

Vinnsla og vörubróun
Processing and Product
Development

Líftækni
Biotechnology



Matvælaöryggi
Food Safety



Kolmunni sem markfæði

Margrét Geirsdóttir
Ragnar Jóhannsson

Líftækni

Skýrsla Matis 06-08
Mars 2007

ISSN 1670-7192

<i>Titill / Title</i>	Kolmuni sem markfæði		
<i>Höfundar / Authors</i>	<i>Margrét Geirsdóttir, Ragnar Jóhannsson</i>		
<i>Skýrsla / Report no.</i>	05-08	<i>Útgáfudagur / Date:</i>	Mars 2008
<i>Verknr. / project no.</i>	1613		
<i>Styrktaraðilar / funding:</i>	<i>Rannís</i>		
<i>Ágríp á íslensku:</i>	<p>Markmið verkefnisins var að svara rannsóknasurningunni: Hvaða lífvirkni er hægt að fá fram hjá peptíðum unnum úr kolmunna með ensímum? Lífvirkni er forsenda þess að unnt sé að nota kolmunna sem markfæði. Sem hráefni voru notuð einangruð kolmunnaprótein. Rannsóknin sýndi að niðurbrotin kolmunnaprótein hafa lífvirkni. Hins vegar reyndust skynmatseiginleikar afurða ekki nægjanlega góðir og heimtur lágar. Var það sérstaklega sökum þess hversu erfiðlega gekk að afla fersks kolmunna sem hráefnis.</p> <p>Í seinni skrefum verkefnisins var því ákveðið að nota þorsk. Markmiðið var að kanna sérstaklega hvort einangruð þorskprótein höfðu aðra eiginleika en hakk m.t.t. skynmats og blóðþrýstingslækkandi eiginleika afurða. Niðurstaðan var að ekki fannst munur á þessum eiginleikum í rannsókninni.</p> <p>Í verkefninu var kannað samspil vatnsrofs með ensímum og vinnslueiginleikar og lífvirkni. Samspil vatnsrofs kolmunnapróteina einangruð með nýrri aðferð og lífvirkni þeirra hefur ekki verið framkvæmd áður og var þar um alþjóðlegt nýnæmi að ræða. Í verkefninu var aflað mikillar þekkingar á sviði ensímiðurbrots og lífvirknieiginleika próteinafurða.</p>		
<i>Lykilord á íslensku:</i>	<i>Ensímvatnsrof, Kolmuni, Vinnslueiginleikar, Lífvirkni, Markfæði</i>		
<i>Summary in English:</i>	<p>The aim of the project was to answer the question: What kind of bioactive properties do peptides produced by enzyme hydrolysis of blue whiting have? Some sort of bioactivity is needed if they are to be used in functional food. The substrate for the hydrolysis was isolated blue whiting proteins. Well-known, commercially available enzymes were used to hydrolyse the proteins to different degrees of hydrolysis (%DH). The blue whiting hydrolysates showed bioactive properties but their sensory characteristics were not good. Furthermore the yield of the process was low. The reason for this was a shortage of fresh raw material.</p> <p>Thus, in the next steps cod was therefore used. The main aim was to study whether different sensory and bioactive characters were achieved when isolated proteins were used compared to mince. The results of the project indicate that there is no difference.</p> <p>In the project the connection between enzyme hydrolysis and functional and bioactive properties was examined. Main emphasis was on the effect of using isolated proteins as raw material for enzyme hydrolysis. In the project important knowledge in the field of enzyme hydrolysis and bioactivity was gained that will facilitate future research.</p>		
<i>English keywords:</i>	<i>Enzyme hydrolyse, Blue whiting, Functional properties, Bioactive properties, Functional food</i>		

Efnisyfirlit

1.	Inngangur	1
2.	Efni og aðferðir	2
2.1.	Hráefni	2
2.1.1.	Kolmunnir	2
2.1.2.	Þorskur	2
2.2.	Ensímrof	4
2.2.1.	Kolmunnir	4
2.2.2.	Þorskur	5
2.3.	Stig vatnsrofs (Degree of hydrolysis; %DH)	6
2.4.	Efnafræðilegir eiginleikar	7
2.4.1.	Efnasamsetning	7
2.4.2.	Sýrustig (pH)	7
2.5.	Dufteiginleikar	7
2.5.1.	Vatnsvirkni	7
2.5.2.	Litur	8
2.6.	Eðliseiginleikar	8
2.6.1.	Vatnsheldni (Water holding capacity)	8
2.6.2.	Olíubinding (oil binding capacity)	9
2.6.3.	Ýruhæfni (emulsion capacity)	9
2.6.4.	Ýrustöðugleiki (emulsion stability)	10
2.6.5.	Leysanleiki	10
2.7.	Lífvirkni	11
2.7.1.	Gastrin/CCK virkni	11
2.7.2.	Andoxunareiginleikar	11
2.7.3.	ACE (Angiotensin Converting Enzyme) hindravirkni	12
2.8.	Rafdráttur	13
2.8.1.	Próteinrafdráttur	13
2.8.2.	Peptíðrafdráttur	13
2.8.3.	Hárpípurafdráttur	14
2.9.	Skynmat	15
3.	Niðurstöður – Mælingar á kolmunna	16
3.1.	Ensímrof	16

3.2.	Efnafræðilegir eiginleikar	17
3.2.1.	Efnasamsetning	17
3.2.2.	Sýrustig (pH).....	18
3.3.	Dufteiginleikar	19
3.3.1.	Vatnsvirkni.....	19
3.3.2.	Litur.....	20
3.4.	Eðliseiginleikar	22
3.4.1.	Vatnsheldni (Water holding capacity)	22
3.4.2.	Olíubinding (oil binding capacity).....	23
3.4.3.	Ýruhæfni (emulsion capacity).....	24
3.4.4.	Ýrustöðugleiki (emulsion stability)	25
3.4.5.	Leysanleiki	26
3.5.	Lífvirkni	27
3.5.1.	Gastrin/CCK	27
3.5.2.	Andoxun.....	28
3.5.3.	ACE – hindravirkni.....	30
3.6.	Rafdráttur	31
3.6.1.	Próteinrafdráttur	31
3.6.2.	Peptíðrafdráttur	33
4.	Niðurstöður – Þorskur.....	34
4.1.	Leysanleiki í 0.1 M NaCl lausn	34
4.2.	Lífvirkni	35
4.2.1.	ACE.....	35
4.3.	Rafdráttur	35
4.3.1.	Próteinrafdráttur	35
4.3.2.	Capillary electrophoresis - CE	35
4.4.	Skynmat	36
5.	Ályktanir	37
6.	Heimildir	38

1. Inngangur

Mjólkurprótein og sojaprótein hafa víðtæka notkunarmöguleika í matvælaíðnaði og hafa verið notuð með góðum árangri. Vitað er að í fiski er að finna gæðaprótein og því forvitnilegt að rannsaka hvort fiskprótein úr fisktegundum sem hingað til hafa lítt hafa verið nýttar til manneldis, búi yfir sambærilegum eiginleikum og áðurnefnd prótein. Tilgangurinn er að margfalda verðmæti hinna vannýttu afurða.

Kolmunni er ein þeirra fisktegunda sem finnst í Norður- og Norðaustur-Atlantshafi, allt frá Svalbarða að strönd Norður-Afríku og hefur lengst af verið nýttur í fiskimjöl. Kolmunni var lítið veiddur fyrir 1980 en síðan 1997 hefur kolmunnaafli íslenskra skipa aukist verulega og fer aflinn að mestu til bræðslu, þó svo eftirspurn eftir honum sem matfisk hafi vaxið á undanförunum árum.

Í þessari skýrslu er greint frá framkvæmd og niðurstöðum frá einangrun kolmunnapróteina, niðurbroti þeirra með ensímum og mælingum á vinnslueiginleikum þeirra. Til samanburðar voru mæld fjögur próteinduft sem eru á markaði. Einnig var lífvirkni þeirra mæld. Erfitt getur verið að nálgast kolmunna af nægjanlegum ferskleika og í næstu skrefum verkefnisins var því ákveðið að nota þorsk. Vinnslueiginleikar og lífvirkni þeirra var mæld.

2. Efni og aðferðir

2.1. Hráefni

Í verkefninu var unnið með kolmunna annars vegar og þorsk hins vegar.

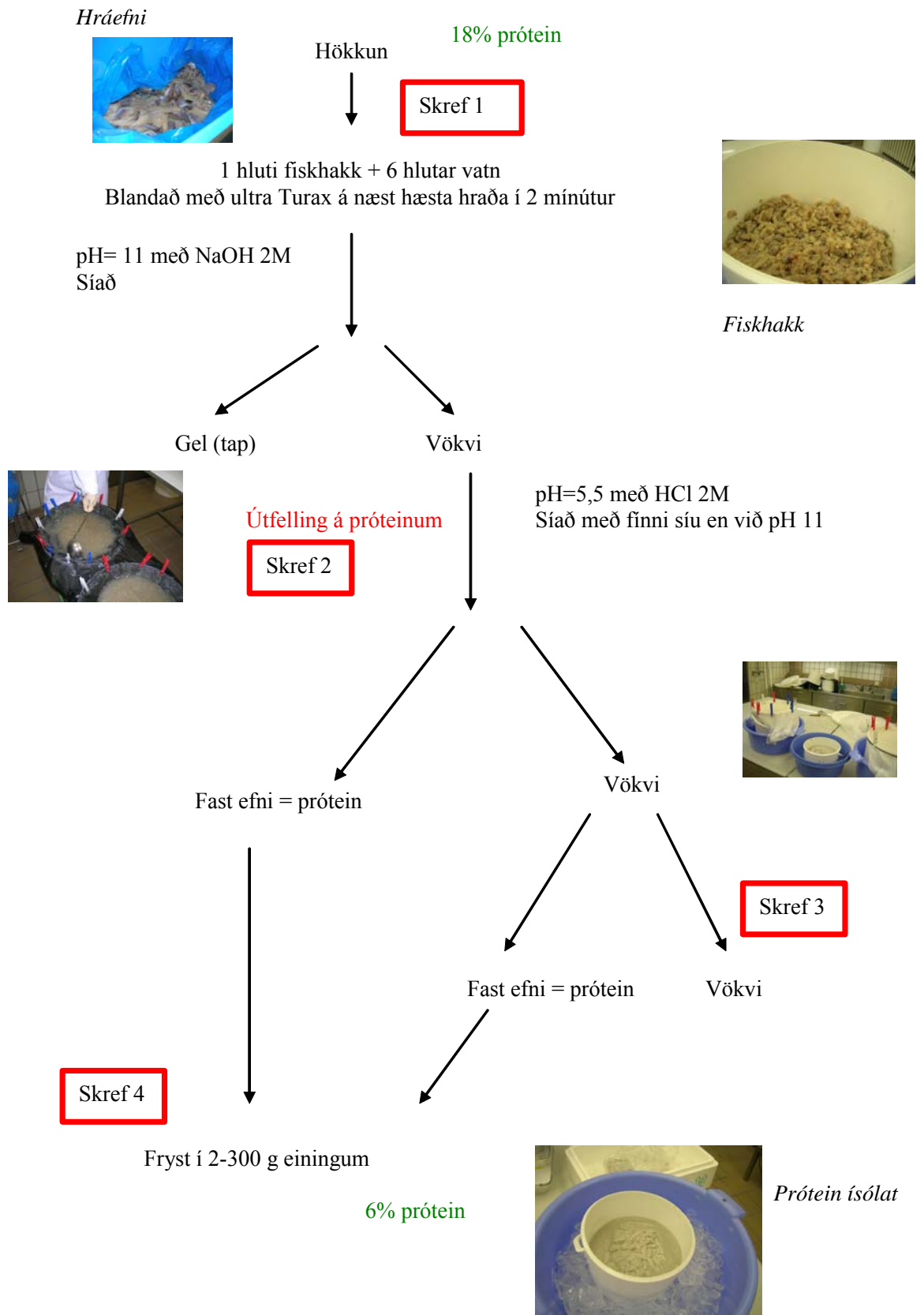
2.1.1. Kolmunni

Veiðar á kolmunna eru árstíðabundnar. Tvær gerðir kolmunnahráefnis voru notaðar. Annars vegar var notaður hausaður og slægður kolmunni sem hafði verið sjófrystur í blokkir í desember 2003 (eldri fiskur). Hins vegar voru keypt kolmunnaflök frá Færeyjum sem voru veidd á vorvertíð 2005 (nýrri fiskur). Blokkir voru geymdar við -24°C í frysti þangað til tilraunir fóru fram (júlí 2005 og október 2005).

Fiskurinn var þíddur við 5°C í 24 klst fyrir notkun og hakkaður í heimilishakkavél (Kenwood) í gegnum 8 mm göt. Prótein voru einangruð með því að blanda sex hlutum af vatni á móti einum hluta hakks, lausn gerð einsleit í UltraTurax homogenizer í eina mínútu. Sýrustig var stillt á pH 11 með 2 M NaOH. Stoðprótein skilin frá með síun og vökvaþasa safnað. Prótein felld út úr vökvaþasa með því stilla sýrustig á jafnhleðslupunkt (pH 5.5) með 2 M HCl. Prótein einangruð með síun og fryst fyrir ensímhýdrólýsu. Unnið var við kældar aðstæður (mynd 1). Sem samanburðarsýni voru notaðar tvær gerðir af sojapróteini (Solbar og DanProDS), ein gerð af kaseinat mjólkurpróteini (DMW International) og undanrennuduft (MS).

