibrene trekker seg sammen. Ved å reversere reaksjonene vil muskelen være i avslappet tilstand (FAO 1988).

Energikilden til ATP genereringen i den lyse fiskemuskel er glykogen, mens i den mørke muskelen brukes også lipider. Siden den mørke muskelen også inneholder store mengder mitokondria, kan CO_2 og H_2O metaboliseres aerobisk i muskelen. I den lyse muskelen foregår anaerobisk metabolisme som danner melkesyre som må transporteres videre til leveren. På grunn av forskjellen i den lyse og mørke muskelen, er den lyse muskelen laget for sterke og korte muskelbevegelser, mens den mørke muskelen er laget for sammenhengende, men ikke så sterke muskelbevegelser (FAO 1988).

Regulatoriske proteiner, som tropomyosin og troponin kompleks, er viktige under muskelsammentrekning og avslapning, og er bundet til aktinfilamentene. Når muskelen er

avslappet, vil tropomyosin dekke over bindesidene på myosin for å hindre interaksjoner mellom myosin og aktin. Når muskelen trekkes sammen, vil Ca^{2+} bindes til troponinkomplekset slik at tropomyosin endrer posisjon og myosin og aktin kan reagere med hverandre (Reece et al. 2011). Tropomyosin er formet som en stav og har en molvekt på 70 kDa. Molekylet består av to like kjeder som har α -helix struktur. Troponin består av tre globulære enheter som til sammen har en molvekt på 70 kDa. De tre globulære enheten kalles troponin C (binder Ca^{2+} -ioner), troponin T (bindes til tropomyosin) og troponin I (bindes til aktin samtidig som det inhiberer myosinets ATPase-aktivitet) (Rustad 2005).

Sarkoplasmaproteiner består av myoalbumin, globulin og enzymer. Proteinene utgjør 25-30% av det totale proteininnholdet og er løselige i vann eller nøytrale saltløsninger med lav ionestyrke ($<0,15\text{M}$). Hoveddelen av proteinene i denne gruppen er enzymer som tar del i metabolismen i cellene, som ved anaerobisk energikonversjon av glykogen til ATP. En viktig egenskap proteinene har er at fraksjonene kan endre seg dersom organeller blir ødelagt. Dette kan skje under frysing av fisken. Sarkoplasmaproteiner kan brukes for å bestemme forskjeller mellom ulike fiskearter, da alle artene har egne mønstre ved separering ved hjelp av isoelektrisk fokuseringsmetode (FAO 1988).

Bindevev- og stromale proteiner, i hovedsak kollagen, utgjør ca. 3% i beinfisk og 10% i bruskfisk av det totale proteininnholdet og er uløselige i nøytrale saltløsninger. Mengden kollagen varierer mellom ulike arter noe som kan tyde på at kollagen reflekterer hvor mye og hvordan fiskene svømmer (FAO 1988).

Ulike sarkomere proteiner er beskrevet i tabell 2.4.4 som er vist på neste side.

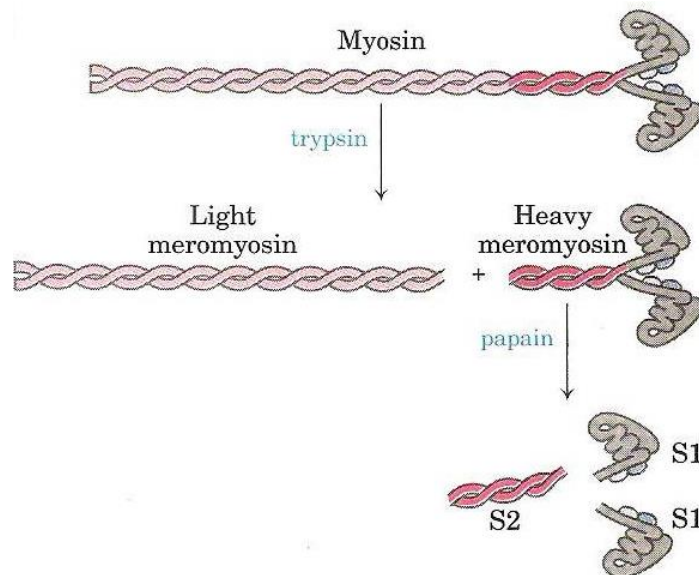
Tabell 2.4.4: Molekylvekten til ulike sarkomere proteiner (Fennema 1996)

	Muskel type	Antall aminosyrer	Molekylvekt
<u>Tynn filament</u>			
G- aktin	Kanin	374	42000
β - aktinin			
BI	Kylling		35000
BII			31000
Tropomyosin			
α -tropomyosin	Kylling	284	33000
β -tropomyosin	Kylling	284	36000
Troponin			
C	Kylling		18000
I	Kanin	179	20900
T	Kylling	274	30500
<u>Tykk filament</u>			
Myosin			
Tung kjede	Kylling	1938	220000
Alkali lett kjede			16000-22000
DTNB lett kjede			18000
C-Protein	Mennesket	1142	128000
H-protein	Kanin		69000
X-Protein	Kanin		152000
<u>Sarkomer struktur</u>			
α - aktinin	Kanin		100000
Desmin			55000
Nebulin	Kanin		700000-900000
Titin	Kanin		1000000
Myomesin			170000
I-Protein	Kylling		50000

2.4.1 Myosin og aktin

En muskelkontraksjon skjer ved at aktin- og myosinfilamentene glir over hverandre. Myosin og aktin utgjør til sammen 80% av det totale proteininnholdet i en fiskemuskel (Nelson et al. 2008).

Myosin har en molekylvekt på 540 000 Da og består av 6 enheter: 2 tunge kjeder (molekylvekt på 220 000 Da hver), og fire lette kjeder (molekylvekt på 20 000 Da hver). Den lette kjeden binder seg til α -helix regionen av tungkjeden. Myosin er formet i en α -helix med en venstrehåndsskru (Nelson et al. 2008). Den tunge kjeden i myosin består av et hode og en hale, se figur 2.4.1.1 nedenfor. Hale regionen består av to tunge kjeder i en α -helix. Toppen av hode inneholder aktinbindingssete, ATPase sete, alkali lettjedesete og DTNB lettjedesete. Hode er 16,5 nm langt, 6,5 nm bredt og 4,0 nm tykt. Haleregionen til myosinets tunge kjede er ansvarlig for bindingen til de tykke filamentene (Fennema 1996).



Figur 2.4.1.1: Oppbygningen til myosin som viser lett kjede, tung kjede og hode (S1) (Nelson et al. 2008).

Aktin utgjør ca. 20% av myofibrille proteinene i muskelen. Aktin er bundet fastere til strukturen i muskel enn myosin. Formen til aktin kan beskrives som to peanøtter med lik størrelse og som ligger side om side. Aktin monomerene, kalt globulært aktin (G-aktin), danner en dobbel helixstruktur kalt fiber aktin (F-aktin). Disse utgjør hoveddelen av det tynne filamentet. G-aktin består av 374-375 aminosyrer og har en molekylvekt på 42000-48000 Da.

Det er stabilt i vann og kan også forekomme som en dimer. G-aktin binder veldig godt til ATP, og i nærvær av magnesium vil polymerisering skje spontant for å danne F-aktin med konkurrerende hydrolyse av binding til ATP for å danne ADP og uorganisk fosfat. G-aktin polymeriserer også når nøytrale salter er tilgjengelig med en konsentrasjon på 0,15M.

Filamentet av F-aktin reagerer med hodet til myosin (Fennema 1996).

Aktomyosin er myosin og aktin som er blandet in vitro. Dette komplekset kan bli dissosiert ved tilsetning av ATP. Aktomyosin og myosin finnes i muskelestrakter (Fennema 1996).

2.4.2 Løseligheten til proteiner

Løseligheten til muskelproteiner er viktige for å kunne lage et godt fiskeprodukt. Løseligheten påvirker vannbindingsevnen og evnen til å danne geler, som er viktig for produktets tekstur.

Løseligheten til proteinene i fiskemuskelen påvirkes av hydrofobe og ioniske interaksjoner.

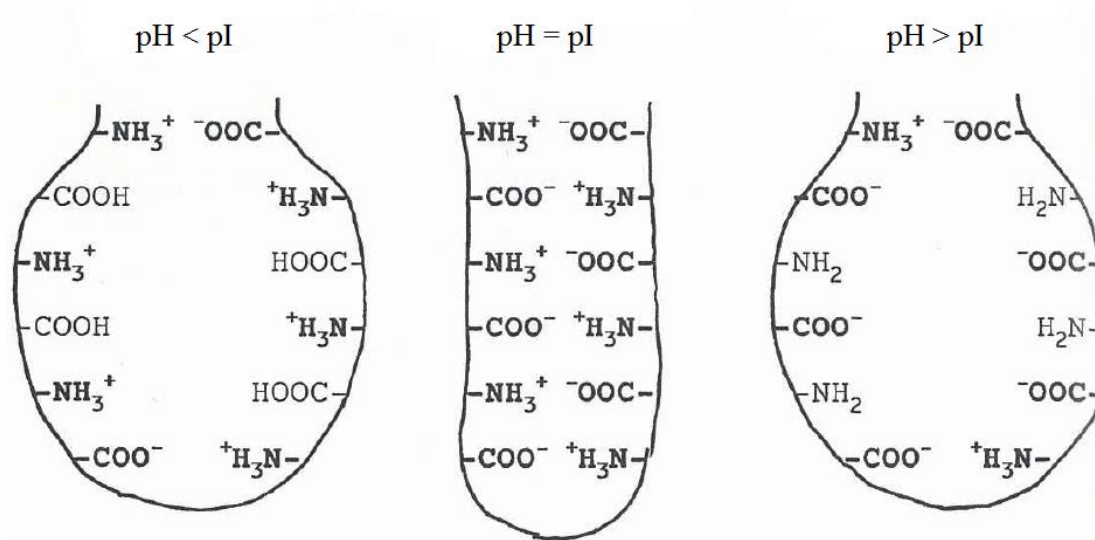
Hydrofobe interaksjoner danner protein- protein interaksjoner som fører til lav løselighet.

Mens ioniske interaksjoner danner protein-vann interaksjoner og gir da en økt løselighet.

Løseligheten til proteinene har blitt beskrevet tidligere under avsnitt 2.4 om

myofibrillproteiner, sarkoplasmproteiner og bindevev- og stromale proteiner. Løseligheten påvirkes av ulike faktorer som pH, ionestyrke, temperatur og nærværet av organiske løsninger (Fennema 1996).

pH: Ved pH under eller over isoelektrisk pH, har proteinet henholdsvis positiv eller negativ nettoladning. Hvis løseligheten plottes som funksjon av pH, vil de fleste proteinene i mat gi en U- formet kurve. Minimumspunktet er ved isoelektrisk pH til proteinet. Forandringen i løseligheten ved økende temperatur skjer på grunn av at proteinet får større hydrofob overflate ved utfolding (Fennema 1996).



Figur 2.4.2.1: Ved pH lavere enn pI vil proteinet ha netto positiv ladning på grunn av ioniserte aminogruupper og udissoisierte karboksylgrupper. Når pH=pI er nettoladningen 0 og ved pH>pI er nettoladningen negativ da alle karboksylgruppene er ionisert og aminogruppene er nøytrale (Lynum 1994).

I figur 2.4.2.1 ovenfor viser hva som skjer med proteinet ved ulike pH i forhold til pI. Ved pH ulik pI, vil proteinet svulle på grunn av positiv eller negativ nettoladning forårsaket av hydrogenioner. Svullet nettverk gir bedre VBE på grunn av ladningsfrastøt. Løseligheten til proteinet vil også øke ved pH ulik pI.

Temperatur: Ved konstant pH og ionestyrke, er løseligheten til proteinet økende ved økende temperatur mellom 0° og 40°C. Unntaket er meget hydrofobiske proteiner som β-kasein. Ved temperaturer over 40°C vil økning i termisk kinetisk energi forårsake at proteiner folder seg ut, eksponeres for upolare grupper, aggregerer og løseligheten avtar (Fennema 1996).

Salt: Ved lav ionestyrke (<0,5), får proteinene en nøytral ladning på overflaten. Dette kan påvirke løseligheten på to måter: Proteiner med upolare deler vil få en lavere løselighet enn proteiner uten upolare deler. Redusert løselighet skyldes økning i hydrofobe interaksjoner, som øker protein- proteinvekselvirkningen, mens en økning i løselighet skyldes ionevekselvirkning som øker protein-vannvekselvirkning. Ved ionestyrke >1,0, har saltet en ionespesifikk effekt på proteinløseligheten. Når saltkonsentrasjonen nærmer seg 1, ved bruk av likning 2.4.2.2, vil salter med sulfat og fluorid minke løseligheten, men tiocyanat og perklorat salter øker løseligheten (Fennema 1996).

$$\mu = 0,5\sum C_i Z_i^2 \quad (2.4.2.2)$$

hvor μ er saltkonsentrasjonen, C_i er ionekonsentrasjonen og Z er valensen (Fennema 1996).

Ved konstant saltkonsentrasjon, vil rangeringen av løselighet, fra lav til høy løselighet, følge Hofmeisterrekken for anioner: $\text{SO}_4^{2-} < \text{F}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{ClO}_4^- < \text{SCN}^-$ og for kationer: $\text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$. Generelt følger proteinløseligheten likning 2.4.3.3, nedenfor (Fennema 1996).

$$\text{Log}(S/S_0) = \beta - K_S C_S \quad (2.4.2.3)$$

hvor S og S_0 er løseligheten til proteinet i salt løsning og vann, K_S er minking i løseligheten, C_S er molarkonsentrasjonen til salt, β er en konstant. K_S er positiv for salt som gir minking i løselighet og negativ for salt som gir økning i løseligheten (Fennema 1996).

2.4.3 Proteindenaturering

Løseligheten til et protein påvirkes hvis proteinet endrer struktur. Endringer av proteinets struktur kan forekomme hvis det blir endringer i miljøet hvor proteiner befinner seg. Endringer i sekundær-, tertiær- eller kvartinærstrukturen til proteinet, uten at det brytes ned eller kuttes, kalles denaturering. Miljøet kan endres ved pH, temperatur, ionestyrke etc. Ved endringer i strukturen til proteinet, kan det miste noen av sine egenskaper. I mat kan strukturendringer føre til at løselighetsegenskapen endres (Fennema 1996).

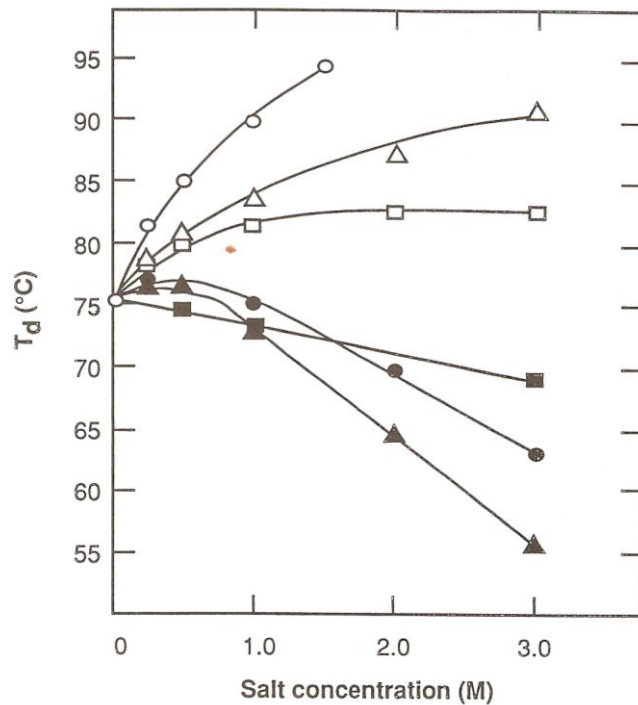
Ulike faktorer som kan forårsake denaturering hos proteiner:

Temperatur: Når et protein gradvis blir varmet opp over kritisk temperatur, vil noen av proteinene denatureres. Smeltepunktet eller denatureringstemperaturen er satt til det punktet hvor forholdet mellom denaturerte proteiner og proteiner med opprinnelig struktur er lik 1. Denaturering skjer ved at ikke-kovalente interaksjoner blir svekket. Ved høye temperaturer vil hydrogenbindinger, elektrostatiske og Van der Waals interaksjoner bli ustabile, men de vil være stabile ved lave temperaturer. I motsetning vil hydrofobe interaksjoner bli mer stabile ved høye temperaturer da de er endoterme, men etter hvert vil også hydrofobe interaksjoner bli ustabile. Over en bestemt temperatur vil nedbrytningen av vannstrukturen gjøre hydrofobe interaksjoner ustabile. Styrken til hydrofobe interaksjoner når et maksimum rundt ca. 60-70°C (Fennema 1996).

Ved høyere temperaturer vil også den kinetiske energien til polypeptidkjeden føre til utfolding. Dette vil påvirke konformasjonsentropien, $-\Delta S_{\text{Konf}}$. Denatureringstemperaturen, T_d , til proteinet er ved den temperaturen som gir fri energi lik 0. For eksempel har myoglobin denatureringstemperatur ved 79°C (Fennema 1996).

pH: Proteiner er mest stabile ved det isoelektriske punktet enn ved noen annen pH. Ved nøytral pH har de fleste proteinene negativ ladning og noen få har positiv ladning. Blir pH verdiene veldig høye eller lave, vil nettoladningen bli høy og føre til svelling og utfolding av proteinet. Utfolding vil forekomme mer ved alkalisk pH, enn ved veldig lav pH. Ved alkalisk pH vil karboksyl-, fenol-, og sulfhydrylgruppene prøve å utfolde seg i vandig miljø. pH-indusert denaturering er ofte reversible, men kan i noen sammenhenger være irreversible (Fennema 1996).

Salt: Salt kan påvirke proteinstabiliteten på to måter. Ved lav saltkonsentrasjon vil ioner reagere med proteiner ved ikke-spesifikke elektrostatiske interaksjoner. Den elektrostatiske nøytraliseringen av proteinladningen vil vanligvis stabilisere proteinstrukturen. En ionestyrke $<0,2\text{M}$ vil gi en komplett nøytral ladning. Ved høyere ionestyrker ($>1\text{M}$) har salt en ionespesifikk effekt som påvirker stabiliteten til proteinstrukturen. Proteinstrukturen påvirkes mer av anioner enn kationer. For eksempel ved lik ionestyrke, vil Na_2SO_4 og NaCl øke T_d , mens NaSCN og NaClO_4 minke T_d . Graden av hvor stor påvirkning saltet har på proteinstrukturen er gitt ved Hofmeisterserien: $\text{F}^- < \text{SO}_4^{2-} < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{ClO}_4^- < \text{SCN}^- < \text{Cl}_3\text{CCOO}^-$. Fluorid-, klorid- og sulfatsalter stabiliserer proteinstrukturen, mens salter av andre anioner destabiliserer proteinstrukturen. Salter som stabiliserer proteiner, forbedrer hydreringen av proteiner og styrker hydrogenbindinger med vann. Mens salt som destabiliserer proteiner reduserer hydreringen av proteiner, se figur 2.4.3.1.



Figur 2.4.3.1: Effekten av ulike natriumsalter ved denatureringstemperaturen, T_d for β -laktoglobulin ved pH=7. Δ , NaCl; \square , NaBr; \bullet , NaClO₄; \blacktriangle , NaSCN; \blacksquare , urea. (Fennema 1996)

2.4.4 Geldannelse

Løseligheten til proteiner kan også påvirkes ved dannelse av geler. En gel er en fase mellom fastfase og væskefase. Den blir dannet av kryssbindinger mellom polymerer ved kovalente eller ikke-kovalente bindinger som kan binde vann og andre molekyler med lav molekylvekt. De fleste proteingelene i mat dannes ved oppvarming av proteinløsninger. Under oppvarming dannes det først en progel ved denaturering. Progelen er som oftest viskøs og en liten grad av proteinpolymerisering har funnet sted. Ved dannelse av progel, utfoldes proteinene og utsettes for flere funksjonelle grupper, som hydrogenbindinger og hydrofobe grupper. Under utfolding kan det dannes proteinnettverk. Denne prosessen er irreversibel. Nettverket dannes i hovedsak ved hjelp av hydrogenbindinger, og elektrostatiske og hydrofobe interaksjoner (Fennema 1996).

Dannelse av gel vil bli forklart under flere punkter senere.

2.4.5 Vannbindingsevne

Et av de viktigste aspektene under produksjon av tilberedte produkter, er og kunne oppnå høy stabilitet under tilberedning. Dette innebærer å forhindre vann og fett fra å trekkes ut av produktet under oppvarming (Ofstad et al. 1995). For å kunne beholde vannet i fisken må vannbindingsevnen (VBE) være god. Det er vist at VBE er relatert til endringen i løseligheten av myofibrillene og sarkoplasmaproteinene. Totalt utgjør lipidene og vannet ca. 80 % av fiskemuskel. Ca. 90 % av den totale mengden vann, er fritt vann i muskelen og som bindes ved hjelp av kapillære og overflatekrefter intracellulært (Ofstad et al. 1993). Det er fritt vann som er interessant å måle ved VBE, da fritt vann kan migrere ut av muskelen. Flere faktorer er med på å kunne immobilisere vannet, som for eksempel pH, temperatur, ionestyrke og komponenter som kan bindes til proteinene. I litteratur fra Varmbo (2001) ble det beskrevet at ved oppvarming av laksemuskel, vil VBE reduseres betydelig når temperaturen passerer 30°C. Mellom 45° og 50° C har det blitt observert krymping i muskelcellene ved at myofibrillene trekker seg mer sammen når myosin denatureres. Kapillærkreftene som holder vannet på plass, svekkes slik at vannet lettere kan sentrifugeres ut. Mellom 60° og 70° C har det blitt observert en liten økning i VBE ved tidligere forsøk. Det kan skyldes at sarkoplasma proteiner blandes med gelatin slik at kapillærene som slipper ut vannet tettes igjen (Varmbo et al 2001). Ved å justere ned pH i fiskemuskel kan denne egenskapen forsvinne. Dette er vist i et forsøk av Varmbo et al. (2001). Det ble da observert at det ikke ble noen økning i VBE etter at den først hadde minket (Varmbo et al. 2001).

Ved tilsetning av salt, blir myofibrillene depolymerisert og vil danne gel ved oppvarming. Ionestyrken, pH og varmebehandlingen vil påvirke strukturen til aktomyosin og myosin geler som igjen påvirker VBE. Geler med store porer og kapillærer holder dårligere på vannet, enn geler med fine, kontinuerlige porer. I tillegg har fet fisk dårligere gel- egenskaper enn de fleste hvite fiskene (Ofstad et al. 1995).

VBE har et minimum ved pH ca 5 som er det isoelektriske punktet til myofibrillproteinene. Når $pH=pI$ dannes det et tett proteinnettverk på grunn av liten frastøtning mellom peptidkjedene. Tilsetning av salt til muskelvev fører til øket VBE (for $pH>pI$). Årsaken til dette er at Cl^- bindes til de positive gruppene i proteinene mens Na^+ bare bindes i liten grad til de negative gruppene. Ved tilsetning av salt øker den negative frastøtningen, proteinnettverket blir åpnere og VBE øker (Rustad 2005).

En enkel metode for å beregne vannbindingsevnen, er lavhastighetscentrifugering.

2.4.6 Proteinoksidasjon

Det har vært mye fokus på lipidoksidasjon, men den senere tid har også betydningen av proteinoksidasjon for kvalitet på mat blitt studert. Oksidasjon av proteiner fører til tap av essensielle aminosyrer, endring av farge, endring i biologisk aktivitet, fordøyelse og funksjonelle egenskaper hos proteinet. Det finnes ulike metoder for å bestemme mengden oksiderte proteiner, som måle økning i karbonylgrupper, måle tap av sulfhydrylgrupper (SH grupper) og dannelse av dityrosin.

Sulfhydrylgrupper og disulfidbindinger er viktige for å opprettholde strukturen og funksjonen til proteiner og spiller en viktig rolle for de funksjonelle egenskapene i næringsmidlene (Opstvedt et al. 1984). Under oppvarming av fisk, vil protein- protein interaksjoner forekomme slik at den sekundære og tertiære strukturen til proteinene endres. Noen av sulfhydrylgruppene i aktomyosin sitter langt inni molekylet. Disulfidbindinger kan dannes både innen en peptidkjede og mellom ulike peptidkjeder i proteiner som har flere peptider. Det vil dannes flere disulfidbindinger ettersom flere sulfhydrylgrupper vil komme frem. En økning i sulfhydrylgrupper kan tyde på at proteiner utfoldes og en reduksjon i totalt mengde sulfhydrylgrupper tyder på at flere disulfidbindinger dannes (Ko et al. 2006).

Disulfid kryssbindinger i proteiner kan oppstå fra oksidering av sulfhydrylgrupper og sulfhydryl- disulfid utvekslinger. Dette har blitt demonstrert i tidligere forsøk (Opstvedt et al. 1984). Det ble funnet at oppvarming som kan påvirke cystein/cystein restene, kan føre til dårligere utnytting av proteiner i dyr. Det har blitt antatt at disulfid kryssbindinger gjør det vanskeligere å angripe proteolytiske enzymer. Dette kan føre til nedgang i proteindegradering (Opstvedt et al. 1984).

Mengden oksiderte proteiner kan måles ved ulike metoder. Bestemmelse av mengden karbonyl grupper og SH grupper er de mest vanlige metodene. Ved proteinoksidasjon, vil mengden SH grupper minke, mens mengden karbonyl grupper øker. Proteinkarbonyl er veldig reaktive og reagerer raskt med aminogrupper slik at det dannes kryssbindinger mellom proteiner. Dette resulterer i polymerisering og aggregering (Kim 2009).

2.5 Lipider

En av de største utfordringene ved marine produkter, er lipidoksidasjon. Siden marine lipider kan ha opptil flere umettede fettsyrer oksideres de raskere enn kjøttprodukter. For å kunne

finne metoder for å redusere harskningsprosessen må man først ha kunnskap om lipidene og hvordan de blir oksidert.

Lipider består av en stor gruppe komponenter som er løselige i organiske løsninger, men bare delvis løselig i vann. Glyserolester, til daglig kalt fett og olje, utgjør 99% av lipidene i dyr og planter. Lipider i mat har unike fysikalske og kjemiske egenskaper. Smeltepunktet, evnen til å krystallisere og muligheten til å binde seg med ikke-lipid molekyler, er viktige funksjonelle egenskaper ved lipidene (Fennema 1996). Lipidene inneholder opptil 40% lange kjeder fettsyrer, med 14-22 karbonatomer, som er umettede. Flere fettsyrer har 5 eller 6 dobbeltbindinger og mange er essensielle for å unngå for eksempel hudsykdommer (FAO 1988).

En stor forskjell mellom fet og mager fisk, er at hos mager fisk lagres lipidene bare i leveren, mens hos fet fisk vil lipidene lagres i fettceller og andre steder i kroppen. I tillegg vil lipidinnholdet i muskelen holde seg stabilt lavt hos mager fisk, mens det kan ha stor variasjon hos fetere fiskearter. Hos laks ligger lipidinnholdet mellom 0,3-14% (FAO1988). Fordeling av lipidinnholdet i en Atlanterhavslaks er vist i tabell 2.5.1.

Tabell 2.5.1: Oversikt over lipidinnholdet i ulike deler av Atlanterhavslaks (Aursand et al. 1993).

Vev	Lipid innhold (%vvekt)
Skinn	18,1±3,3
Mageregion (belly flap)	28,1±3,0
Mørk muskel	27,2±6,7
Lys muskel	9,6±1,2
Ryggrad	22,6±1,8
Hode	19,3±0,4
Dorsal fett region	38,4±7,6
Lever	4,9±0,8
Gonade	2,1±1,2
Visceral vev	26,6±4,8

Fettcellene som fyller lipidlagrene i fete fisker, ligger vanligvis under vevet, i buken, og i musklene som beveger finnene og hale. Avhengig av mengde flerumettede fettsyrer, er fiskefett som oftest i flytende form (FAO 1988).

Det finnes ulike typer lipider: Fettsyrer (umettede og mettede), acylglyseroler og fosfolipider (Fennema 1996). I fisk deles lipidene ofte inn i bare to grupper: fosfolipider og triglyseroler (triglyserid) (FAO1988). *Fettsyrer* er alifatisk monokarboksyler som kan frigjøres ved hydrolyse fra naturlig fett. Mettete fettsyrer er fettsyrer uten dobbeltbindinger, feks. $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (smørsyre). Umettete fettsyrer er fettsyrer med dobbeltbindinger. Navnsetting av umettete fettsyrer blir gitt etter hvor dobbeltbindingene befinner seg. Hvis det er en dobbeltbinding mellom karbonatom 9 og 10 regnet fra metylenden, settes tallet 9 foran navnet på fettsyren (Fennema 1996).

Asylglyseroler er nøytralt fett som består av glyserol med en, to eller tre fettsyrer og kalles henholdsvis, monoacylglyserol, diacylglyserol og triacylglyserol (Fennema 1996).

Triacylglyseroler er lipider som brukes til lagring av energi, spesielt i fettceller med fosfolipidmembran. Fosfolipidene utgjør mesteparten av lipidene. Fettcellene, hvor lipidene blir lagret, befinner seg rundt muskelstrukturen. Konsentrasjonen av fettceller er høyest i nærheten av myoseptene og i regionene mellom lys og mørk muskel. I den mørke muskelen finnes det triglyserider, da muskelen kan metabolisere lipider direkte som energi (FAO 1988). I laks er det også triacylglyseroler i den lyse muskelen.

Den siste typen lipider er *fosfolipider*. Fosfolipidene utgjør strukturen i cellemembranen og kalles ofte strukturlipider (FAO 1988). Alle lipider som inneholder fosforsyre som mono- eller diester kan defineres som fosfolipid. Glycerofosforsyrer som inneholder O-acyl, O-alkyl eller O-alkenyl grupper, kalles glycerofosfolipider (Fennema 1996).

Lipidene kan klassifiseres i ulike grupper basert på strukturelle komponenter, som vist i tabell 2.5.2 under (Fennema 1996).

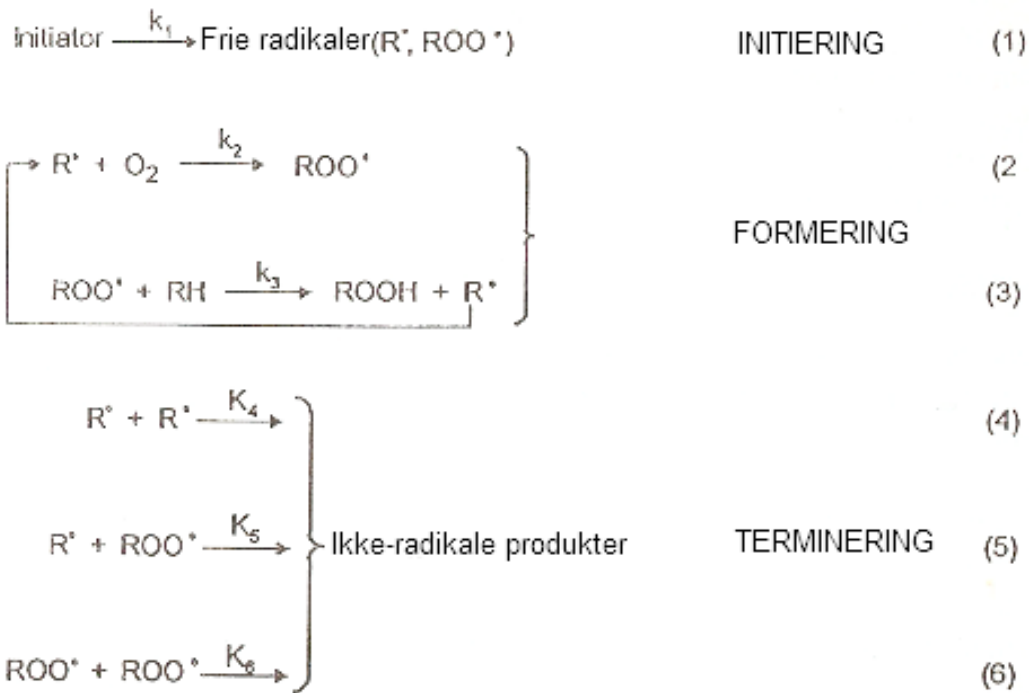
Tabell 2.5.2: Klassifisering av lipider (fritt etter Fennema 1996)

Hovedgruppe	Undergruppe	Beskrivelse
Enkle lipider	Acylglyserol	Glyserol+Fett yrer
	Voks	Lang-kjede alkohol+lang kjede fettsyre
Komponent lipider	Fosfoacylglyserol	Glyserol+fettsyre+fosfat+annen nitrogen holdig gruppe.
	Sphingomyelins	Sphingosin+fettsyre+fosfat+cholin
	Cerebrosider	Sphingosin+fettsyre+enkel sukker
	Gangliosider	Sphingosin+fettsyre+kompleks karbohydrat med sialic syre
Deriverte lipider	Komponenter som kan defineres som lipider, men som verken er enkle eller komponent lipider	For eksempel karotenoider, steroider, fett løselige vitaminer

2.5.1 Lipidoksidasjon

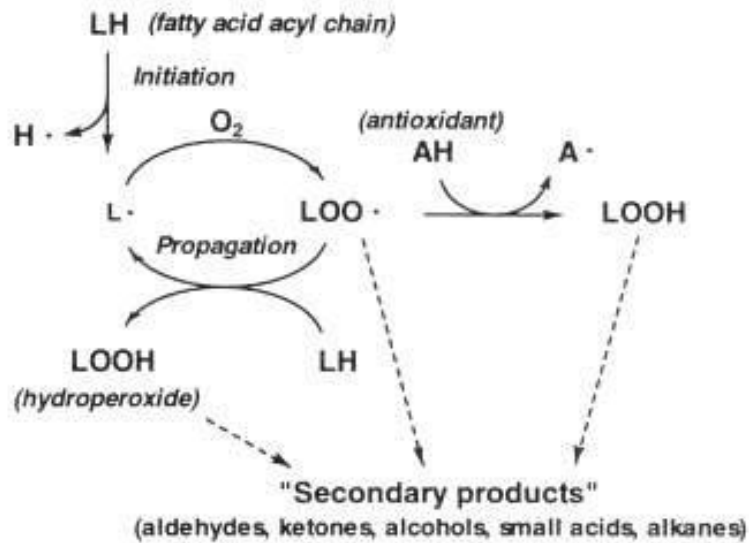
Oksidasjon av lipider er en av de største årsakene til at maten blir dårlig. Det er en stor økonomisk utfordring for matindustrien da lipidoksidasjon fører til dårlig lukt og smak på matproduktene. Spesielt marine lipider oksideres raskt blant annet på grunn av at de har flere dobbeltbindinger som lettere oksideres. Mengden oksiderte lipider kan beregnes ved ulike metoder. For primære og sekundære oksidasjonsprodukter kan PV (peroksidverdien), AV (ansidinverdien) og TBARS måles (Semb 2012).