2.1.2. Þorskur

Þorskflök voru keypt frá Fiskverkun Hafliða í Desember 2006. Fiskurinn var hakkaður í blandara og skipt upp í tvo hluta. Annar hlutinn var frystur strax í 250 g skömmtum, pakkað í lofttæmda poka og frystur við -75°C . Prótein voru einangruð úr hinum hlutanum skv pH aðferð (sbr mynd 1): hakk og vatni blandað sama í hlutföllum 1:6, gert einsleitt með töfrasprota, sýrustig stillt á pH 11 með 2M NaOH, óleysanlegur hluti fjarlægður með grisju, prótein felld út úr síuðum vökva með því að stilla pH á 5.5 með 2M HCl. Prótein skilin frá með grisju og pakkað í 250 g lofttæmda poka og fryst við -75°C .

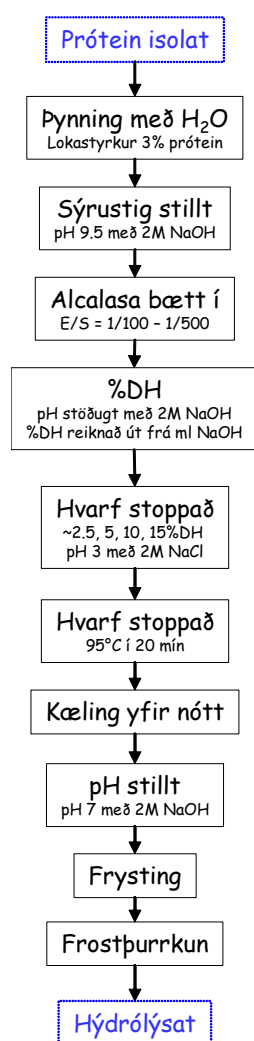


Mynd 1. Einangrun próteina fyrir ensímhýdrólýsu með pH aðferð.

2.2. Ensímrof

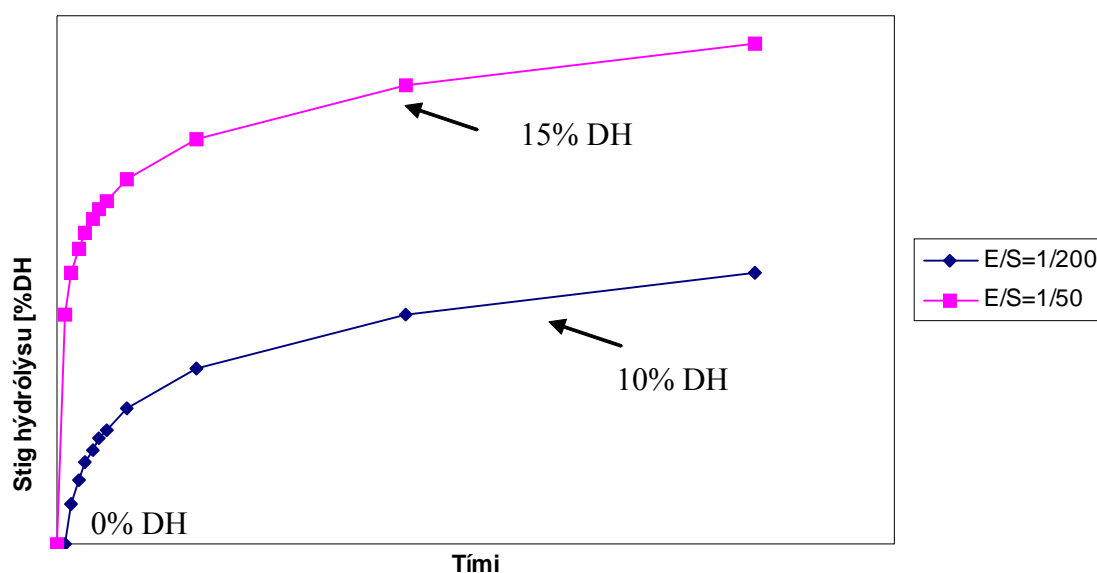
2.2.1. Kolmunni

Ensímrof var gert í pH stat tæki (718 STAT Titrion) frá Metrohm. Alcalase® frá Novozymes (Bagsværd, Danmörku). Mismunandi magn ensíms var notað eftir því hvaða vatnsrofsmagn leitað var eftir (mynd 2). Ákveðið magn sýnis við herbergishita með þekkt magn af próteini var sett í Hvarfhólf / Hvarfsellu pH stat tækis. Sýrustig stillt á rétt upphafssýrustig (pH 9.5), ensím bætt í og pH stat tæki sett af stað, en pH stat tæki sér um að bæta við basa til að viðhalda réttu sýrustigi á meðan á hvarfi stendur. Sýni voru tekin við mismunandi stig vatnsrofs (%DH), fyrst hægt á hvarfi með því að stilla sýrustig á pH 3.0 og að því loknu stöðvað með hitun við 95°C í 20 mínútur. Sýni látið kólna yfir nótt, sýrustig stillt á pH 7, fryst í álbökkum og geymt í frysti fram að frostþurrkun. Til að stilla sýrustig var notað 2M NaOH og 2M HCl.



Mynd 2. Framkvæmd ensímhýdrólýsu.

Hýdrólýsa var stöðvuð við um 0, 2.5, 5, 10 og 15%DH. Magn ensíms og keyrslutími var háð því hvaða lokahýdrólýsustig leitað var eftir (mynd 3). Frostþurrkuð voru eftirfarandi sýni fyrir bæði hráefnin: Hakk, prótein isolat og mismikið vatnsrofið prótein isolat: 0%, 2.5, 5, 10% og 15%DH. 0% sýni var meðhöndlað á þann hátt að isolat var þynnt, pH stillt á 9.5, næst á pH 3, sýni hitað og að því loknu var sýrustig stillt á pH 7.



Mynd 3. Dæmi um hýdrólýsuferla. Áhrif tíma og mismunandi hlutfall ensíms og hvarfefnis (S).

2.2.2. Þorskur

Prótein voru þídd yfir nótt í kæli og þynnt með vatni svo próteininnihald væri um 3%. Lausnin var gerð einsleit í jafnara (homogenizer – Ultra Turrax T25) í eina mínútu og síðan sett í hitabað við 30°C. Þegar því hitastigi hafði verið náð var sýrustig stillt á pH 7.5 með 2 M NaOH. Ensímrof var gert með aðstoð pH stat tækis (718 STAT Titriton). Ensímin Protamex og Neutrase bæði frá Novozymes voru notuð. Hlutfall ensíms (E) og hvarfefnis (S) E/S var breytilegt eftir því hvaða lokastigi vatnsrofs leitað var eftir. Rétt magn ensíms var vigtað ásamt 25 ml af vatni og bætt út í hvarflausnina og pH stat tæki sett af stað, en pH stat tæki sér um að bæta við basa til að viðhalda stöðugu sýrustigi á meðan á hvarfi stendur. Þegar æskilegu stigi vatnsrofs (%DH – sjá síðar) var náð var hvarf stöðvað með hitun í 85°C heitu hitabaði með hristingu í 20 mínútur.

Sýnið var látið kólna yfir nótt í kæli og sett í skilvindu í 30 mínútur við 8.000 x g. Leysanlegur hluti frystur í bökkum sem að því loknu var frostþurrkaður.

2.3. Stig vatnsrofs (Degree of hydrolysis; %DH)

Stig vatnsrofs (Degree of hydrolysis, %DH) var reiknað út frá magni og styrk basa sem var notað til að viðhalda stöðugu sýrustigi á meðan á ensímniðurbroti stóð. DH er skilgreint sem fjöldi peptíðtengja (h) sem hafa verið klofin sem hlutfall af heildarfjölda peptíðtengja samkvæmt (Adler-Nissen, 1986):

$$\%DH = \frac{h \times 100}{h_{tot}} = \frac{BN_B}{\alpha h_{tot} \times MP} \times 100$$

Þar sem

B = magn basa [ml]

NB = styrkur basa [M]

α = vatnsrofsstuðull (“average degree of dissociation”) α -NH hópa (sjá neðar)

MP = magn próteins [g]

h_{tot} = heildarfjöldi peptíðtengja = 7,501 mequiv/g

α vatnsrofsstuðull, var reiknaður skv.

$$\alpha = 10^{pH-pK} / (1 + 10^{pH-pK})$$

Þar sem

pH = sýrustig við ensímhýdrólýsu

pK = meðaltal jafnvægisfasta fyrir NH hópa amínósýranna.

pK gildi sem fall af hitastigi (T í Kelvin) var reiknað skv.:

$$pK = 7.8 + \frac{298 - T}{298T} \times 2400$$

2.4. Efnifræðilegir eiginleikar

2.4.1. Efnasamsetning

Magn próteins var mælt í hráefni og magn vatns, fitu, próteins, salts, ösku og saltlausrar ösku mælt í próteindufti samkvæmt aðferðahandbók í gæðahandbók efnastofu Rannsóknastofnunar fiskiðnaðarins (nú Matís) (Ghb-e-AM). Prótein mæld með Kjeldahl aðferð.

Próteinmagn í lausnum fyrir ACE og CE mælingu var mælt með aðferð Dumas hjá Nýsköpunarmiðstöð Íslands í macro analyzer vario MAX CN tæki frá Elementar. Í stuttu máli þá er sýnið brennt við 900°C með háhreinu súrefni í háhreinum Helium burðarfasa. Bruninn er síðan fullkomnaður með sérstökum súlum og öll önnur gös en N₂ og CO₂ hreinsuð burt og allur raki fjarlægður. Mælinemi var TCD (Thermal conductivity detector). Aðferð Dumas byggir á því að mæla köfnunarefni (N) sem er til staðar í sýninu sem er síðan umreiknað yfir í prótein.

2.4.2. Sýrustig (pH)

Sýrustig var mælt í vatnsheldnisýnum fyrir skilvindun. Sýrustig var mælt með Knick Portamess pH meter (Knick, Berlin, Germany).

2.5. Dufteiginleikar

2.5.1. Vatnsvirkni

Vatnsvirkni var mæld með Novasina a_w-center (Axair Ltd., Pfäffikon, Switzerland) (mynd 4). Hitastig var stillt á 23,9°C. Hvert sýni var mælt þrisvar sinnum.



Mynd 4. Vatnsvirkni (a_w) mælir frá Novasina.

2.5.2. Litur

Litur var mældur með Minolta CR-300 chroma meter (Minolta Camera Co., Ltd., Osaka, Japan) í Lab* litakerfinu (CIE 1976) skv Bragadóttir og félagar (2007) með CIE Illuminant C þar sem L segir til um hversu hvítt sýnið er (L = 100 er hvítt og L = 0 er svart), +a* gildi er rautt, -a* grænt, +b* gult og -b* blátt. Duftin voru mæld í tilraunaglösum (25 mm í þvermál) sem komið var fyrir í til þess gerðum glasahaldara frá Minolta og litur mældur þrisvar sinnum þar sem tilraunaglasí var snúið um 120° milli mælinga. Til að tryggja að sýni væri jafnt í tilraunaglasí var því slegið létt 18 sinnum í borðið og hrist á “vortex” í 5 sekúndur fyrir mælingu.

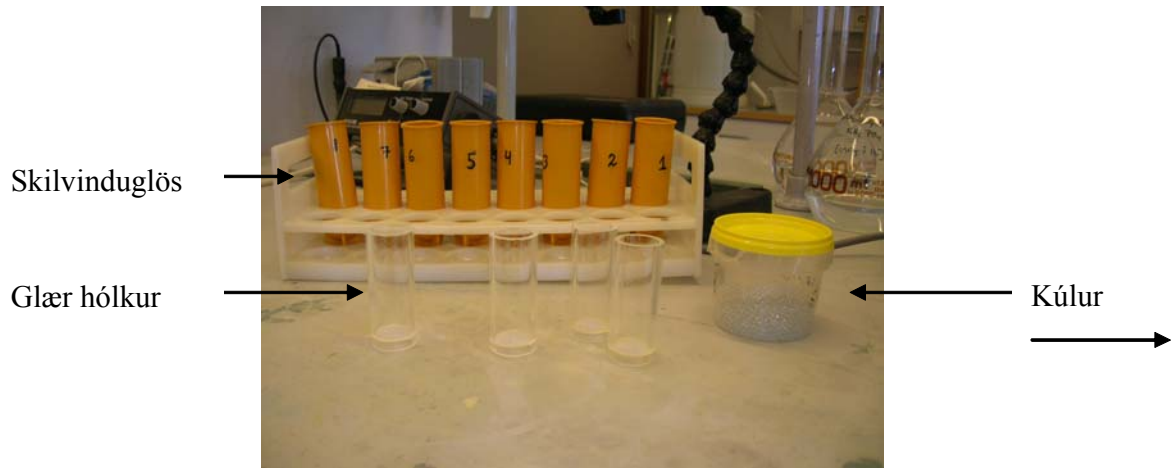
2.6. Eðliseiginleikar

Við vatnsrof og stillingu á sýrustigi myndast salt. Því hærra stig vatnsrofs því hærra magn salts (sjá efnaniðurstöður). Vegna þess að salt hefur mikil áhrif á eiginleika próteina þá var salti bætt við í sýni þannig að sama saltmagn var í öllum sýnum eða um 20% við sumar mælingar.