Lipidoksidasjon starter gjennom to kjemiske prosesser: Autooksidasjon og fotosyntetisert oksidasjon. Ved en autooksidasjon, vil molekylær oksygen reagere ved hjelp av selv-katalytisk mekanisme. Autooksidasjon av fett skjer ved hjelp av frie radikaler. Reaksjonen er delt inn i tre deler: Initiering, formering og terminering. De ulike likningene er vist nedenfor i figur 2.5.1.1 (Fennema 1996).



Figur 2.5.1.1: Autooksidasjon av fett skjer over tre steg: Initiating, formering og terminering. (Fennema 1996).

Hydroperoksider (ROOH) er autooksidative primærprodukter av flerumettede fettsyrer (PUFA). De er også veldig ustabile molekyler som oksideres videre til sekundære reaksjonsprodukter. Hydroperoksider brytes ned over flere steg og hvert hydroperoksid kan danne mange ulike produkter, da de kan brytes ned på forskjellige måter. Første steg i nedbrytningen skjer ved oksygen-oksygen bindingen i hydroksidgruppen, hvor bindingen brytes og danner en alkoxyradikal og en hydroxyradikal. Deretter vil karbon- karbon bindingen kuttes på hver side av alkoxygruppen. Tilslutt vil det dannes sekundære oksidasjonsprodukter, se figur 2.5.1.2 nedenfor (Fennema 1996).



Figur 2.5.1.2: Oversikt over de tre ulike stegene i en lipidoksidasjon hvor det dannes sekundære oksidasjonsprodukter (FAO 1988).

Sekundære oksidasjonsprodukter, inkludert ketoner, aldehyder, fri fettsyrer og alkoholer etc., er med på å endre smak, lukt og tekstur i maten. Karbonylgrupper påvirker fargen gjennom Maillardreaksjon slik at maten får en brun farge. Aldehyder og radikale grupper endrer proteinene og dermed fysiske egenskapene til maten og fører til reduksjon i næringsinnholdet (Sohn 2011).

Hvor raskt lipidoksidasjon skjer, er avhengig av mange ulike faktorer:

fettsyresammensetningen, oksygeninnhold, temperatur, overflateareal, fuktighet osv. For fettsyrene vil syrer i *cis*- konformasjon oksideres raskere enn *trans* isomeren, og konjugerte dobbeltbindinger reagerer raskere enn ikke- konjugerte dobbeltbindinger. Autooksidasjon av mettede fettsyrer går veldig sakte ved romtemperatur, men går raskt ved høye temperaturer. Økende temperatur og overflateareal, vil ha økende effekt på oksidasjonsraten. Ved svært lav vannaktivitet og ved høy vannaktivitet ($0,1 > a_w > 0,55-0,85$), vil oksidasjonsraten være relativt høy (Sohn 2011).

2.6 Biokjemiske reaksjoner post-mortem

Endringer i VBE og proteinløseligheten kan forekomme allerede før og under slakting av fisken. Under slakting av fisk skjer en rekke biokjemiske og fysikalske endringer, blant annet muskelsammentrekninger. Endringene er viktige for kvaliteten til muskelvevet (Rustad 2005).

Første del av reaksjonene skjer i en tilstand kalt pre-rigor. I pre-rigor fasen vil aktiv glykolyse foregå i muskelen, og glykogen omdannes til melkesyre slik at pH reduseres. Hvor raskt pH reduseres varierer med fiskeart, fôring og hvordan slaktingen foregår. Både hastigheten for minkende pH og endelig pH er viktig for muskelens tekstur og VBE (Rustad 2005).

Etter pre-rigor inntreffer fisken rigor (inntreffer 1-7 timer etter død). I rigor blir fisken stiv på grunn av at ATP-innholdet bli lavt. Når glykogen omsettes anaerobt, blir det dannet langt mindre ATP pr mol glukose. Dette fører til at ATP-innholdet i muskel synker. Når ATP-innholdet er blitt tilstrekkelig lavt kan ikke muskelen lenger slappe av og den forblir låst i sammentrukket stilling (Rustad 2005).

I fasen etter rigor, postrigor, blir musklene gradvis mørere. En lang rigorfase gir lengere holdbarhet for fisken, og det er derfor viktig at fisken kjøles raskt ned til rundt 0°C. VBE like etter slakting til muskelvev er god, men under rigor når den et minimum på grunn av reduserende pH og tett nettverk. Når rigor oppløses, vil VBE stige igjen når myofibrillproteinenes tilgjengelighet for vann øker (Rustad 2005).

På grunn av post-mortem kan hovedkomponentene i myofibrillene eller bindevevet, og bindingene som stabiliserer strukturen mellom muskelkomponentene, degraderes.

Degraderingen kan føre til uønsket tekstur i fisk som gir lavt utbytte og dårlig kvalitet (Rustad 2005).

2.7 Konserveringsmetoder

For å hindre at fisken oksideres så raskt kan den konserveres ved hjelp av ulike metoder.

Noen av metodene er beskrevet nedenfor.

2.7.1 Røking

Røking og tørking av fisk har lenge vært brukt for å beholde kvaliteten og øke holdbarheten til fisken. I dag er saltet og røkt Atlanterhavslaks et populært produkt på grunn av produktets unike smak, farge og tekstur (Røra et al. 2004). I starten ble røking brukt for å tilføre nye

smaker og for å kunne oppbevare fisken i lengre perioder uten noen form for kjøling. Fisken kan oppbevares lengre på grunn av lav vannaktivitet, fysisk barriere med tørr fiskeoverflate og antimikrobielle/antioksidative egenskaper som kommer fra røyken fra veden. Under røkeprosessen kan ved eller spon brukes. Det finnes mange treslag som kan brukes, men all ved som brukes må være helt tørr og uten tilsetninger og mugg. Ulike treslag og bruk av spon vil gi forskjellige smaker. Bruken av spon vil gi mest smak og det brenner ved lavere temperaturer og varer gjerne lengre grunnet mangel på oksygen (Hall 2011).

Teksturen til røkt fisk er en viktig del av kvaliteten. Ulike faktorer som påvirker teksturen er alder, størrelse, fettinnhold, fordeling av muskelfett og mengde proteiner. Etter død og behandling av fisken vil nedbrytning av myofibriller og bindevev starte. Når rå fisk lagres i is, vil muskelkvaliteten svekkes. Dette skyldes endogene proteaser som starter hydrolyse av ulike proteiner i musklene (Hultmann 2003).

Røkeprosessen kan gjøres på flere måter. En metode er kaldrøking. Kaldrøking er en kombinasjon av salting, delvis dehydrering og røking som foregår mellom 20°- 30°C. Effekten av røkeprosessen, med vekt på kvalitet og holdbarhet, avhenger av råstoffet, type røking og varigheten av prosessen. Temperatur er en viktig parameter i prosessen og har blitt vist at temperaturen kan påvirke kvalitetsegenskapene signifikant i røkt laks. Ved å øke temperaturen ved kaldrøking, vil fargen endres, stabiliteten til karotenoid reduseres, teksturen blir hardere, men kapasiteten for å holde på væske ble ikke endret. I kaldrøkt laks endret proteinene seg ved en temperatur økning mellom 21,5°C og 29,9°C, slik at saltløselige myofibrillære proteiner ble vanskeligere å ekstrahere mens katepsin B-lignende og generell proteolytisk aktivitet forble uendret (Røra et al. 2004).

2.7.2 Salting

Salting av fisk er også en gammel konserveringsmetode. Ved salting vil vannet trekkes ut og saltkonsentrasjonen øker. Når saltkonsentrasjonen blir for høy vil celleveggen i mikroorganismer denatureres (SNL).

Salting kan brukes alene eller kombineres med tørking og røyking. Hvis saltet, fet fisk blir lagret over lengre tid blir den speket, mens svak salting kan føre til fermentering. Salting deles opp i to deler: Tørrsalting eller lakesalting. Ved tørrsalting legges fisk, enten hele eller som fileter avhengig av størrelsen, i tørt salt i overskudd. Lakesalting skjer ved at fisken legges i en saltlake med passende sammensetning og styrke. Saltlake kan også injiseres direkte i

fisken ved hjelp av sprøyte. Saltlaken inneholder noen ganger fosfat for å binde vannet i fisken (SNL).

I dette forsøket ble det brukt saltet og røkt laks for å studere oksidasjonen i lakseproduktet ved lagring over tid.

2.7.3 Varmebehandling av råstoff

Varmebehandling er en viktig prosedyre for å prosessere fisk og kjøtt. Det forventes færre mikrober, og bedre inhibering av mikrobiell vekst. Varmebehandling påvirker også farge, mørning, farge og produktstrukturen. Disse endringene skjer i hovedsak på grunn av denaturering og opphopning av proteiner (Pan et al. 2009).

Under oppvarming av fisk endres teksturen. Dette skyldes i hovedsak endringer i de myofibrillære proteinene, og i fet fisk vil også fettinnhold spille en stor rolle. Sammenlignet med kjøtt, er bindevevet i fisken svakere. Grunnen til at bindevevet er svakere i fisk enn i kjøtt, er at fisk inneholder mindre mengder kollagen og at kollagenet i fisk smelter ved lavere temperaturer. Andre forskjeller mellom kjøtt og fisk er konsentrasjonen av proteinaser i fiskemuskel. Flere forsøk som er gjort tyder på at alkaliske proteinaser i muskelen forårsaker degradering av teksturen som observeres rundt 50°- 70°C. Dannelsen av gel som skjer ved lave temperaturer av fisk ("suwari"), har blitt observert hos flere fiskearter. For å forbedre teksturegenskapene ved dannelse av fiskegel, kan oppvarmingen skje i to trinn (Autio et al. 1989).

Oppvarming ødelegger bindevevet slik at fisk faller lettere fra hverandre. Temperaturer over 45°C fører til denaturering av bindevevsproteiner. Denaturering av proteiner reduserer dimensjonen av myofibriller og kollagen, noe som fører til krymping i diameteren til muskelfibrene og lengden av sarkomeren. Krymping fører til at vannet føres ut av muskelen. Denaturering og væsketap gir endret tekstur, og væsken som slippes ut inneholder proteiner som kan koagulere på muskeloverflaten slik at det dannes en hinne. Sarkoplasma proteiner har ikke stor påvirkning på teksturen av fisken, men kan påvirke dannelse av gel i intakt muskel (Skipnes et al. 2011).

2.8 Laks

Laks har lenge fått mye oppmerksomhet på grunn av mengden omega-3 (n-3) fettsyre den inneholder. Disse fettsyrene har gunstig effekt på å forhindre hjertesykdommer og andre helseproblemer. En økende andel av laks kommer lakseoppdretter. Tidligere ble det rapportert at oppdrettslaks hadde et lavere innhold av omega-3 fettsyrene enn vill laks. Det har blitt vist at oppdrettslaks har høyere innhold av fett slik at totalt mengde n-3 fettsyrer per 100 gram er likt eller høyere i oppdrettslaksen enn i vill laks. Sammensetningen av fettsyrene avhenger mye av hva laksen spiser (Aursand et al. 1993).

Den røde fargen i laksen kommer ikke fra myoglobin, men fra røde karotenoider, astaxanthin. Hovedfunksjonen til dette pigmentet er ikke fastsatt, men det har blitt foreslått at det fungerer som en antioksidant. Oppbygningen av muskelen fungerer som er mottak for karotenoider som er viktig under gytingen hos laksen. Ved gyting utvikles det en kraftig rød farge under skinnen hos hannene, mens hos hunnene transporteres det karotenoider inn i eggene som hjelper til for utviklingen etter fertilisering. Den kraftige rødfargen blir svakere etter gytingen. Proteinreduksjon oppstår også når laksen migrerer til gyttestedet (FAO 1988).

Fisken har ikke mulighet til å syntetisere astaxanthin og er derfor avhengig av tilførsel av karotenoidet i maten. Dermed kan rødfargen variere mye fra laks til laks, etter hvor den kommer fra, eller om det oppdrettslaks eller vill laks. Hos oppdrettslaksen er astaxanthin en del av fôret, da rødfargen er et viktig kvalitetskriterier for fisken (FAO 1988).

2.8.1 Salma laks

I dette forsøket ble det blant annet brukt Salma Laks. Laksen kommer fra et oppdrettsanlegg på Bømlo. Fra laksen svømmer til den er ferdig vakuumpakket tar det maks 4 timer og har 10 dager holdbarhet (SALMA). Innholdet i Salma laksen er oppgitt i tabell 2.8.1.1 nedenfor.

Tabell 2.8.1.1: Innholds fortegnelse i Salma laks (SALMA).

Innhold pr. 100 g.	Energi kJ	Protein (%)	Karbohydrater (%)	Fett (%)	Omega 3 (g)/Omega 6 (g)
	834	19,5	0	13-15	3/1,6

Laksen er rundt 18 måneder før den slaktes. Når lakseyngelen settes ut, veier den mellom 60-200 gram. Hos Salma har de 10-12 kg laks per kubikkmeter som tilsvarer 1% laks per 99%

vann. Laksen trives best med temperaturer mellom 6°-14°C. Fiskeforet laksen får består av 25-30% fiskemel og fiskeolje/rapsoolje (SALMA).

3 Materialer og Metode

3.1 Materialer

Det ble brukt to ulike typer røkt laks til første delen av oppgaven. En røkt laks fra «Godt Kjøp» som var et helt halestykke. Og den andre typen laks var fra «Sotra Seafood» som også var fra halepartiet, men var ferdig oppdelt i skiver.

Til den andre delen av oppgaven ble det brukt fersk laks fra SALMA. Denne typen ble valgt for at den sannsynligvis ville gi sammenlignbare resultater fra hver gang. Laksen har blitt håndtert på lik måte for hver fisk hos SALMA.

3.1.1 Røkt laks

Kjøpte to forskjellige merker: «Godt kjøp» helt halestykke(GK) og «Sotra seafood» i skiver (SS). Fisken ble stekt på 750 W effekt i en jernpanne med flytende Melange i ca. 10 minutter med røring. SS fisken i skiver ble lettere delt og ble veldig smuldrete, mens laksen av merke GK holdt fasongen bedre (terninger).

Veide opp den stekte laksen i forskjellige bokser for fersk, nystekt, 1 uke gammel, 2 uker gammel, 3 uker gammel og 4 uker gammel. Den stekte laksen ble oppbevart i plastbokser med lokk i et kjølerom (+4°C). En boks med røkelaks ble tatt ut for hver uke.

3.1.2 Fersk Salma laks

Hver tirsdag ble det kjøpt fersk Salma laks som skulle brukes samme dagen. Laksen ble først delt opp i store biter før den hakket opp i kjøkkenmaskin i 8 sekunder på middels effekt til den ble til en grov farse. Farsen ble fordelt i ulike zip- poser og veid opp (50 gram i hver pose). Farsen ble forsiktig klemt ned og fordelt jevnt utover i posen til den hadde en tykkelse på ca. 0,7 cm. Posen ble lagt på vannbad ved ulike temperaturer (mellom 20°- 70°C) i 10 minutter. Denne metoden ble valgt da den tidligere har blitt utført av Sivertsen (2012). En pose ble lagt på is (4°C). Etter varmebehandling i 10 minutter ble posen lagt raskt på is for nedkjøling, før videre analyse.

3.2 Metoder

Alle metodene som ble brukt er lagt med som vedlegg (vedlegg A-H).

3.2.1 Lipidekstrasjon

De ferdige oppdelte lakseporsjonene ble før hver uke veid opp i sentrifugerør og ekstrahert med metoden til "Bligh and Dyer" (Bligh et al. 1959). Ca. 10 g prøve ble veid ut i en sentrifugekopp som ble sentrifugert ved 4100 g i 13 minutter. Nederste fase (orange) ble pipettert ut (ca. 25-30 ml) og overført til sentrifugerør. 2 ml av kloroformfasen ble tatt ut og overført til reagensrør. Rørene ble satt til avdamping med N₂- gass i ca. 50-60 minutter til all kloroformen var fordampet. Rørene ble veid opp og lipidinnhold beregnet. Resten av kloroformfasen ble fryst ned for senere analyser av harskning (PV og TBARS).

3.2.2 Bestemmelse av primære oksidasjonsprodukter, PV

Bestemmelse av PV med Ferrothiocyanatmetoden ble utført ved hjelp av metoden av Undeland (1991).

For måling av PV ble det kjørt to paralleller for hver prøve. 2 ml av kloroformfasen, fra lipidekstraksjonen, ble fordampet under N₂- gass i ca. 1 time. Etter tilsetninger ble løsningen mikset i nøyaktig 15 sekunder og satt på vent i 2 minutter og 45 sekunder. Det var viktig å være nøyaktig med tiden da absorbansen endret seg raskt. Ny standardkurve ble laget for hver uke da isohexanen ga veldig ulike blankprøver. Fe³⁺ ble brukt som standard ved sammenligning.

3.2.3 Bestemmelse av sekundære oksidasjonsprodukter, TBARS

TBARS ble målt ut fra metoden til Ke et al. (1959).

1 ml av kloroformfasen til 2 paralleller, fra lipidekstraksjonen, ble fordampet under N₂- gass i ca. 45 minutter. Absorbanseverdiene ble sammenlignet med en standardkurve laget av TEP (1.1.3.3. tetraethoxypropan).

3.2.4 pH- måling

pH ble målt i Salma laksen før varmebehandlingen. Dette ble gjort ved å blande 2 g laks sammen med 2 ml KCl (0,15M) (Rustad et al. 1993)

For å justere ned pH ble det tilsatt 800µl HCl (1M). Denne metoden ble valgt da det var blitt gjort før av Ofstad (1995).

For å finne mengde HCl som skulle tilsettes, ble det først kjørt en testrunde hvor to laksefarser ble tilsatt to ulike mengder HCl, henholdsvis 600µl/50g laksefarse og 1000 µl/50g laksefarse. Syren ble rørt forsiktig inn i laksefarsen. pH i farsen ble målt hvert 10 minutt frem til pH holdt seg stabil.

I det først forsøket med lavere pH ble HCl tilsatt etter at laksefarsen var ferdig laget. Etter tilsetning av HCl ble farsen forsiktig blandet og brukt videre til analyser etter 30 minutter.

I det andre forsøket med lavere pH ble HCl tilsatt etter at laksen ble kjørt i kjøkkenmaskinen i 4 sekunder. Etter tilsetning av HCl ble laksen kuttet i kjøkkenmaskinen i 4 sekunder til. pH ble målt ca. hvert 10 minutt til pH stabiliserte seg.

3.2.5 Vannbindingsevne (VBE)

VBE ble bestemt med en lavhastighetssentrifugering som beskrevet av Eide et al. (1982)

2 gram Salma laks fra hver zip pose etter varmebehandling ble veid opp i 2 prøvebeholder som ble sentrifugert i 5 minutter ved 210 g. Tørrvekten ble bestemt ved å veie ut 2 gram laks fra hver prøve og satt i varmeskap ved 105 grader i 24 timer.

3.2.6 Protein ekstraksjon

4 gram laksefarse ble veid opp og homogenisert i 20 sekunder i 80 ml fosfatbuffer (0,05M, pH=7). Løsningen ble sentrifugert i 20 minutter ved ca. 7200 rpm. Supernatanten ble filtrert gjennom glassull og volumet justert til 100 ml med fosfatbufferen. Dette er den vannløselige fraksjonen. Bunnfallet i sentrifugerøret ble homogenisert i 20 sekunder med fosfatbuffer med KCl (0,05M, pH=7) som igjen ble sentrifugert i 20 minutter ved 7200 rpm. Supernatanten ble filtrert igjennom glassull og volumet justert til 100 ml med fosfatbufferen tilsatt salt. Dette var den saltløselige fraksjonen (Anderson et al. 1968).

3.2.6.1 Laging av fosfatbuffer med og uten KCl

Fosfatbufferen uten salt brukes ved ekstraksjon av vannløselige proteiner, mens fosfatbufferen med KCl brukes ved ekstraksjon av saltløselige proteiner. Mengde og innhold er oppgitt i vedlegg.

3.2.7 BioRad metoden

BioRad ble gjennomført ved bruk av metoden til Bradford (1976).

100µl av proteinekstratene, i tre paralleller, med passe fortynning ble tilsatt BioRad og absorbanen (595nm) etter 5 minutter og alle prøvene ble avlest innen 60 minutter etter tilsetning av Biorad. Absorbansen ble sammenlignet med verdier laget av standarden Bovin Serum Albumin.

3.2.8 Kvantifisering av SH- grupper

SH- grupper ble målt ved farging med 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoat) (DTNB) i overskudd som beskrevet av Ellman (1959)

100 µl av proteinekstraktet ble overført til eppendorfrør. Fosfatbuffrene (med og uten KCl) som ble brukt i proteinekstraktene ble brukt som blank prøver. Alle rørene ble tilsatt urealøsning og DTNB for farging. Etter 30 min. ble absorbanen (412nm) avlest.

SH- gruppene ble målt dagen etter proteinekstraksjonen ble laget på grunn av dårlig tid. Noen testmålinger ble kjørt samme dag som proteinekstraksjonen ble laget for å se om det ble noen endringer i verdiene.

3.2.9 PhastGel elektroforese

500 µl av proteinekstraksjonen ble tilsatt 500 µl elektroforese buffer i eppendorfrør, og ble satt på kokende vannbad i 5 minutter. Prøvene ble satt i fryser til de skulle brukes (Laemmli 1970).

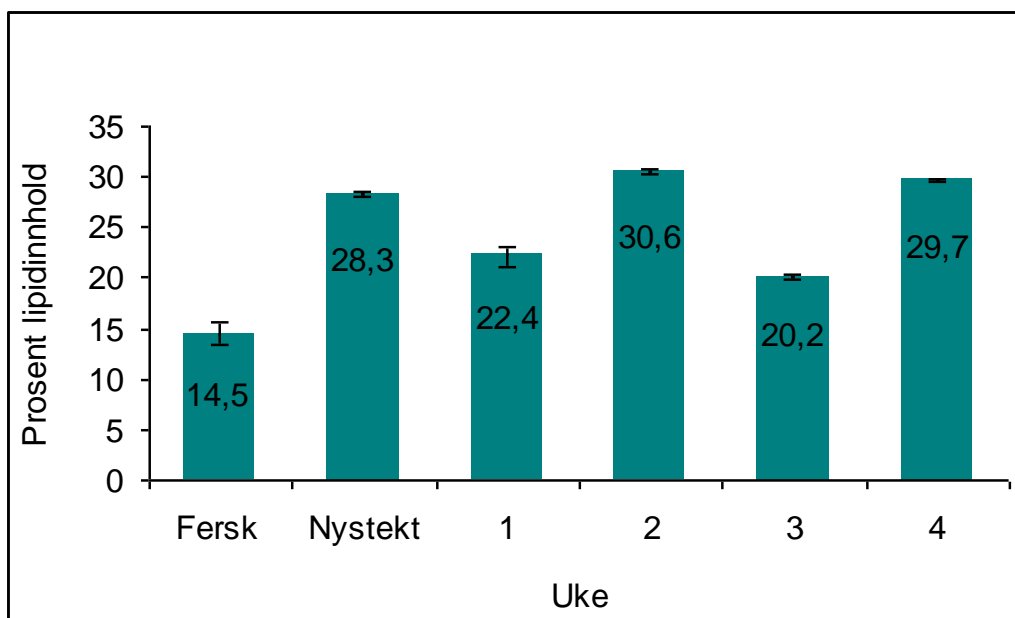
Før prøvene ble overført til gelene, ble de tilsatt en liten dråpe Brophenolblue (1%) og satt til koking i noen minutter. Prosedyren laget av Pharmacia ble fulgt for gjennomføring av gelelektroforesen.

4 Resultater og diskusjon

Målte og beregnede verdier ligger i vedlegg (Vedlegg A-H)

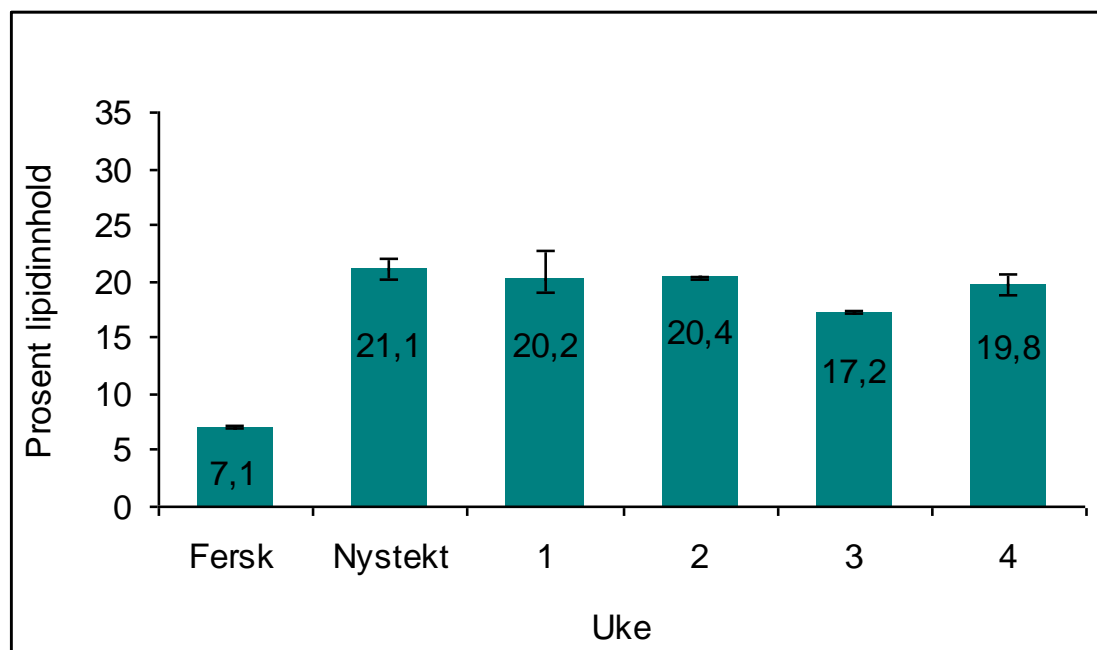
4.1 Lipidinnhold

Lipidinnhold ble målt i den stekte røkelaksen, både for "Sotra Seafood" (SS) og "Godt kjøp"(GK). Resultatene er vist i figurene (figur 4.1.1 og 4.1.2) under. Det ble målt lipidinnhold i røkelaksen før den ble stekt (fersk) og samme dagen som den ble stekt (nystekt). Deretter ble det utført nye målinger hver uke inntil fire uker.



Figur 4.1.1: Lipidinnholdet målt i "Sotra Seafood"- laks fra ustekt røkelaks til stekt røkelaks lagret i 4 uker. "Fersk" ble målt for røkelaksen før den ble stekt. Usikkerheten er gitt som standardfeil.

Resultatet i figur 4.1.1 viser veldig varierende verdier for hver uke. For nystekt, uke 2 og uke 4 er verdiene relativt stabile og det samme for verdiene fra uke 1 og 3. Alle verdiene er høyere enn for fersk røkelaks (ustekt).



Figur 4.1.2: Lipidinnholdet målt i "Godt Kjøp"- laks fra ubehandlet røkelaks til røkelaks lagret i 4 uker. Usikkerheten er vist som standardfeil i figuren.

Resultatene for GK laksen er vist i figur 4.1.2. Figuren 4.1.2 viser at lipidinnholdet holder seg stabilt fra nystekt til 4 uker. I likhet med figur 4.1.1, viser figur 4.1.2 en kraftig økning fra fersk røkelaks til nystekt røkelaks.

Den kraftige økningen for begge typene røkelaks skyldes trolig at røkelaksen ble stekt i en del margarin. Noe av lipidene fra margarinet er tatt opp av laksen og har ført til økt lipidinnhold. I denne oppgaven er det hva som skjer i ukene etter at laksen er stekt som er interessant. I figur 4.1.2 for GK holder lipidinnholdet seg ganske stabilt fra nystekt til 4 uker som forventet.

Mens for SS er det veldig varierende verdier. Dette kan skyldes at SS røkelaksen var i skiver istedenfor i et helt stykke. Under steking ble det brukt litt mer margarin da SS- laksen stadig satte seg fast i pannen og gikk i oppløsning. I tillegg ble SS- laksen mer ujevnt stekt da den gikk mer i oppløsning enn GK- laksen. Lipidinnholdet fra nystekt til uke 4 er relativt like for både SS og GK laksen, hvor verdiene ligger mellom 20-30 % igjennom hele forsøket.

Noen av forskjellen i verdiene kan komme av at fett fra fisken har kommet ut av laksebitene og blitt liggende igjen i boksen under oppbevaringen på kjølerommet. Dette kan utgjøre en liten forskjell i det målte lipidinnholdet.

I den ferske røkelaksen er lipidinnholdet signifikant høyere i SS enn i GK, nesten dobbelt så mye lipider. Den store forskjellen kan skyldes at prøvene er tatt fra ulike deler av laksen.

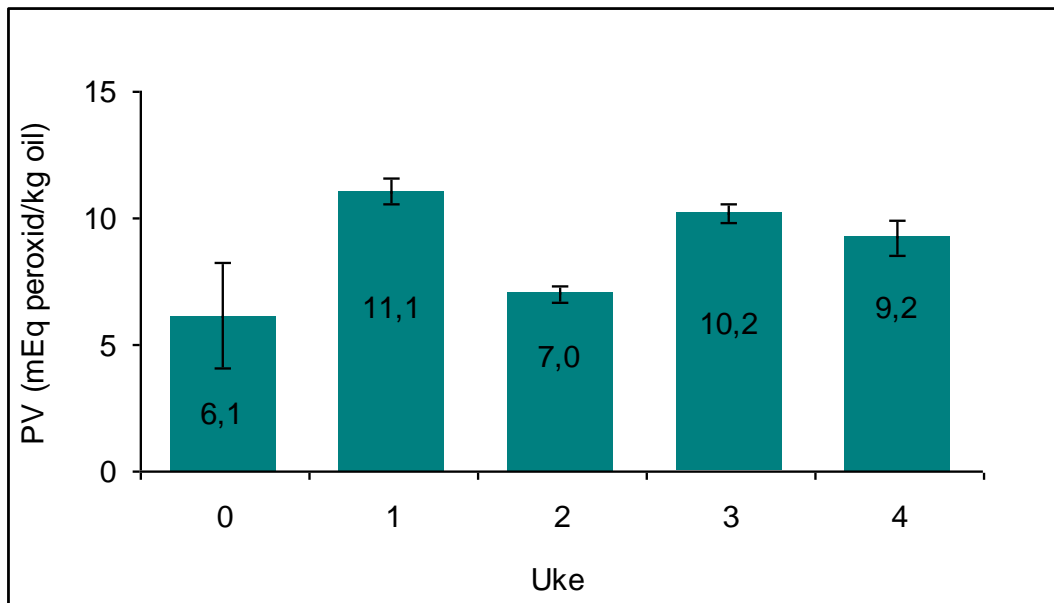
Lipidinnholdet varierer en del fra område til område hos laksen, se avsnitt 2.5 Lipider og tabell

2.5.1. Halestykket på laksen har et lavere lipidinnhold enn f.eks midten av fisken.

Lakseskivene fra Sotra Seafood kan ha blitt tatt fra områder med høyere lipidinnhold. I Salma laksen står det at laksen inneholder 13-15% fett og dette er et ryggstykke. Det kan tyde på at laksen fra Sotra Seafood er tatt fra ryggen da det har et lipidinnhold på 14,5%. I tillegg er også Sotra Seafood et kjent kvalitetsmerke, mens ”Godt Kjøp” er et merke som Rema 1000 har lansert som skal være et godt alternativ, men billig. Ulike merker på laksen kan gi stor forskjell i fettinnhold, SS laksen kan ha høyere fettinnhold enn GK laksen.

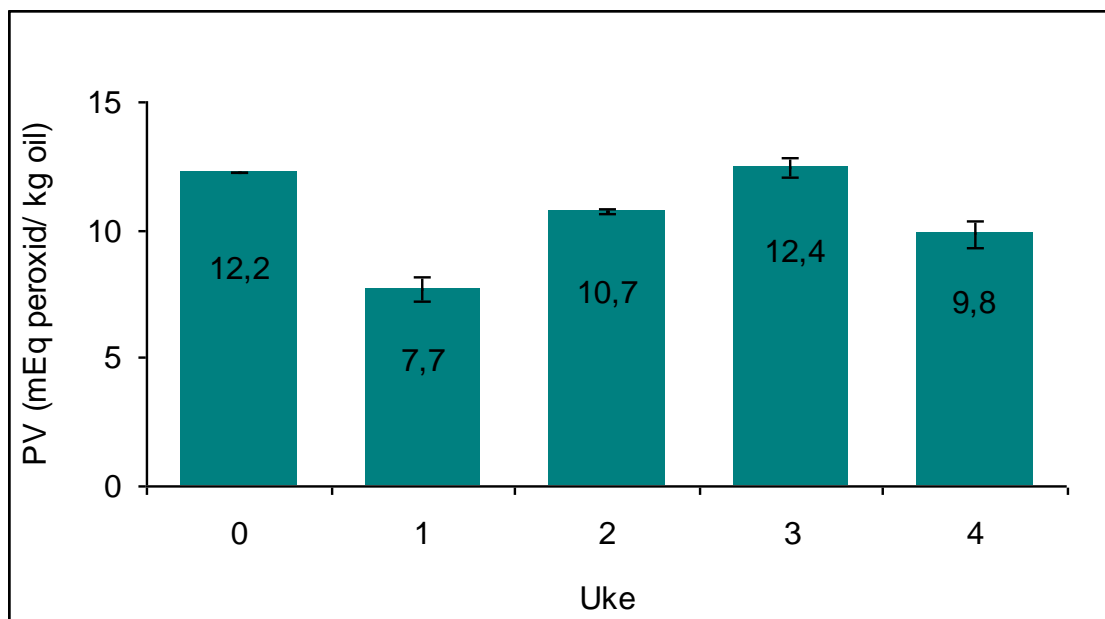
4.2 Bestemmelse av primære oksidasjonsprodukter

Et av målene med oppgaven var å studere holdbarheten til stekt røkelaks som kunne brukes som ”topping” på et lakseprodukt. Derfor ble det målt PV verdier for å bestemme mengde primære oksidasjonsprodukter som hadde blitt dannet. PV ble målt for både SS- og GK- laks fra røkelaksen var nystekt til den hadde blitt lagret i 4 uker. Resultatene er vist i figurene (figur 4.2.1 og 4.2.2) under.



Figur 4.2.1: Målt PV for ”Sotra Seafood”-laks over 4 uker. Uke 0 var da røkelaksen var nystekt. Usikkerheten er vist som standardfeil i figuren.

I figur 4.2.1 ovenfor er resultatene for primær oksidasjon av lipider i SS laksen vist. Man kan se en tydelig økning fra nystekt til uke 1. Fra uke 1 til uke 4 holder verdiene seg relativt stabile. I uke 2 er PV verdien signifikant lavere enn både i uke 2 og uke 3.



Figur 4.2.2: Målt PV for ”Godt Kjøp” laks over 4 uker. Uke 0 var da røkelaksen var nystekt. Usikkerheten er oppgitt som standardfeil i figurene.

I figur 4.2.2 er målingene av PV i GK laksen vist. Fra nystekt til uke 1 er det en signifikant minking i PV før den øker litt til uke 2. Fra uke 2 til uke 4 holder PV verdiene seg stabile.

PV verdiene som ble målt for GK og SS ligger i samme området som resultater for (Kim 2009) som brukte fett ekstrakter og uraffinert olje fra laks. Fisken som ble brukt til prøvene, var blitt matet med ulike fôrtyper og prøvene ble oppbevart ved temperaturer fra -27°C til -40°C og 40°C i 5-20 dager.

Ved sammenligning av figur 4.2.1 og 4.2.2 er PV verdiene for nystekt røkelaks (uke 0) dobbelt så høy for SS laksen enn GK laksen. Frem til uke 4 ender PV verdiene for begge røkelaksene opp med nesten samme verdi. Dette kan skyldes at SS laksen ble stekt mer enn GK laksen. SS laksen flaket seg veldig opp under steking og satte seg godt fast i pannen selv om det ble brukt mye margarin. GK laksen ble stekt i større terninger og holdt fasongen fint. Dermed vil også GK laksen ha et større overflate areal, som fører til større tilgjengelighet for oksygen og dermed økt oksidasjon.

I figur 4.2.1 for SS laks, er det veldig stor usikkerhet for PV verdien målt i nystekt (uke 0) røkelaks. Grunnen til dette kan være at metoden som ble brukt var litt uklar på hvor lenge prøven skulle stå før avlesning av absorbansen. Forklaringen ble skrevet på to ulike måter: miks i 15 sekunder, vent 2 minutter og miks 45 sekunder eller miks 15 sekunder på vortex, vent så i 2 minutter og 45 sekunder. Absorbansen som ble målt varierte mye innenfor få

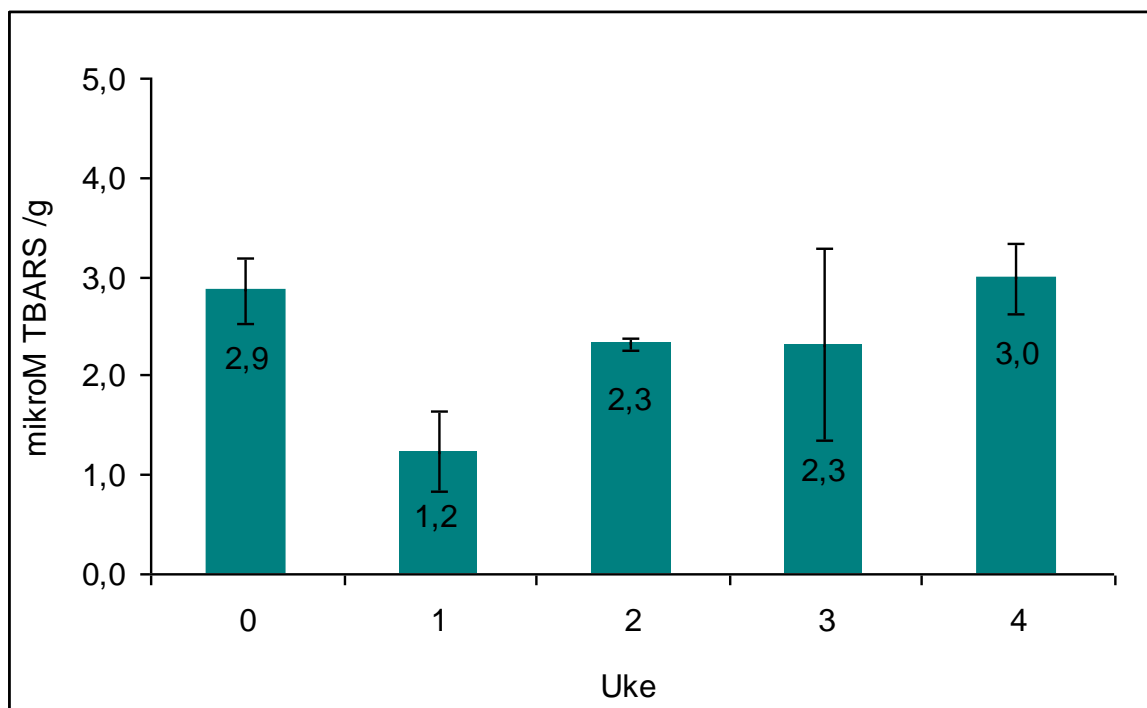
sekunder, så det var viktig at den ble avlest akkurat etter 2 minutter og 45 sekunder. Dermed hadde den første prøven som ble målt for SS, større usikkerhet enn de andre målingene.

En økning i PV verdiene kan tyde på at oksidasjonen til primære oksidasjonsprodukter er høyere enn hastigheten for dannelsen av sekundære oksidasjonsprodukter.

I tillegg til å måle PV, kunne det ha blitt målt konjugerte diener for å se på tidlige oksidasjonsfaser. Ustabiliteten til primære oksidasjonsprodukter øker ved økt temperaturer og primære oksidasjonsprodukter reagerer videre til sekundære produkter. Konjugerte diener dannes av hydrogenperoksider fra flere umettede fettsyrer (PUFA).

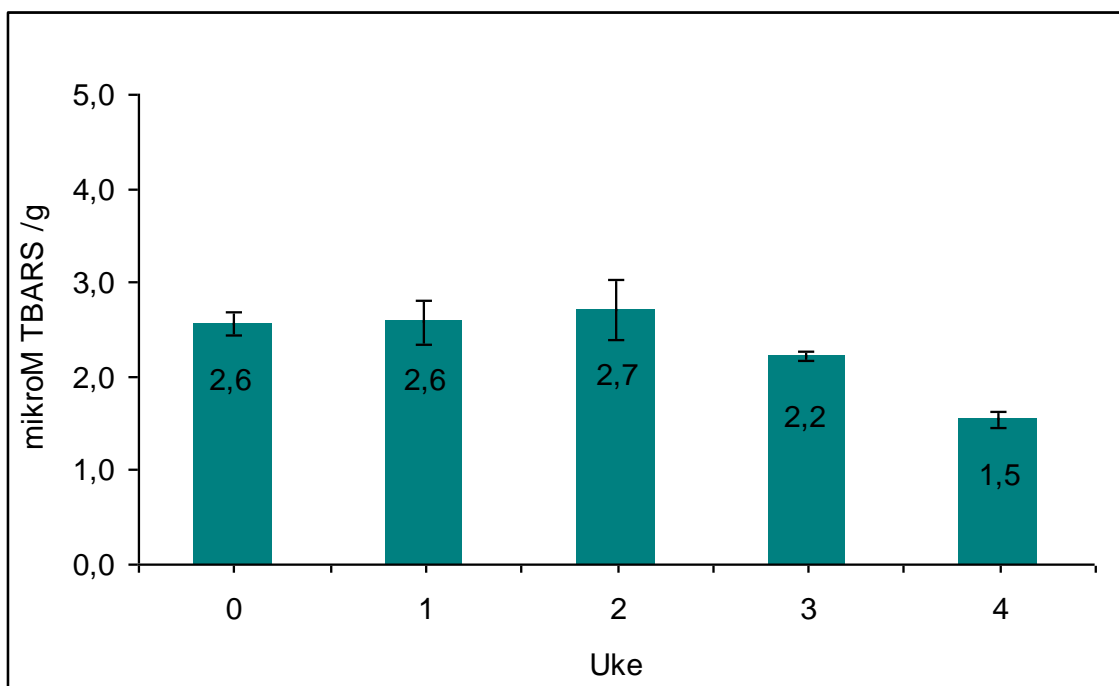
4.3 Bestemmelse av sekundære oksidasjonsprodukter

Siden primære oksidasjonsprodukter er veldig ustabile, blir det ikke helt korrekt å bare måle PV for å kunne studere holdbarheten til røkelaksen. For å få et bedre bilde av hvor mye som oksideres, bør sekundære oksidasjonsprodukter også måles. Sekundære produkter kan måles ved bruk av TBARS. Resultatene er vist i figur 4.3.1 og 4.3.2.



Figur 4.3.1: TBARS for "Sotra Seafood" laksen. Søylene vises med standardfeil. Uke 0 viser verdiene for nystekt røkelaks, og uke 4 viser verdiene målt for røkelaks lagret i 4 uker.

Resultatet for målingene av TBARS i SS laks er gitt i figur 4.3.1. Fra nystekt til uke 1 halveres TBARS verdien. Fra uke 1 til uke 4 øker den noe, men ser ut til å holde seg relativt stabil de siste par ukene. For alle verdiene er usikkerheten ganske stor, spesielt for uke 3.



Figur 4.3.2: TBARS for ”Godt Kjøp” laksen. Søylene vises med standardfeil. Uke 0 viser verdiene for nystekt røkelaks, og uke 4 viser verdiene målt for røkelaks lagret i 4 uker.

I figur 4.3.2 ovenfor viser målte verdier for TBARS i GK laksen. Fra laksen er nystekt til lagring etter 2-3 uker holder verdiene seg ganske stabile. Fra uke 2-3 og til uke 4 ser det ut som det er en minking i verdiene. TBARS i uke 4 er signifikant lavere enn i uke 3.

Usikkerheten for verdiene er noe mindre i GK laksen enn i SS laksen. Ved å sammenligne verdiene i figur 4.3.1 og 4.3.2, ser vi at for de to lakseproduktene er verdiene ganske like hver uke.

TBARS er en metode for å måle sekundære oksidasjonsprodukter. I motsetning til primære oksidasjonsprodukter, har sekundære oksidasjonsprodukter både smak og lukt. Det ble luktet på prøvene for hver uke. Det var ikke så veldig stor forskjell fra uke til uke, men lukten på prøvene de siste to ukene var noe sterkere enn tidligere. Lukten kan ikke beskrives som dårlig, men det var litt kraftigere lakselukt. I tillegg til lukt, kunne det se ut som fisken så mer ”kunstig”/”gummiaktig” ut etter hvert som ukene gikk.

Forventer en liten økning i TBARS verdiene, da primære oksidasjonsprodukter som blir dannet er veldig ustabil og oksideres raskt videre til sekundære oksidasjonsprodukter.

Nedgangen som blir observert fra uke 2 til uke 4 i figur 4.3.2, kan skyldes polymerisering av fett. TBARS verdiene som ble målt for begge lakseproduktene ligger innenfor samme området som TBARS verdiene som Semb (2012) har fått i sitt forsøk (0-3,5 μ M TBARS/g).

Prøvene til Semb (2012) kom fra olje fra torskelever og fiskeoljer fra Sør Afrika. Prøvene ble holdt i kjøleskap (4°C) i mørket. Målingene ble utført fra 1 dag til 29 dager. Semb (2012) viser også til at ved lavere TBARS verdier (0,11-0,48 µM TBARS/g), vil usikkerheten bli større.

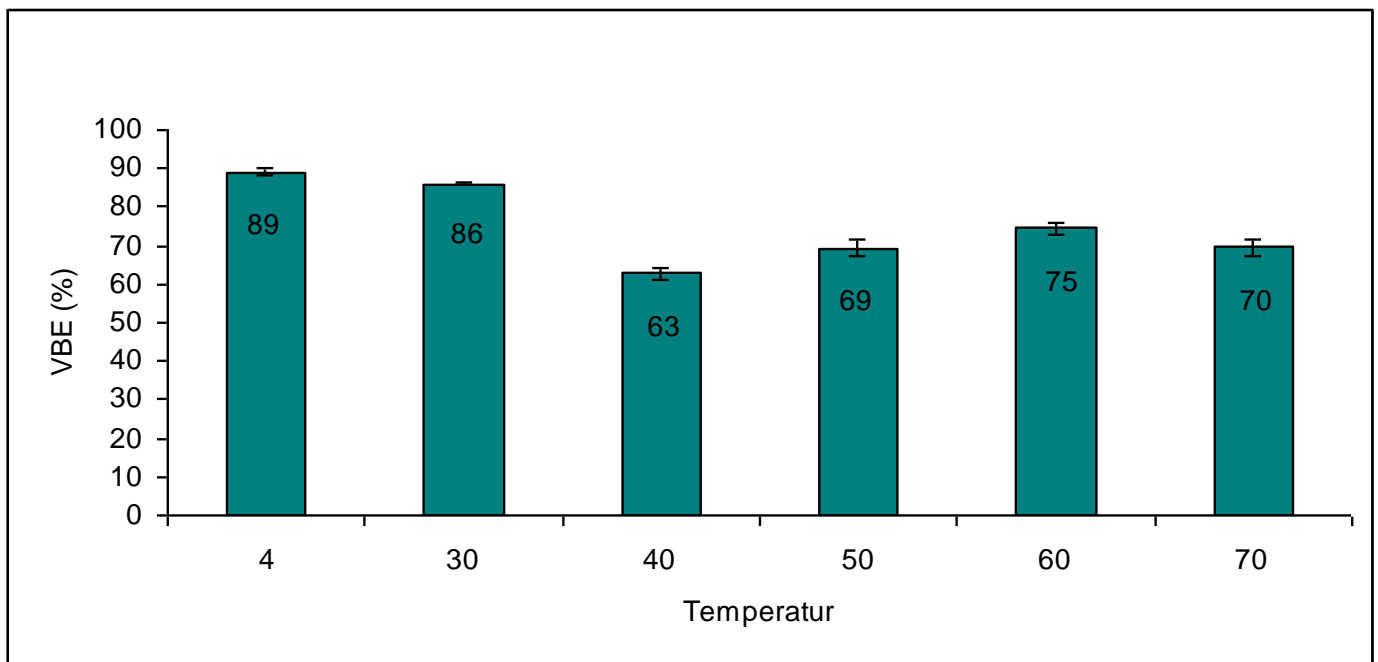
Den store usikkerheten i TBARS skyldes trolig at TBARS er en ganske usensitiv og uspesifikk metode da det er vanskelig å få molekyler til å reagere med thiobarbituric acid (TBA). Fargen som måles, dannes ved at malonaldehyd og TBA reagerer og danner et rosa kompleks som absorberes ved 532-535 nm. Forhold som temperatur, pH, med antioksidanter tilstedet og metall ioner påvirker fargen på komplekset som måles. Likevel blir TBARS mye brukt. For å få sikrere resultater, kan TBARS brukes sammen med HPLC for å finne ut hvilke komponenter som dannes (Semb 2012).

Varmebehandling av laksemuskel

For å kunne utvikle og forbedre eksisterende fiskeprodukter er det nødvendig med mer kunnskap om hvilke endringer som finner sted i råstoffet under ulike prosessbetingelser. For å studere endringer i muskelproteiner ble endringer i vannbindingsevnen (VBE), proteinløselighet og proteinoksidasjon målt etter varmebehandling ved ulike temperaturer. Tilsetning av salt og endring i pH ble også målt for å se om dette kunne forbedre VBE og proteinstabiliteten. Salt og endring i pH ble valgt da dette har blitt brukt i andre matprodukter for å bedre holdbarhet.

4.4 Vannbindingsevne

Vannbindingsevne (VBE) i fiskemuskel til fersk Salma laks ble målt og beregnet. Resultatene er vist i figurene 4.4.1-4.4.4 nedenfor. VBE ble beregnet for laks uten tilsetninger, med salt og med nedjustert pH. Målingene og beregningene ble gjort samme dag fisken ble kjøpt slik at den var ferskest mulig.



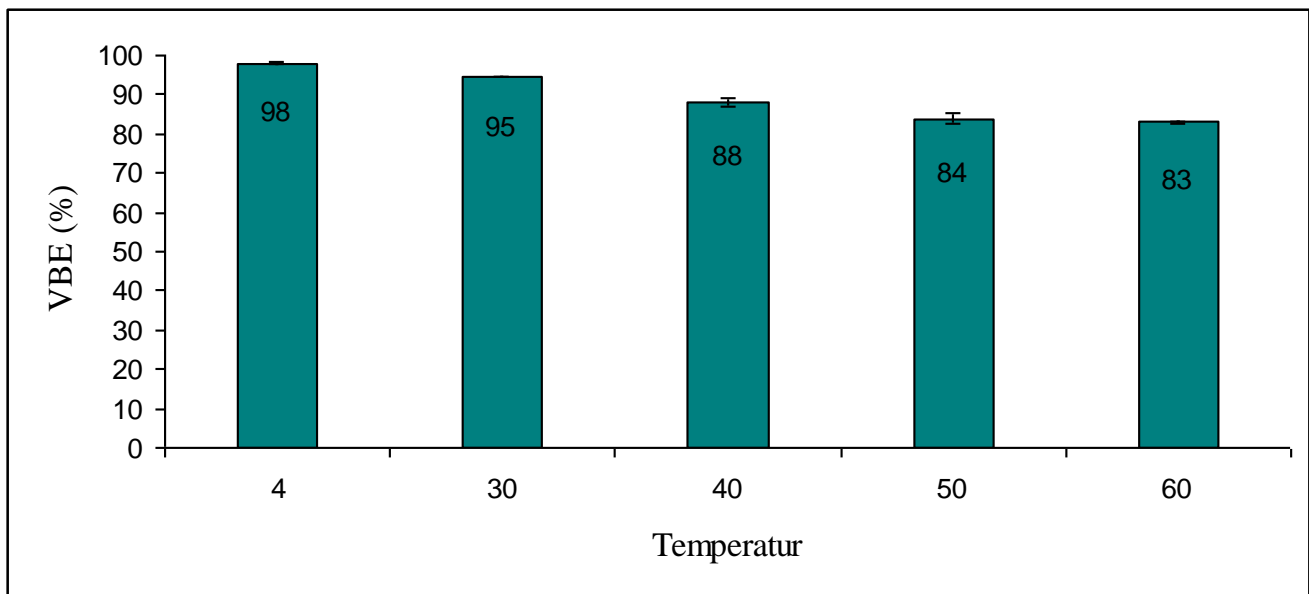
Figur 4.4.1: Vannbindingsevnen til laks uten noen tilsetninger. Varmebehandlet i 10 minutter ved 4° til 70°C. pH i laksen ble målt til 6,12. Usikkerheten er oppgitt som standardfeil.

Resultatene for målt VBE i laksefarse uten tilsetninger er vist i figur 4.4.1 ovenfor. VBE holder seg ganske stabil fra 4° til 30°C. Fra 30° til 40°C observeres det en kraftig nedgang i VBE, men resultatene fra 40° til 60°C viser en signifikant økning i VBE før verdien flater ut.

For VBE forventes en minking ettersom temperaturen øker. Som forklart i avsnitt 2.4.5 om vannbindingsevne, vil oppvarming føre til denaturering av muskelproteiner, spesielt myosin, og krymping av myofibrillene fører til at vann presses ut av musklene slik at det blir mindre plass i muskelen.

Sammenlignet med tidligere forsøk (Ofstad et al. 1993), ble det observert et maksimumspunkt for vanntap ved ca. 50°C. Fra 30°C til 50°C skjedde det en kraftig økning i vanntapet før en svak nedgang etter 50°C. I figur 4.4.1 ovenfor er maksimalt vanntap også observert mellom 40°C og 50°C. I forsøket til Ofstad et al. (1993) ble det observert at ved 40°C hadde kollagenlaget helt mistet sitt lineære mønster. I tillegg ble det observert at myofibrillene krympet med økende temperatur. Det ble spesielt observert kraftig krymping ved 50°C for laks, ved samme temperatur hvor VBE nådde minimumspunktet. Rundt 45°C starter denatureringen av myosin som forårsaker krympingen av myofibrillene (Ofstad et al. 1993).

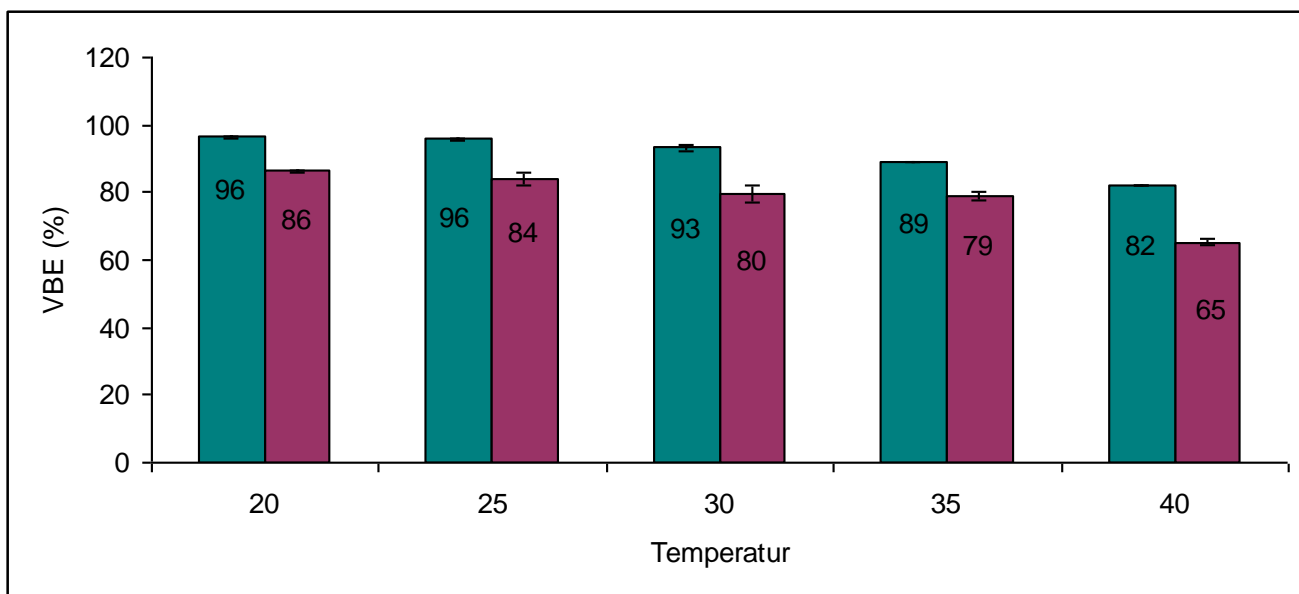
I et forsøk av Varmbo (2001) ble VBE observert som en funksjon av tiden. For 60°C ble det observert en VBE på 80% etter 0 min, ca. 40% etter 5 min. Varmbo (2001) utførte også forsøket ved 70°C. Det ble observert VBE på litt under 80% etter 0 minutter og 45% etter 5 minutter. Resultatene fra figur 4.4.1 viser litt lavere VBE enn Varmbo (2001) ved 60°C og 70°C. Dette kan skyldes at laksefarsen som ble brukt i dette forsøket ble liggende på vannbad noen minutter etter at hele laksefarsen hadde nådd henholdsvis 60°C og 70°C. Laksefarsen skulle ligge i vannbad i 10 minutter, men fisken kan ha oppnådd ønsket temperatur før 10 minutter. I forsøket til Varmbo (2001) observeres det at VBE minker fra 0 til 5 minutter.



Figur 4.4.2: Laksefarse tilsatt salt og vann. Laksefarsen ble varmebehandlet i vannbad i 10 minutter ved 4°C til 60°C. Laksefarsen er tilsatt 1% saltløsning (NaCl i vann). Usikkerheten er oppgitt som standardfeil.

Figur 4.4.2 viser VBE for laksefarse tilsatt salt og vann. Fra 4°C til 50°C kan man observere en svak nedgang i VBE før den flater ut ved 50°C. Laksefarsen ble tilsatt vann i tillegg til salt for å løse opp saltet slik at det ble jevnere fordelt i laksen. Det ble valgt en saltprosent på 1 da dette er mest vanlig i lakseprodukter.

Sammenlignet med figur 4.4.1, har laksefarsen tilsatt salt og vann høyere VBE ved alle temperaturene som ble målt. Dette tyder på at saltet bidrar til at vannet holdes på plass i fiskemuskelnettverket under varmebehandling. I tillegg er VBE mer stabilt med salt enn ved uten salt. Det samme ble observert i tidligere forsøk gjort av Ofstad et al. (1995). I Ofstad et al (1995) ble det observert at væsketapet i laksen holdt seg mellom 0-10% ved oppvarming fra 30°C til 60°C med forskjellig saltkonsentrasjon og pH. Ved tilsetning av salt vil Cl⁻ binde seg til myofibrill filamentene slik at den negative ladningen øker. I tillegg vil det dannes elektrostatiske frastøtning mellom filamentene, grunnet Cl⁻, som forårsaker svelling slik at VBE øker.



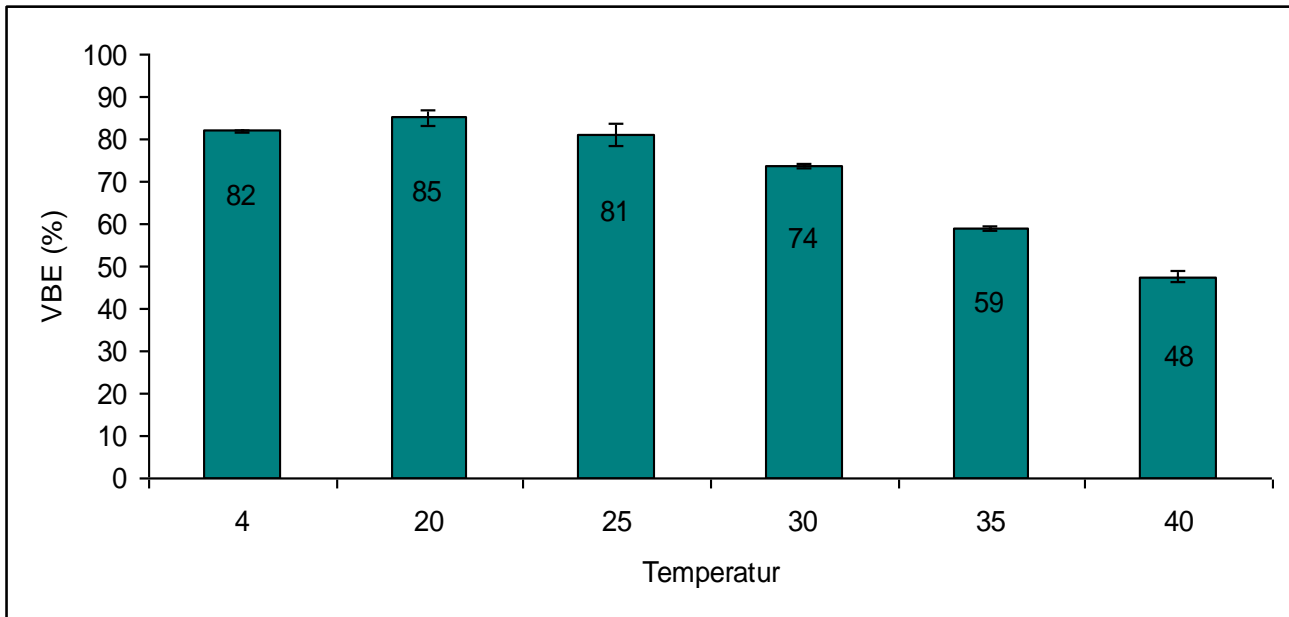
Figur 4.4.3: Laksefarse tilsatt salt og vann (grønn kurve) og laksefarse tilsatt vann (fiolett kurve). Varmebehandlet i vannbad i 10 minutter ved temperaturer fra 20°C til 40°C. pH ble målt til 6,07. Usikkerheten er oppgitt som standardfeil.

VBE i laksefarse tilsatt salt og vann er vist i figur 4.4.3. VBE ligger relativt stabilt fra 20°C til 30°C før den minker ned mot 40°C. Det samme skjer med laksefarse tilsatt bare vann, men der minker den først mellom 35°C og 40°C. Grunnen til at det kun ble målt VBE mellom 20°C og 40°C var at det ble observert ved ulike målinger (proteinløselighet, VBE, og proteinoksidasjon) at mellom 30°C og 40°C skjedde det store endringer. Derfor ble det valgt noen temperaturer rundt 30-40°C og et antall prøver det var mulig å kjøre på en dag. For å se hva som skjedde rett før 30°C og ut fra at det burde kjøres to paralleller ble det valgt å analysere prøver for 20°C, 25°C, 30°C, 35° og 40° da 10 antall prøver var et greit antall å kjøre på en gang.

I figur 4.4.3, er VBE for laksefarse tilsatt salt og vann alltid høyere enn laksefarse tilsatt bare vann. Dette viser at saltet som er tilsatt har en innvirkning på VBE. Forskjellen mellom VBE er størst ved 40°C, hvor vanntapet er størst i laksefarse uten tilsetninger. Dette kan tyde på at saltet stabiliserer proteinene slik at laksefarsen holder bedre på vannet.

I forsøket utført av Ofstad et al. (1995) ble det observert en økning i væsketapet mellom 30°C og 40°C. Væsketapet øker fra ca. 3% til 8% ved tilsatt 0,17 mol/L NaCl med pH =6,0. VBE vist i figur 4.4.3 ved samme temperaturintervall viser noe lavere verdier, men i dette forsøket minker også VBE mellom 30°C og 40°C. Forskjellen i verdiene kan skyldes at pH og

saltkonsentrasjonene er litt forskjellig fra dette forsøket og i forsøket gjort av Ofstad et al. (1995).



Figur 4.4.4: Vannbindingsevnen til laks med nedjustert pH. pH ble justert fra 6,09 til ca. 5,63 ved å tilsette HCl (8,288ml, 1M). Målingene ble gjennomført ved 4°C til 40°C på vannbad i 10 minutter. Usikkerheten er oppgitt som standardfeil.