2.6.1. Vatnsheldni (Water holding capacity)

Um það bil 3,2 grömm af dufti var blandað við 100 g af þorskhakki (línuporskur sem landað var í Stykkishólmi daginn áður) og 20 g af eimuðu vatni í matvinnsluvél (Braun Electronic, Type 4262, Kronberg, Þýskalandi) í 30 sekúndur á hraða 5. Sýni látið bíða á ís í 30 mínútur. Vatnsheldni var síðan ákvörðuð samkvæmt skilvindaðferð (centrifugation method) (Eide og fleiri 1982). Sýni (2 g) var nákvæmlega vegið í glæran hólk með neti í botni, sett í skilvinduglös með glerkúlum (mynd 5) og skilvindað tafarlaust (Sorvall RC-5B Refrigerated Super Speed Centrifuge, Du Pont Instruments, USA) við 210 x g í 5 mínútur við 0-5°C. Þyngdartap eftir skilvindun var deilt með vatnsinnihaldi þorskhakksins og tjáð sem %WHC. Hvert sýni var mælt fjórum sinnum. Vatnsheldi reiknuð skv.

$$\text{WHC (\%)} = \frac{\text{þyngd sýnis} * \text{vatnsinnihald (\%)} - \text{þyngdartap}}{\text{þyngdartap} * \text{vatnsinnihald (\%)}} * 100$$



Mynd 5. Sýnaglös o.fl. fyrir vatnsheldnimælingu.

2.6.2. Olíubinding (oil binding capacity)

Um 5 g af dufti vigtuð nákvæmlega og 20 g olía sett í skilvinduglas (Beuchat, 1977). Lausnin látin standa við herbergishita í 30 mín, blandað með spatúlu á 10 mín fresti. Skilvindað í GSA rótor við 4000 rpm í 30 mín, við hitastig um 20°C. Olíufasanum hellt af og hann veginn nákvæmlega. Olíubinding reiknuð samkvæmt

$$OBC = \frac{\text{heildarmagn olíu (g)} - \text{magn af olíu hellt af (g)}}{\text{massi próteins (g)}}$$

2.6.3. Ýruhæfni (emulsion capacity)

Um eitt gramm af dufti vegið nákvæmlega og 100 mL af 0,1 M NaCl voru sett í 1L plastbikarglas (Kristinsson og Rasco, 2000; Webb og fleiri, 1970). Elektróðum fjölmælis, sem mældi viðnám (Ω), var komið fyrir innan á plastbikarglasinu. Sýnið blandað með UltraTurrax á grænum hraða (9500rpm) í 20 sekúndur, án þess að snerta botn plastbikarglassins. Hraði Ultra Turrax aukinn í rauðan hraða (13500rpm), án þess að snerta botn plastbikarglassins. Wesson Vegetable Oil látin renna úr 500 mL skiltrekt, ofan í plastbikarglasið, til að skapa olíu í vatni ýrulausn. Viðnámið hækkaði skyndilega, ýrulausnin féll og olíurennslíð var stöðvað. Á þessum punkti, þegar viðnámið hækkaði og ýrulausnin féll, hafði ýruhæfni próteinanna náð hámarki og

myndað vatn í olíu ýrulausn. Hvert sýni var mælt tvisvar sinnum. Ýruhæfni var reiknuð samkvæmt:

$$EC = \frac{\text{massi eftir blöndun (g)} - \text{massi fyrir blöndun (g)}}{\text{massi próteins (g)}} / \text{eðlismassi olíu (g / mL)}$$

2.6.4. Ýrustöðugleiki (emulsion stability)

Um eitt gramm af dufti vegið nákvæmlega, 100 mL af 0,1 M NaCl og 100 mL af Wesson Vegetable Oil voru sett í 1 L plastbikarglas (Kristinsson og Rasco, 2000; Miller og Groninger, 1976; Yasumatsu og félagar, 1972). Sýnið blandað með UltraTurrax á rauðum hraða (13500rpm) í 2 mínútur. Sýninu hellt í 3 mæliglös (50 mL) og látið standa í 15 mínútur. Heildarrúmmál og rúmmál vatnsfasa lesið af kvarða mæliglassins. Hvert sýni var mælt þrisvar sinnum. Ýrustöðugleiki reiknaður samkvæmt:

$$ES = \frac{(\text{heildarrúmmál (mL)} - \text{vatnsfasi (mL)}) * 100}{\text{heildarrúmmál (mL)}}$$

2.6.5. Leysanleiki

Leysanleiki var mældur með tveimur aðferðum – annars vegar í vatni og hins vegar í saltlausn fyrir lífvirknimælingu.

Leysanleiki í vatni

Leysanleiki próteinduftsins í vatni, var metinn með Kjeldahl aðferð. Um það bil 2 g af dufti vegin nákvæmlega voru leyst í 190 mL af eimuðu vatni og blandað með UltraTurrax á gulum hraða (8000rpm) í 30 sekúndur. Sýnið látið bíða á ís í 60 mínútur. Skilvindað (Sorvall RC-5B Refrigerated Super Speed Centrifuge, Du Pont Instruments, USA) við 16274 x g í 15 mínútur. Magn af leysanlegu próteini í vökvafasanum var ákvarðað með aðferð Kjeldahl (Nx6,25). Próteinleysanleiki reiknaður skv.

$$\text{Próteinleysanleiki} = \frac{\text{prótein í lausn [g]}}{\text{Heildarmagn próteina [g]}} \cdot 100$$

Leysanleiki í saltlausn

Leysanleiki próteinduftsins í saltlausn var einnig metinn samkvæmt aðferð Morr og félaga (1985) með smá breytingum. Um 0,5 g af dufti vegið nákvæmlega í 150 ml bikarglas ásamt um 40 ml af 0.1M NaCl lausn. Segli komið fyrir í glasi, sett á segulhræru og hrært í 1 klst án þess að “vortex” myndist. Að tíma loknum var lausn færð í 50 ml mæliflösku og fyllt að marki með 0.1M NaCl lausninni. Skilvindað í 30 mínútur við 20.000 x g. Floti safnað fyrir ACE mælingar. Prótein mæld með Dumas.

2.7. Lífvirkni

Áhrif kolmunnapróteina á seytingu meltingarensíma og andoxunareiginleikar þeirra voru mældir. Einnig var ACE virkni kolmunnapróteina og þorskpróteina mæld.

2.7.1. Gastrin/CCK virkni

Gastrin og Cholecystokinín (CCK) eru peptíðhormón í smágörnum sem hafa víða virkni t.d. að örva próteinmyndun (Johnson og félagar, 1978) og stjórna garnahreyfingum og seytingu meltingarensíma (Beinfeld, 1995). Nýlega var sýnt fram á þáttöku CCK í því að vekja seddutilfinningu og draga úr matarlyst (Bray, 2000). RIA (Radioimmunoassay; geislaónæmismælingu) var notuð skv. Ravallec-Plé og Wormhoudt (2003).

2.7.2. Andoxunareiginleikar

DPPH

Andoxunarvirkni kolmunnapeptíða var mæld skv Morales og Jimenez-Peres (2001). Trolox var notað sem viðmið. Styrkur DPPH var reiknaður frá eftirfarandi jöfnu sem var fengin með línulegri aðhvarfsgreiningu: $[DPPH]_t = 0.0241 (A_{520nm}) + 0.022$ ($r^2 = 0.9995$). Vatn var notað sem blankur í öllum tilraunum.

β-carotene/linoleat

Andoxunarvirkni var einnig mæld í beta-carotene/linoleate módelkerfi skv Marco (1968).

2.7.3. ACE (Angiotensin Converting Enzyme) hindravirkni

Kanínulungna ACE 1 UN frá Sigma var leyst upp í 5 mL af afjónuðu vatni og skipt í nokkra skammta (0,2 U/mL) (Vermeirssen og félagar, 2005). Uppleyst ensímið var síðan geymt í frysti þar til það var notað í virknipróf.

Útbúin var 0,5 mM FAPGG (N-[3-(2-Fúrýl)acrýloyl]-Phe-Gly-Gly frá Sigma) hvarfefnislausn í 50 mM Tris HCl pH 7,5, 300 mM NaCl. Upphaflega var settur 100 µL af vatni (blankur) eða hindra í tilraunaglas ásamt 25 µL (5mU) af ACE lausn. Þessi blanda var hituð við 37°C í 2 mínútur í hitabaði. Síðan var bætt við 900 µL af FAPGG lausn og blandað með sveip (vortex) blandara, tilraunaglassið sett aftur í hitabaðið í 2 mínútur. Að því loknu er hvarflausnin flutt með pípettu yfir í tóma kúvettu sem búið er að koma fyrir í ljósmælinum. Gleypnin er mæld með afjónað vatni sem viðmið í hituðum kúvettuhaldara (37°) á 5 mínútna kafla. Settur er 30 sekúndna lag-tími á keyrsluna. Gleypniminnkunin sem á sér stað samsvarar ensímvirkninni. Hallatalan sem fæst út frá gleypniminnkuninni samsvarar gleypniminnkun á mínútu. Meðaltal hallatalanna er sett inn í eftirfarandi jöfnu til þess að reikna ACE hindrunina:

$$\% ACE\ hindrun = \left(1 - \left(\frac{\Delta A_{hindri}}{\Delta A_{blankur}} \right) \right) \times 100 \%$$

2.8. Rafdráttur

2.8.1. Próteinrafdráttur

Eitt gramm af sýni leyst í 240 mL af eimuðu vatni. Blandað saman með UltraTurrax á gulum hraða (8000 rpm) í 30 sek. 100 µL sýni, 190 µL Laemmli sýnabuffer (BioRad, cat nr 161-0737) og 10 µL β-mercaptoethanol sett í Eppendorf glas. Hrist kröftuglega í 5 sek. Soðið í 3-6 mín, kælt strax á ís. Skilvindað (Eppendorf centrifuge, 5415C) við 15000 rpm í 12 mín. Sýnið fryst þar til rafdráttur fór fram. Sýnið þítt við stofuhita (ca. 22°C) og sett á gel (BioRad, Ready Gel, 4-15% Tris-HCl, 10 wells, 30 µL, cat nr 161-1104). Rafdregið við 60 mA fyrir hvert gel og 200V. Sýnið fest á gelið (3% TCA lausn) í 15 mín með vægum hristingi. Gelið litað (0,25% Coomassie Brilliant Blue, 45% methanol, 7% acetic acid, leyst í eimuðu vatni) í 30 mín og aflitað (45% methanol, 7% acetic acid, leyst í eimuðu vatni) í 3x30 mín með vægum hristingi. Próteinrafdráttur var gerður á gömlum og nýjum fiski (fiskhakki, prótein ísolati og 0% hydrolyseruðu sýni). Tvær gerðir staðals voru einnig keyrðar. High-Range (cat nr. 161-0303) frá Bio-rad og Low-range (cat nr. 161-0304) einnig frá Bio-rad (tafla 1).

2.8.2. Peptíðrafdráttur

Eitt gramm af sýni leyst í 240 mL af eimuðu vatni. Blandað saman með UltraTurrax á gulum hraða (8000 rpm) í 30 sek. 309 µL sýni, 588 µL Tricine sýnabuffer (BioRad, Tricine Sample Buffer, 30mL, cat nr 161-0739) og 12 µL β-mercaptoethanol sett í Eppendorf glas. Hrist kröftuglega í 5 sek. Soðið í 3-6 mín, kælt strax á ís. Skilvindað (Eppendorf centrifuge, 5415C) við 15000 rpm í 12 mín. Sýnið fryst þar til rafdráttur fór fram. Sýnið þítt við stofuhita (ca. 22°C) og sett á gel (BioRad, Ready Gel, 10-20% Tris-Tricine/Peptide, 10 wells, 50 µL, cat nr 161-1162). Rafdregið við 60 mA fyrir hvert gel og 200V (keyrslubuffer. þynntur 10x Tris/Tricine/SDS Premixed Electrophoresis Buffer, Bio Rad, cat nr 161-0744). Gelið litað (0,25% Coomassie Brilliant Blue, 45% methanol, 7% acetic acid, leyst í eimuðu vatni) í 30 mín og aflitað (45% methanol, 7% acetic acid, leyst í eimuðu vatni) í 3x30 mín með vægum hristingi. Peptíðrafdráttur var gerður á gömlum fiski (5% & 15% hydrolyseruð sýni) og nýjum fiski (5%, 10% og 15% hydrolyseruðu sýni). Staðall var polypeptide (cat nr. 161-0326) frá Bio-Rad. Þyngdir má sjá í töflu 1.

Tafla 1. Mólþungi (MW) staðla fyrir SDS og peptíð rafdrátt. Staðlar eru allir frá Bio-Rad, númer 161-0326 (“Polypeptide”), 161-0304 (“low”) og 161-0303 (“high”).