Forsøket med laksefarse med nedjustert pH ble utført to ganger. Resultatene fra første forsøk er lagt i vedlegg da disse sannsynligvis hadde ujevn pH i farsen. I andre forsøk ble tilsetning av HCl gjort mens laksen ble malt i kjøkkenmaskinen og laksefarsen ble liggende ca. 1 time med tilsatt HCl. pH ble målt jevnt i løpet av timen til den stabiliserte seg. Resultatene fra målt VBE fra andre forsøk er gitt i figur 4.4.4. I første forsøk med nedjustering av pH ble HCl tilsatt etter at laksefarsen var ferdig malt og ble brukt til videre analyse etter ca. 30 minutter. Dermed ble ikke syren jevnt fordelt i laksefarsen slik at det ble forskjellig pH i ulike deler av farsen. Resultatene fra første forsøk med nedjuster pH er vist i vedlegg (vedlegg E-H).

I figur 4.4.4 observeres en jevn nedgang i VBE fra 20°C til 40°C. VBE for laksefarse med nedjuster pH ligger signifikant lavere både for laksefarse uten tilsetninger (figur 4.4.1) og med tilsatt salt og vann (figur 4.4.3).

I avsnitt 2.4.5 om vannbindingsevnen ble det forklart at VBE minker når pH kommer nærmere pI. Lavere VBE med en lavere pH kan skyldes økning i protein- protein interaksjoner grunnet lavere antall negative ladninger i aminosyrene i myofibrillære proteiner. Figur 4.4.3 viser signifikant lavere VBE i forhold til laksen uten tilsetninger (figur 4.4.1).

Dette tyder på at det er en sammenheng mellom VBE og pH. VBE minker også ved økende temperatur. Spesielt mellom 30- 40°C skjer det en betydelig minking i VBE. I forsøket gjort av Ofstad et al. (1995) ble det observert at ved 40°C hadde pH en større negativ effekt på vanntapet enn ved 30°C. Dette fenomenet kan også observeres i figur 4.4.4 hvor det skjer en kraftig nedgang i VBE fra 30°C og 40°C. Den kraftige nedgangen tyder på at proteinene med lavere pH er mer varmesensitive enn proteiner med høyere pH.

Ved lavere pH og høyere temperaturer vil proteinene utfoldes og få flere hydrofobe overflater. Dette kan føre til at vannet frastøtes og skyves ut av muskelen. Dette fører til at VBE vil være lavere for laksefarse med lavere pH.

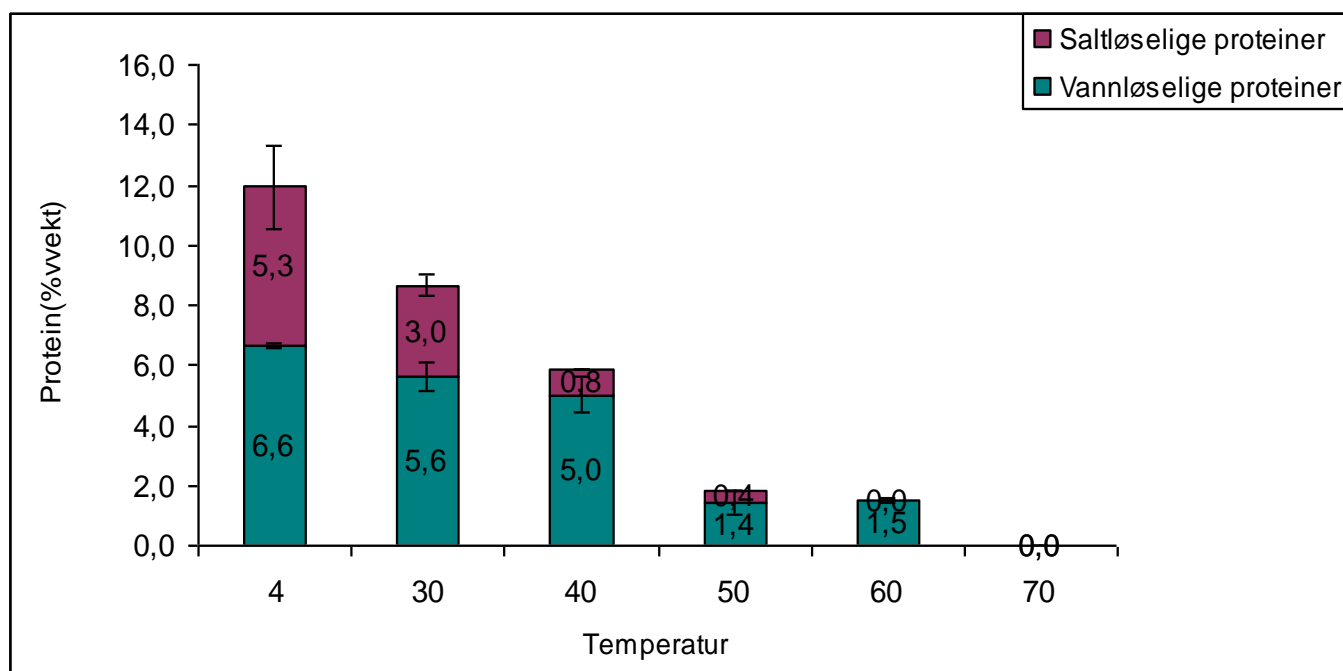
Ved å sammenligne figurene over (figur 4.4.1-4.4.4) kan man observere at tilsetning av salt er den faktoren som gir størst positiv effekt på VBE, mens pH har størst negativ effekt. Fra 4°C til 25°C-30°C utgjør ikke temperaturen noen stor forskjellen i VBE. I figur 4.4.4 ser det ut som temperatur og pH utgjør en stor forskjell i VBE ved 30°C og 40°C, noe som tyder på at proteinene som har lavere pH, er mer varmesensitive.

4.5 Endringer i proteinets løselighet

For å få et overblikk over hva som skjer med proteinene under oppvarming av fiskeprodukter, ble endringen i løseligheten til proteinene målt ved temperaturer mellom 4°C og 40°C.

Endringen i proteinløseligheten ble målt ved å ekstrahere ut vann- og saltløselige proteiner ved bruk av buffere. Mengden løselige proteiner ble målt ved bruk av Biorad metoden.

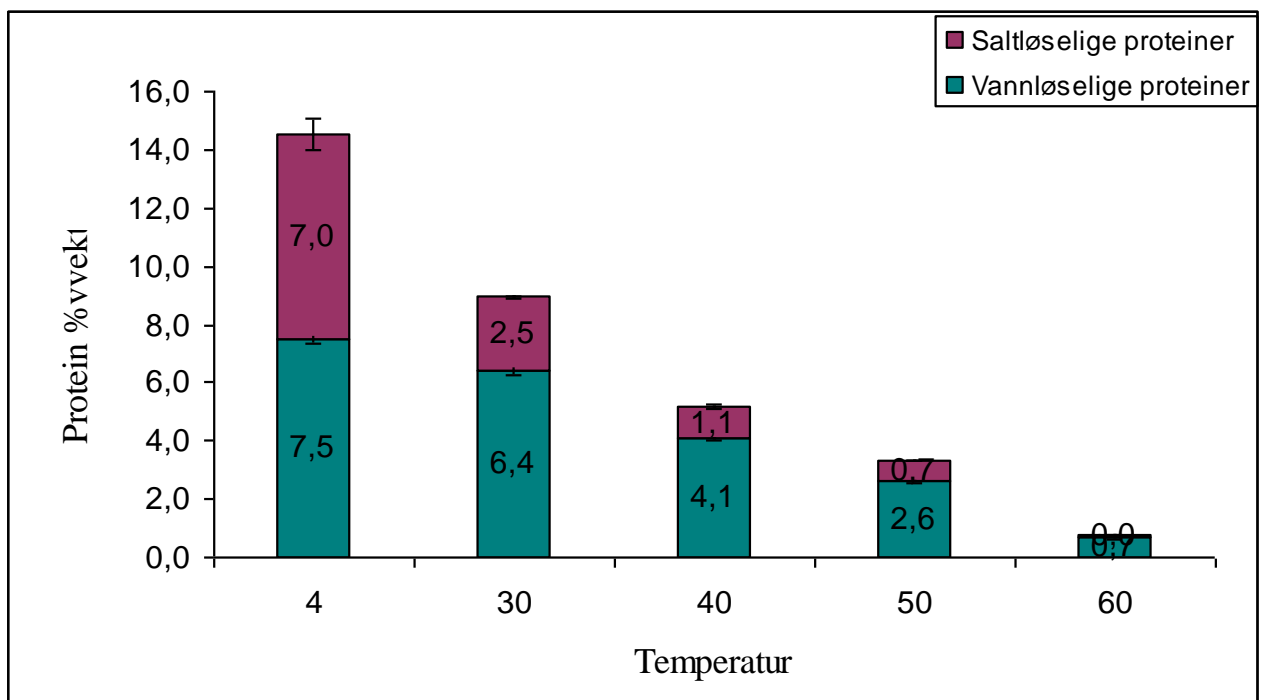
Resultatene er vist i figurene 4.5.1- 4.5.4 nedenfor.



Figur 4.5.1: Proteinmengden i laksefarse uten tilsetninger. Laksefarsen ble varmet i vannbad i 10 minutter ved temperaturer mellom 4°C til 70°C. Usikkerheten er oppgitt som standardfeil.

Figur 4.5.1 ovenfor viser er betydelig nedgang i proteinmengden, både for saltløselige og vannløselige. Ved 60°C har det ikke blitt registrert noen saltløselige proteiner, og ved 70°C er det verken vann- eller saltløselige proteiner igjen. Dette viser at proteinene i fisken denatureres raskt ved høyere temperaturer. De saltløselige proteinene denatureres ved lavere temperaturer enn de vannløselige proteinene, da de vannløselige proteinene er mer stabile (Kim 2009). Ved temperaturer mellom 30°-40°C skjer det en kraftig denaturering for de saltløselige proteinene, mens for vannløslige proteinene skjer denne denatureringen ved høyere temperaturer, mellom 40° - 50°C. Et forsøk gjort av Hultmann et al. (2002) på røking av laks, ble det observert redusert løselighet av myofibrillære proteiner når røketemperaturen økte fra 20°C til 30°C. Mens for de vannløselige proteinene holdt seg upåvirket. I figur 4.5.1 blir det også observert en kraftig nedgang i proteinløseligheten for saltløselige proteiner når temperaturen øker fra 30°C til 40°C, mens de vannløselige proteinene virker upåvirket.

En parallell fra hver temperatur ble videre analysert ved SDS-PAGE.

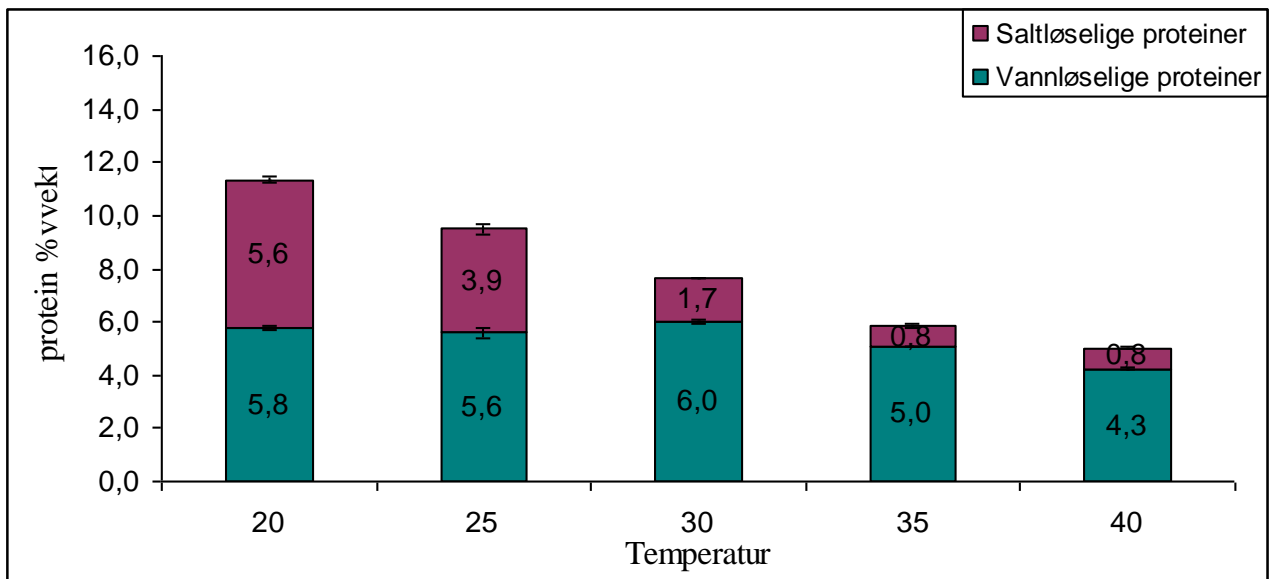


Figur 4.5.2: Laksefarse tilsatt salt. Laksefarsen ble varmet på vannbad i 10 minutter ved temperaturer fra 4°C til 60°C. Usikkerheten er oppgitt som standardfeil.

I figur 4.5.2 kan man se proteinløseligheten målt for laksefarse tilsatt salt. Løseligheten er oppgitt i % våtvekt for farse uten tilsatt vann, se utregning i vedlegg. Fra 4°C til 30 °C blir det observert en kraftig nedgang i ekstraherte saltløselige proteiner. Fra 30°C til 60°C minker mengden ekstraherte proteiner sakte frem til det ikke blir målt noen saltløselige proteiner ved 60°C. For vannløselige proteiner, er mengden ekstraherte proteiner mer stabile fra 4°C til 30°C. Fra 30°C til 60°C skjer det en signifikant nedgang i mengde ekstraherte proteiner.

Ved å sammenligne figur 4.5.2 og 4.5.1 observeres det at ved å tilsette salt øker løseligheten til saltløselig og vannløselige proteiner ved lave temperaturer, 4°C- 30°C.

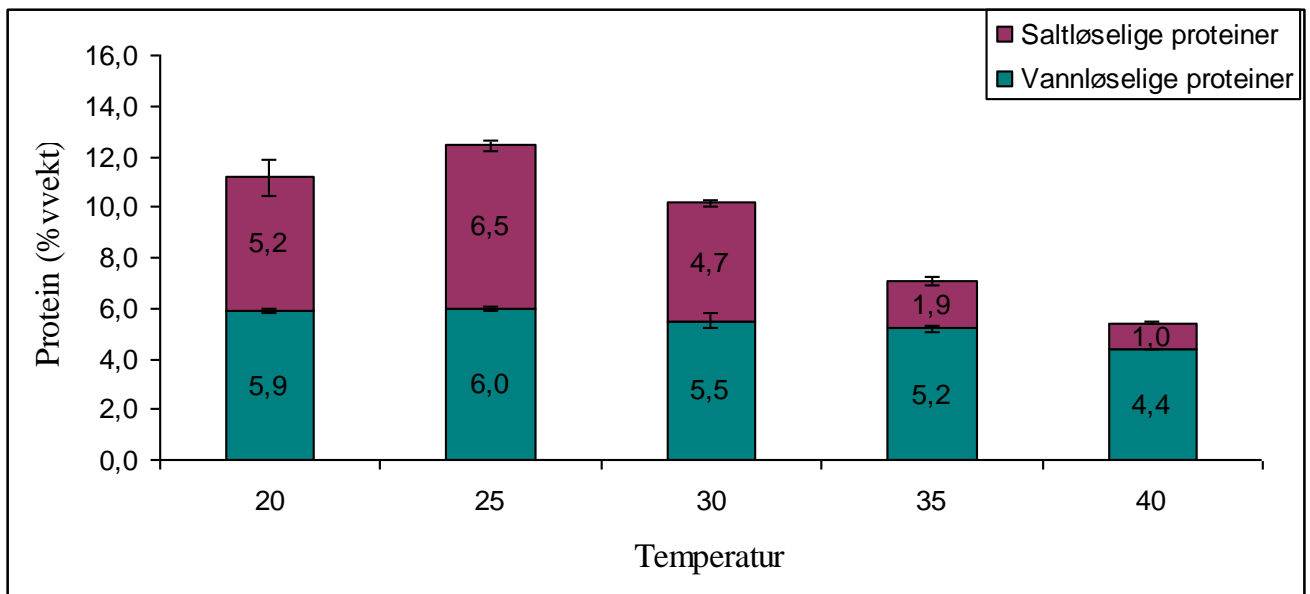
I figur 4.5.3 nedenfor har det blitt gjennomført samme forsøket, bare at det har blitt sett nærmere på temperaturene mellom 20°C og 40°C hvor det skjer store forandringer i proteinløseligheten.



Figur 4.5.3: Laksefarse tilsatt salt. Laksefarsen har blitt varmet opp på vannbad i 10 minutter ved temperaturer mellom 20°C og 40°C. Usikkerheten er oppgitt som standardfeil.

Etter tilsetning av salt i laksefarsen kan man se ut fra figur 4.5.3 at mengden ekstraherte proteiner ligger omtrent på samme nivå som ved laksefarse uten tilsetninger (figur 4.5.1). I figur 4.5.3 er det en betydelig nedgang i ekstrahert saltløselige proteiner fra 20°C til 35°C. Proteinene denatureres lettere ved høyere temperaturer, som forklart i avsnitt 2.4.2 proteindenaturering. For vannløselige proteiner ekstraheres omtrent samme mengde ut for temperaturene mellom 20° og 35°C, men ved 40°C kan det se ut som en nedgang i ekstraherbarheten.

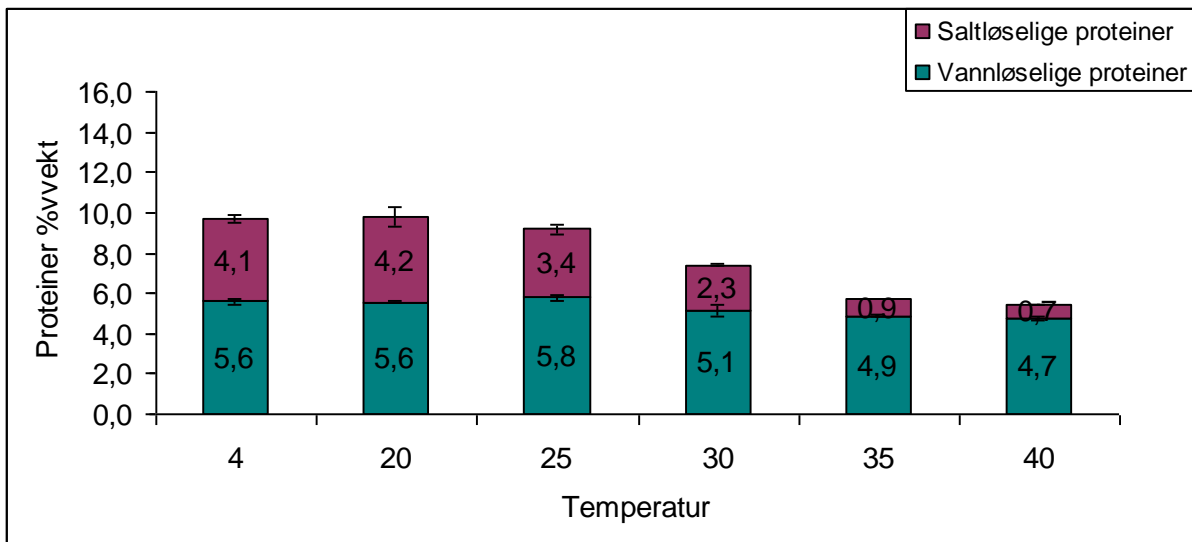
Saltprosenten som ble brukt i dette forsøk ble bestemt på grunnlag av at det ofte er 1% tilsatt salt som er vanlig i produktene som er ute på markedet. Ved eventuelle videre utprøving kan det være interessant å prøve ut lavere saltinnhold. Ved sammenligning av laksfarse uten tilsetninger (figur 4.5.1) og laksefarse med salt (figur 4.5.3) ser man tydelig at 1% salt utgjør signifikant forskjell i løseligheten.



Figur 4.5.4: Laksefarse tilsatt vann. Løseligheten er oppgitt i % vvekt for farse uten tilsatt vann, se utregning i vedlegg. Laksefarsen ble varmet på vannbad i 10 minutter ved temperaturer fra 20°C til 40°C. Usikkerheten er oppgitt som standardfeil.

I figur 4.5.4 vises resultatene for laksefarse tilsatt bare vann hvor proteinløseligheten ble målt. Løseligheten er oppgitt i % vvekt for farse uten tilsatt vann, se utregning i vedlegg F.

Proteinløseligheten ved 30°C og 40°C er ganske like verdiene i figur 4.5.1 ved samme temperaturer. Når resultatene ble så like viser de at det er mulig å bruke fisk fra SALMA til sammenligning. Verdiene er såpass like at man kan si at usikkerheten ved å sammenligne verdiene er veldig liten. Noen av forskjellene i verdiene kan være på grunn av menneskelig feil, som for eksempel unøyaktige målinger eller at det har blitt igjen rester i sentrifugekoppene.



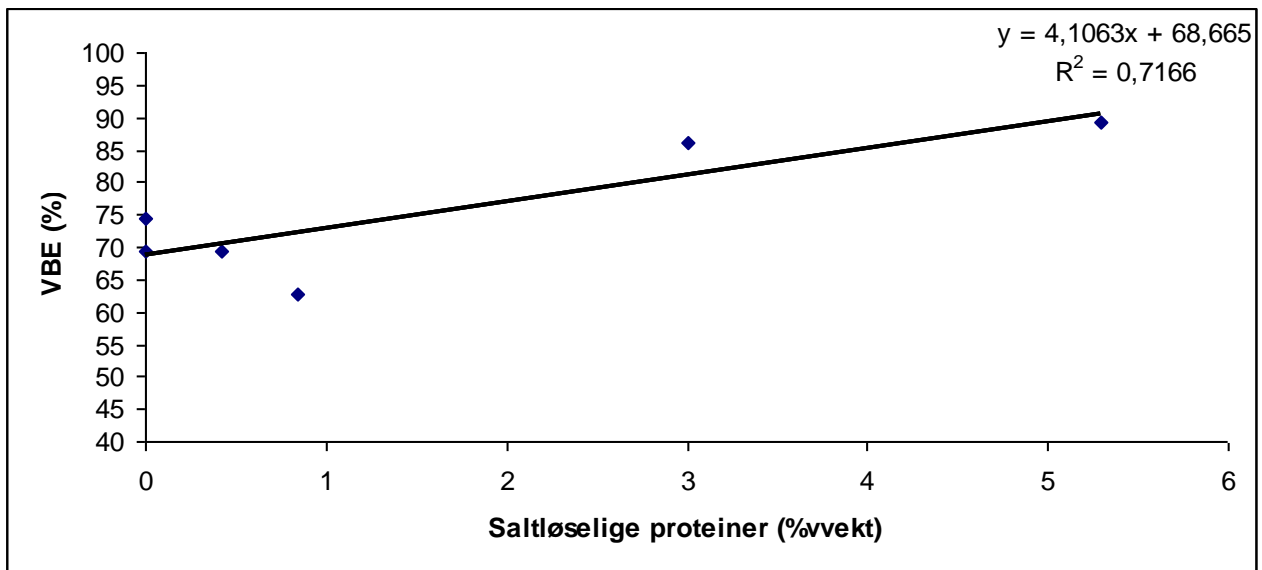
Figur 4.5.5: Proteiner i laksefarsen med lavere pH. pH ble justert fra 6,09 til 6,63 med tilsetning av HCl (1M). Laksefarsen ble varmebehandlet i vannbad i 10 minutter ved temperaturer mellom 4°C og 40°C. Usikkerheten er oppgitt som standardfeil.

I figur 4.5.5 vises resultatene fra proteinekstraksjon for laksefarsen med nedjustert pH. Fra 4°C til 25°C holder mengden ekstraherte proteiner seg stabile, både for saltløselige og vannløselige proteiner. Ved 25°C til 40°C observeres en nedgang i mengde ekstraherte saltløselige proteiner, mens mengden vannløselige proteiner holder seg fortsatt stabil. Sammenlignet med laksefarse tilsatt salt (figur 4.5.3) er mengden ekstraherte proteiner relativt like for alle temperaturene. I likehet med tilsetning av salt, gir lavere pH også redusert løselighet, enn ved laksefarse uten tilsetninger (figur 4.5.1). Løseligheten til proteinene minker ved lavere pH (ved $\text{pH} > \text{pI}$). Dette skyldes at muskelnettverket blir tettere på grunn av mindre elektrostatiske frastøtninger ved pH nærmere pI.

Ved å sammenligne alle figurene (figur 4.5.1-4.5.5) ser det ut som både salt og pH påvirker løseligheten til proteinene like mye. Tilsetning av salt og nedjustert pH utgjør samme effekt på løseligheten til saltløselige proteiner og vannløselige proteiner ved temperaturer over 25°C. Det ser også ut som det er temperaturendringene som utgjør den største forskjellen for løseligheten til proteinene, ut fra den saltkonsentrasjonen og pH verdien som ble valgt i denne oppgaven.

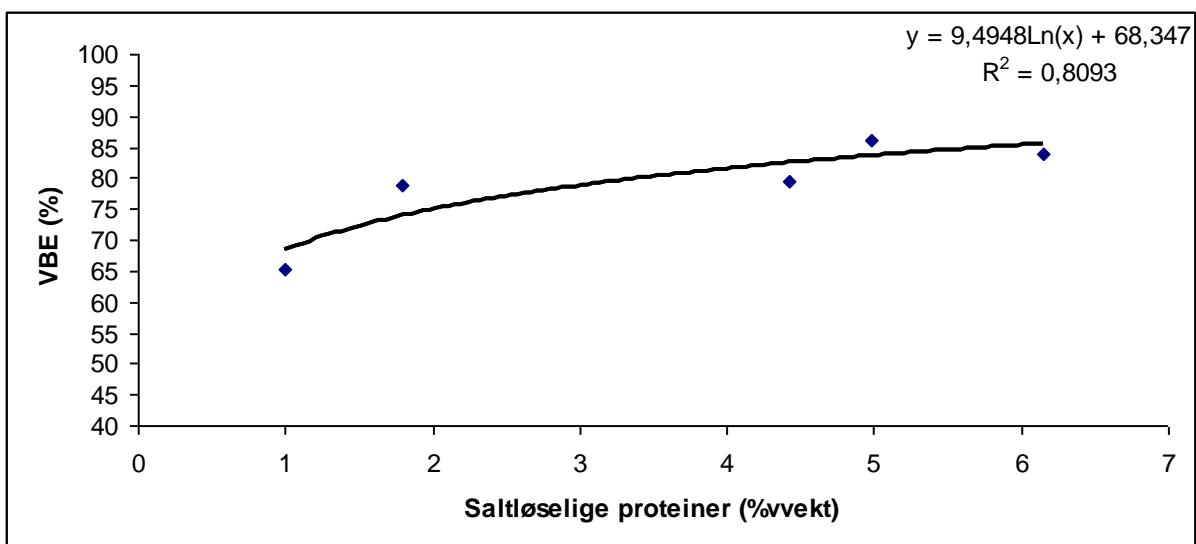
Ut fra resultatene fra figur 4.5.1 til 4.5.5 kan det tyde på at både nedjustert pH og tilsetning av salt kan brukes i lakseprodukter for å få mer stabile proteiner i produktet. De vannløselige proteinene blir ikke så mye påvirket verken av salt, pH eller temperaturendringer (mellom 4°C - 40°C), bortsett fra en liten redusering fra 4°C til 30°C uten tilsetning av salt eller endring i pH.

Figurene 4.5.6-4.5.9 på neste side viser om det er noen signifikant sammenheng mellom VBE og saltløselige proteiner.



Figur 4.5.6: Laksefarse uten tilsetninger: Saltløselige proteiner som en funksjon av vannbindingsevnen. R= 0,85.

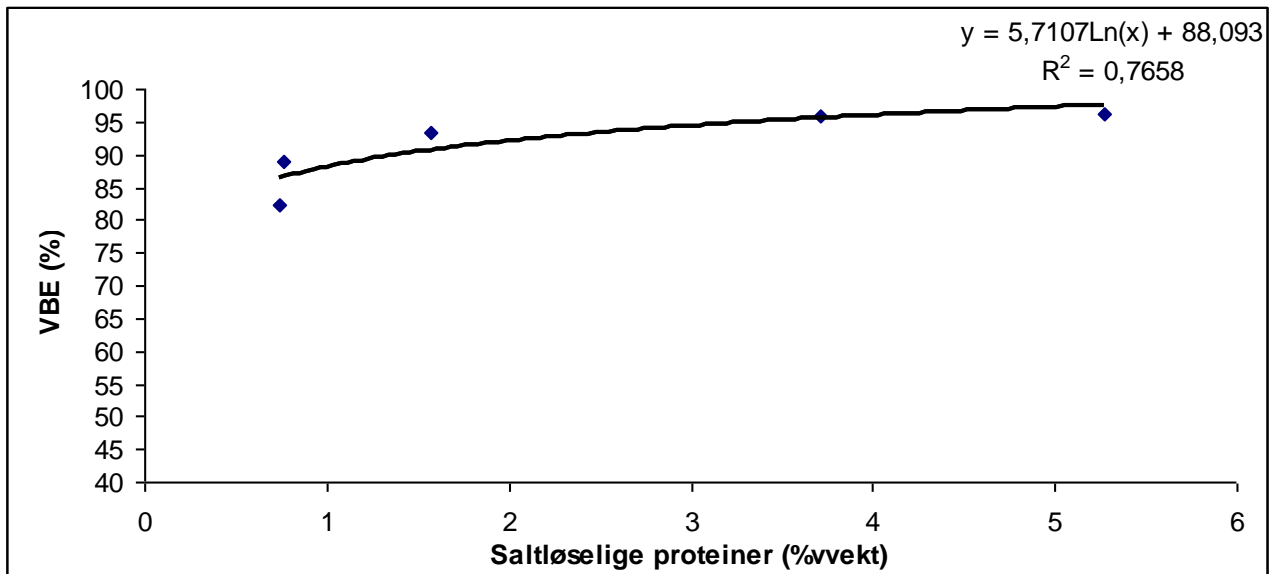
Figur 4.5.6 over viser en sammenheng mellom vannbindingsevnen og mengden ekstrahert saltløselige proteiner for laksefarse uten tilsetninger. Det er stor spredning i punktene ved lave verdier for saltløselige proteiner, men korrelasjonskoeffisienten viser at det er signifikant lineær korrelasjon mellom VBE og saltløselige proteiner.



Figur 4.5.7: Laksefarse med vann: Saltløselige proteiner som en funksjon av vannbindingsevnen. R=0,89.

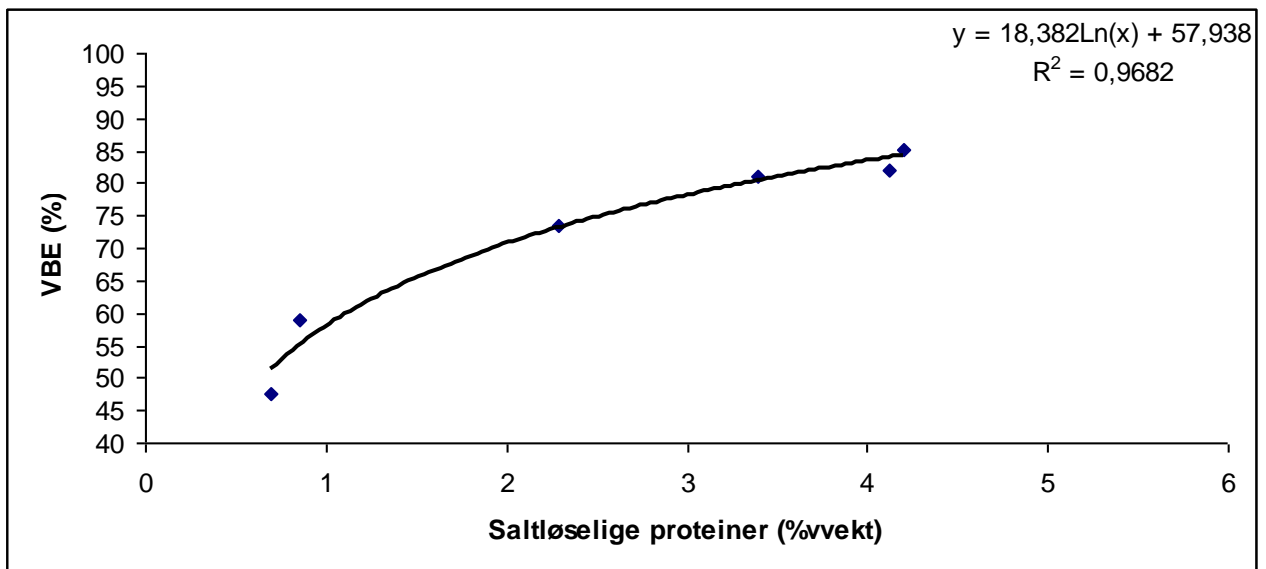
Figur 4.5.7 viser sammenhengen mellom VBE og løseligheten til saltløselige proteiner i laksefarse som er tilsatt vann. Figuren viser en økning i løseligheten til proteinene med

økende VBE. Beregnet korrelasjonskoeffisient viser en signifikant logaritmisk korrelasjon mellom VBE og saltløselige proteiner.



Figur 4.5.8: Laksefarse med salt og vann. Saltløselige proteiner som en funksjon av vannbindingsevnen. $R=0,88$.

Figuren 4.5.8 over viser løseligheten til saltløselige proteiner i laksefarse tilsatt salt/vann i forhold til VBE. Samme som ved figur 4.5.7 for laksefarse med vann, viser også figur 4.5.8 at det er signifikant logaritmisk korrelasjon mellom VBE og saltløselige proteiner.



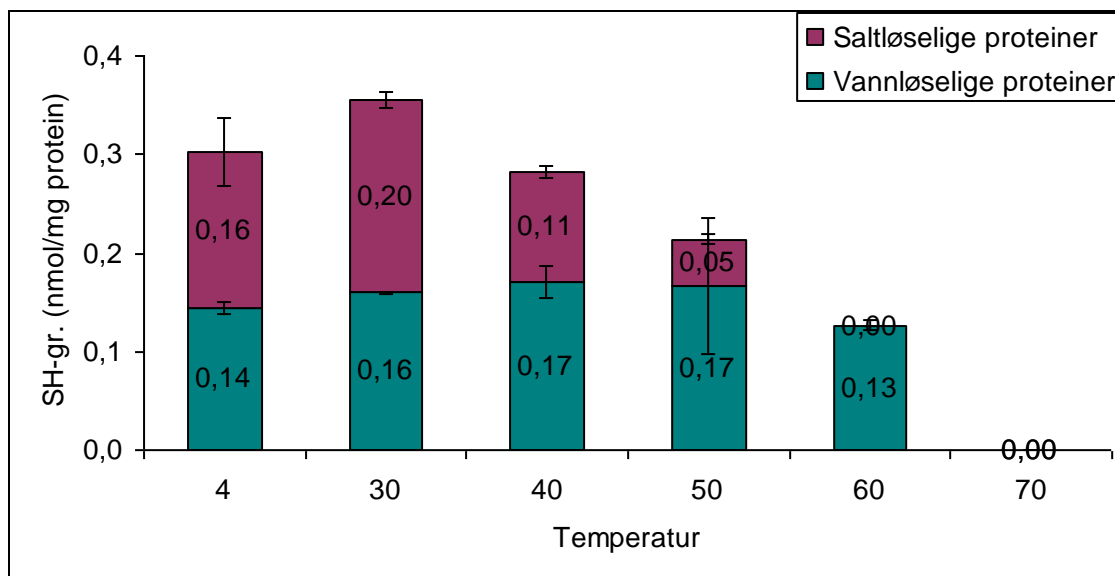
Figur 4.5.9: Laksefarse med nedjustert pH. Saltløselige proteiner som en funksjon av vannbindingsevnen. $R=0,98$.

Figur 4.5.9 viser løseligheten til saltløselige proteiner i laksefarse med nedjustert pH i forhold til VBE. Korrelasjonskoeffisienten viser signifikant logaritmisk korrelasjon mellom VBE og saltløseligheten.

Ved å sammenligne alle kurvene ovenfor (figur 4.5.6-4.5.9) kan det se ut som det er pH som har størst effekt på løseligheten til saltløselige proteiner i forhold til VBE. Tilsatt vann i laksefarsen utgjør ikke så veldig stor forskjell for løseligheten og VBE. Tilsetning av salt ser ut som har en mer stabiliserende effekt på VBE, slik at VBE holder seg relativt stabil ved økende løselighet for saltløselige proteiner.

De ulike VBE ved lav løselighet i laksefarse tilsatt salt og i laksefarse med nedjustert pH, kan skyldes at ved tilsetning av salt dannes et åpent nettverk og vann bindes letter ved at proteinet blir mer hydrofilt med tilføring av Cl^- . Med nedjustert pH danner proteinene et tettere nettverk når pH nærmer seg det isoelektriske punktet til de myofibrillære proteinene. Et tettere nettverk gjør at det blir vanskeligere å holde på vann.

4.6 Kvantifisering av SH grupper



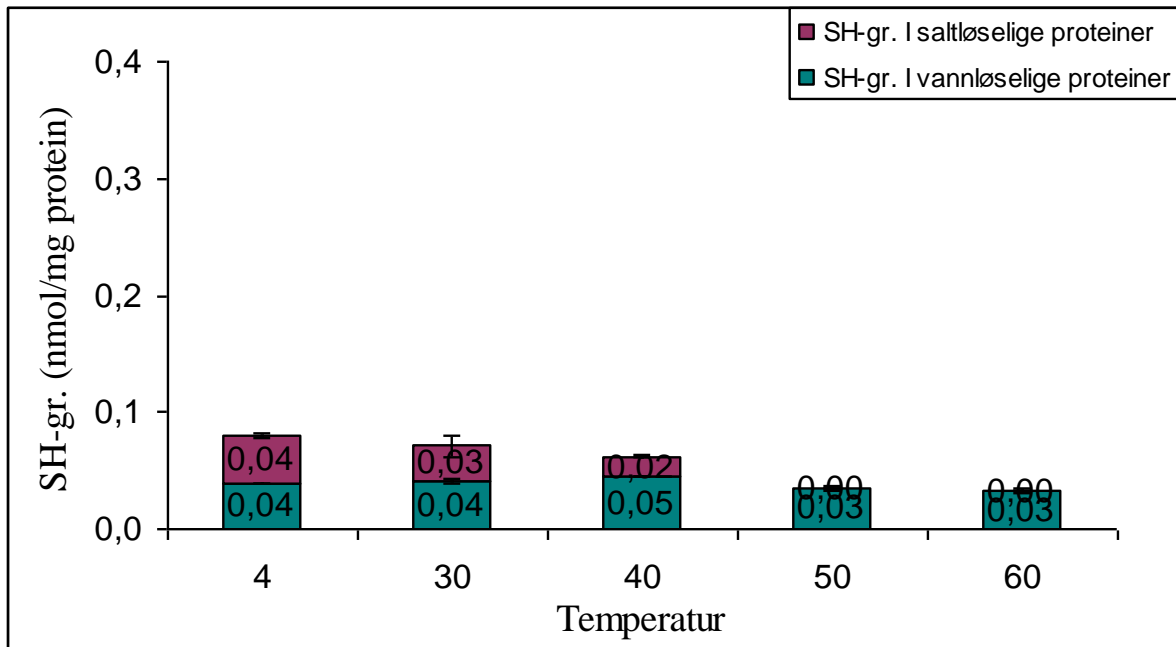
Figur 4.6.1: SH gruppene målt i laksefarse uten tilsetninger. Laksefarsen ble varmet på vannbad i 10 minutter ved temperaturer fra 4°C til 70°C. Usikkerheten er oppgitt som standardfeil.

I figur 4.6.1 vises resultatene fra målt mengde SH grupper i vannløselige og saltløselige proteiner. Mengde SH grupper i vannløselige proteiner holder seg ganske stabil fra 4°C til 50°C. Ved 60°C har det minket noe, mens ved 70°C ble det ikke målt noen SH grupper. Dette skyldes at det ikke ble ekstrahert noen proteiner ved 70°C. I de saltløselige proteinene skjer det en reduisering i mengde SH grupper fra 30°C og ved 60°C blir det ikke registrert noen SH grupper.

Ved å sammenligne figur 4.6.1 og figur 4.5.1 kan man se at begge kurvene har en kraftig nedgang ved 30°C for de saltløselige proteinene. Dette tyder på at proteinene har blitt kraftig denaturert og flere disulfid bindinger har blitt dannet. Den lille økningen som forekommer fra 4°C til 30°C kan være at proteinene starter å utfolde seg og at SH gruppene i proteinet ble mer tilgjengelig. Begge kurvene viser at mengden SH grupper minker ved økende temperatur, både for vannløselige og saltløselige proteiner. Dette kan skyldes at SH gruppene oksideres og danner disulfidbindinger som vil gi en nedgang i proteinløseligheten. Da vil det bli vanskeligere å ekstrahere proteinene.

Vannløselige proteiner er mer stabile i forhold til saltløselige proteiner og vil derfor forvente at verdien for vannløselige proteiner holder seg mer stabile enn verdien for saltløselige proteiner.

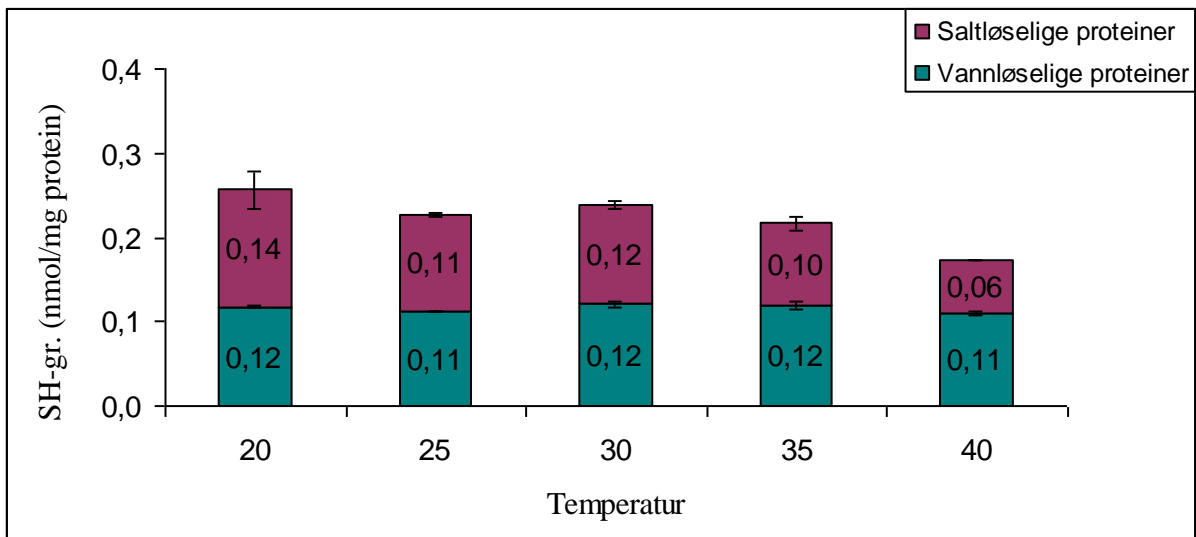
Målingene av SH grupper ble gjort dagen etter proteinløseligheten på grunn av tidspress. Dette kan ha påvirket målingene slik at det har blitt endringer i mengde SH grupper i proteinene.



Figur 4.6.2: Mengde SH grupper målt i laksefarse tilsatt salt og vann. Laksefarsen har blitt varmet på vannbad i 10 minutter ved temperaturer fra 4°C til 60°C. Usikkerheten er oppgitt som standardfeil.

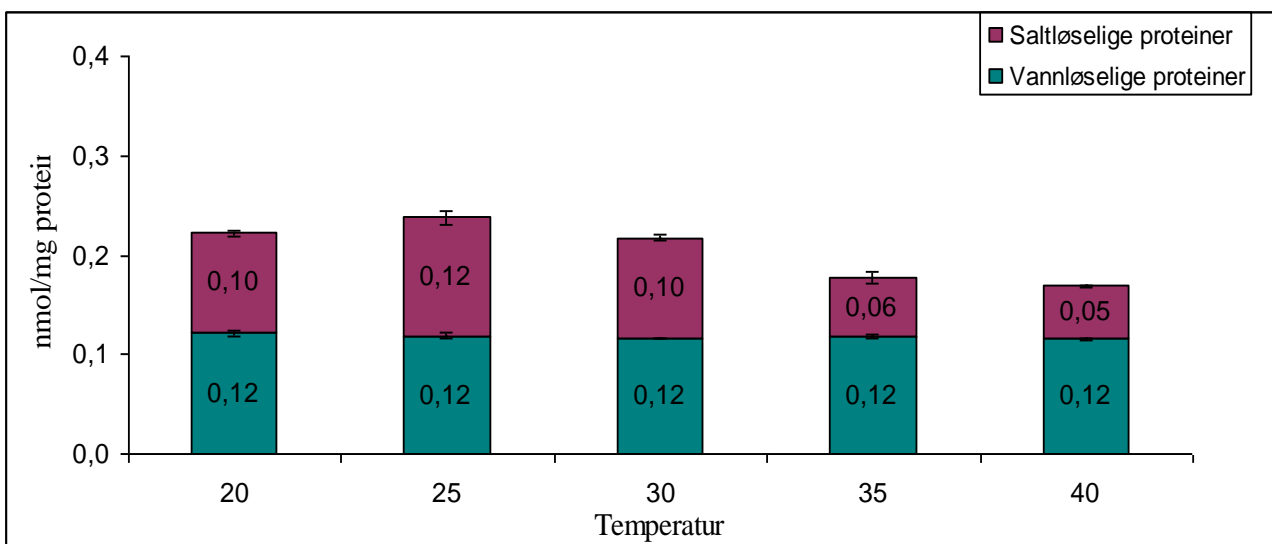
I figur 4.6.2 er resultatene fra målingene av SH grupper i laksefarse tilsatt salt og vann vist. Verdiene ligger lavt fra 4°C, både for vannløselige og saltløselige proteiner. Mengden SH grupper holder seg stabilt frem til 40°C. SH gruppene i de saltløselige gruppene forsvinner helt ved 50°C og 60°C. For SH gruppene i vannløselige proteiner holder mengden seg ganske stabilt i hele temperaturintervallet.

I laksefarsen tilsatt salt og vann ble det målt SH grupper dagen før, samme dag som proteinekstraksjon ble utført. Ved sammenligning av absorbansen målt dagen før, med dagen etter ble det funnet en stor nedgang. Ved 4°C sankt absorbansen med 30-40% og ved 60°C sankt absorbansen mellom 70-90%. Dette utgjør en stor forskjell i SH gruppene som ble målt i laksefarsene. Dette kan forklare hvorfor verdiene i figur 4.6.2 var så veldig lave. Lave verdier kan skyldes oksidering av SH grupper.



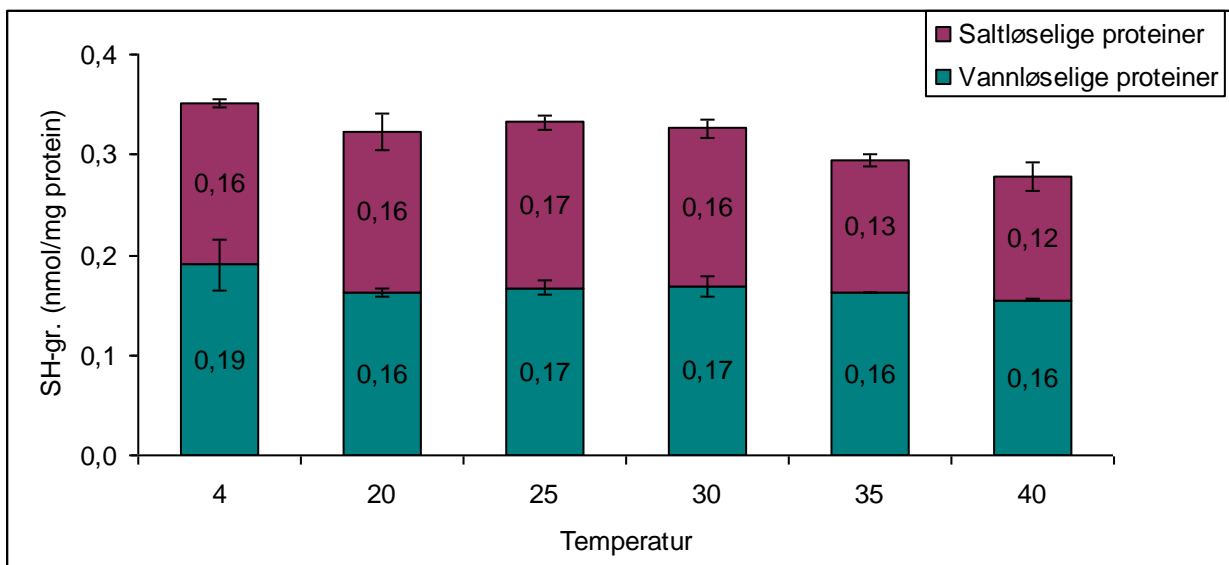
Figur 4.6.3: SH grupper målt i laksefarse tilsatt vann. Varmebehandlet i 10 minutter på vannbad med temperaturer fra 20°C til 40°C. Usikkerheten er gitt som standardfeil.

I figur 4.6.3 vises resultatene fra målingene av SH grupper i laksefarse med tilsatt vann. Målingene som er gjort, både for SH grupper i saltløselige proteiner og vannløselige proteiner, holder seg relativt stabile fra 20°C til 40°C. Mengden SH grupper fra figur 4.6.3, ligger i samme området som mengde SH grupper i laksefarse uten tilsetninger, figur 4.6.1. Dette viser at Salma laksen som ble valgt kan brukes til sammenligninger, da det viser seg at verdiene er relativt like fra gang til gang.



Figur 4.6.4: Mengde SH grupper (nmol/mg protein) målt i laksefarse tilsatt salt og vann. Vannet har blitt fjernet ved utregning. Varmebehandlet i 10 minutter på vannbad med temperaturer fra 20°C til 40°C.

På samme måte som ved laksefarse uten tilsetninger, kan man også se på figur 4.6.4 at SH gruppene i de saltløselige proteinene minker ved økende temperatur, fra 25°C. SH gruppene i de vannløselige proteinene holder seg ganske stabile ved økende temperaturer. Ved å sammenligne figur 4.6.4 med figur 4.6.1 ser man at verdiene er noe lavere for laksefarse med tilsatt salt, enn for laksefarse uten tilsetninger. Saltet som ble tilsatt kan ha gjort proteinene mer stabile slik at de har fått høyere denaturerings temperatur og det har skjedd mindre endringer i proteinstrukturen. Mengden SH grupper vil dermed gi noen lavere verdier enn for laksen som ikke var tilsatt salt. Ved å se på løseligheten til proteinene (figur 4.5.1 og 4.5.4) ser man at løseligheten til laksefarse uten salt er høyere ved 30°C enn for laksefarse med salt med samme temperatur. Dette kan viser at proteinløseligheten ble redusert i laksefarsen tilsatt salt.



Figur 4.6.5: Mengde SH grupper målt i laksefarse med nedjustert pH. Laksefarsen ble varmet på vannbad i 10 minutter ved temperaturer fra 4°C og 40°C. pH ble målt justert til 5,63. Usikkerheten er oppgitt som standardfeil.

Ut fra figur 4.6.5 kan man se at verdiene holder seg ganske stabile både i vannløselige proteiner og i saltløselige proteiner. Proteinene holder seg mer stabile ved pH nærmere det isoelektriske punktet.

For laksefarse med nedjustert pH ble tatt noen målinger for SH grupper samme dag som proteinekstraksjon. Dette viste at absorbansen målt dagen før var 6-20% lavere enn absorbansen målt dagen etter. Prosentforskjellen økte ved økende temperatur for saltløselige proteiner da absorbansen ved 40°C var svært lave.

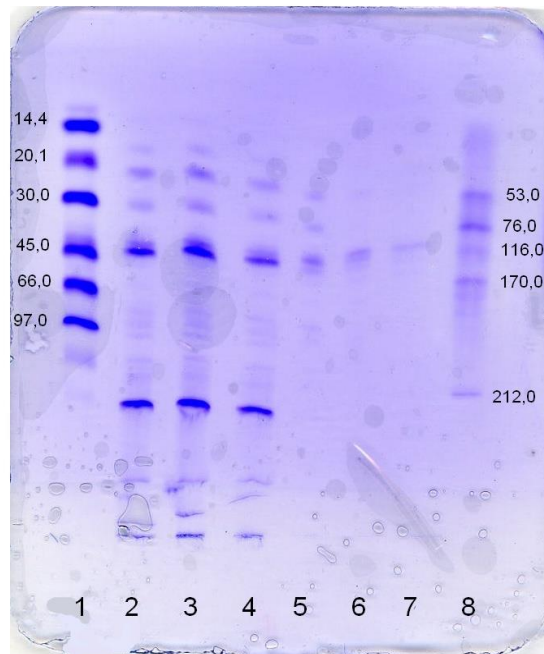
Ved en sammenligning mellom figur 4.6.5 og 4.5.5 kan man se at proteinløseligheten minker for de saltløselige proteinene ved 25°C, men mengden SH grupper blir ikke redusert før 30°C.

Ved å sammenligne alle figurene ovenfor (figur 4.6.1-4.6.5) kan det tyde på at salt påvirker SH gruppene mest, ved at mengden SH grupper blir mest redusert, av faktorene (salt, pH, temperatur). Laksefarsen som var tilsatt salt var også den som hadde størst avvik for absorbansen fra samme dag som proteinekstraksjon og dagen etter. Dette kan skyldes at saltet stabiliserer proteinene og hindrer dem fra å utfolde seg slik at SH gruppene kommer frem.

I figur 4.6.5 er det blitt målt høye verdier av SH grupper sammenlignet med de andre laksefarsene ved 35°C og 40°C. Mens for saltløselige proteiner i figur 4.5.5 ble det målt lave verdier i forhold til lavere temperaturer. Dette tyder på at de saltløselige proteinene ved 35°C og 40°C ble lite oksidert i forhold til proteinene ved lavere temperaturer.

4.7 Phastgel elektroforese

For å se hvilke proteiner som ble ekstrahert, ble det gjennomført gelelektroforese. Det ble kjørt både for saltløselige og vannløselige proteiner, men i dette tilfellet var det de saltløselige proteinene som ble prioritert da det var disse som ga mest interessante resultater. Noen av resultatene er vist i figur 4.7.1-4.7.5. Resten av resultatene er vist i vedlegg H. LMW Std. Og HMW Std er standardene som ble brukt og er standarder med henholdsvis lav molekylvekts proteiner og høy molekylvekts proteiner.



Figur 4.7.1: Saltløselige proteiner i laksefarse uten tilsetninger. Vekten på standardene er oppgitt i kDa. 1) LMW Std., 2) Uten varmebehandling, 4°C, 3) Uten varmebehandling, 4°C, 4) Varmet til 30 °C, 5) Varmet til 40 °C, 6) Varmet til 50 °C, 7) Varmet til 60 °C, 8) HMW Std.

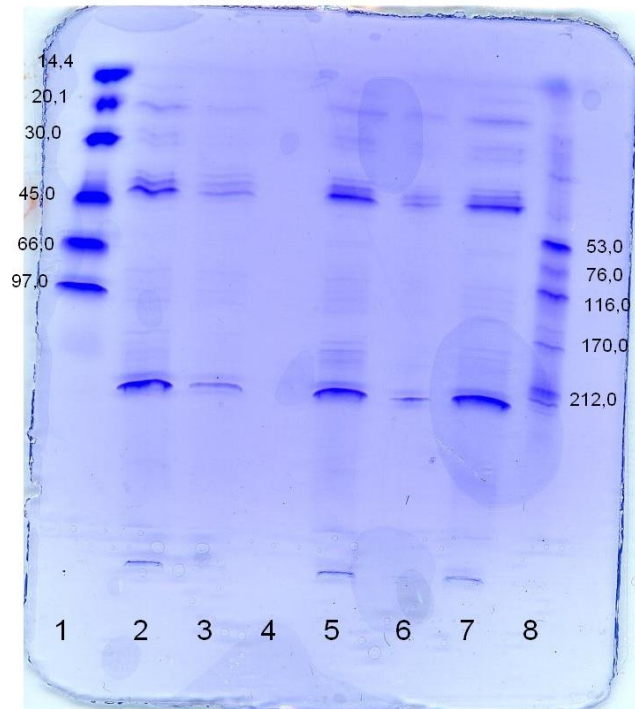
I figur 4.7.1 ovenfor er det vist resultatene av gelen som ble kjørt ved hjelp av elektroforese for laksefarsen uten noen tilsetninger. Man kan tydelig se kraftige bånd ved 212 kDa og 45 kDa i prøve nr. 2,3 og 4. Båndene som vandret til 45 kDa kan det observeres at båndstyrken blir svakere ved prøvenr. 2>3>4>5>6>7. Dette viser at det ble ekstrahert mindre proteiner ved høyere temperaturer. I tabell 4.7.2 nedenfor er båndene blitt forsøkt identifisert. Identifisering er ikke 100% korrekt da båndene i gelen har vandret ved ulik hastighet slik at de kan bli sammenlignet med feil standard og noen bånd er litt utydelige, men tabellen gir en indikasjon på hva båndene kan være.

Tabell 4.7.2: Oversikt over identifisering av proteinene funnet i gelen.

Brønn /Protein (Mw i kDa)	2	3	4	5	6	7
Alkali lett kjede (16,6)						
DTNB- lett kjede (18)/Troponin C (18)						
Troponin I (20,9)	X	X	X	-	-	-
Troponin T (30)	X	X	X	-	-	-
Cap Z α(36)/ Tropomyosin α- enhet (37)						
G-aktin (42)	X	X	X	X	X	X
α- aktinin (100)						
C-protein (128)						
Myosinets tunge kjede (220)	X	X	X	-	-	-

Ved å se på figur 4.7.1 og tabell 4.7.2 kan man se at myosinets tunge kjede er tilstede ved 4°C til 30°C. Når laksefarsen har blitt varmet opp til 40°C har myosinets tunge kjede forsvunnet. Dette stemmer bra i forhold til VBE som ble målt i figur 4.4.1. Mellom 30°C og 40°C hadde VBE en kraftig nedgang. I figur 4.5.1 for proteinløseligheten ble det også observert en kraftig nedgang i proteinløseligheten ved samme temperatur.

G-aktinet i laksefarsen blir ekstrahert ved alle temperaturene, men mengden reduseres en del for temperaturene mellom 40°C til 60°C. For troponin I og troponin T blir det observert små mengder ved 4°C til 30°C.



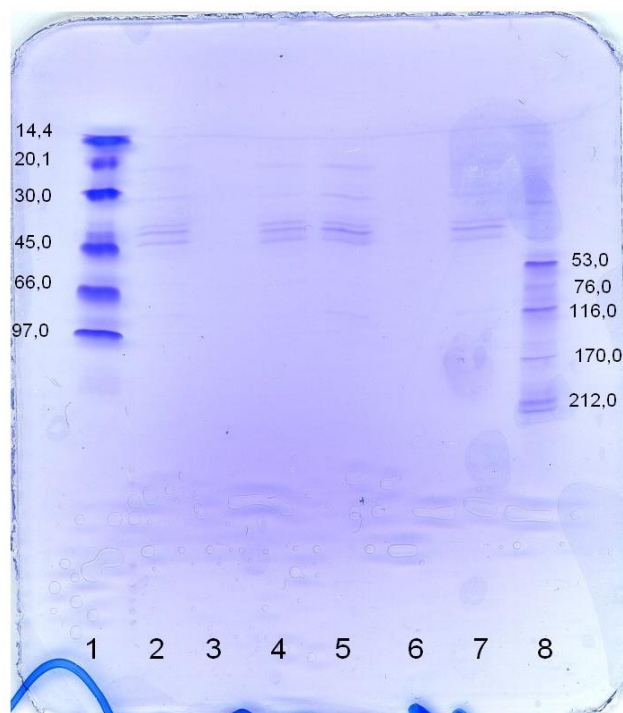
Figur 4.7.3: Saltløselige proteiner, laksefarse varmet til 30 °C. Molvekten på standardene er oppgitt i kDa. 1) LMW Std., 2) laksefarse uten tilsetning, 3) laksefarse med salt og vann, 4) ingen prøve, 5) laksefarse med vann, 6) laksefarse med lavere pH (2. forsøk), 7) laksefarse med lavere pH (1. forsøk), 8) HMW Std.

I figur 4.7.3 vises resultatene for gelelektroforese for laksefarse som ble varmet til 30°C. Alle prøvene viser båndt ved 212 kDa, 45 kDa, 30 kDa (bortsett fra prøve nr. 6) og 20,1 kDa. Båndene i prøve nr. 3 og 6 er mye svakere enn i prøve nr. 2,5 og 7. Dette viser at det har blitt ekstrahert en lavere mengde proteiner for disse prøvene. Ved hjelp av tabell 4.7.4 har båndene blitt forsøkt å identifisere.

Tabell 4.7.4: Oversikt over identifisering av proteinene funnet i gelen.

Brønn /Protein (Mw i kDa)	2	3	4	5	6	7
Alkali lett kjede (16,6)						
DNTB lett kjede (18)/Troponin C (18)						
Troponin I (20,9)	X	X		X	X	X
Troponin T (30,5)	X	X		X	-	X
Cap Z α(36)/ Tropomyosin α- enhet (37)						
G-aktin (42)	X	X		X	X	X
α- aktinin (100)						
C-protein (140)						
Myosinets tunge kjede (220)	X	X		X	X	X

Ved å sammenligne figur 4.7.3 og tabell 4.7.4 viser at alle ekstraktene inneholdt myosinets tunge kjede, G- aktin, troponin T (bortsett fra laksefarse med lavere pH) og troponin I. Dette viser at mange proteiner er mulig å ekstrahere ved 30°C, men ved tilsetning av salt eller ved lavere pH vil det ekstraheres lavere mengder av disse proteinene. Prøve nr.7 inneholder laksefarse med lavere pH som ble gjort i forsøk nr.1 som viser et mye tydeligere bånd enn for pH forsøk nr. 2 som vises i prøve nr. 6. Disse verdiene kan gi noen usikkerheter da HCl som ble tilsatt ikke var blitt ordentlig mikset med farsen og pH ble da forskjellig i farsen.



Figur 4.7.5: Saltløselige proteiner i laksefarse varmet til 40°C. Vekten på standardene er oppgitt i kDa. 1) LMW Std., 2) laksefarse uten tilsetning, 3) ingen prøve, 4) laksefarse med salt og vann, 5) laksefarse med vann, 6) laksefarse med lavere pH (2. forsøk), 7) laksefarse med lavere pH (1. forsøk), 8) HMW Std.

I figur 4.6.5 vises resultatene fra gelelektroforesen for laksefarse varmet ved 40°C. Det er ikke mange bånd som vises, men ved 45 kDa er det et svakt bånd for alle prøvene og ved 30kDa og 20,1 kDa kan det tyde på noen svake bånd. Det er vanskelig å se om båndet er svakere for noen av prøvene, da det allerede er så vidt det vises. Ved å sammenligne båndene fra figur 4.7.5 med tabell 4.7.6 nedenfor, kan båndene forsøkt å bli identifisert. Sølvfarging kunne ha blitt brukt for å få tydeligere bånd.

Tabell 4.7.6: Oversikt over identifisering av proteinene funnet i gelen.

Brønn /Protein (Mw i kDa)	2	3	4	5	6	7
Alkali lett kjede (16,6)						
DNTB lett kjede (18)/Troponin C (18)						
Troponin I (20,9)	X		X	X	-	X
Troponin T (30,5)	X		X	X	-	X
Cap Z α (36)/ Tropomyosin α - enhet (37)						
G-aktin (42)	X		X	X	-	X
α - aktinin (100)						
C-protein (128)						
Myosinets tunge kjede (220)						

Ved å sammenligne figur 4.7.5 og tabell 4.7.6 kan man se at proteinene som har blitt ekstrahert er G- aktin, troponin T og troponin I. Det er blitt ekstrahert betydelig mindre proteiner ved 40°C enn ved 30°C, vist i figur 4.7.3. I tillegg har ikke myosinets tunge kjede blitt ekstrahert i det hele tatt ved 40°C. Det er vanskelig å si om det er noen forskjell mellom tilsetning av salt eller senke pH ved bare å se på båndstyrken da den allerede er for svak til å kunne sammenlignes.

5 Konklusjon

Lipidinnholdet i stekt røkelaks holder seg relativt stabilt ved kjølelagring i 4 uker. Konsentrasjonene av primære- og sekundære oksidasjonsprodukter holdt seg også relativt stabile. For røkelaks oppdelt i skiver ble resultatene noe varierende. Dette viser at stekt røkelaks kan brukes til topping. Imidlertid bør det utføres flere analyser med hensyn på fettlekkasje og utseende etter oppbevaring.

Laksefarsen som ble varmebehandlet ved ulike temperaturer viser også gode resultater med hensyn på bruk i et mulig lakseprodukt. Ulike betingelser som tilsats av salt, reduksjon av pH og ulike varmebehandlingsbetingelser ble prøvd ut. Temperaturer over 35°C-40°C viste seg å gi redusert vannbindingsevne (VBE) i forhold til temperaturer mellom 4°C og 30°C. Ved lave temperaturer (4°C) var proteinløseligheten høyest for laksefarsen uten tilsetninger. Ved å tilsette salt i laksefarsen minket VBE bare med 15 % fra 4°C til 60°C. Nedjustert pH ga lavere VBE, og det ble observert at proteinene ble mer varmesensitive ved lavere pH.

Varmesensitive proteiner kan skape problemer hvis produktet må varmebehandles før salg. For løseligheten til proteinene ble det observert minkende løselighet med økende temperaturer (4°C-40°C) for de saltløselige proteinene, mens de vannløselige viste liten endring. Målingene av SH grupper og proteinløselighet viste at ved å senke pH i laksefarsen, vil mengden oksiderte proteiner være lavere enn ved tilsetning av salt eller uten tilsetninger. Ved å kjøre gel- elektroforese ble det observert at ved 30°C hadde alle prøvene ekstrahert ut myosin og aktin. Laksefarse uten tilsetninger inneholdt større konsentrasjon myosin og aktin. Mens ved 40°C ble det kun observert aktin i laksefarse uten tilsetninger og med salt.