Prótein	Uppruni	MW [Da]	Polypeptide	Low	High
Myosin	Rabbit skeletal muscle	200,000			X
beta-galactosidase	<i>E. coli</i>	116,250			X
Phosphorylase b	Rabbit muscle	97,400		X	X
Serum albumin	Bovine	66,200		X	X
Ovalbumin	Hen egg white	45,000		X	X
Carbonic anhydrase	Bovine	31,000		X	
Triosephosphate isomerase	Rabbit	26,625	X		
Trypsin inhibitor	Soybean	21,500		X	
Myoglobin	Equine	16,950	X		
alpha-lactalbumin	Bovine	14,437	X		
Lysozyme	Hen egg white	14,400		X	
Aprotinin	Bovine pancreas	6,500	X		
Insulin, beta chain, oxidized	Bovine	3,496	X		
Bacitracin	-	1,423	X		

2.8.3. Hárpípurafdráttur

Aðferð til greiningar á peptíðum með hárpípurafdrætti (capillary electrophoresis; CE) var byggð á aðferð Engvang og Nielsen (2000) og frá Henrik H. Nielsen (2004). Fosfatbuffer (100 mM, pH 2.75, filteraður gegnum 45µm filter og afgasaður) var notaður sem aðgreiningarbuffer (separation buffer). Fyrir fyrstu notkun hárpípusúlunnar eða langa geymslu var súlan skoluð með 1M NaOH (60 mín), 0.1 M NaOH (15 mín), H₂O (5 mín), 100mM fosfórsýru (10 mín) og aðgreiningarbuffer (15 mín). Hitastig súlunnar var 25°C. Sýni var sprautað inn við þrýstinginn 15 kNsm⁻² og aðskilið við fastan straum (constant voltage of 15kV) í 20 mínútur. UV gleypni var mæld við 195 nm, 214 nm og 280 nm með DAD skynjara. Milli keyrslna var súlan hreinsuð (preconditioned) með 100 mM fosfórsýru í 5 mínútur og með greiningarbuffer í 8 mínútur. Aðgreiningarbuffer var endurnýjaður fyrir hverja keyrslu. Af sýni voru teknir 0.3 ml og fluttir í Ependorfph glas ásamt 0.3 ml af 100

mM fosfat buffer sýrustig 2.7. Lausn færð í sprautu með 0,45µm síu og síað í CE – glas.

2.9. Skynmat

Skynmat var gert á þorskpróteinum. Vatnslausnir voru búnar til af sýnum úr vatni við herbergishita. Styrkur lausna var 1%. Sýnin voru metin á styrkleikaskala af átta þjálfuðum dómurum. Dómararnir gáfu einkunnir á bilinu 0 (engin/ekkert) til 4 (mikil/mikið lykt/bragð) fyrir harðfisk- og fiskilykt, harðfisk-, fiski- og beiskt bragð.

Hver dómari fékk um 20ml af hverju sýni í litlu plastglasi. Sýnin voru dulmerkt með þriggjustafa tölustöfum og dómarar höfðu engar upplýsingar um sýnin. Sýnin níu voru metin í tvísýni, mest sex sýni í einu. Matsblað fyrir skynmat má sjá í viðauka.

3. Niðurstöður – Mælingar á kolmunna

3.1. Ensímrof

Magn ensíms og tímalengd ensímrofs var mismikið eftir því hvaða endanlegt stig vatnsrofs leitað var eftir (töflur 2a og 2b). Misjafnt var hversu margar keyrslur voru gerðar fyrir hvert hýdrólýsustig. Fyrir eldri fiskinn var ekki komin reynsla á að stjórna ensímhýdrólýsinni og í sumum tilfellum gekk hýdrólýsering of langt. Betur gekk með nýrri fiskinn. Athygli er vakin á því að í gröfum og myndum er %DH rúnað í 0, 2,5, 5, 10 og 15%. Einnig var búið til sýni sem var um 7.75%DH af eldri fisk. Ónákvæmni var í hýdrólýseringu og því er þessu sýni sleppt í flestum niðurstöðum og í allri umræðu.

Tafla 2a. Nýrri fiskur. Hitastig (T), meðaltalshitastig±staðalfrávik, hlutfall ensíms og hvarfefnis (E/S), magn próteins (MP), tímalengd hvarfs (t), stig hýdrólýsu (DH) og meðalstig hýdrólýsu.

Dagsetning	T [°C]	T [°C] Meðaltal	E/S	MP [g]	t [min]	DH [%]	DH [%] Meðaltal
21.9.2005	23,7		0	21	0	0	
27.9.2005	21,8	22,4±1,1	0	62	0	0	0
29.9.2005	21,8		0	68	0	0	
27.9.2005	22,2	22,0±0,3	1/1000	62	153	2,5	2,5
30.9.2005	21,8		1/500	65	105	2,5	
24.9.2005	21,8	21,8±0,0	1/1000	67	377	5,1	5,1
28.9.2005	21,8		1/500	76	260	5,0	
22.9.2005	23,0	22,3±1,0	1/50	65	84	10	10,0
3.10.2005	21,6		1/50	64	89	10,0	
21.9.2005	21,6		1/50	20	206	16,7	
28.9.2005	22,5	22,0±0,5	1/50	66	197	14,9	15,8
29.9.2005	21,8		1/50	63	156,5	15,9	

Tafla 2b. Eldri fiskur. Hitastig (T), meðaltalshitastig±staðalfrávik, hlutfall ensíms og hvarfefnis (E/S), magn próteins (MP), tímalengd hvarfs (t), stig hýdrólýsu (DH) og meðalstig hýdrólýsu.

Dagsetning	T [°C]	T [°C] Meðaltal	E/S	MP [g]	t [min]	DH [%]	DH [%] Meðaltal
26.6.2005	21,6		1/50	76	12,5	2,5	
29.6.2005	21,0		1/50	76	13,5	2,5	
1.8.2005	23,8	23,3±1,9	1/1000	23	113,5	2,5	2,6
1.8.2005	25,0		1/1000	27	135	2,7	
3.9.2005	25,0		1/1000	27	135	2,7	
14.10.2005	23,7	23,7±0,0	1/500	60	290	5,0	5,1
9.9.2005	23,7		1/1000	18	302	5,2	
6.9.2005	23,8	23,8	1/1000	24	1234	10,7	10,7
29.6.2005	23,4		1/50	74	264	16,3	
28.6.2005	22,5	23,1±0,5	1/50	63	327,5	16,5	16,6
30.6.2005	23,4		1/50	12	246,5	17,1	

3.2. Efnafræðilegir eiginleikar

3.2.1. Efnasamsetning

Próteinmagn var mælt í hráefni og próteinisolati (tafla 3).

Tafla 3. Próteinmagn í hráefni og próteinisolati.

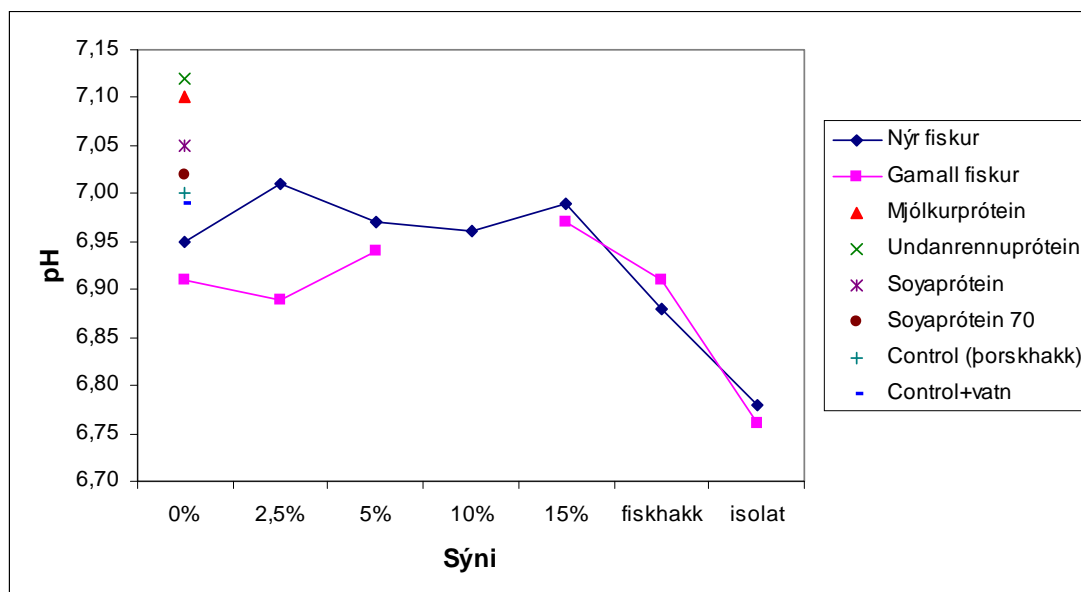
	Hakk [%]	Prótein Isolat [%]
Eldri fiskur (Hausaður og slægður)	18.1	8.3
Nýrri fiskur (flök)	18.4	6.8

Heildarefnasamsetning var mæld í próteindufti (tafla 4). Saltmagn eykst í dufti með auknu stigi vatnsrofs (%DH). Er það tilkomið þar sem NaOH er bætt út í sýni við hydrólýseringu og saltsýru (HCl) til að ná endanlegu sýrustigi. Magn salts, NaCl, eykst því eftir því sem stig vatnsrofs er hærra.

Tafla 4. Efnasamsetning í próteindufti. Meðaltal (n=2) ± staðalfrávik.

	Prótein [%]	Fita [%]	Vatn [%]	Aska [%]	Salt [%]	Saltlaus aska [%]
Eldri fiskur						
Hakk	86,8 ± 0,5	1,6 ± 0,3	2,7 ± <0,1	9,7 ± 0,5	3,6 ± 0,1	
Prótein isolat	90,6 ± 0,1	0,5 ± <0,1	2,3 ± 0,1	5,0 ± 0,3	4,2 ± <0,1	
0%DH	86,7 ± 0,1	0,2 ± <0,1	4,2 ± 0,1	7,7 ± 0,1	5,3 ± 0,1	2,4 ± <0,1
2,5%DH	81,2 ± 0,2	0,2 ± <0,1	5,2 ± 2,1	13,2 ± 0,1	11,7 ± 0,1	2,5 ± <0,1
5%DH	78,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1	4,3 ± <0,1	15,6 ± <0,1	13,9 ± 0,1	2,8 ± <0,1
10%DH	81,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	4,1 ± 0,1	10,9 ± 0,1	8,2 ± <0,1	
15%DH	77,4 ± 0,1	2,1 ± 0,1	4,1 ± <0,1	13,9 ± 0,4	10,9 ± 0,1	
Nýrri fiskur						
Hakk	89,3 ± 0,8	1,4 ± <0,1	2,4 ± 0,1	8,4 ± 0,1	3,9 ± 0,1	
Prótein isolat	93,0 ± 0,1	0,3 ± <0,1	2,1 ± <0,1	4,2 ± <0,1	3,7 ± <0,1	
0%DH	85,3 ± 0,3	0,2 ± <0,1	1,8 ± <0,1	12,6 ± 0,1	10,4 ± <0,1	2,3 ± <0,1
2,5%DH	80,3 ± 0,3	0,2 ± <0,1	1,7 ± <0,1	17,2 ± 0,2	15,3 ± <0,1	2,4 ± <0,1
5%DH	80,0 ± 0,1	0,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1	15,9 ± 0,3	14,4 ± 0,1	2,5 ± <0,1
10%DH	77,7 ± 2,2	0,3 ± 0,1	1,9 ± <0,1	19,3 ± <0,1	17,1 ± 0,1	2,6 ± <0,1
15%DH	73,7 ± 0,2	0,2 ± <0,1	2,1 ± <0,1	21,3 ± <0,1	18,9 ± <0,1	2,8 ± <0,1

3.2.2. Sýrustig (pH)

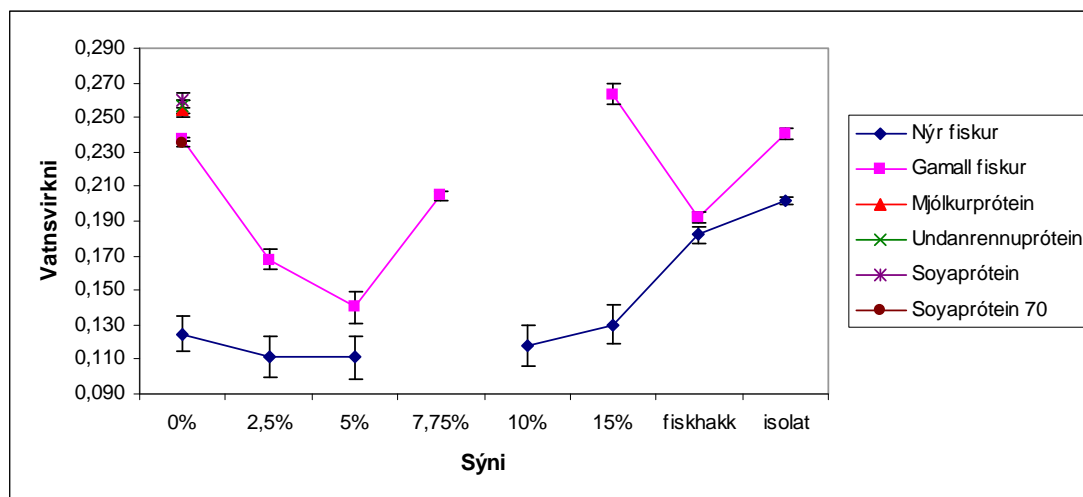


Mynd 6. Sýrustig vatnsheldnisýna, fyrir skilvindun, af kolmunna (mismikið hydrolyseraðra sýna, fiskhacks og prótein isolats) og viðmiðunarsýnum (mjólkurpróteins, undanrennupróteins og tveggja tegunda af sojapróteini).

Sýrustig í sýnum með íbættu próteini af gömlum og nýjum fiski er mjög svipað. Sýrustig í fiskhakk og isolati var ekki stillt fyrir frystingu sem veldur því að pH í hakkinu er lægra fyrir þau sýni. Sýrustig í frostþurrkuðu kolmunnahakki reynist vera um 6,9 sem er hefðbundið sýrustig. Viðmiðunarsýni hafa örlítið hærra sýrustig.

3.3. Dufteiginleikar

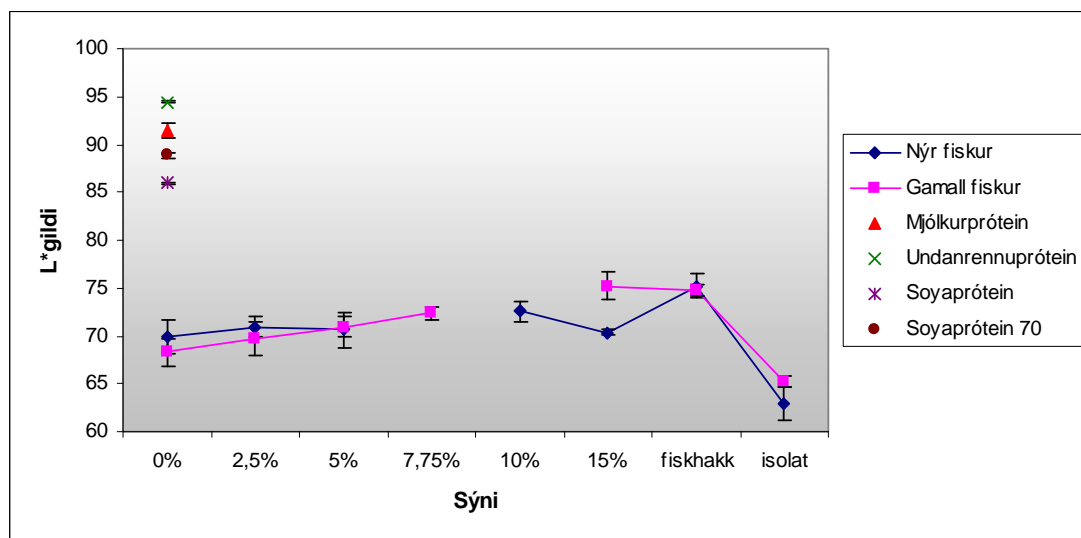
3.3.1. Vatnsvirkni



Mynd 7. Vatnsvirkni kolmunnasýna (mismikið hydrolyseraðra sýna, fiskhacks og prótein isolats) og viðmiðunarsýna (mjólkurpróteins, undanrennuþróteins og tveggja tegunda af soyapróteini).

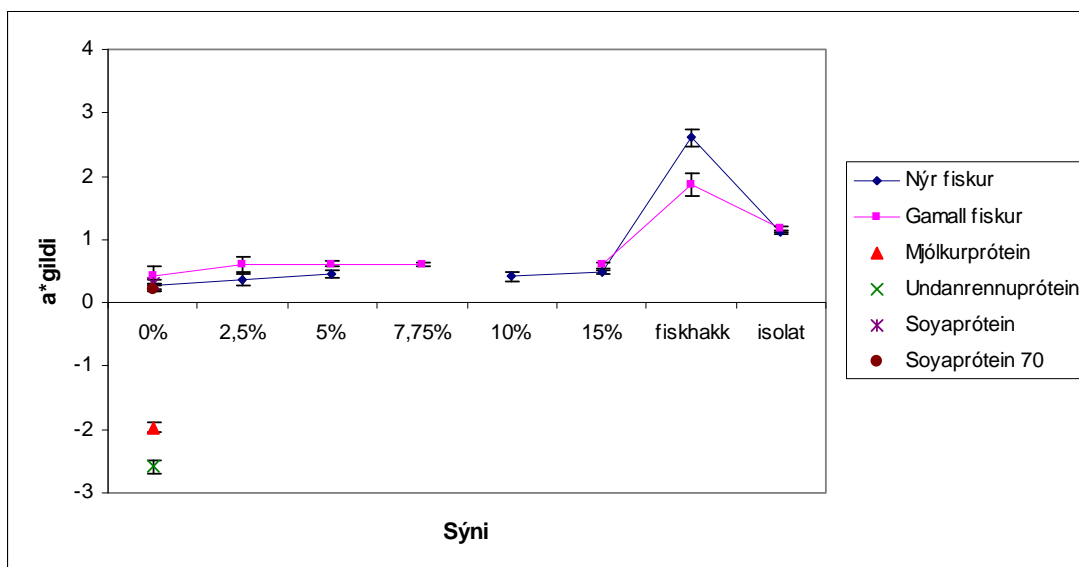
Vatnsvirkni sýnanna er nokkuð frábrugðin. Bæði hjá nýja og gamla fiskinum, hefur 5% hydrolyseraða sýnið lægstu vatnsvirknina. Meiri sveiflur koma fram í vatnsvirkni hjá eldri fiskinum. Þess ber að geta að próteinduftið er mjög þurr vara og dregur þar af leiðandi mjög auðveldlega í sig raka úr andrúmsloftinu. Ástæðan fyrir sveiflum í vatnsvirkni verður mjög líklega rakin til mismunandi geymslumáta á sýnunum. Öll viðmiðunarsýnin, 0% og 15% gamall fiskur, fiskhakk og isolat, bæði nýja og gamla fisksins, voru geymd í sýnatökuglössum en ekki í lofttæmdum umbúðum. Öll sýni nýja fisksins, fyrir utan fiskhakkið og isolatið, voru geymd í lofttæmdum umbúðum og hafa þar af leiðandi lægri vatnsvirkni. Auk þess voru sýnin þurrkuð í tveimur umferðum. Annars vegar í júní 2006 og hins vegar í október. Ekki var gætt nægjanlega vel að geymslu á eldri sýnum og gátu þau því hafa dregið í sig raka fyrir mælingu.

3.3.2. Litur



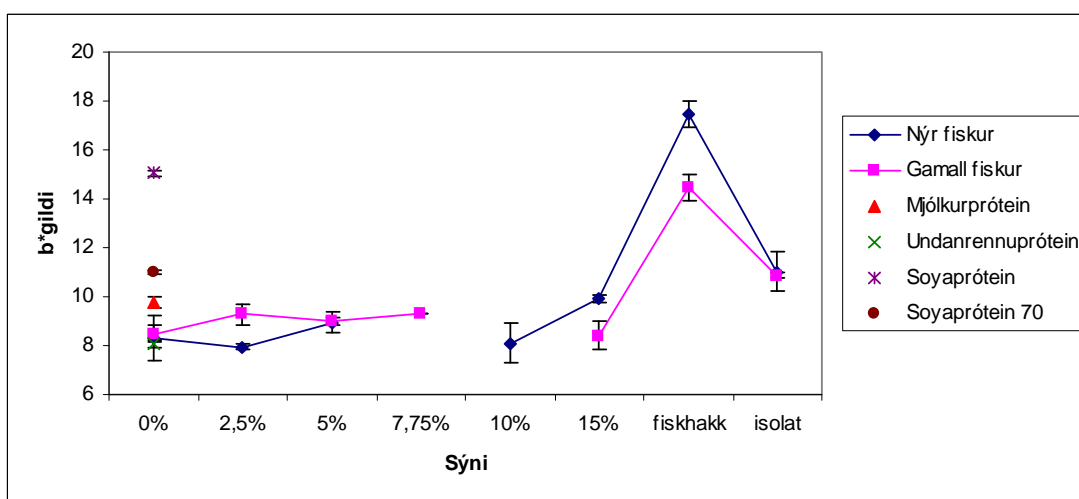
Mynd 8. L*gildi kolmunnaþýna (mismikið hydrolyseraðra sýna, físhakks og prótein ísolats) og viðmiðunarsýna (mjólkurpróteins, undanrennupróteins og tveggja tegunda af sojapróteini).

Af mynd 2 má sjá að L*gildi fyrir nýjan fisk og gamlan fisk eru mjög svipuð. L*gildi fyrir viðmiðunarsýnin (mjólkurprótein, undanrennuprótein og tvær gerðir af sojapróteini) eru hins vegar mun hærri. L*gildið gefur upplýsingar um ljósleika sýnisins, þar sem L=0 þýðir svartur og L=100 þýðir hvítur. Því er ljóst að viðmiðunarsýnin eru mun hvítari en sýnin af nýja og gamla fiskinum. Munur á L*gildi hjá nýjum og gömlum fiski er mjög lítill. Þó er greinilegt að ísolatið er dekkra en önnur sýni, sem kemur á óvart þar sem við einangrun próteina eru fjarlægð efni sem geta valdið lit í sýnum. Þetta þarf að kanna nánar í næstu rannsóknum.



Mynd 9. a*gildi kolmunnasýna (mismikið hydrolyseraðra sýna, fiskhacks og prótein isolats) og viðmiðunarsýna (mjólkurpróteins, undanrennuþróteins og tveggja tegunda af sojapróteini).

a*gildið gefur upplýsingar um grænan og rauðan lit. Ef gildi er neikvætt bendir það til þess að sýnið sé grænleitt en jákvætt gildi að sýni sé rauðleitt. Mjólkurprótein og undanrennuþrótein hafa örlítið grænan tón (neikvætt gildi) og eru frábrugðin öðrum sýnum að því leyti. Öll önnur sýni hafa örlítið rauðan tón, þeirra mest fiskhakk og isolat bæði nýja fisksins og gamla fisksins. Hér reynist hakk vera rauðleitari en isolat sem er í samræmi við það sem búist var við. Munur á a-gildi hjá nýjum og gömlum fiski er mjög lítill.



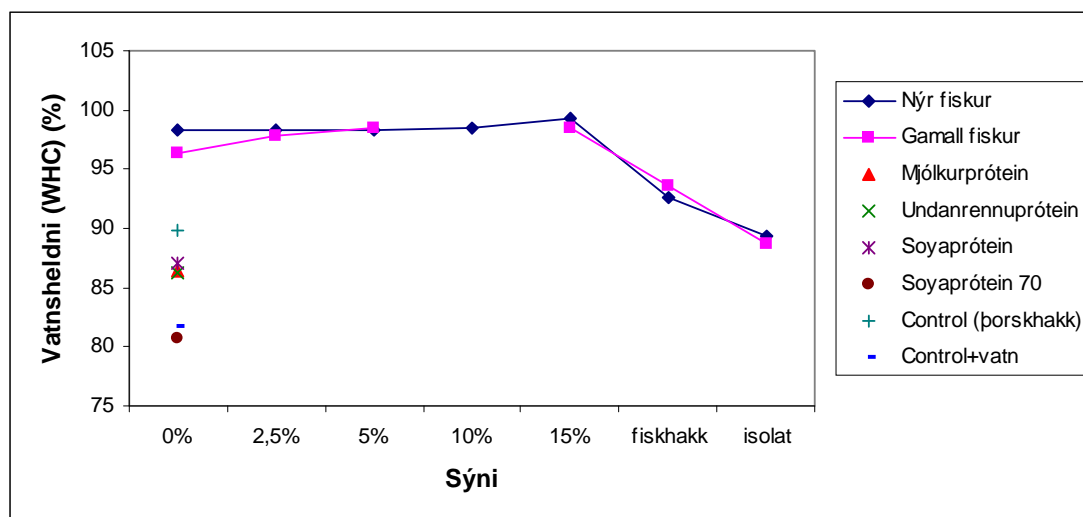
Mynd 10. b*gildi kolmunnasýna (mismikið hydrolyseraðra sýna, fiskhacks og prótein isolats) og viðmiðunarsýna (mjólkurpróteins, undanrennuþróteins og tveggja tegunda af sojapróteini).

b*gildið gefur upplýsingar um bláan (b<0) og gulan (b>0) lit. Öll sýnin mælast með jákvæða tölu og því er ekkert þeirra með bláan tón. Gulustu sýnin eru báðar gerðir

sojapróteins, fiskhakk og prótein isolat, bæði nýja fisksins og gamla fisksins. Eins og hjá a-gildinu þá er isolat minna gult en hakksýni.