Ut fra resultatene som ble funnet i dette forsøket kan det se ut som at salt fungerer best som tilsetning for å forbedre holdbarheten i et lakseprodukt, spesielt hvis produktet må varmebehandles. Redusert pH hindrer proteinoksidasjon best, men det gjør også proteinene varmesensitive. I tillegg er det vist at stekt røkelaks har potensialet til å fungere som topping på et fiskeprodukt. Likevel er det vanskelig å si hva som må gjøres for å kunne lage et nytt produkt med god holdbarhet bare ved å se på disse resultatene. Videre analyser og prøver bør utføres, det kan også testes ut om det er mulig å kombinere salt og pH. I tillegg må det tas hensyn til det mikrobielle som også må prøves ut før produktet kan lages.

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., (2008) "Molecular Biology of The Cell", 5th ed., Garland Science. s.1965-1050.
- Anderson, M.L., Ravesi, E.M., 1968. "Relation between protein extractability and free fatty acid production in cod muscle aged in ice." *J. Fish. Res. Bd. Can.* 25, 2025-2069.
- Aursand, M., Bleivik, B., Rainuzzo, J.R., Jørgensen, L., Mohr, V. (1994) "Lipid Distribution and Composition of Commercially Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*)" *J Sci Food Agric* 1994, 64, 239-248.
- Autio, K., Kiesvaara, M., Polvinen, K. (1989) "Heat-Induced Gelation of Minced Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*): Effect of pH, Sodium Chloride and Setting" *Journal of Food Science*. V:54, 805- 808.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- Bradford, M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Børresen, T (1980) "Nytutviklede metoder for bestemmelse av vannbindingsevne, saltvansbindingsevne og koketap i fiskemuskel" FTFI-rapport 663.1-7-2 1980, Tromsø
- Eide, O., Børresen, T., Strøm, T., "Minced fish production from capelin (*Mallotus villosus*). A new method for gutting, skinning and removal of fat from small fatty fish species". *J Food Sci* 1082, 47:347-349, 354.
- Ellman, G. L., "Tissue sulfhydryl groups" (1959), *Arch. Biochem. Biophys*, 82,70.
- FAO: "Fresh fish- Quality and quality changes" (1988) *Fisheries and Aquaculture Department*. Kap. 3-5.
- Fennema, O.R (1996). *Food Chemistry*, 3rd ed. , University of Wisconsin-Madison, Marcel Dekker, Inc. New York Basel. S. 225-431, 879-943.
- Hall, G. M., (2011) " Kap. 3: Preservation by Curing (Drying, Salting and Smoking)" *Fish Processing- Sustainability and New Opportunities*, 1st ed. Blackwell Publishing Ltd.

- 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.
- Hultmann, L., Rørå, A. M. B., Steinsland, I., Skåra, T., Rustad, T., (2003) "Proteolytic activity and properties of proteins in smoked salmon (*Salmo Salar*)- effects of smoking temperature". *Food Chemistry* 85 (2004) s. 377-387
- Ke, P.J., Woyewoda, A.D., 1979. "Microdetermination of thiobarbituric acid values in marine lipids by a direct spectrophotometric method with a monophasic reaction system." *Anal. Chim. Acta* 106, 279-284
- Kim, C.E, (2009) "Determination of Protein and Lipid Oxidation by Near-Infrared Spectroscopy", Institutt for Bioteknologi, NTNU
- Ko, W. C., Yu, C. C., Hsu, K. C. (2006). "Changes in conformation and sulhydryl groups of tilapia actomyosin be thermal treatment". *LWT* 40 (2007) s.1316-1320.
- Laemmli, U.K., 1970. "Cleavage and structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227, 680-685.
- Licciardello, J.J., Ravesi, E.M., Lundstrom, R.C., Wilhelm, K.A., Correia, F.F., Allsup, M.G., 1982. "Time-Temperature Tolerance and Physical-Chemical Quality Tests for Frozen Red Hake." *J. Food Qual.* 5, 215-234.
- Lynum, L. (1994), *Fisk som råstoff*, Tapir Akademisk Forlag.
- Nelson, D., Cox, M.,M. (2008) *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York. S. 176-178.
- 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*, Vol. 12 (1993), s. 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." *Lebensm.- Wiss. U. – Technol.*, 28,329-339.
- Opstvedt, J., Miller, R., Hardy, R.W., Spinelli, J.,(1984) "Heat-Induced Changes in Sulhydryl Groups and Disulfid Bonds in Fish Protein and Their Effect on Protein and Amino Acid Digestibility in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*)."*J. Agrio food Chem.*92,930-937.
- Pan, J., Shen, H., You, J., Luo, Y. (2009) "Changes in Physiochemical properties of myofibrillar protein from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during heat treatment", *Journal of Food Biochemistry* 35 (2011) 939-952.

- Pharmacia LKB Biotechnology ”PhastSystem™, Development Technique File No. 200, Fast coomassie staining.”
- Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P., Jackson, R., (2011) *Campbell Biology*, 9th ed. Pearson, S.: 1150-1155.
- Riddles, R. W., Blakeley, R. L., Zerner, B., ”Reassessment for Ellman’s reagent (1983)”, *Methods in enzymology*, 91,8.
- Rustad, T. (2005) ”Muskelvevet i kjøtt og fisk”, institutt for bioteknologi.
- Rustad, T., Padget, E., Halvorsen, J. (1993) ”Vannbinding i fiskemuskel”
Forskningsprosjekt 1902-301.033, Norges Fiskeriforskningsråd, Trondheim: NTNU, Institutt for bioteknologi.
- Rørå, A. M. B., Birkeland, S., Hultmann, L., Rustad, T., Skåra, T., Bjerkeng, B. (2004), ”Quality characteristics of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets high in soybean or fish oil as affected by cold-smoking temperature”, *LWT* 38 (2005) 201-211.
- SALMA, ”SALMA, fresh Salmon” Nedlastet:29.11.2013 fra www.salma.no
- Semb, T.N (2012) ”Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils”, Institutt for Bioteknologi, NTNU
- Skipnes, D., Johnsen, O., Skåra, T., Sivertsvik, M., Lekang, O. (2011) ”Optimization of Heat Processing of Farmed Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Muscle with Respect to Cook Loss, Water Holding Capacity, Color and Texture” *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 20:331-340, 2011
- SNL: Store Norske Leksikon (2005-2007), ”Salting”. Nedlastet den 28.11.2013 fra: snl.no/salting.
- Sohn, J. H., Ohshima, T., (2011) ”Kap. 8, Lipid oxidation, odour, and colour of fish flesh.” *Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications*, Edited by Cesarettin, Alasalvar, Fereidoon, Kazuo Miyashita and Udaya Wanasundara, 2011 Blackwell Publishing Ltd.
- Taylor, J.R (1997) *An introduction to error analysis*, Appendix A og Appendix C. Sausalito, California, USA, University Science books.
- Undeland et al. (1991) ”Bestemmelse av PV med ferrothiocyanatmetoden etter ueda et al (1986) og idf standard 174A:1991.

- Varmbo, G., Skåra, T., Olsen, S. O., Sivertsvik, M., (2001) "Modelling of Water Holding Capacity (WHC) in Ground Atlantic Salmon (*Salmo salar*), as affected by Heat, pH, and Salt Content" NORCONSERV.

- Videler, J.J (2011) "An opinion paper: emphasis on white muscle development and growth to improve farmed fish flesh quality" *Fish Physiol Biochem.*, 37(2):337-43

Vedlegg A

Beregne t-verdi

Ved beregning om to verdier var signifikant, ble formelen (A-1) brukt. t-verdien som ble beregnet ble sammenlignet med tabellen i Appendix A i Taylor (1997).

$$t = \frac{|A-B|}{\sqrt{a^2+b^2}} \quad \text{A-1}$$

hvor A og B er gjennomsnittsverdien for de to resultatene som skal sammenlignes,

a er empirisk standardavvik av A, og b er empirisk standardavvik av B.

$\sqrt{a^2+b^2}$ er usikkerheten i standardavviket av resultatene som skal sammenlignes. Et 95% konfidensintervall ble brukt.

Vedlegg B

Beregning av lipider

Ekstrahering av lipid og beregning av totalt lipidinnhold

Modifisert utgave av: Bligh, E.G., Dyer W.J (1959). A rapid method of total lipi extraction and purification. Canadian J. Biochem. 37:911-917.

- 1) 5-10 g prøve (noter nøyaktig vekt, 2 desimaler)

Tilsett

16 ml H₂O/

40 ml MeOH/

og 20,0 ml CHCl₃ Homogensiser i 2 min

Ved all homogenisering holdes sentrifugekopper på is i avtrekk. dette for å minimalisere avdamping og øke nøyaktigheten

Tilsett 20,0 ml CHCl₃ og homogeniser i 40 sek.

Tilsett 20 ml H₂O, homogeniser i 40 sek.

Sentrifuger ved 5000 rpm i 10-15 minutter

Pipetter ut det underste laget (kloroformfasen).

For å bestemme totalt lipidinnhold, ta straks en nøyaktig mengde av kloroformfasen (f.eks 2,0 ml) over i et veid reagensrør. Kloroformen dampes av på varmeblokk (60°C) og med tilførsel av N₂-gass. Etter avkjøling i eksikator (minst 1 time), veies røret med fett og % lipid beregnes av innveid prøve.

Resten av kloroformfasen kan dampes inn for andre undersøkelser - dette gjøres på rotavapor i avtrekk. Oppsamlet kondensat avhendes som løsemidler med halogener.

Metoden kan skaleres ned.

Beregning av lipidinnhold:

$$a*b*100/(c*v)$$

a= g inndampa fett, b= tilsatt ml kloroform, c= ml inndampa kloroform og v= innveid g prøve.

Verdiene er vist i tabell B-1.

Tabell B-1: Tabellen viser mengde lipider som ble målt ut av hver prøve. Mengde laks og lipid er oppgitt i gram. Mengde kloroform som ble tilsatt var 40 ml og mengde kloroform som ble dampet inn var 2 ml.

	OPPVEID LAKS	LIPID	LIPID	LIPID	LIPID INNHOOLD (%)	LIPID INNHOOLD (%)	LIPID INNHOOLD (%)	SNITT (%)
SS FERSK	8,1903	0,148	0,0643	0,0545	36,14	15,70	13,31	14,5
SS NYSTEKT	10,773	0,1517	0,154	0,152	28,16	28,59	28,22	28,3
SS 1 UKE	9,1922	0,0969	0,1053	0,1063	21,08	22,91	23,13	22,4
SS 2 UKER	10,0679	0,1552	0,1525		30,83	30,29		30,6
SS 3 UKER	9,0952	0,0908	0,0922	0,0928	19,97	20,27	20,41	20,2
SS 4 UKER	9,3029	0,1518	0,1305	0,1318	32,63	28,06	28,34	29,7
GK FERSK	9,4586	0,0327	0,034		6,91	7,19		7,1
GK NYSTEKT	12,685	0,1285	0,1394	0,1682	20,26	21,98	26,52	21,1
GK 1 UKE	10,4546	0,1182	0,0992	0,0995	22,61	18,98	19,03	20,2
GK2 UKER	9,6231	0,0974	0,0986		20,24	20,49		20,4
GK3 UKER	9,8443	0,0263	0,0852	0,084	5,34	17,31	17,07	17,2
GK4 UKER	9,9022	0,1024	0,099	0,0924	20,68	20,00	18,66	19,8

Vedlegg C

Bestemmelse av PV

Bestemmelse av PV med Ferrothiocyanatmetoden etter UEDA et al (1986) og IDF-standard 174A:1991 som beskrevet av Underland et al.

Prinsipp:

Hydroperoxidene i fett oksiderer Fe(II) til Fe(III). Fe(III) reagerer videre med ammoniumthiocyanat ved oppbygging av et rødt kompleks som har sitt abs-max ved 500 nm.

UTFØRELSE

A) Analyse av prøver

- Løs opp fett i iso-hexan til en konsentrasjon av minst 20mg/ml (avhengig av hvor oksidert fett er)
- Mål opp 10 ml 95% etanol i et stort prøverør (slik at det er god plass til miksing)
- Tilsett 200 µl prøveløsning (fett i iso-hexan)
- Tilsett 200 µl 30%- ig ammoniumthiocyanatløsning
- Tilsett 200 µl Fe (II)- løsning (se nedenfor)
- Miks i 15 sekunder på vortex, vent så i 2 minutter og 15 sekund
- Mål absorbansen ved 500 nm mot kyvette med ren 95% etanol.

A) ANALYSE AV BLANK

Gjør det samme som i forsøk A), men erstatt de 200 µl prøveløsning med 200 µl ren isohexan. OBS! Det er viktig at det hele tiden blir brukt samme iso- hexan. Vi har erfart at forskjellige flasker kan gi ulike abs, dvs. blank-analysen må gjøres på samme iso- hexan som prøven løses i!

B) STANDARDKURVE BASERT PÅ Fe(III)

Gjør en standardkurve fra 0 til 20 µg Fe(III)

- Mål opp 10 ml 95% etanol i 5 prøverør
- Tilsett 200 µl iso- hexan i hvert prøverør
- Tilsett 0-200 µl av en 100 µg/ml Fe(III) løsning i de fem rørene og

1. 200 µl Fe(III)
2. 150 µl Fe(III) + 50 µl 3,5% HCl
3. 100 µl (Fe(III) + 100 µl
4. 50 µl (Fe(III) + 150 µl
5. 100 µl 3,5% HCl

- Tilsett 200 µl ammoniumthiocyanat
- Miks i 15 sek. vent i 2 min og miks i 45 sek
- Mål abs ved nm
- Lag en kurve og beregn stigningskoeffisient

C) BEREGNING AV PV

$$PV = (Abs_{\text{prøve}} - Abs_{\text{blsnk}}) * L * (\text{mengde iso-hexan}) / 55,84 * m_0 * 2 * 0,2$$

L = stigningskoeffisient std-kurve (OBS: µg Fe(III)/absenhet)

m₀ = analysert mengde fett (g)

55,84 = atomvekt jern

Denne metoden gir PV i meq peroksider/kg.

LØSNINGER

Vei opp 30 g ammonium thiocyanat (pro analysi), bland opp til 100 ml med destillert vann, løs opp med magnetrøring og eventuelt varme (hvis vanskelig løsbar)(holdbart i en uke).

Fe(II)løsning

Vei i 40mg Fe(II)klorid-tetrahydrat (pro analysi), bland i 10 ml 3,7% HCl (holdbart i en uke).

Fe(III)løsning

Bland en ampulle Iron standard (Trisol prod nr. 1.09972, Merck) til 1000 ml 3,5% HCl, noe som gir en konsistens av 1mg/ml. Bland videre 1:10 i 3,5% HCl som gir en konsentrasjon på 100 µg/ml, bruk denne blandingen som std-kurve. Denne løsningen er stabil i flere måneder.

[1][2,3]

[1] Ueda S, Hayahashi M, Namiki M. Effect of ascorbic acid in a modell food system. Agric Biol Chem. 1986;50:1-7

[2] Dairy FI. International IDF Standard 74A, 1991.

[3] Underland I, Stading M, Lignert H. Influence of skinning on lipid oxidation in different horizontal layers of herring (*Clupea harengus*) during frozen storage. J Sci Food Agric. 1998;78:441-50.

Beregnet PV- verdier

Tabell C-1: Oversikt over målte og beregnet verdier for PV. SS 0 er Sotra Seafood laksen som var nystekt, SS1 etter 1 uke osv. GK er Godt Kjøp laksen. PV er oppgitt i mEq peroksider/kg.

	Oppveid fett(g) 1	Oppveid fett (g)2	PV (abs)	PV (abs)	isohexan (ml)	isohexan (ml)	Beregnet PV 1	Beregnet PV2	Snitt PV
SS 0	0,1589	0,3187	0,211	0,233	3,975	3,465	8,200	4,039	6,1
SS 1	0,1053	0,1063	0,311	0,309	2,555	2,655	11,548	10,556	11,1
SS 2	0,1746	0,1844	0,342	0,331	4,365	4,61	7,302	6,693	7,0
SS 3	0,093	0,092	0,268	0,284	2,325	2,3	9,776	10,566	10,2
SS 4	0,1129	0,1121	0,245	0,218	2,82	2,805	9,875	8,551	9,2
GK 0	0,1153	0,1145	0,292	0,292	2,88	2,86	12,208	12,208	12,2
GK 1	0,1134	0,1132	0,358	0,341	2,835	2,83	8,187	7,246	7,7
GK 2	0,1081	0,1534	0,402	0,405	2,705	3,835	10,630	10,787	10,7
GK 3	0,0809	0,0815	0,441	0,428	2,025	2,035	12,794	12,044	12,4
GK 4	0,0843	0,099	0,255	0,233	2,11	2,475	10,393	9,288	9,8

Det ble brukt tre ulike standardkurver til dette forsøk og er derfor ikke tatt med i vedlegg.

Tabell C-2 viser omgjøring av Fe^{3+} som ble gjort om til 0,1 mg/ml Fe^{3+} som ble brukt i standardkurven.

Tabell C-2: Omgjøring av Fe^{3+} i μL til 0,1 mg/ml Fe^{3+} .

$\mu\text{L Fe}^{3+}$	0	50	100	150	200
$\mu\text{L 3,7\% HCl}$	200	150	100	50	0
$\mu\text{g Fe}^{3+}$	0	5	10	15	20

Vedlegg D

Bestemmelse av TBARS

Bestemmelse av TBARS (mikro)

FORMÅL/OMFANG:

Bestemmelse av Thiobarbitursyreverdi, i forhold til harskning av fett.

GJENNOMFØRING:

1) Løsninger:

0,04M TBA-stock-løsning: Løs 2,88g 2-thiobarbitursyre (TBA) i 50 ml dest.vann i en 500 ml målerkolbe og fortynn til riktig volum (500 ml) med eddiksyre.

Det er nødvendig med kraftig røring.

0,3M Na₂SO₃: 18.91g Natriumsulfitt fortynnes til 500 ml med dest. vann.

0,28M TCA: 22,87 g trikloreddiksyre fortynnes til 500ml med dest. vann.

Standard: TEP (1.1.3.3 tetraethoxypropane).

0,22g TEP løses i 100 ml dest. vann (0,01M).

Løsningen fortynnes videre i forholdet 1:100 (0,1mM)

TBA- arbeidsløsnins. (blandes max 30 min. før analyse):

180 ml TBA- stock løsning, 120 ml kloroform og 15 ml natriumsulfitt- løsning.

2) Utførelse

Vei inn ± 10 mg olje, (nøyaktig vekt), i et helt tett kimax-rør. (mengde innveid olje vil variere etter hvor oxidert oljen er).

Tilsett 5 ml TBA- arbeidsløsning. Rist 10-15 sek på en vortex- mikser for å få løst oljen.

Inkuber rørene i kokende vannbad i 45 min.

Avkjøl så rørene i kaldt vann. Sett til 2,5 ml TCA- løsning og bland ved å snu rørene opp- ned. Sentrifuger i 5-10 min ved 2500 rpm for å få skilt den rosa vannfasen fra kloroformfasen.

Mål absorbansen ved 538 nm i 10 mm kyvetter og kalkuler TBA- verdien. (Dest vann brukes som referanse).

Ved for høye avlesninger, kan vannfasen fortynnes med 55% løsning av eddiksyre i vann.

En standardkurve lages ved å måle ut kjente konsentrasjoner av TEP. Som behandles på samme måte som oljeprøvene. (bruk f.eks: 0,25,50,100,150 og 200 µl av en 0,1mM TEP løsning).

3) Viser til: *Analytica Chimica Acta* 106, (1979) 279-284.

Microdetermination of Thiobarbituric acid values in marine lipids by direct spectrophotometric method with a monophasic system P.J Ke and A.D. Woyewoda.

Modifikasjoner: Alle mengder halveres i forhold til originalen ved utføring av metoden.

Tabell D-1: Oversikt over målte og beregnet verdier for TBARS. SS 0 er Sotra Seafood lasken som var nystekt, SS 1 er etter en uke osv. GK står for Godt Kjøp laksen. Konsentrasjonen er oppgitt i µM TBARS/g fett. * Fortynnet med eddiksyre (1:1).

	Vekt1	Abs1	Vekt2	Abs2	Kons. 1	Kons. 2	Snitt kons.
SS 0	0,0109	0,124*	0,0166	0,231*	2,532	3,179	2,9
SS 1	0,0099	0,134	0,0104	0,072*	1,637	0,831	1,2
SS 2	0,0123	0,128*	0,012	0,131*	2,263	2,376	2,3
SS 3	0,0108	0,121	0,0108	0,146*	1,353	3,272	2,3
SS 4	0,0113	0,133*	0,0139	0,204*	2,629	3,339	3,0
GK 0	0,0152	0,18*	0,0106	0,116*	2,682	2,426	2,6
GK 1	0,0117	0,126*	0,0116	0,149*	2,340	2,811	2,6
GK 2	0,0099	0,138*	0,0114	0,125*	3,041	2,382	2,7
GK 3	0,0103	0,093*	0,0107	0,101*	2,176	2,277	2,2
GK 4	0,0105	0,079*	0,0105	0,072*	1,620	1,463	1,5

Konsentrasjonen i tabell x.x ble beregnet ved hjelp av ligning x.x

$$\mu\text{M TBARS/g fett} = (A-b)/(a \times m \times 1000)$$

D-2

hvor, A er absorbansen målt for fett i prøven, a er stigningstallet for standardkurven, b er kryssningspunktet med y-aksen i standardkurven, m er mengde veid fett (g) og 1000 er for å omregne til µM/g.

I dette forsøket ble det brukt tre ulike standardkurver med ulike løsninger.

Omgjøring av TEP standard er vist i tabell D-3.

Tabell D-3: Oversikt over omgjøring av TEP verdiene fra μL til nmol. Standardkurven ble basert på 0,1mM TEP.

μL TEP	0	25	50	100	150	200
μL H ₂ O	200	175	150	100	50	0
n TEP (nmol)	0	2,5	5	10	15	20

Vedlegg E

VBE

VANNBINDINGSEVNE.

Vannbindingsevne er en av de funksjonelle egenskaper som benyttes for å karakterisere fiskeråstoff og fiskeproteiner i forbindelse med foredling av fisk. Vann spiller en meget viktig rolle i alle fysiske, kjemiske og biologiske prosesser både i levende organismer og i vevet etter døden. Ved bearbeidelse av muskelvev (dvs. kjøtt og fisk) for produksjon av næringsmidler vil det derfor være av stor betydning å fremskaffe informasjon om hvor mye vann muskelvevet inneholder og på hvilken måte vannet er bundet i vevet. Når det gjelder et råstoffs funksjonelle egenskaper som f.eks. konsistensdannelse, speingsevne osv. er det særlig vekselvirkninger mellom vann og protein som er av betydning. Det vil igjen si at det er proteinenes funksjonelle egenskaper som er avgjørende. Det totale vanninnhold i muskel måles vanligvis gravimetrisk etter tørking av en prøve i varmeskap ved 105 °C til konstant vekt er oppnådd. Filet fra mager fisk inneholder fra 78-83% vann mens filet fra fet fisk inneholder fra 54-80% vann. Det totale vanninnhold gir imidlertid liten informasjon om de funksjonelle egenskapene. Analyseverdier som gir uttrykk for på hvilken måte vannet er bundet i vevet vil derimot ofte gi verdifull kunnskap om de funksjonelle egenskapene. I denne forbindelse brukes ofte uttrykk som »fritt vann», »løst bundet vann», »fast bundet vann», hydratvann osv. Når vi måler vannbindingsevne (sammenligner vannbindingsevne for ulike råstoff), måler vi på det vannet som karakteriseres som fritt vann eller løst bundet vann.

Gjennomføring:

Fiskemuskelens evne til å holde på vann (egen vevsvæske) bestemmes etter trykkpåkjenning ved sentrifugering. Metoden er utviklet ved FTFI i Tromsø av T. Børresen. En skisse av prøveholder med sentrifugerør er vist i figuren under.

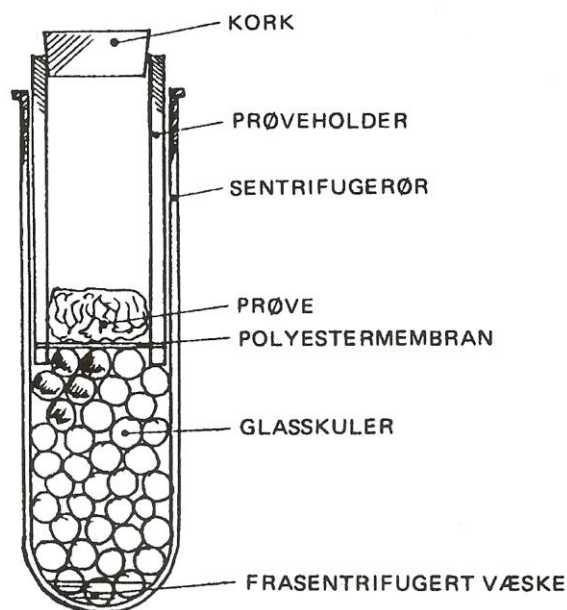


Fig. 1. Sentrifugerør med prøveholder for bestemmelse av vannbindingsevne i fiskemuskel.

VANNBINDINGSEVNE I FISKEMUSKEL

Utstyr: Skalpell, kniv
 Kjøttkvern
 MSE-bordsentrifuge
 Analysevekt
 Prøveholdere i perspexplast
 Sentrifugerør halvveis fylt med glasskuler, 5mm diameter

Prinsipp: Fiskemuskelens evne til å holde på egen vevsvæske bestemmes etter trykkpåkjenning ved sentrifugering.

Prosedyre:

- 1) Fisk fileteres og avskinneres
- 2) Filet males 3 ganger i kjøttkvern
- 3) Prøver av fiskemasse veies opp for tørrvektsbestemmelse
- 4) Vei opp ca. 2 g fiskemasse i hver av 4 prøveholdere. Noter nøyaktig vekt
- 5) Plasser prøveholdere i sentrifugerør og sentrifuger i 5 min., hastighet 1500 rpm (210xg)
- 6) Vei prøveholdere etter sentrifugering
- 7) Tørrvekt av fiskemasse før sentrifugering bestemmes ved tørking i varmeskap ved 105 °C i 24 timer.
- 8) For fete fisker bestemmes fettinnholdet i prøven ved soxlet eller Bligh & Dyer.

Ved analyse av maskinseparert fiskemasse o.l., begynn på pkt 3.

Prøveholdere rengjøres i 1 N NaOH. *NB! Prøveholdere tåler ikke syre !!*

Dato:

Laborant

Prøve:

% vann før sentr.: V1=

rør nr.				
prøveholder, tom				
+ fisk				
etter sentr.				
vekt fisk				
% vekttap, Δr				
vannbind.evne				
Gjennomsnitt				

Beregning av vannbindingsevne:

$$\text{WBC (\%)} = \frac{V1 - \Delta r}{V1} * 100\%$$

Referanser:

Børresen, T. 1980. Nyutviklete metoder for bestemmelse av vannbindingsevne, saltvannsbindingsevne og koketap i fiskemuskel. FTFI-rapport 663.1-7-2 1980, Tromsø.

Eide, O., Børresen, T. and Strøm, T., Minced fish production from capelin (*Mallotus villosus*). A new method for gutting, skinning and removal of fat from small fatty fish species. J Food Sci 1982, 47: 347-349, 354.

Tabellene nedenfor (Tabell E-1 til E-6) viser beregnet VBE for de ulike laskefarsene.

Tabell E-1: Oversikt over oppveide prøver før og etter sentrifugering for laksefarse uten tilsetninger.

Vekten er oppgitt i gram. Vekt 2 viser beregninger for tørrvekten. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Temperatur/ parallel	Total vekt 1	Etter sentrifugering	Vekt tap	% vekttap	Total vekt2	etter tørrking	%vann	% Tørrstoff	VBE
4A	18,363	18,2092	0,1538	7,62	10,4963	9,2	64,63	35,37	88,2
4B	18,1073	17,9763	0,1310	6,40	10,2672	8,9781	64,29	35,71	90,0
30A	17,3114	17,1218	0,1896	9,45	10,5412	9,2011	65,89	34,11	85,6
30B	17,8634	17,6865	0,1769	8,50	10,4966	9,2019	62,46	37,54	86,3
40A	16,9332	16,4537	0,4795	23,06	10,3388	9,0073	64,50	35,50	64,2
40B	17,9793	17,5057	0,4736	23,66	10,4524	9,2163	61,07	38,93	61,2
50A	16,9724	16,5356	0,4368	21,62	10,454	9,1399	65,53	34,47	67,0
50B	18,0141	17,655	0,3591	17,90	10,4094	9,1239	63,12	36,88	71,6
60A	17,8538	17,4885	0,3653	17,99	10,4714	9,0921	66,90	33,10	73,1
60B	17,0961	16,7837	0,3124	15,37	10,4587	9,1256	64,05	35,95	75,9
70A	17,2315	16,8362	0,3953	19,08	10,363	8,9507	67,35	32,65	71,6
70B	16,894	16,4456	0,4484	21,82	10,6222	9,27	66,81	33,19	67,3

Tabell E-2: Oversikt over oppveide prøver før og etter sentrifugering for laksefarse tilsatt salt. Vekten er oppgitt i gram. Totalvekt 1 viser før sentrifugering og totalvekt 2 viser beregninger for tørrvekten (gram). Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Temp	Total vekt 1	Etter sentrifugering	Vekt tap	% vekt tap	Total vekt2	etter tørking	%vann	% Tørrstoff	VBE
4A	18,2255	18,1941	0,0314	1,46	11,7952	10,3918	67,15	32,85	97,8
4B	16,9762	16,9499	0,0263	1,24	10,3551	8,9381	68,77	31,23	98,1
30A	18,0066	17,9336	0,0730	3,62	11,7149	10,2937	69,66	30,34	94,7
30B	17,1588	17,0826	0,0762	3,66	11,8082	10,3849	67,79	32,21	94,5
40A	17,886	17,7362	0,1498	7,31	11,7912	10,3808	68,82	31,18	89,3
40B	17,884	17,7	0,1840	8,87	11,8043	10,3498	69,30	30,70	87,2
50A	17,6795	17,3954	0,2841	13,67	10,9832	9,1258	91,60	8,40	85,0
50B	17,3464	17,0999	0,2465	12,16	10,3658	8,9291	69,47	30,53	82,5
60A	18,4185	18,1772	0,2413	11,72	11,717	10,3358	68,48	31,52	82,8
60B	17,412	17,1744	0,2376	11,77	13,4521	11,9878	69,87	30,13	83,1

Tabell E-3: Oversikt over oppveide prøver før og etter sentrifugering for laksefarse tilsatt salt med utvalgte temperaturer. Vekten er oppgitt i gram. Totalvekt 1 viser før sentrifugering og totalvekt 2 viser beregninger for tørrvekten (gram). Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Temp	Total vekt1	Etter sentrif.	Vekt tap	% tap	Totalt vekt2	Etter tork	%vann	% tørrstoff	VBE
20A	18,1394	18,0894	0,05	2,43	11,6794	10,3924	64,1	35,8	96,2
20B	18,3815	18,3362	0,0453	2,24	10,5923	9,2813	63,0	36,9	96,4
25A	17,376	17,3189	0,0571	2,78	10,4157	9,1457	63,2	36,7	95,6
25B	17,649	17,5965	0,0525	2,57	10,5202	9,1781	64,0	35,9	95,9
30A	17,4443	17,3701	0,0742	3,63	10,4061	9,1143	63,6	36,3	94,2
30B	17,0953	17,0016	0,0937	4,65	10,4547	9,2034	62,1	37,8	92,5
35A	17,6048	17,4641	0,1407	6,92	10,4797	9,1868	62,8	37,1	88,9
35B	17,8652	17,7205	0,1447	7,07	10,5214	9,1767	64,5	35,4	89,0
40A	17,084	16,8551	0,2289	11,53	10,615	9,2788	64,8	35,1	82,2
40B	16,8766	16,5337	0,3429	16,95	10,4741	9,1384	65,1	34,8	73,9

Tabell E-4: Oversikt over oppveide prøver før og etter sentrifugering for laksefarse tilsatt vann.

Vekten er oppgitt i gram. Totalvekt 1 viser før sentrifugering og totalvekt 2 viser beregninger for tørrstoffet (gram). Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Temp	Total vekt1	Etter sentrif.	Vekt tap	% tap	Totalt vekt2	Etter tørk	%vann	% tørrstoff	VBE
20A	16,9748	16,7867	0,1881	9,275	10,5609	9,1781	69,13	30,86	86,58
20B	16,9061	16,7124	0,1937	9,393	10,5626	9,1973	66,42	33,57	85,85
25A	18,0822	17,8367	0,2455	11,809	10,5238	9,1552	65,93	34,06	82,09
25B	17,2396	17,0442	0,1954	9,369	10,3688	8,986	66,74	33,25	85,96
30A	18,0484	17,7974	0,251	12,281	10,4577	9,0377	68,08	31,91	81,96
30B	17,6292	17,3864	0,2428	11,692	10,3142	9,2823	51,31	48,68	77,21
35A	17,6689	17,3524	0,3165	15,141	10,3374	8,9386	67,48	32,51	77,56
35B	17,214	16,8811	0,3329	16,189	10,6497	8,9561	80,86	19,13	79,97
40A	17,4818	17,0144	0,4674	22,933	10,4742	9,0771	67,87	32,12	66,21
40B	16,8843	16,4011	0,4832	23,757	10,4196	9,0685	66,38	33,61	64,21

Tabell E-5: Oversikt over oppveide prøver før og etter sentrifugering for laksefarse med nedjustert pH

(1). pH ble målt til 6,08. Vekten er oppgitt i gram. Totalvekt 1 viser før sentrifugering og totalvekt 2 viser beregninger for tørrvekten (gram). Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Temp	Total vekt1	Etter sentrif.	Vekt tap	% tap	Totalt vekt	Etter tørk	%vann	% tørrstoff	VBE
4A	17,1772	16,8223	0,3549	17,01	10,4848	9,044	69,90	30,09	75,65
4B	18,1609	17,7919	0,369	17,64	10,4005	9,1014	64,31	35,68	72,55
20A	17,1552	16,7577	0,3975	19,39	10,5067	9,1131	68,03	31,96	71,49
20B	18,0897	17,7072	0,3825	18,36	10,6152	9,2358	68,26	31,73	73,09
25A	17,6477	17,4451	0,2026	9,92	10,4981	9,0644	69,24	30,75	85,66
25B	17,4591	17,1239	0,3352	16,35	10,3637	8,9676	69,09	30,90	76,33
30A	17,0761	16,7626	0,3135	15,42	11,7701	10,314	70,43	29,56	78,10
30B	18,4519	18,1916	0,2603	12,48	11,7359	10,2987	69,05	30,94	81,92
35A	18,2904	17,9188	0,3716	18,16	11,7711	10,3321	69,36	30,63	73,81
35B	17,3188	16,8919	0,4269	20,64	10,5169	9,1077	69,30	30,69	70,20
40A	18,5008	17,9889	0,5119	25,41	11,7599	10,3669	67,92	32,07	62,58
40B	18,0178	17,495	0,5228	25,26	10,4191	9,022	67,65	32,34	62,65

Tabell E-6: Oversikt over oppveide prøver før og etter sentrifugering for laksefarse med nedjustert pH (2). Vekten er oppgitt i gram. Totalvekt 1 viser før sentrifugering og totalvekt 2 viser beregninger for tørrvekten (gram). Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Temp	Total vekt1	Etter sentrif.	Vekt tap	% tap	Totalt vekt2	Etter tørk	%vann	% tørrvekt	VBE
4A	17,0872	16,8469	0,240	11,81	15,3201	13,9331	66,10	33,90	82,1
4B	18,0655	17,8068	0,259	12,34	13,1854	11,7842	67,71	32,29	81,8
20A	17,1736	16,9408	0,233	11,48	13,2227	11,8040	67,61	32,39	83,0
20B	17,5636	17,3886	0,175	8,58	13,0410	11,7000	66,11	33,89	87,0
25A	17,1244	16,9024	0,222	10,84	13,9227	12,5520	66,42	33,58	83,7
25B	18,3974	18,1062	0,291	14,19	13,1434	11,7816	66,17	33,83	78,5
30A	17,2016	16,8470	0,355	17,29	14,2817	12,8811	66,78	33,22	74,1
30B	18,1279	17,7471	0,381	18,38	13,0824	11,7091	68,10	31,90	73,0
35A	17,7067	17,1170	0,590	28,40	14,2290	12,7997	68,66	31,34	58,6
35B	17,3932	16,8813	0,512	25,57	13,1029	11,7825	63,23	36,77	59,6
40A	17,9299	17,2622	0,668	32,95	13,1929	11,8877	64,36	35,64	48,8
40B	17,1130	16,3557	0,757	36,48	12,9604	11,5552	68,14	31,86	46,5

Vedlegg F

Proteinløselighet

Protein solubility – water and salt soluble proteins

About 4 g of cod and salmon fillets (n=2) were homogenised (with Ultra-Turrax) in 80 ml 0.05 M phosphate buffer (pH 7) for 30 (may be less) seconds and centrifuged (refrigerated centrifuge, 8000 x g, 4°C) for 20 minutes. The supernatant was filtered through glass wool and the volume was made up to 100 ml with phosphate buffer. This was the water-soluble fraction. The precipitate was further homogenised for 10 s in 80 ml 0.05 M phosphate buffer with 0.6 M KCl and centrifuged as above. The supernatant was decanted and adjusted with phosphate buffer with KCl to a volume of 100 ml. This was the salt-soluble fraction. The amount of proteins in the extract was determined after suitable dilution, with the BioRad protein assay using bovine serum albumin (BSA) as a standard (Bradford, 1976). The analyses were run in triplicate. The absorbance was read in a Spectrophotometer (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech) at a wavelength of 595 nm.

I tabell F-1 nedenfor viser bestanddelene i buffrene som ble laget for å ekstrahere vannløselige og saltløselige proteiner.

Tabell F-1: Buffer med og uten KCl

Komponent	Molvekt, g/mol	Mengde tot 0,5 L	Mengde tot 1,0L	Mengde tot 1,5L	Mengde tot 2,0L
KH ₂ PO ₄	136,09	3,4023	6,8045	10,2068	13,609
NaOH	40,00	0,582	1,164	1,746	2,328
KCl	74,56	22,368	44,736	67,104	89,472
Dest. vann		til 0,5 L	til 1,0L	til 1,5 L	til 2,0 L

Fosfatbufferne ble justert til pH=7 (6,96-7,07) ved hjelp av NaOH (2M) eller HCl (2M).

BIORADMETODEN FOR BESTEMMELSE AV PROTEIN.

Referanse:

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254

Prinsipp: Bioradmetoden er basert på at maksimum absorbans for en sur løsning av Coomassie Brilliant Blue G-250 skifter fra 465 til 595 når fargen bindes til protein.

Løsninger:

Standard: Bovint serum albumin. Konsentrasjon på stockløsning er 1 mg/ml. Det lages opp porsjoner på 100 ml som fordeles på plastflasker og fryses ned. Disse oppbevares i fryser på mellomrom. Tint standard kan oppbevares et par dager på kjølerom.

Fargekonsentratet leveres som konsentrat, finnes på kjølerom. Før bruk blandes 1 del konsentrat med 4 deler dest. vann. Fortynnet fargereagens kan oppbevares på mørk flaske i romtemperatur i 14 dager.

Utførelse:

Standardkurve: Pipetter ut etter tabellen under:

Standard	Blank	1	2	3	4	5
µl standard	0	20	40	60	80	100
µl vann	100	80	60	40	20	0

Pipetter ut 100 µl av passe fortynnete prøver i reagensrør, ta 3 paralleller av hver prøve. Evt kan det lages fortynninger av stockløsningen 0.2; 0.4...mg/ml. Disse må brukes samme dag.

Blank, standarder og prøver tilsettes 5,0 ml fortynnet fargereagens og blandes godt (whirl mixer). Absorbans ved 595 nm leses av etter 5 min. Fargen er stabil i inntil 60 min.

Avhending av løsninger etter avlesning på spektrofotometer: Helles i beholder merket Bioradavfall avtrekk 413

Tabellene nedenfor (tabell F-1 til F-6) viser beregnet proteinmengde %vvekt i hver laksefarse.

Tabell F-1a: Mengde ekstraherte vannløselige proteiner i laksefarse uten tilsetninger. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Vannløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Konsentrasjon (mg/ml)	Protein %vvekt	Vekt fisk
4A	0,64	0,643	0,614	0,632	2,701	6,71	4,0254
4B	0,652	0,625	0,594	0,624	2,648	6,57	4,0278
30A	0,607	0,612	0,558	0,592	2,456	6,10	4,0233
30B	0,542	0,574	0,526	0,547	2,098	5,17	4,0566
40A	0,455	0,495	0,523	0,491	1,778	4,43	4,0171
40B	0,575	0,592	0,565	0,577	2,268	5,59	4,0564
50A	0,246	0,259	0,24	0,248	0,402	0,99	4,0565
50B	0,299	0,299	0,319	0,306	0,727	1,81	4,0282
60A	0,682	0,75	0,729	0,720	0,648	1,59	4,0684
60B	0,665	0,659	0,66	0,661	0,576	1,43	4,0317
70A	0,114	0,123	0,13	0,122	0	0	4,0369
70B	0,14	0,114	0,127	0,127	0	0	4,0351

Tabell F-2b: Mengde ekstraherte saltløselige proteiner i laksefarse uten tilsetninger. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Saltløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Konsentrasjon	Protein %vvekt	Vekt fisk
4A	0,465	0,431	0,462	0,453	1,561	3,88	4,0254
4B	0,651	0,668	0,641	0,653	2,699	6,70	4,0278
30A	0,371	0,369	0,359	0,366	1,071	2,66	4,0233
30B	0,415	0,415	0,423	0,418	1,363	3,36	4,0566
40A	0,49	0,482	0,459	0,477	0,350	0,87	4,0171
40B	0,46	0,454	0,476	0,463	0,333	0,82	4,0564
50A	0,331	0,352	0,313	0,332	0,173	0,43	4,0565
50B	0,303	0,306	0,385	0,331	0,172	0,43	4,0282
60A	0,189	0,186	0,173	0,183	-0,010	0,00	4,0684
60B	0,157	0,162	0,147	0,155	-0,044	0,00	4,0317
70A	0,081	0,084	0,098	0,088	-0,126	0,00	4,0369
70B	0,079	0,066	0,076	0,074	-0,144	0,00	4,0351

For beregning av proteinmengden i laksefarse uten tilsetninger ble det brukt to standardkurver med to ulike BioRadløsninger.

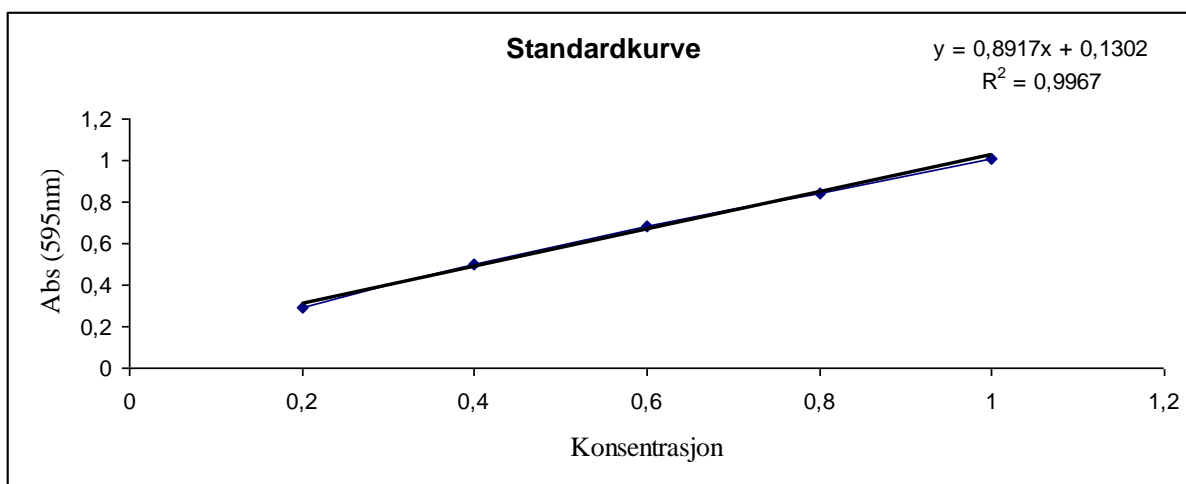
Tabell F-2a: Mengde ekstraherte vannløselige proteiner i laksefarse tilsatt salt og vann. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Vannløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Konsentrasjon (mg/ml)	Protein %vvekt	Vekt fisk
4A	0,633	0,635	0,613	0,627	2,786	6,946	4,0105
4B	0,677	0,647	0,637	0,6537	2,935	7,265	4,04
30A	0,564	0,558	0,557	0,5597	2,408	5,959	4,0412
30B	0,602	0,572	0,563	0,579	2,517	6,243	4,031
40A	0,448	0,395	0,399	0,414	1,591	3,951	4,0282
40B	0,434	0,388	0,398	0,4067	1,550	3,808	4,0714
50A	1,04	0,972	0,958	0,99	0,964	2,392	4,0314
50B	1,086	1,04	1,052	1,0593	1,042	2,604	4,0015
60A	0,391	0,373	0,399	0,3877	0,289	0,709	4,0743
60B	0,323	0,393	0,345	0,3537	0,251	0,622	4,031

For å fjerne vannet som var tilsatt laksefarsen sammen med saltet, ble alle måltverdier for fiskevekten multiplisert med 0,95 da det var tilsatt 5 % vann i farsen.

Tabell F-2b: Mengde ekstraherte saltløselige proteiner i laksefarse tilsatt salt og vann. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Saltløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Konsentrasjon (mg/ml)	Protein %vvekt	Vekt fisk
4A	0,571	0,595	0,544	0,57	2,466	6,149	4,0105
4B	0,638	0,66	0,653	0,6503	2,917	7,219	4,04
30A	0,538	0,503	0,566	0,552	0,946	2,341	4,0412
30B	0,58	0,563	0,564	0,569	0,984	2,442	4,031
40A	0,474	0,476	0,48	0,4767	0,389	0,965	4,0282
40B	0,572	0,519	0,518	0,5363	0,455	1,119	4,0714
50A	0,364	0,368	0,341	0,3577	0,255	0,633	4,0314
50B	0,359	0,365	0,357	0,3603	0,258	0,645	4,0015
60A	0,155	0,155	0,17	0,16	0,033	0,082	4,0743
60B	0,132	0,137	0,118	0,129	0	0	4,031



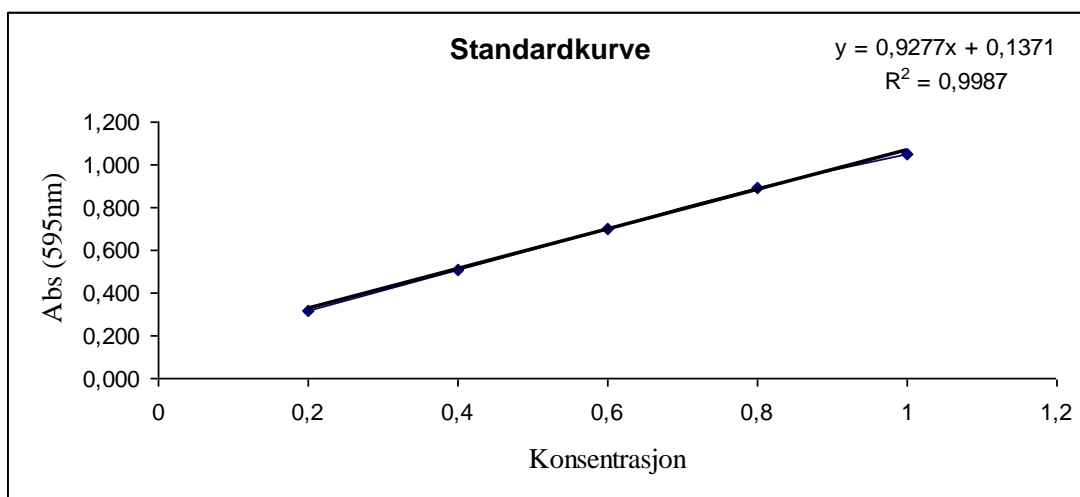
Figur F-2C: Standardkurve som ble brukt for å beregne proteinmengde i laksefarse med salt og vann.

Tabell F-3a: Mengde ekstraherte vannløselige proteiner i laksefarse tilsatt salt og vann med utvalgt temperaturer. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Vannløselig proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Konsentrasjon (mg/ml)	Protein %vvekt	Vekt fisk
20A	0,533	0,573	0,556	0,554	2,246	5,538	4,057
20B	0,599	0,552	0,494	0,548	2,216	5,439	4,0743
25A	0,552	0,551	0,542	0,548	2,216	5,512	4,021
25B	0,521	0,54	0,51	0,524	2,083	5,134	4,0577
30A	0,541	0,553	0,567	0,554	2,245	5,608	4,0034
30B	0,616	0,535	0,561	0,571	2,336	5,758	4,0581
35A	0,499	0,503	0,503	0,502	1,964	4,806	4,0883
35B	0,5	0,486	0,499	0,495	1,928	4,786	4,0298
40A	0,455	0,435	0,449	0,446	1,666	4,082	4,0822
40B	0,428	0,421	0,464	0,438	1,619	3,999	4,0509

Tabell F-3b: Mengde ekstraherte saltløselige proteiner i laksefarse tilsatt salt med utvalgt temperaturer. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Saltløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Konsentrasjon (mg/ml)	Protein %vvekt	Vekt fisk
20A	0,506	0,489	0,584	0,526	2,097	5,170	4,057
20B	0,816	0,524	0,564	0,544	2,193	5,382	4,0743
25A	0,446	0,412	0,423	0,427	1,562	3,885	4,021
25B	0,414	0,39	0,406	0,403	1,434	3,536	4,0577
30A	0,456	0,42	0,426	0,434	0,640	1,598	4,0034
30B	0,448	0,407	0,434	0,430	0,630	1,554	4,0581
35A	0,403	0,413	0,42	0,412	0,296	0,724	4,0883
35B	0,448	0,436	0,428	0,437	0,323	0,803	4,0298
40A	0,43	0,422	0,415	0,422	0,307	0,753	4,0822
40B	0,419	0,403	0,407	0,410	0,293	0,725	4,0509



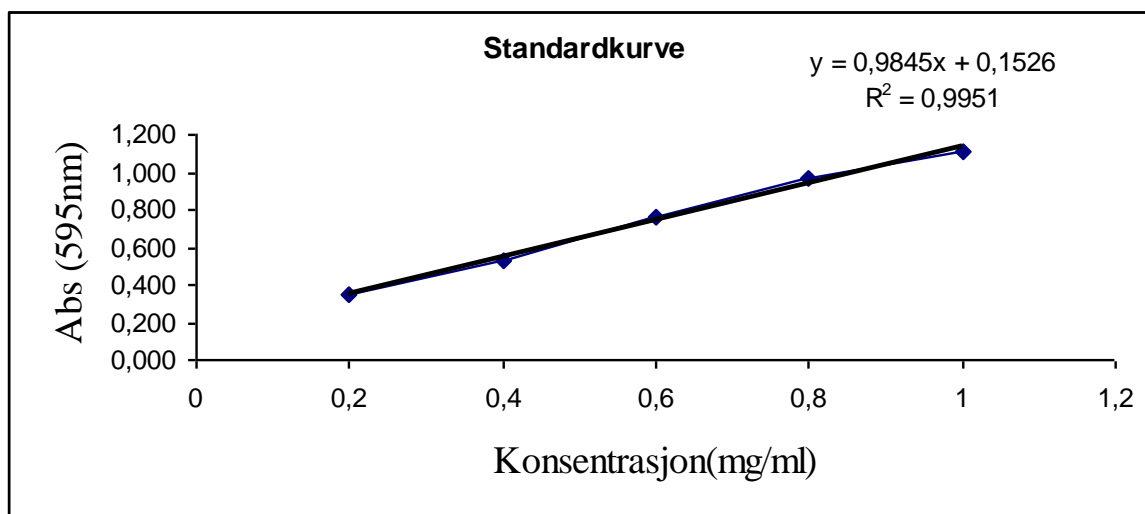
Figur F-3C: Standardkurve som ble brukt for å beregne proteinmengde i laksefarse med salt.

Tabell F-4a: Mengde ekstraherte vannløselige proteiner i laksefarse tilsatt vann. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Vannløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Konsentrasjon (mg/ml)	Protein %vvekt	Vekt fisk
20A	0,606	0,610	0,611	0,609	2,318	5,691	4,0731
20B	0,619	0,591	0,580	0,597	2,255	5,560	4,0565
25A	0,588	0,603	0,590	0,594	2,240	5,570	4,0215
25B	0,597	0,619	0,605	0,607	2,308	5,742	4,0192
30A	0,600	0,594	0,590	0,595	2,245	5,489	4,0902
30B	0,560	0,540	0,550	0,550	2,018	4,962	4,0677
35A	0,532	0,533	0,542	0,536	1,945	4,783	4,0673
35B	0,545	0,554	0,567	0,555	2,045	5,059	4,0427
40A	0,470	0,491	0,488	0,483	1,678	4,160	4,0336
40B	0,486	0,486	0,479	0,484	1,681	4,138	4,0635

Tabell F-4b: Mengde ekstraherte saltløselige proteiner i laksefarse tilsatt vann. Temperatur og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Saltløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Konsentrasjon (mg/ml)	Protein %vvekt	Vekt fisk
20A	0,604	0,603	0,619	0,609	2,316	5,687	4,0731
20B	0,478	0,499	0,503	0,493	1,730	4,266	4,0565
25A	0,698	0,644	0,623	0,655	2,552	6,345	4,0215
25B	0,625	0,633	0,611	0,623	2,389	5,944	4,0192
30A	1,110	1,074	1,033	1,072	1,868	4,568	4,0902
30B	1,023	0,993	1,009	1,008	1,738	4,274	4,0677
35A	0,810	0,799	0,808	0,806	0,663	1,631	4,0673
35B	0,943	0,908	0,940	0,930	0,790	1,954	4,0427
40A	0,545	0,52	0,549	0,538	0,391	0,971	4,0336
40B	0,564	0,568	0,551	0,561	0,415	1,021	4,0635



Figur F-4C: Standardkurve som ble brukt for å beregne proteinmengde i laksefarse med salt.

Tabell F-5a: Mengde ekstraherte vannløselige proteiner i laksefarse med nedjustert pH (1).

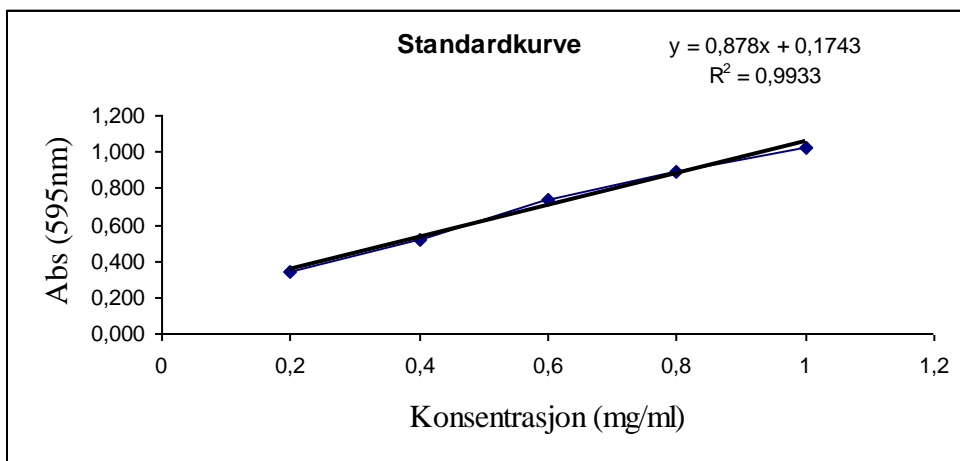
Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Vannløselig proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Konsentrasjon (mg/ml)	Protein %vvekt	Vekt fisk
4A	0,517	0,521	0,54	0,526	2,003	4,95	4,0442
4B	0,561	0,518	0,553	0,544	2,105	5,20	4,0487
20A	0,526	0,522	0,533	0,527	2,009	4,92	4,0776
20B	0,54	0,536	0,54	0,539	2,075	5,08	4,0835
25A	0,581	0,568	0,577	0,575	2,284	5,68	4,0168
25B	0,563	0,543	0,545	0,550	2,141	5,27	4,0618
30A	0,575	0,572	0,573	0,573	2,272	5,62	4,0368
30B	0,572	0,564	0,559	0,565	2,225	5,51	4,0378
35A	0,498	0,491	0,498	0,496	1,830	4,50	4,0601
35B	0,513	0,514	0,503	0,510	1,912	4,70	4,0629
40A	0,806	0,79	0,785	0,794	2,116	5,17	4,0879
40B	0,753	0,772	0,765	0,763	2,013	4,97	4,0452

Tabell F-5b: Mengde ekstraherte vannløselige proteiner i laksefarse med nedjustert pH (1).

Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Saltløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Konsentrasjon (mg/ml)	Protein %vvekt	Vekt fisk
4A	0,603	0,55	0,59	0,581	2,316	5,73	4,0442
4B	0,432	0,459	0,445	0,445	1,543	3,81	4,0487
20A	0,426	0,421	0,426	0,424	1,424	3,49	4,0776
20B	0,471	0,458	0,449	0,459	1,623	3,98	4,0835
25A	0,441	0,44	0,436	0,439	1,507	3,75	4,0168
25B	0,479	0,48	0,472	0,477	1,724	4,24	4,0618
30A	0,319	0,3	0,306	0,308	0,458	1,13	4,0368
30B	0,358	0,342	0,357	0,352	0,608	1,51	4,0378
35A	0,553	0,538	0,536	0,542	0,419	1,03	4,0601
35B	0,607	0,628	0,634	0,623	0,511	1,26	4,0629
40A	0,492	0,48	0,484	0,485	0,354	0,87	4,0879
40B	0,512	0,518	0,512	0,514	0,387	0,96	4,0452



Figur F-5C: Standardkurve som ble brukt for å beregne proteinmengde i laksefarse med nedjustert pH(1).

Tabell F-6a: Mengde ekstraherte vannløselige proteiner i laksefarse med nedjustert pH (2). Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

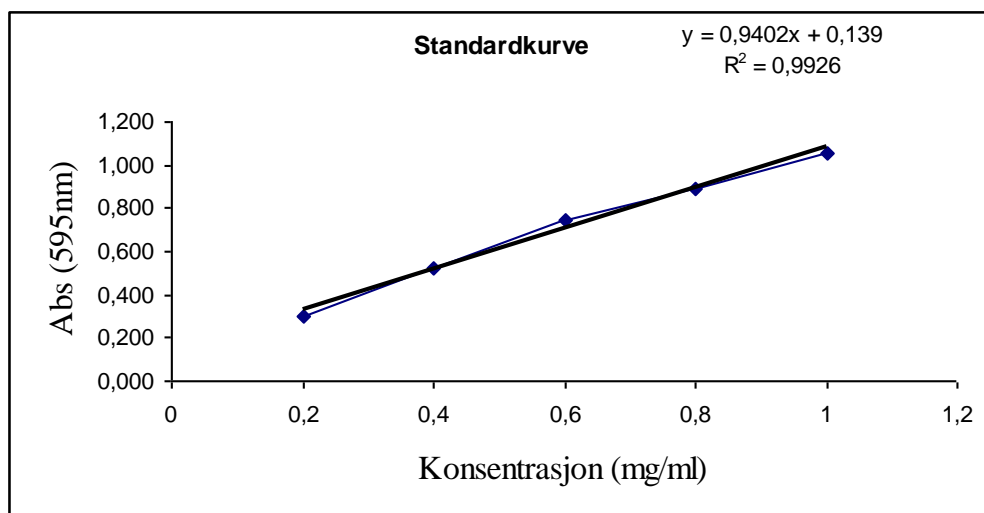
Vannløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Konsentrasjon (mg/ml)	Protein %vvekt	Vekt fisk
4A	0,552	0,563	0,551	0,555	2,214	5,46	4,0483
4B	0,586	0,573	0,567	0,575	2,320	5,72	4,0536
20A	0,562	0,56	0,547	0,556	2,219	5,48	4,0492
20B	0,573	0,563	0,57	0,569	2,285	5,65	4,0372
25A	0,564	0,562	0,573	0,566	2,273	5,63	4,0359
25B	0,602	0,571	0,587	0,587	2,381	5,94	4,0043
30A	0,478	0,518	0,526	0,507	1,959	4,80	4,0752
30B	0,549	0,566	0,545	0,553	2,203	5,38	4,0915
35A	0,487	0,518	0,518	0,508	1,961	4,85	4,0393
35B	0,516	0,514	0,524	0,518	2,016	4,91	4,0975
40A	0,733	0,75	0,759	0,747	1,941	4,83	4,0173
40B	0,735	0,71	0,745	0,730	1,886	4,63	4,0703

Tabell F-6b: Mengde ekstraherte saltløselige proteiner i laksefarse med nedjustert pH (2).

Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Saltløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Konsentrasjon (mg/ml)	Protein %vvekt	Vekt fisk
4A	0,431	0,445	0,443	0,440	1,599	3,94	4,0483
4B	0,477	0,46	0,463	0,467	1,743	4,29	4,0536
20A	0,425	0,433	0,415	0,424	1,517	3,74	4,0492
20B	0,496	0,496	0,487	0,493	1,883	4,66	4,0372
25A	0,368	0,385	0,383	0,379	1,275	3,15	4,0359
25B	0,429	0,406	0,403	0,413	1,455	3,63	4,0043
30A	0,57	0,609	0,578	0,586	0,950	2,33	4,0752
30B	0,562	0,584	0,569	0,572	0,920	2,24	4,0915
35A	0,45	0,451	0,469	0,457	0,338	0,83	4,0393
35B	0,49	0,472	0,468	0,477	0,359	0,87	4,0975
40A	0,382	0,399	0,406	0,396	0,273	0,67	4,0173
40B	0,406	0,408	0,43	0,415	0,293	0,72	4,0703

Figur F-6C: Standardkurve som ble brukt for å beregne proteinmengde i laksefarse med nedjustert pH(2)



Vedlegg G

Kvantifisering av SH-grupper

Denne metoden kan gjøres på proteinekstrakter av ulike typer, f.eks. vannløselig fraksjon laget for måling av karbonylgrupper, vannløselige proteinhomogenater eller lignende. En proteinkonsentrasjon på 1-5 mg/ml er som oftest passende.

Kjemikalier

Buffer A: 0,1 M Na fosfatbuffer, pH 7,4, 1 mM EDTA.

Urea-løsning: 8 M urea (48,048 g/100 ml) i Buffer A, juster pH til 7,4.
NB! Nært mettet løsning, endoterm reaksjon, bør varmes opp for å løse seg.

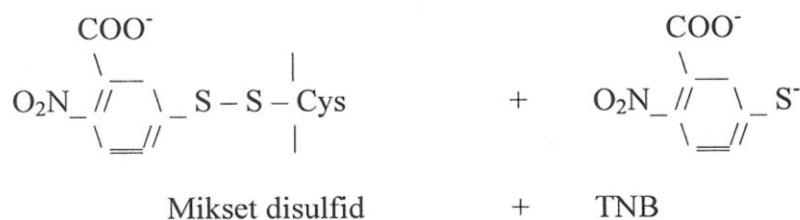
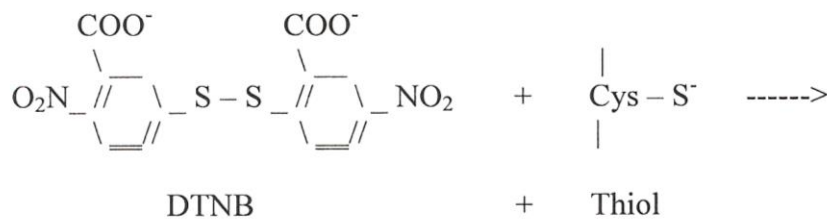
DTNB-løsning: 0,1 % DTNB (0,1 g/100 ml) i Buffer A, juster pH til 7,4.
DTNB er ikke løselig ved lav pH. Temperatursensitiv og holder bare i noen timer ved romtemperatur. Frys i aliquots på 1-5 ml.

Fremgangsmåte

- 1 Pipetter ut 100 µl proteinekstrakt over i eppendorfrør, lag 3 paralleller. Blank lages med Buffer A i stedet for proteinekstrakt.
- 2 Alle rørene tilsettes 800 µl urea-løsning og 100 µl DTNB-løsning.
- 3 Bland godt med whirlmixer.
- 4 Inkuber ved romtemperatur i 30 min.
- 5 Sentrifuger 3 min, 12000 rpm, romtemp. (20-25 °C)
- 6 Absorbansen leses av ved 412 nm nullstilt mot blank.

Bakgrunn:

Ellman's reagent, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoat) (DTNB) er en symmetrisk aryl disulfid som reagerer med frie thioler for å danne TNB.



TNB har en intens absorpsjon ved 412 nm sammenlignet med resten av reagentene i reaksjonen. DTNB har absorpsjonsmaksimum på 324 nm. Ratioen thiol:TNB er 1:1, så absorbansen er direkte overførbar til mengde thiol til stede.

DTNB reagerer i utgangspunktet bare med frie thiol, men med denaturerende reagenser til stede vil også reduserte Cys-forbindelser være tilgjengelige for å reagere med DTNB.

I denne metoden brukes urea for å denaturere proteinet og gjøre SH-gruppene mer tilgjengelige. DTNB skal være til stede i overskudd i reaksjonen for å sikre at alle SH-grupper reagerer. DTNB er følsom for basisk pH, oksygen og temperatur. Derfor utføres reaksjonen som oftest ved pH nær nøytral, kjent temperatur og noen ganger under anaerobe forhold. For å bevare kvaliteten på DTNB i løsning bør reagensen oppbevares i fryser.

Produktet i reaksjonen, TNB, er sensitiv for ulike bufferioner og andre stoffer. Dette gjør at det er viktig å bruke riktig ekstinksjonskoeffisient i forhold til løsningene som brukes, se tabellen lengre ned.

Siden vi hovedsakelig har 8 M urea og svak fosfatbuffer bruker vi $E = 14\,290$.