3.4. Eðliseiginleikar

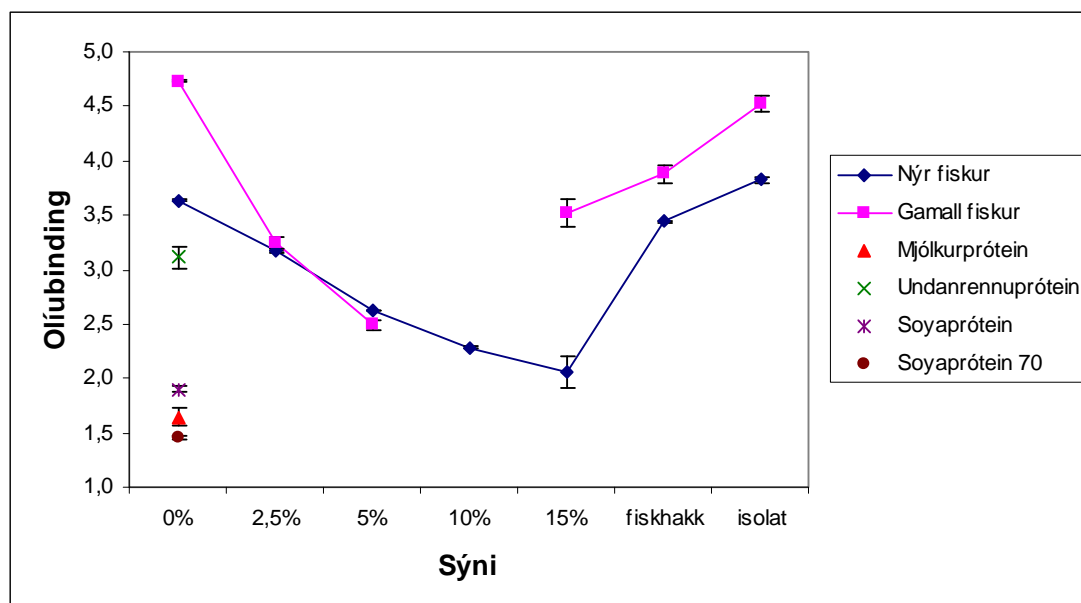
3.4.1. Vatnsheldni (Water holding capacity)



Mynd 11. Vatnsheldni kolmunnasýna (mismikið hydrolyseraðra sýna, fiskhakks og prótein isolats) og viðmiðunarsýna (mjólkurpróteins, undanrennuþróteins og tveggja tegunda af sojapróteini).

Á mynd 5 sést greinilega að vatnsheldni nýja og gamla fisksins er mjög svipuð. Viðmiðunarsýnin hafa lægri vatnsheldni en fisksýni. Þetta er að hluta rakið til lægra próteininnihalds í viðmiðunarsýnunum. Afar athyglisvert er að viðmiðunarsýnin (sýni með íbættu mjólkur-, undanrennu- eða sojapróteini) hafa öll lægri vatnsheldni en control sýni (sýni með þorskhakki, hvorki vatni né próteini bætt í). Þessi niðurstaða var ekki í samræmi við væntingar, þar sem önnur rannsókn sýndi aukna vatnsheldni við íblöndun próteins (Kristinsson og Rasco, 2000).

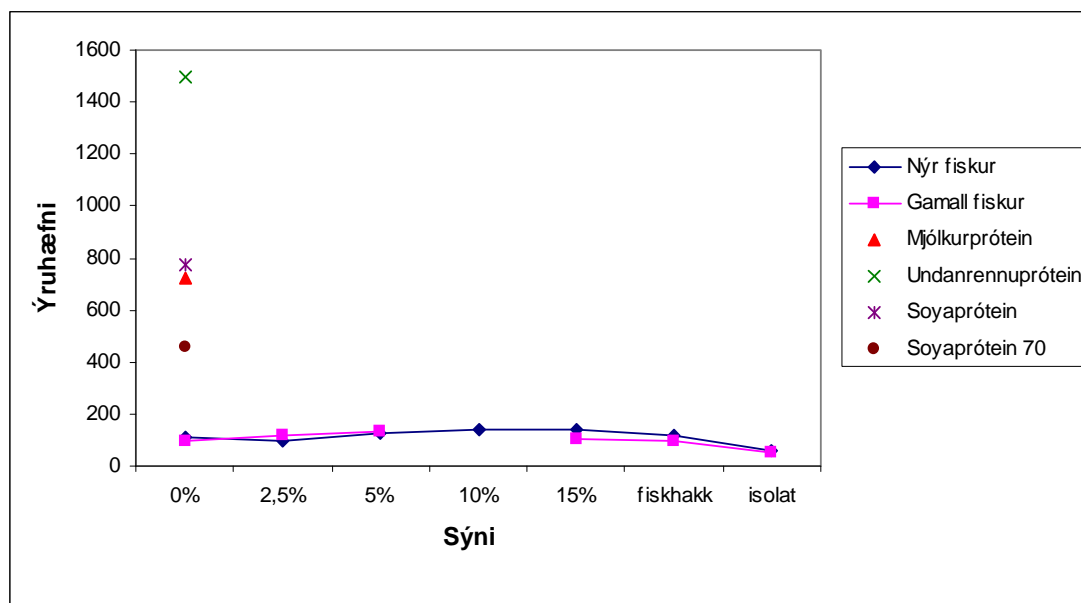
3.4.2. Olíubinding (oil binding capacity)



Mynd 12. Olíubinding kolmunnasýna (mismikið hydrolyseraðra sýna, fiskhacks og prótein isolats) og viðmiðunarsýna (mjólkurpróteins, undanrennuþróteins og tveggja tegunda af sojapróteini).

Á mynd 12 er augljóst að viðmiðunarsýni hafa mun lægri olíubindingu en kolmunnasýnin. Því er augljóst að fiskpróteinið hefur mun betri getu til að binda olíu en mjólkur- og sojapróteinin sem hér voru til viðmiðunar. Einnig er ljóst að hydrolysering lækkar getu til olíubindingar, þar sem sýni án hydrolyseringar hafa meiri getu til olíubindingar en hydrolyseruðu sýnin.

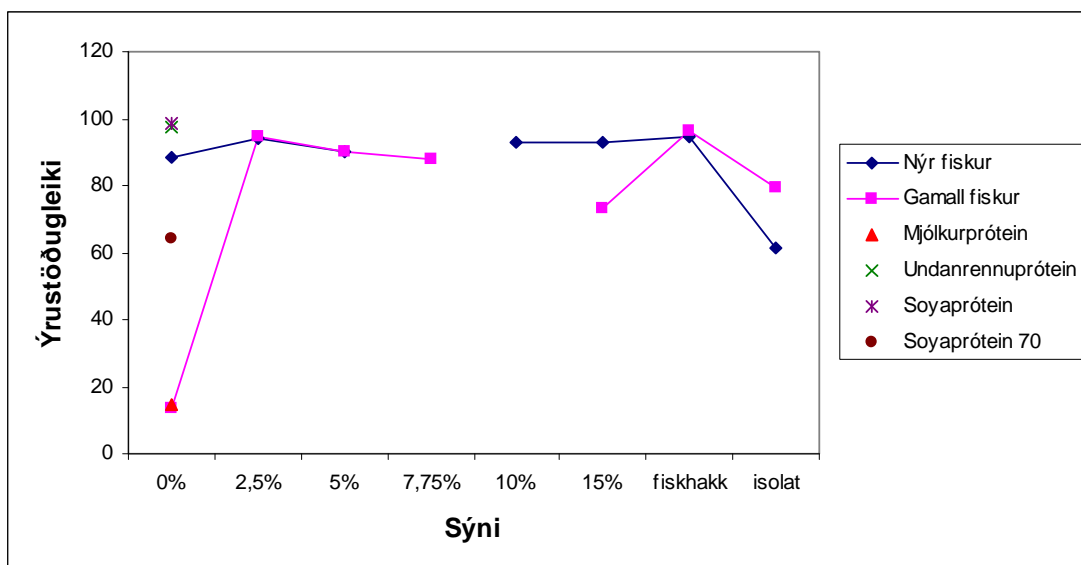
3.4.3. Ýruhæfni (emulsion capacity)



Mynd 13. Ýruhæfni kolmunnaþýna (mismikið hydrolyseraðra þýna, fiskhacks og þrótein isolats) og viðmiðunarsýna (mjólkurþróteins, undanrennuþróteins og tveggja tegunda af sojapróteini).

Ýruhæfni fiskþróteinanna er nokkuð svipuð, eins og sést á mynd 13. Viðmiðunarsýnin hafa öll mun meiri hæfni til ýrumyndunar en fiskþróteinin, þeirra þó mest undanrennuþróteinið. Niðurstöður í ýruhæfni eru nokkuð misjafnar. Þekkt er að hitastig og flæðihraði olíu hafi töluverð áhrif á niðurstöður (Liang og Kristinsson, 2005). Einnig skal hafa í huga að salt getur haft áhrif á ýrueiginleika, bæði aukið og dregið úr þeim eftir þróteinum og saltmagni (Martinez og félagar 2007). Hið háa saltinnihald kolmunnaþróteina getur því haft áhrif hér.

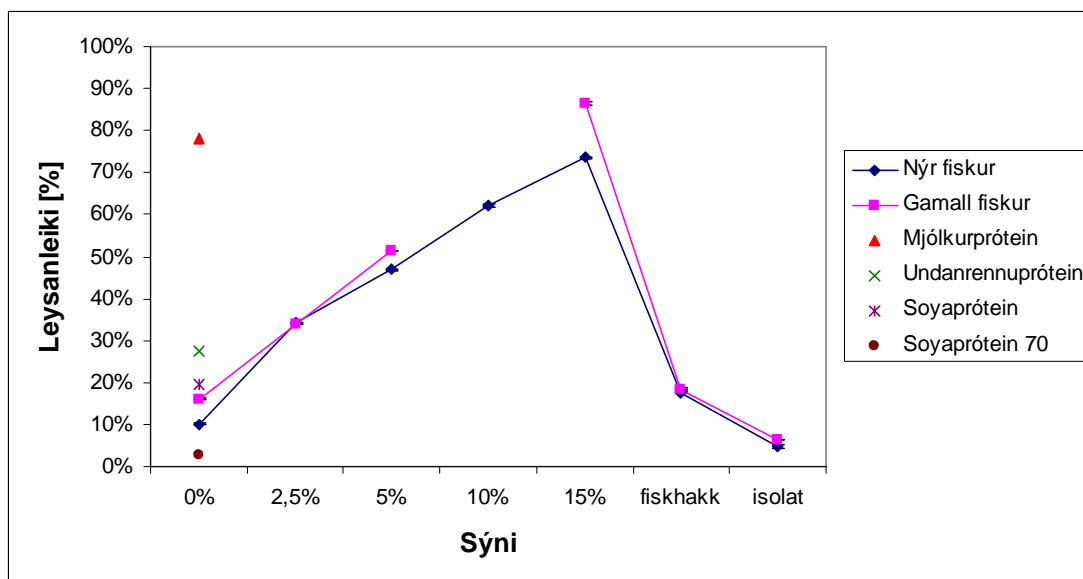
3.4.4. Ýrustöðugleiki (emulsion stability)



Mynd 14. Ýrustöðugleiki kolmunnasýna (mismikið hydrolyseraðra sýna, fiskhacks og prótein isolats) og viðmiðunarsýna (mjólkurpróteins, undanrennuþróteins og tveggja tegunda af sojapróteini).

Nokkur breytileiki kom fram í ýrustöðugleika sýnanna, bæði hjá kolmunnasýnunum og viðmiðunarsýnunum. Ýruhæfni fiskpróteinanna er nokkuð svipuð, eins og sést á mynd 8. Illa gekk að blanda sumum duftum saman við olíuna og eru því lagskipt þegar þeim er hellt í mæliglösín. Í fyrsta glasið hellist mest af froðunni og í síðasta glasinu verður mest af vatnsfasa, þar sem hann hefur settið eftir á botni plastbikarglassins.

3.4.5. Leysanleiki



Mynd 15. Próteinleysanleiki kolmunnasýna (mismikið hydrolyseraðra sýna, fiskhacks og prótein isolats) og viðmiðunarsýna (mjólkurpróteins, undanrennuþróteins og tveggja tegunda af soyapróteini).

Próteinleysanleiki eykst eftir því sem hýdrólýsustig eykst (mynd 15). Sýni úr nýrri og eldri fiski hegða sér mjög svipað. Athygli vekur að próteinleysanleiki viðmiðunarpróteina er lítil nema þá mjólkurpróteins.

3.5. Lífvirkni

3.5.1. Gastrin/CCK

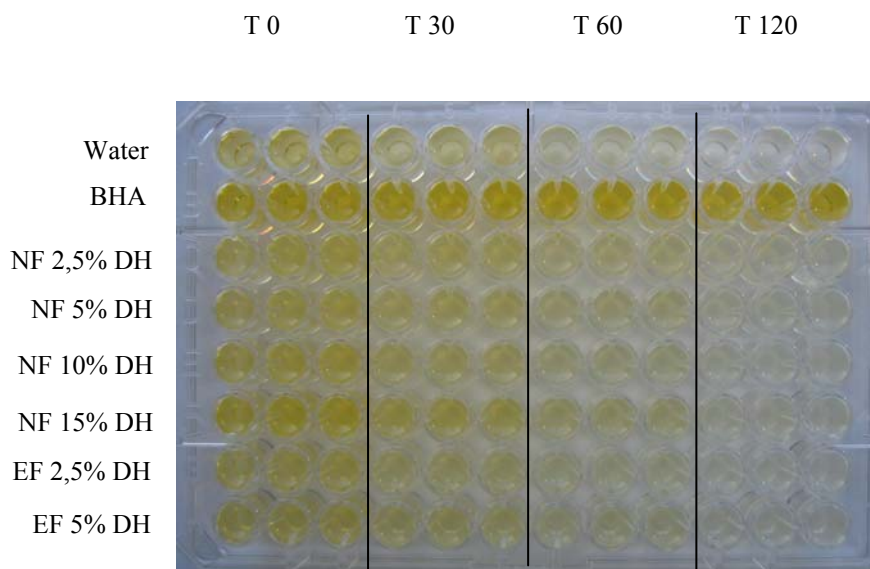
Niðurstöður á RIA mælingu gastrin/CCK má sjá í töflu 5. Erfitt reyndist að leysa sýnin upp. Þrátt fyrir það voru niðurstöður með góðum endurtakanleika (reproducibility). ED 50 gildið segir til um nauðsynlegt magn af peptíðum til að binda 50% af mótefninu. Lág gildi bendir því til góðrar virkni. Ekki eru sjáanleg bein áhrif af %DH fyrir ED 50 gildin.