Løsning	E ved 412 nm
2 % SDS	12 500
0,1 M phosphate, pH 8,0, 1 mM EDTA	14 150
Buffered 6 M guanidine hydrochloride	13 700
6 M guanidine hydrochloride	13 880
8 M urea	14 290

Utregninger:

Vi vet at

$$E = \frac{A}{b \cdot C}$$

og ekstinksjonskoeffisienten for TNB (fargestoffet som dannes av DTNB og SH-grupper) i ulike løsninger. Vi gjør om ligningen for å finne konsentrasjonen, og justerer for reell konsentrasjon av prøven i røret. Det kan også regnes tilbake til g våtvekt eller mg/ml protein.

$$C = \frac{A \cdot \text{tot. V i kyvetten (ml)}}{b \cdot E \cdot \text{prøve V i kyvetten (ml)}}$$

C = Konsentrasjon (M)

A = Absorbans ved 412 nm

b = 1 (kyvettens bredde)

E = Ekstinksjonskoeffisient for TNB 14290 ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Kilder:

Ellman, G.L., Tissue sulfhydryl groups (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70

Riddles, R.W., Blakeley, R.L., Zerner, B., Reassessment of Ellman's reagent (1983) *Methods in enzymology*, 91, 8

Tabellene nedenfor (tabell G-1 til G-6) viser beregnet konsentrasjon (nmol/mg protein) av SH grupper i vannløselige og saltløselige proteiner.

Tabell G-1a: SH grupper i vannløselige proteiner i laksefarse uten tilsetninger. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Vannløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Snitt A+B	C(nmol/ml)	nmol/mg protein
4A	0,39	0,418	0,39	0,399	0,385	0,269	0,149
4B	0,363	0,376	0,371	0,370			0,138
30A	0,369	0,363	0,355	0,362	0,363	0,254	0,159
30B	0,373	0,364	0,355	0,364			0,160
40A	0,306	0,3	0,335	0,314	0,346	0,242	0,155
40B	0,375	0,38	0,38	0,378			0,187
50A	0,13	0,128	0,14	0,133	0,094	0,066	0,235
50B	0,011	0,134	0,02	0,055			0,097
60A	0,089	0,073	0,079	0,080	0,077	0,054	0,131
60B	0,067	0,082	0,073	0,074			0,121
70A	0,009	0,006	0,006	0,007	0,012	0,008	0
70B	0,026	0,013	0,01	0,016			0

Tabell G-1b: SH grupper i saltløselige proteiner i laksefarse uten tilsetninger. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Saltløselige proteiner	Abs1	Abs 2	Abs 3	Gj.snitt	Snitt A+B	C(nmol/ml)	nmol/mg protein
4A	0,266	0,27	0,253	0,263	0,338	0,237	0,123
4B	0,415	0,429	0,395	0,413			0,194
30A	0,225	0,215	0,248	0,229	0,239	0,167	0,188
30B	0,247	0,257	0,244	0,249			0,205
40A	0,038	0,039	0,043	0,040	0,038	0,026	0,117
40B	0,035	0,037	0,035	0,036			0,104
50A	0,003	0,009	0,01	0,007	0,008	0,006	0,043
50B	0,009	0,126	0,143	0,009			0,052
60A	0,007	0	0	0,002	0,002	0,001	0
60B	0,005	-0,003	0	0,001			0
70A	0,013	0,028	0,012	0,018	0,015	0,010	0
70B	0,013	0,009	0,014	0,012			0

Tabell G-2a: SH grupper i vannløselige proteiner i laksefarse tilsatt salt. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Vannløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Snitt A+B	C(nmol/ml)	nmol/mg protein
4A	0,419	0,41	0,394	0,408	0,416	0,2853	0,04
4B	0,427	0,435	0,411	0,424		0,2969	0,04
30A	0,36	0,372	0,341	0,358	0,379	0,2503	0,04
30B	0,413	0,4	0,389	0,401		0,2804	0,04
40A	0,273	0,272	0,259	0,268	0,268	0,1875	0,05
40B	0,271	0,267	0,264	0,267		0,1871	0,05
50A	0,122	0,126	0,112	0,120	0,129	0,0840	0,03
50B	0,137	0,153	0,121	0,137		0,0959	0,04
60A	0,04	0,036	0,026	0,034	0,032	0,0238	0,03
60B	0,026	0,032	0,034	0,031		0,0215	0,03

Tabell G-2b: SH grupper i saltløselige proteiner i laksefarse tilsatt salt. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Saltløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Snitt A+B	C(nmol/ml)	nmol/mg protein
4A	0,387	0,405	0,371	0,388	0,406	0,2713	0,04
4B	0,385	0,458	0,428	0,424		0,2965	0,04
30A	0,076	0,081	0,07	0,076	0,142	0,0530	0,02
30B	0,141	0,155	0,131	0,142		0,0996	0,04
40A	0,023	0,028	0,018	0,023	0,025	0,0161	0,01
40B	0,029	0,033	0,018	0,027		0,0187	0,02
50A	0,013	0,016	0,009	0,013	0,014	0,0089	0
50B	0,017	0,021	0,006	0,015		0,0103	0
60A	0,004	0,005	0	0,003	0,004	0,0021	0
60B	0,007	0,008	0	0,005		0,0035	0

Tabell G-2c: SH grupper målt dagen før målingene i tabell G-2a. Forskjellen mellom verdiene fra tabellG-2a og tabell G-2c er vist i prosent.

Prøve	Abs1	Abs 2	Abs 3	Snitt	Forskjell %
4A i vannløselige proteiner	0,751	0,665	0,706	0,707	41,188
4A i saltløselige proteiner	0,664	0,871	0,605	0,635	36,065
60A i vannløselige proteiner	0,17	0,096	0,06	0,133	75,689
60A i saltløselige proteiner	0,046	0,065	0,088	0,077	94,771

Tabell G-3a: SH grupper i vannløselige proteiner i laksefarse tilsatt salt med utvalgte temperaturer.

Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Vannløselig proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Snitt A+B	C(nmol/ml)	nmol/mg protein
20A	0,394	0,406	0,39	0,397	0,387	0,2776	0,12
20B	0,373	0,385	0,375	0,378		0,2643	0,12
25A	0,352	0,362	0,354	0,356	0,365	0,2491	0,12
25B	0,388	0,372	0,359	0,373		0,2610	0,12
30A	0,39	0,384	0,374	0,383	0,380	0,2678	0,12
30B	0,373	0,381	0,38	0,378		0,2645	0,12
35A	0,32	0,33	0,308	0,325	0,329	0,2274	0,12
35B	0,339	0,321	0,337	0,332		0,2326	0,12
40A	0,303	0,269	0,248	0,273	0,271	0,1913	0,12
40B	0,268	0,276	0,262	0,269		0,1880	0,11

Tabell G-3b: SH grupper i saltløselige proteiner i laksefarse tilsatt salt med utvalgte temperaturer.

Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Saltløselig proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Snitt A+B	C(nmol/ml)	nmol/mg protein
20A	0,297	0,313	0,294	0,301	0,308	0,2109	0,10
20B	0,305	0,324	0,314	0,314		0,2200	0,10
25A	0,27	0,289	0,25	0,270	0,255	0,1887	0,13
25B	0,246	0,237	0,24	0,241		0,1686	0,11
30A	0,094	0,092	0,097	0,094	0,092	0,0660	0,10
30B	0,092	0,086	0,088	0,089		0,0620	0,10
35A	0,025	0,022	0,024	0,024	0,026	0,0166	0,05
35B	0,027	0,034	0,025	0,029		0,0201	0,06
40A	0,026	0,021	0,07	0,024	0,023	0,0164	0,05
40B	0,023	0,022	0,023	0,023		0,0159	0,05

Tabell G-4a: SH grupper i vannløselige proteiner i laksefarse tilsatt vann. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Vannløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Snitt A+B	C(nmol/ml)	nmol/mg protein
20A	0,378	0,386	0,387	0,384	0,380	0,268	0,117
20B	0,369	0,374	0,384	0,376		0,263	0,115
25A	0,36	0,365	0,363	0,363	0,362	0,254	0,112
25B	0,365	0,35	0,367	0,361		0,252	0,111
30A	0,368	0,356	0,381	0,368	0,358	0,258	0,121
30B	0,349	0,34	0,353	0,347		0,243	0,114
35A	0,336	0,332	0,354	0,341	0,353	0,238	0,119
35B	0,354	0,366	0,377	0,366		0,256	0,128
40A	0,268	0,262	0,261	0,264	0,270	0,185	0,110
40B	0,273	0,282	0,274	0,276		0,193	0,115

Tabell G-4b: SH grupper i vannløselige proteiner i laksefarse tilsatt vann. Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Saltløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Snitt A+B	C(nmol/ml)	nmol/mg protein
20A	0,409	0,411	0,385	0,402	0,337	0,2811	0,14
20B	0,262	0,284	0,271	0,272		0,1906	0,09
25A	0,405	0,417	0,394	0,405	0,397	0,2836	0,11
25B	0,388	0,394	0,385	0,389		0,2722	0,11
30A	0,319	0,296	0,297	0,304	0,294	0,2127	0,12
30B	0,274	0,293	0,282	0,283		0,1980	0,11
35A	0,095	0,102	0,105	0,101	0,110	0,0704	0,10
35B	0,122	0,122	0,114	0,119		0,0835	0,11
40A	0,04	0,038	0,032	0,037	0,037	0,0257	0,06
40B	0,035	0,038	0,037	0,037		0,0257	0,06

Tabell G-5a: SH grupper i vannløselige proteiner i laksefarse med nedjustert pH (1). Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Vannløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Snitt A+B	C(nmol/ml)	nmol/mg protein
4A	0,361	0,353	0,355	0,356	0,360	0,252	0,123
4B	0,365	0,361	0,363	0,363			
20A	0,32	0,312	0,309	0,314	0,323	0,226	0,111
20B	0,331	0,33	0,334	0,332			
25A	0,346	0,359	0,353	0,353	0,344	0,241	0,109
25B	0,339	0,336	0,333	0,336			
30A	0,355	0,353	0,349	0,352	0,350	0,245	0,109
30B	0,346	0,35	0,344	0,347			
35A	0,298	0,295	0,315	0,303	0,304	0,212	0,114
35B	0,303	0,301	0,309	0,304			
40A	0,303	0,322	0,322	0,316	0,313	0,219	0,106
40B	0,303	0,313	0,314	0,310			

Tabell G-5b: SH grupper i saltløselige proteiner i laksefarse med nedjustert pH (1). Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Saltløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Snitt A+B	C(nmol/ml)	nmol/mg protein
4A	0,369	0,36	0,359	0,363	0,304	0,212	0,110
4B	0,246	0,237	0,255	0,246			
20A	0,214	0,211	0,207	0,211	0,229	0,160	0,105
20B	0,241	0,247	0,252	0,247			
25A	0,217	0,211	0,222	0,217	0,223	0,155	0,096
25B	0,217	0,238	0,23	0,228			
30A	0,148	0,156	0,148	0,151	0,163	0,114	0,214
30B	0,174	0,165	0,188	0,176			
35A	0,049	0,038	0,044	0,044	0,051	0,035	0,076
35B	0,063	0,052	0,061	0,059			
40A	0,035	0,034	0,03	0,033	0,033	0,022	0,061
40B	0,034	0,032	0,03	0,032			

Tabell G-6a: SH grupper i vannløselige proteiner i laksefarse med nedjustert pH (2). Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Vannløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Snitt A+B	C(nmol/ml)	nmol/mg protein
4A	0,371	0,375	0,374	0,373	0,431	0,301	0,165
4B	0,363	0,364	0,737	0,488			0,215
20A	0,357	0,352	0,355	0,355	0,366	0,256	0,157
20B	0,375	0,378	0,376	0,376			0,167
25A	0,365	0,382	0,368	0,372	0,389	0,272	0,160
25B	0,409	0,399	0,412	0,407			0,175
30A	0,332	0,333	0,323	0,329	0,350	0,245	0,158
30B	0,374	0,392	0,348	0,371			0,178
35A	0,325	0,319	0,328	0,324	0,324	0,227	0,163
35B	0,317	0,323	0,333	0,324			0,163
40A	0,292	0,297	0,291	0,293	0,297	0,208	0,153
40B	0,295	0,303	0,305	0,301			0,157

Tabell G-6b: SH grupper i saltløselige proteiner i laksefarse med nedjustert pH (2). Temperaturer og paralleller er vist i kolonnen til høyre.

Saltløselige proteiner	Abs1	Abs2	Abs3	Gj.snitt	Snitt A+B	C(nmol/ml)	nmol/mg protein
4A	0,264	0,264	0,299	0,276	0,269	0,188	0,165
4B	0,267	0,259	0,261	0,262			0,157
20A	0,246	0,238	0,242	0,242	0,273	0,191	0,142
20B	0,302	0,303	0,305	0,303			0,178
25A	0,218	0,213	0,217	0,216	0,226	0,158	0,158
25B	0,235	0,234	0,236	0,235			0,172
30A	0,157	0,162	0,15	0,156	0,148	0,103	0,167
30B	0,145	0,14	0,133	0,139			0,149
35A	0,042	0,042	0,047	0,044	0,046	0,032	0,125
35B	0,05	0,046	0,048	0,048			0,138
40A	0,033	0,038	0,045	0,039	0,035	0,024	0,137
40B	0,029	0,031	0,033	0,031			0,110

Tabell G-6c: Målinger av SH grupper gjort samme dag som proteinekstraksjon (dagen før målingene i tabell G-6a og G-6b).

temp	Abs 1	Abs2	Gj.snitt	C(nmol/ml)	nmol/mg protein	Avvik i % fra dagen etter
Vannløselig:						
4A	0,362		0,362	0,2533240028	0,1117319284	15,9442724458
20A	0,321	0,335	0,328	0,2295311407	0,1019150784	10,2599179207
25A	0,335	0,333	0,334	0,233729881	0,1004584385	14,1755888651
30A	0,299	0,305	0,302	0,211336599	0,101549576	13,7963843958
35A	0,3	0,306	0,303	0,2120363891	0,1066553436	6,529562982
40A	0,278		0,278	0,1945416375	0,1016720665	6,4498037016
Saltløselig						
4A	0,223		0,223	0,156053184	0,0934034188	17,1003717472
20A	0,21	0,209	0,2095	0,1466060182	0,0862391939	23,1662591687
25A	0,174	0,193	0,1835	0,1284114766	0,0940772496	18,6252771619
30A	0,125	0,131	0,128	0,0895731281	0,0957732999	13,4160090192
35A	0,035	0,034	0,0345	0,0241427572	0,0692747313	24,7272727273
40A	0,02		0,02	0,0139958013	0,0494383933	42,5837320574

Vedlegg H

Gel elektroforese

Table 1: Coomassie staining method for PhastGel IEF media to program into the development method file.

Step number	Solution	IN-port	OUT-port	Time	Temperature
1	Fix	1	1	5 min	20°C
2	Wash/Destain	2	0	2 min	20°C
3	Stain	3	0	10 min	50°C
4	Wash/Destain	2	0 (or 5)	10 min	50°C

¹ The destaining solution in step 4 can be filtered through activated charcoal and recycled 3 to 4 times. Use out-port 5 to collect the solution for recycling.

PhastGel electrophoresis media

Prepare the following solutions for PhastGel electrophoresis media. The solutions are listed in order of use. A volume of 80 ml is required to fill the chamber and tubing (for every step).

Label the bottles with their corresponding in-port number according to the programmed method.

1. Stain: 0.1% PhastGel Blue R solution in 30% methanol and 10% acetic acid in distilled water.

Stock solution: dissolve 1 tablet of PhastGel Blue R in 80 ml of distilled water and stir for 5–10 minutes. Add 120 ml of methanol and stir for 2–3 minutes. This makes a 0.2% solution.

Final solution: mix 1 part of filtered stock solution with 1 part of 20% acetic acid in distilled water.

Prepare this solution fresh the day you plan to use it. Do not recycle this solution.

2. Destain: 30% methanol and 10% acetic acid in distilled water (3:1:6).

Prepare at least 300 ml of this solution; enough to fill the chamber three times.

3. Destain: use the solution prepared for step 2.
4. Destain: use the solution prepared for step 2.
5. Preserving solution: X% glycerol and 10% acetic acid in water.

Note: The concentration of glycerol is different for different gels.

2.5% for PhastGel Homogeneous 7.5
5% for PhastGel 10–15 and 12.5
10% for PhastGel 3–25 and 20.

5% for PhastGel 1–15
Do not recycle this solution. This solution will help to keep the gels flexible and resistant to cracking.

Program the method in table 2 into the development method file for SDS-PAGE. Program the method in table 3 into the development method file for native-PAGE. Native-PAGE gels take about 10 minutes longer to destain than SDS-PAGE gels.

Table 2: Coomassie staining method for SDS-PAGE with PhastGel electrophoresis media to program into the development method file.

Step number	Solution	IN-port	OUT-port	Time	Temperature
1	Stain	4	0	8 min	50°C
2	Wash/Destain	2	0 (or 5) ¹	5 min	50°C
3	Wash/Destain	2	0 (or 5)	8 min	50°C
4	Wash/Destain	2	0 (or 5)	10 min	50°C
5	Preserving solution	3-5	0	5 min	50°C

¹ The destaining solutions in steps 2, 3, and 4 can be filtered through activated charcoal and recycled 3 to 4 times. Use out-port 5 to collect the solutions for recycling.

Standard brukt ved elektroforese

Standardene er begge produsert av Amersham Biosciences, GE Healthcare.

- LMW Std.= Low molecular weight protein, brukt som standard. I tabell 1 vises hvilke proteiner LMW Std. standarden inneholder.

Tabell 1: Innholdet i en prøve Low molecular weight protein med 576 µg/prøve

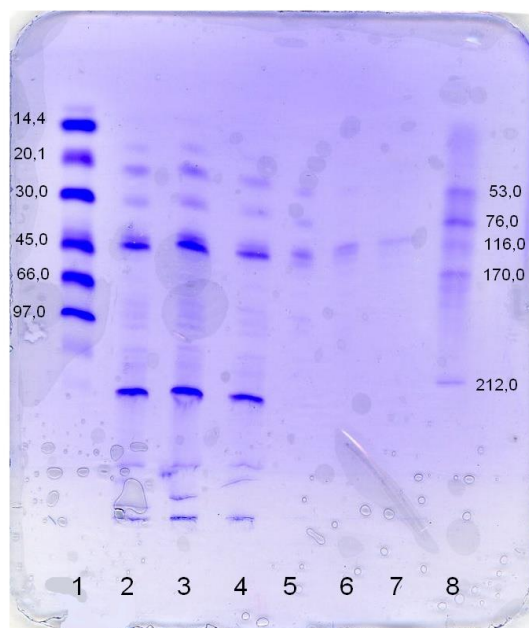
Protein	Opphav	Mengde i prøven (µg)	Molekylvekt (Da)	Ca. Rf- verdi
Phosphorylase b	Rabbit muscle	67	97000	0,07
Albumin	Bovine serum	83	66000	0,13
Ovalbumin	Chicken egg white	147	45000	0,25
Carbonic anhydrase	Bovine erythrocyte	83	30000	0,46
Trypsin inhibitor	Soyabean	80	20100	0,67
α-Lactalbumin	Bovine milk	116	14400	0,89

HMW Std.= High Molecular Weight protein, brukt som standard. I tabell 2 vises hvilke proteiner HMW Std. standarden inneholder.

Tabell 2: Innholdet i en prøve High molecular weight protein med 176 µg/prøve

Protein	Opphav	Mengde i prøven (µg)	Molekylvekt (Da)	Ca. Rf- verdi
Myosin	-	-	220000	0,02
α ₂ - Macroglobulin	Bovine Plasma	100	170000	0,09
β-Galactosidase	E.Coli	16	116000	0,24
Transferrin	Human	17	76000	0,41
Glutamic dehydrogenase	Bovine Liver	18	53000	0,66

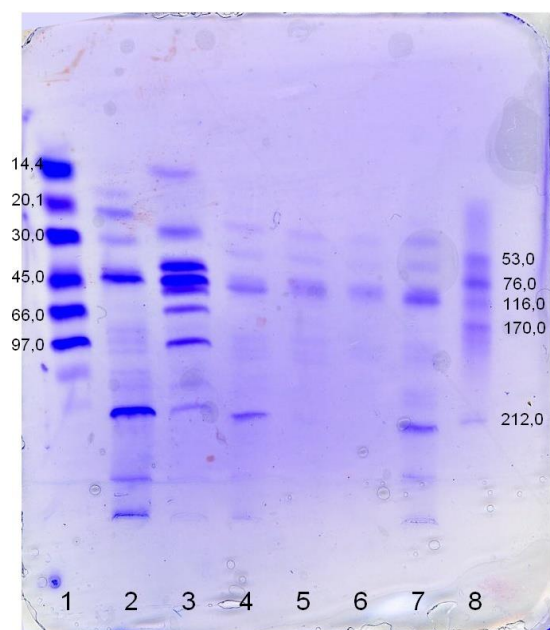
Nedenfor (Figur H-1- Figur H-8) vises båndene som kom fram etter SDS-gel elektroforese og farging.



Figur H-1: Saltløselige proteiner i laksefarse uten tilsetninger 1) LMW Std., 2) Uten varmebehandling, 4°C, 3) Uten varmebehandling, 4°C, 4) Varmet til 30°C, 5) Varmet til 40°C, 6) Varmet til 50°C, 7) Varmet til 60°C, 8) HMW Std.

Tabell H-1a: Oversikt over identifisering av proteinene funnet i gelen.

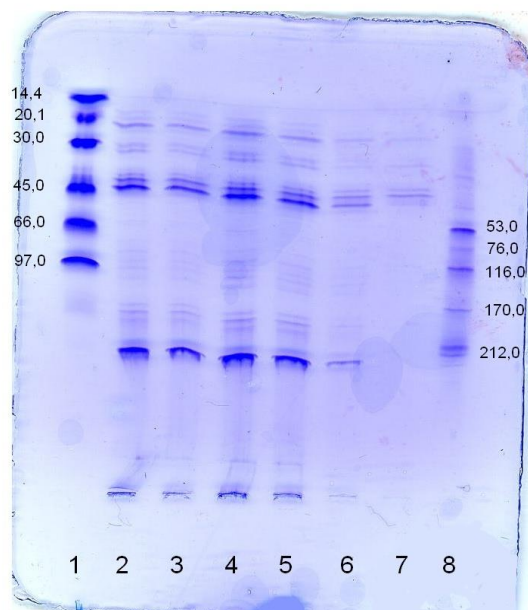
Brønn /Protein (Mw i kDa)	2	3	4	5	6	7
Alkali lett kjede (16,6)						
DNTB lett kjede (18)/Troponin C (18)						
Troponin I (20)	X	X	X	-	-	-
Troponin T (30)	X	X	X	-	-	-
Tropomyosin α - enhet (37)						
Tropomodulin (40)						
G-aktin (42)	X	X	X	X	X	X
α - aktinin (97)						
C-protein (140)						
Myomesin (185)						
Myosinets tunge kjede (220)	X	X	X	-	-	-



Figur H-2: Saltløselige proteiner i laksefarse tilsatt salt og vann. 1) LMW Std., 2) Varmet til 20°C, 3) Varmet til 25°C, 4) Varmet til 30°C, 5) Varmet til 35°C, 6) Varmet til 40°C, 7) Laksefarse med vann varmet til 35°C, 8) HMW Std.

Tabell H-2a: Oversikt over identifisering av proteinene funnet i gelen.

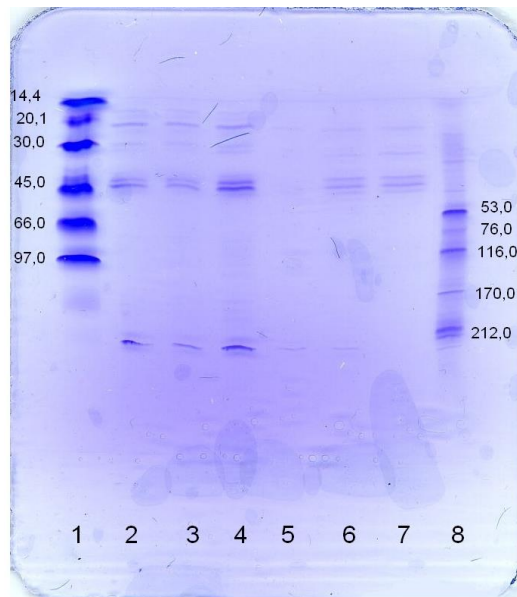
Brønn /Protein (Mw i kDa)	2	3	4	5	6	7
Alkali lett kjede (16,6)						
DNTB lett kjede (18)/Troponin C (18)						
Troponin I (20,9)	X	X	X	X	X	X
Troponin T (30,5)	X	X	X	X	X	X
Tropomyosin α - enhet (37)						
G-aktin (42)	X	X	X	X	X	X
α - aktinin (100)	-	X	-	-	-	-
C-protein (128)						
Myosinets tunge kjede (220)	X	X	X	-	-	X



Figur H-3: Saltløselige proteiner i laksefarse tilsatt bare vann. 1) LMW Std., 2) Varmet til 20 °C, 3) Varmet til 20 °C, 4) Varmet til 25 °C, 5) Varmet til 30 °C, 6) Varmet til 35 °C, 7) Varmet til 40 °C, 8) HMW Std.

Tabell H-3a: Oversikt over identifisering av proteinene funnet i gelen.

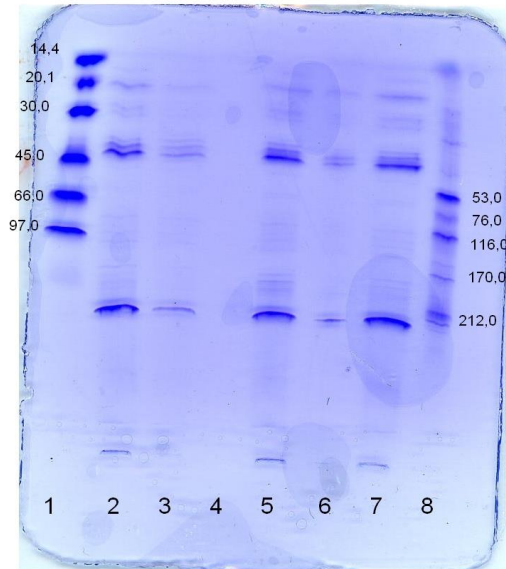
Brønn /Protein (Mw i kDa)	2	3	4	5	6	7
Alkali lett kjede (16,6)						
DNTB lett kjede (18)/Troponin C (18)						
Troponin I (20,9)	X	X	X	X	X	X
Troponin T (30,5)	X	X	X	X	X	X
Tropomyosin α - enhet (37)						
G-aktin (42)	X	X	X	X	X	X
α - aktinin (100)						
C-protein (128)						
Myosinets tunge kjede (220)	X	X	X	X	X	-



Figur H-4: Saltløselige proteiner i laksefarse med lavere pH. 1) LMW Std., 2) Uten varmebehandling, 4°C, 3) Varmet til 20°C, 4) Varmet til 25°C, 5) Varmet til 30°C, 6) Varmet til 35°C, 7) Varmet til 40°C, 8) HMW Std.

Tabell H-4a: Oversikt over identifisering av proteinene funnet i gelen.

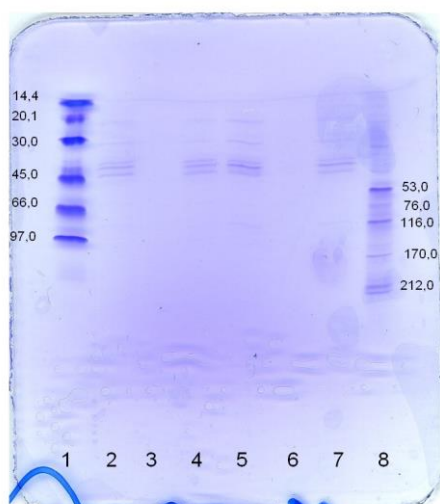
Brønn /Protein (Mw i kDa)	2	3	4	5	6	7
Alkali lett kjede (16,6)						
DNTB lett kjede (18)/Troponin C (18)						
Troponin I (20,9)	X	X	X	-	X	X
Troponin T (30,5)	X	X	X	-	X	X
Tropomyosin α - enhet (37)						
G-aktin (42)	X	X	X	-	X	X
α - aktinin (100)						
C-protein (128)						
Myosinets tunge kjede (220)	X	X	X	-	-	-



Figur H-5: Saltløselige proteiner, laksefarse varmet til 30 °C. 1) LMW Std., 2) laksefarse uten tilsetning, 3) laksefarse med salt og vann, 4) ingen prøve, 5) laksefarse med vann, 6) laksefarse med lavere pH (2. forsøk), 7) laksefarse med lavere pH (1. forsøk), 8) HMW Std.

Tabell H-5a: Oversikt over identifisering av proteinene funnet i gelen.

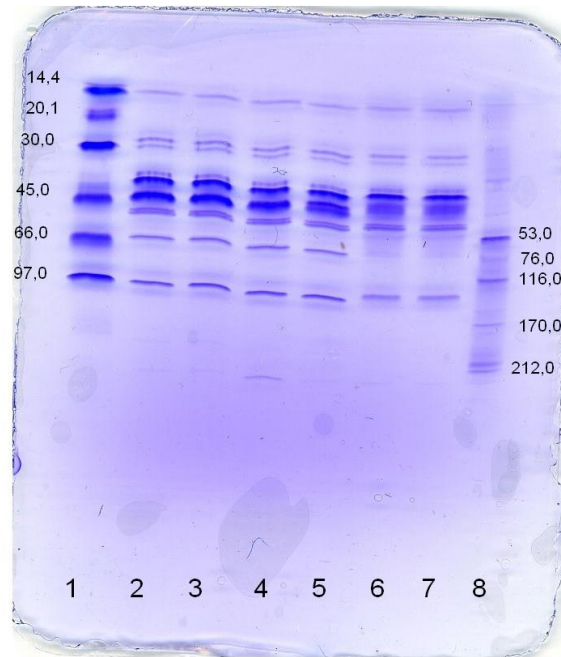
Brønn /Protein (Mw i kDa)	2	3	4	5	6	7
Alkali lett kjede (16,6)						
DNTB lett kjede (18)/Troponin C (18)						
Troponin I (20,9)	X	X		X	X	X
Troponin T (30,5)	X	X		X	X	X
Tropomyosin α - enhet (37)						
G-aktin (42)	X	X		X	X	X
α - aktinin (100)						
C-protein (128)						
Myosinets tunge kjede (220)	X	X		X	X	X



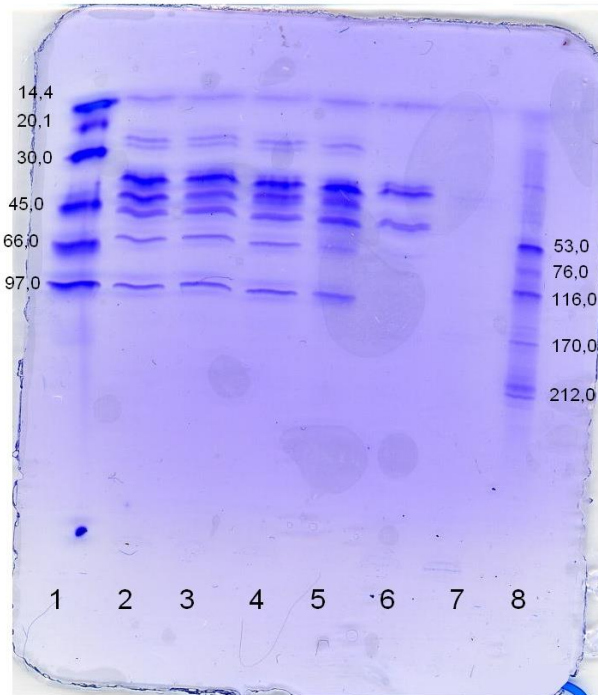
Figur H-6: Saltløselige proteiner i laksefarse varmet til 40°C. 1) LMW Std., 2) laksefarse uten tilsetning, 3) ingen prøve, 4) laksefarse med salt og vann, 5) laksefarse med vann, 6) laksefarse med lavere pH (2. forsøk), 7) laksefarse med lavere pH (1. forsøk), 8) HMW Std.

Tabell H-6a: Oversikt over identifisering av proteinene funnet i gelen.

Brønn /Protein (Mw i kDa)	2	3	4	5	6	7
Alkali lett kjede (16,6)						
DNTB lett kjede (18)/Troponin C (18)						
Troponin I (20,9)	X	-	X	X	-	X
Troponin T (30,5)	X	-	X	X	-	X
Tropomyosin α - enhet (37)						
G-aktin (42)	X	-	X	X	-	X
α - aktinin (100)						
C-protein (128)						
Myosinets tunge kjede (220)						



Figur H-7: Vannløselige proteiner i laksefarse varmet til 30°C. 1) LMW Std., 2) laksefarse uten tilsetning, 3) laksefarse uten tilsetninger, 4) laksefarse med salt og vann, 5) laksefarse med vann, 6) laksefarse med lavere pH, 7) laksefarse med lavere pH, 8) HMW Std.



Figur H-8: Vannløselige proteiner. 1) LMW Std., 2) Laksefarse uten tilsetninger varmet til 40 °C, 3) laksefarse tilsatt salt og vann varmet til 40 °C, 4) laksefarse tilsatt vann varmet til 40 °C, 5) laksefarse med lavere pH varmet til 40 °C, 6) laksefarse uten tilsetninger varmet til 60 °C, 7) laksefarse uten tilsetninger varmet til 70 °C, 8) HMW Std.