Tafla 5. Gastrin/CCK RIA (Radioimmunoassay; geislaónæmismælingu) kolmunnapróteina.

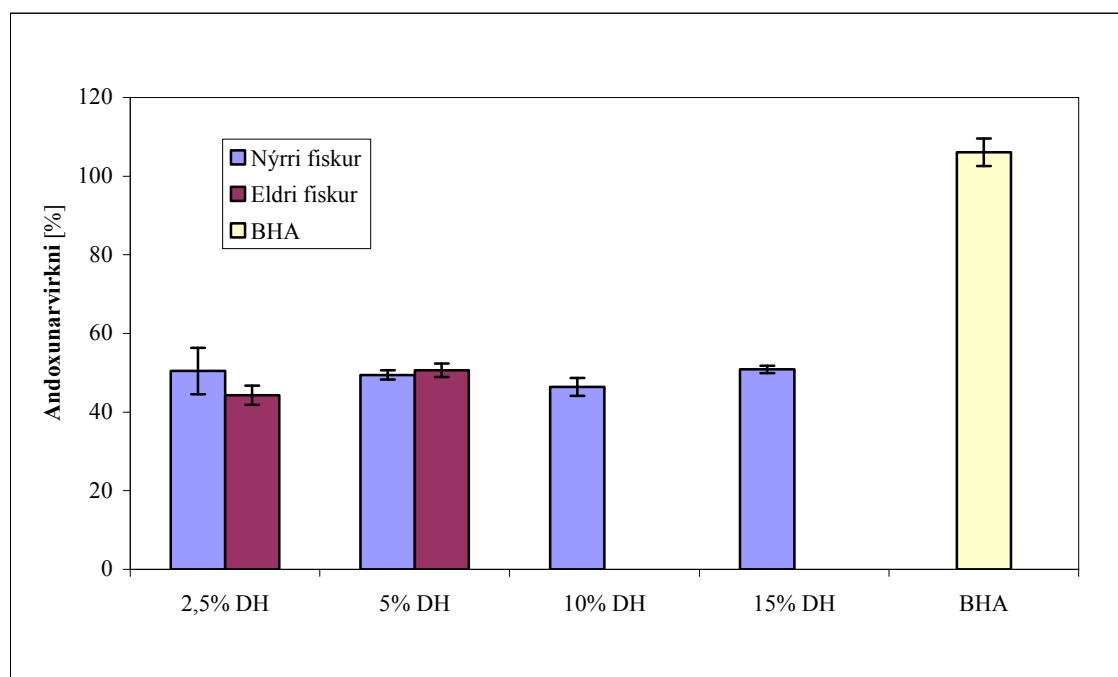
Hráefni	Prótein [mg/ml]	Hallatala (G=-42,3)	Magn [pg/mg þurrefni]	Magn [pg/mg prótein]	ED 50 [mg] (G=12pg)
Eldri fiskur					
Hakk	10,6	-20,8	0,7	31,8	349,8
0%DH	12,5	-17,9	0,6	23,6	1217,3
2,5%DH	22,7	-69,4	0,2	4,0	12,8
5%DH	29,2	-34,9	0,7	11,1	34,1
Nýrri fiskur					
Hakk	9,8	-32,6	0,4	20,5	81,8
0%DH	7,5	-4,9	0,9	59,3	-
2,5%DH	23,5	-48,4	0,3	6,0	26,2
5%DH	26,3	-39,3	0,6	11,4	24,9
10%DH	24,5	-31,3	0,8	16,9	37,1
15%DH	29,1	-68,1	0,2	3,1	13,5

3.5.2. Andoxun

Sem fyrr reyndist erfitt að leysa duftin upp og einungis unnt að greina leysanlegu sýnin. Niðurstöður má sjá á myndum 16 og 17. Ekki reyndist vera munur með stigi vatnsrofs (%DH) á andoxunarvirkni.



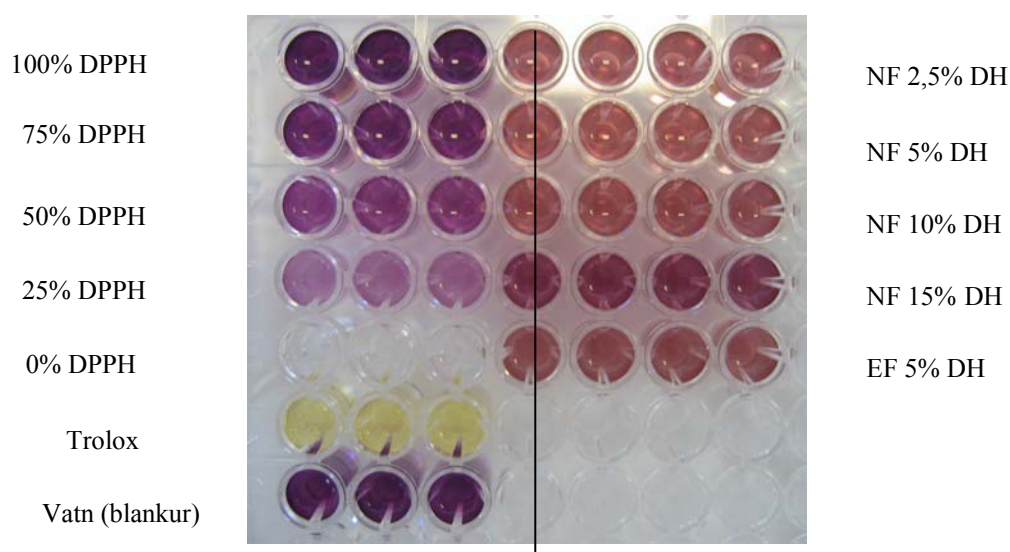
Mynd 16. Mæling á andoxunarvirkni kolmunnapróteina í β -karótein linolat módelkerfi. NF =nýrri fiskur; EF=eldri fiskur.



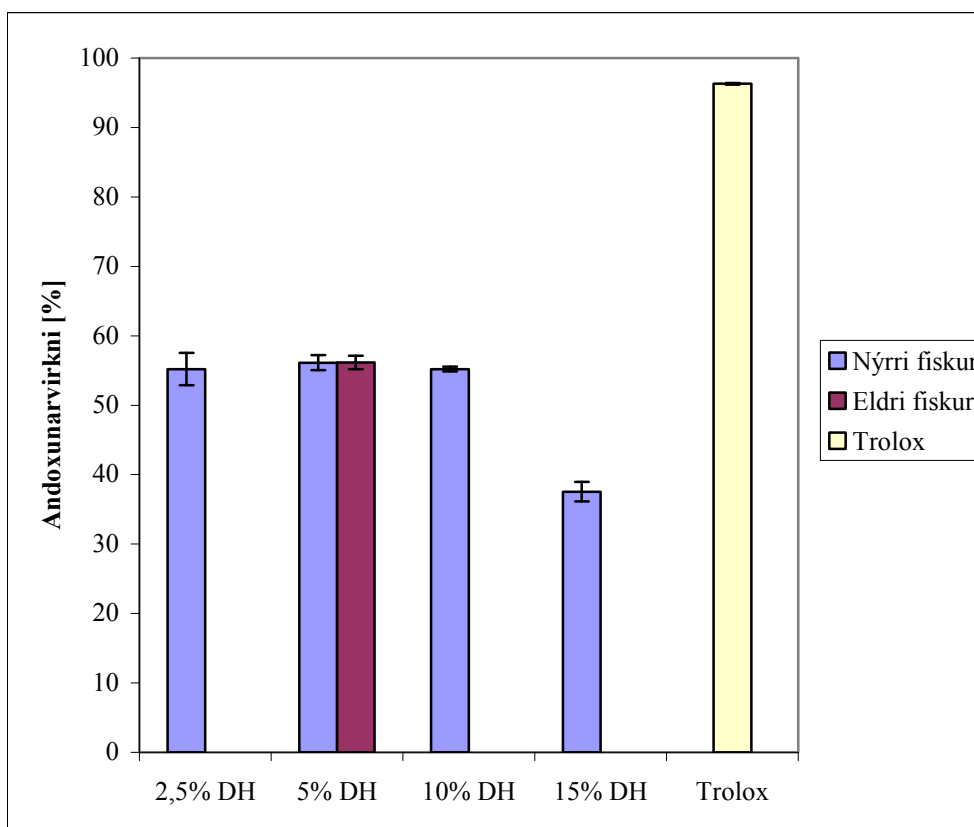
Mynd 17. Andoxunarvirkni kolmunnapróteina eftir 60 mínútur mælt í β -karótein linolat módelkerfi ([prótein]=10 mg/ml skv Biuret).

DPPH

Niðurstöður á andoxunarvirkni kolmunnapróteina mælt með DPPH má sjá á myndum 18 og 19. Með auknu stigi vatnsrofs dró örlítið úr andoxunarvirkni peptíða. Þessi niðurstaða er ekki í samræmi við það sem aðrir rannsakendur hafa komist að. Aðrar niðurstöður benda til þess að hækkað stig vatnsrofs auki andoxunarvirkni peptíða (Li og félagar 2007). Erfiðleikar við að leysa upp sýni gætu verið ástæðan fyrir þessum niðurstöðum. Hefði verið áhugavert að endurtaka mælingar á andoxunarvirkni hýdrólýsata. Ekki reyndist það unnt á þessu stigi rannsóknarinnar.



Mynd 18. Mæling á andoxunarvirkni kolmunnahýdrólýsata með DPPH. NF = Nýrri fiskur; EF = eldri fiskur.



Mynd 19. DPPH andoxunarvirkni kolmunna próteins ([prótein]=20 mg/mL skv Biuret).

3.5.3. ACE – hindravirkni

Sýni fyrir ACE hindravirkni voru dregin út í 0,1M NaCl lausn skv aðferð Morrís.

Tafla 6. ACE-hindravirkni í kolmunna

Sýni	ACE hindrun [%]	IC ₅₀ [mg/ml]
0% DH	9,4	-
2,5% DH	53,3	3,28
5% DH	61,7	3,14
10% DH	71,7	1,15
15% DH	75,0	1,32
Isolat	5,5	-
Hakk	35,9	-

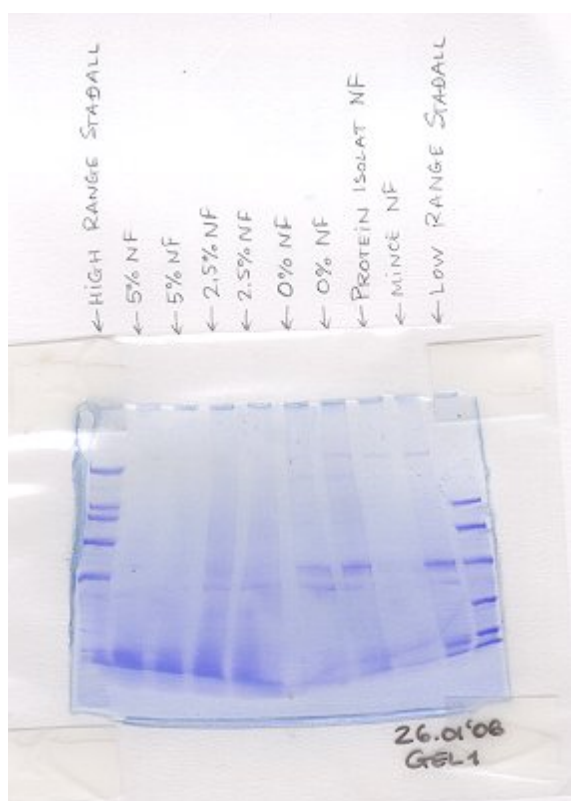
- IC₅₀ ekki mælanlegt

ACE hindravirkni kolmunna dufts eykst með auknu niðurbroti próteina (Tafla 6). Ekki reyndist unnt að mæla IC₅₀ gildi fyrir kolmunnaprótein sem ekki hafði verið hýdrólýserað (0%DH), isolat og hakk (Tafla 5). Til þess að það sé mögulegt þarf hindravirkni sýnis að vera yfir 50% sem reyndist ekki vera fyrir þessi sýni.

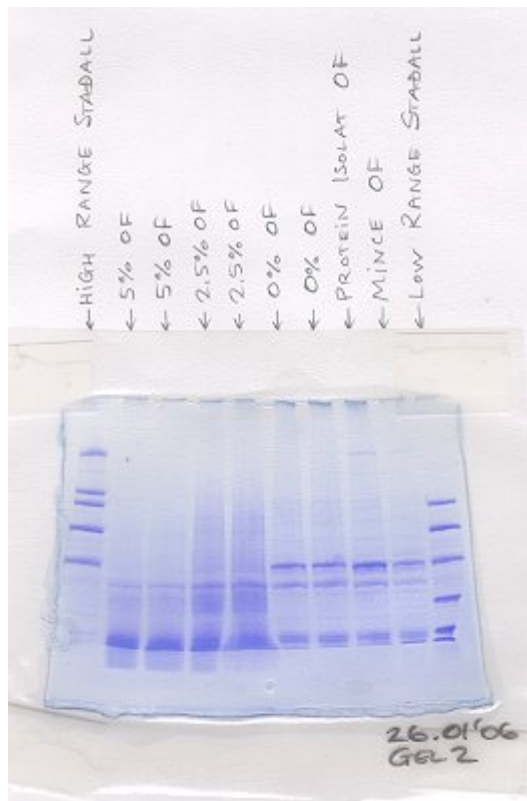
3.6. Rafdráttur

3.6.1. Próteinrafdráttur

Próteinrafdráttur af gömlum og nýjum fiski er mjög svipaður (myndir 20 & 21). Ekki verður vart að prótein falli út í gamla fiskinum. Örlítið greinist af myosíni í fiskhaki, próteinisolati og 0% hydrolyseruðum massa. Gamli fiskurinn inniheldur eitthvað af próteini með mólþunga hærra en 97kD, þar sem staðallinn phosphorylase er staðsettur. Sömu sýni innihalda greinilega prótein með mólþunga um 45kD, þar sem ovalbúmín er staðsett í staðlinum. Er það líklegast vöðvapróteinið aktín. Ekki kemur á óvart að hydrolyseruðu sýnin (2,5% og 5%) hafi ekki greinanlegt magn af þyngri próteinum en 45kD, þar sem próteinin eru að nokkru leyti niðurklippt. Þyngsta greinanlega próteinið hjá 2,5% og 5% hydrolyseruðum sýnum er á milli carbonic anhydrase (31kD) og ovalbumins (45kD) og það prótein er líklega trópónín (~37kD).



Mynd 20. SDS próteinrafdráttur. Línur 2 til 9 frostþurrkuð kolmunnaprótein úr nýrri fisk (NF), hakk (lína 9), isolat (lína 8), mismikið vatnsrofið (0-5%DH – línur 2-7). Lína 1 “high range” staðall (~200, 116, 97, 66 og 45 kDa), lína 10 “low range “ staðall frá Bio-Rad (~97, 66, 45, 31, 22 og 14 kDa).



Mynd 21. SDS Próteinrafdráttur. Línur 2 til 9 frostþurrkuð kolmunnaprótein úr eldri fisk (OF), hakk (lína 9), isolat (lína 8), mismikið vatnsrofið (0-5%DH – línur 2-7). Lína 1 “high range” staðall (~200, 116, 97, 66 og 45 kDa), lína 10 “low range” staðall frá Bio-Rad (~97, 66, 45, 31, 22 og 14 kDa).

3.6.2. Peptíðrafdráttur

Peptíðrafdráttarsýni af gömlum og nýjum fiski eru nokkuð svipuð (mynd 22). Þó er erfitt að ákvarða nákvæmlega mólþunga próteinanna í sýnunum þar sem keyrslan tókst ekki nógu vel. Samt er greinilegt að lítil munur er á peptíðsýnum af gömlum og nýjum fiski. Til dæmis hafa 5% hydrolyseruðu sýnin sömu próteinin, próteinböndin eru daufari hjá 10% hydrolyseruðu sýnunum og því minna magn af próteinum. Hjá 15% hydrolyseruðu sýnunum er varla unnt að greina peptíðbönd og því greinilegt að töluvert niðurbrot hefur átt sér stað og peptíðin eru orðin mjög smá.



Mynd 22. Peptíðrafdráttur. Línur 4 til 9 frostþurrkuð kolmunnaprótein úr nýrri (NF) og eldri fisk (OF), mismikið vatnsrofið (5-15%). Línur 1 og 10 peptíðstaðall frá Bio-Rad (~27, 17, 14 og 7 Da). Lína 2 og 3 þorskrótein (sýni út ótengdu verkefni sem fengu að fljóta með á geli).

4. Niðurstöður – Þorskur

4.1. Leysanleiki í 0.1 M NaCl lausn

Próteininnihald í lausnum úr leysanleikamælingu skv Morr mælt með Dumas (Tafla 7).

Tafla 7. Leysanleiki próteina í 0.1 M NaCl lausn.

Heiti	Hráefni	Ensím	%DH	Total N	Prótein [g/100g]	Leysanleiki [%]
H-N-05	Hakk	Neutraxe	5%	0,143	0,895	100
H-P-05	Hakk	Protamex	5%	0,142	0,885	99
H-P-10	Hakk	Protamex	10%	0,141	0,880	101
I-N-05	Isolat	Neutraxe	5%	0,146	0,910	97
I-P-05	Isolat	Protamex	5%	0,147	0,920	96
I-P-10	Isolat	Protamex	10%	0,141	0,880	97
I-P-15	Isolat	Protamex	15%	0,137	0,855	96
H-0-00	Hakk	Ekkert	0%	0,093	0,580	56 [#]
I-0-00	Isolat	Ekkert	0%	0,085	0,530	51 [#]

[#]Próteinmagn í dufti ekki mælt. Leysanleiki miðast því við að sýni innihaldi einungis prótein.

4.2. Lífvirkni

4.2.1. ACE

Niðurstöður á ACE-hindravirkni má sjá í töflu 8. Greinilegt er að þegar DH hækkar eykst hindravirkni sýnisins; það er að segja IC₅₀ gildi lækkar. Með öðrum orðum að minna magn af sýni þarf til að hindra 50% af ensími. Hýdrólýserað Isolat virðist hafa meiri hindravirkni en hýdrólýserað hakk. Kemur það á óvart þar sem gera má ráð fyrir að í hakkinu séu fleiri vatnsleysanleg peptíð og aminosýrur til staðar. IC₅₀ gildi fyrir kolmunna (tafla 6) voru svipuð niðurstöðum fyrir þorsk.

Tafla 8. ACE hindrun og IC₅₀ gildi fyrir próteinduft.

Heiti	Hráefni	Ensím	%DH	ACE-hindrun [%]	IC ₅₀ [mg/100g prótein]
H-N-05	Hakk	Neutraxe	5%	69,1	3,33
H-P-05	Hakk	Protamex	5%	67,6	3,08
H-P-10	Hakk	Protamex	10%	76,5	0,91
I-N-05	Isolat	Neutraxe	5%	74,2	2,21
I-P-05	Isolat	Protamex	5%	70,4	1,53
I-P-10	Isolat	Protamex	10%	75,9	1,32
I-P-15	Isolat	Protamex	15%	77,7	0,62
H-0-00	Hakk	Ekkert	0%	33,1	nd
I-0-00	Isolat	Ekkert	0%	31,7	nd

4.3. Rafdráttur

4.3.1. Próteinrafdráttur

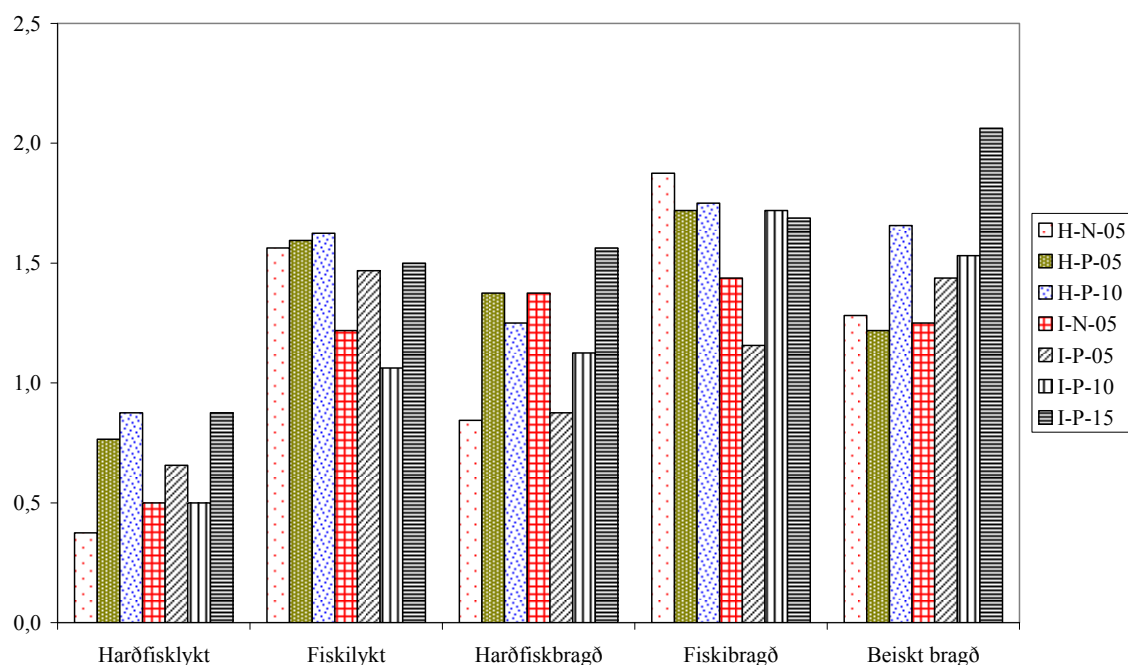
Þorsksýni voru mæld með próteinrafdrætti. Engin bönd sáust við rafdráttin. Kemur það ekki á óvart þar sem einungis var unnið með leysanlegan hluta próteinanna. Niðurstöður ekki sýndar.

4.3.2. Capillary electrophoresis - CE

Þorsksýni voru mæld með Capillary electrophoresis. Niðurstöður við 195 nm má sjá í viðauka. Þar sem mörg peptíð eru til staðar í sýnunum reyndist erfitt að greina niðurstöður. Virðist vera frekar munur á keyrslum en sýnum. Niðurstöður úr öðru verkefni þar sem peptíð voru einangruð á súlu fyrir mælingu með CE gáfu betri niðurstöður (Margrét Geirsdóttir og félagar, 2007). Framtíðar rannsóknir munu því beinast að því að einangra sýni fyrir mælingu á CE.

4.4. Skynmat

Ekki reyndist vera marktækur munur á skynmatsþáttum, hvorki eftir hráefni, vatnsrofsstigi né ensími (mynd 23). Þó sést munur á 5, 10 og 15% DH isolati brotið niður með ensíminu Protamex. Duftið reyndist marktækt beiskara eftir því sem niðurbrot var aukið ($p < 0.05$). Einnig reyndist 10% DH sýni úr hakki vera beiskara en önnur sýni þó sá munur reyndist ekki vera marktækur. Að sýni reynist beiskari eftir því sem vatnsrofsstig hækkar hefur einnig verið fundið hjá öðrum rannsakendum (Pripp og Ardö, 2007; FitzGerald og O’Cuinn, 2006).



Mynd 23. Niðurstöður skynmats á vatnsrofnum þorskróteinum.

H = hakk, I = Isolat; N = Neutrase; P = Protamex, 05; 10; 15 = Stig vatnsrofs; %DH.

Að nota próteinisolat sem hráefni fyrir hýdrólýsu reyndist því ekki skila sér í próteindufti með minna fiskbragð og –lykt, harðfiskbragð og –lykt né beiskt bragð.

5. Ályktanir

Kolmunnaprótein reyndust hafa mun meiri getu til að binda olíu en mjólkur- og sojapróteinin sem notuð voru til viðmiðunar. Hydrolysering minnkaði greinilega olíubindingu fiskpróteinanna. Vatnsrofin kolmunnaprótein gáfu þó ekki nægjanlega góðar niðurstöður. Í fyrsta lagi voru skynmatseiginleikar þeirra ekki nægjanlega góðir; mikil fisklykt og dökkur litur á sýnum. Einnig var framleiðsla þeirra ekki nægjanlega góð. Kom þar tvennt til. Vandamál kom fram vegna þess hve hátt saltinnihald var. Í rannsóknum á þorski á síðari stigum voru því notuð ensím við vatnsrof sem eru virk við lægra sýrustig sem dró úr notkun á síru og basa sem var að valda hinu háa saltinnihaldi. Einnig voru vandamál við mælingar þar sem sýnin voru ekki að fullu leysanleg. Við mælingar á þorski var því unnið með leysanlegan hluta sýnanna. Sérstaklega var erfitt varðandi kolmunna að erfiðlega gekk að fá ferskt hráefni til að vinna með. Var því unnið með þorsk í seinni hluta tilraunar.

Aðaltilgangur með mælingum á þorski var að kanna hvort einangruð þorskprótein (isolat) hefði aðra eiginleika heldur en niðurbrotið þorskhatt. Einnig hvort munur væri á eiginleikum afurða eftir því hvaða ensím væru notuð til að brjóta niður próteinin. Skynmatseiginleikar og blóðþrýstingslækkandi áhrif voru þeir eiginleikar sem áhersla var lögð á. Niðurstöður benda ekki til þess að munur sé á skynmatseiginleikum né blóðþrýstingslækkandi áhrifum eftir því hvort notað var hatt eða isolat. Ekki fanst heldur munur eftir því hvaða ensím var notað. Marktækur munur fannst einungis á eiginleikum eftir því hversu hátt stig vatnsrofs (%DH) var.

6. Heimildir

Adler-Nissen J (1986). *Enzymatic hydrolysis of Food Proteins*; Elsevier Applied Science Publishers. Barking, UK.

Beinfeld MC (1995). Cholecystokinin/gastrin. Í *Psychopharmacology: The fourth generation of progress* (ritstj. Bloom FE, Kupfer D), Raven Press, bls. 585-594.

Beuchat LR (1977). Functional and Electrophoretic Characteristics of Succinylated Peanut Flour Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25**(2), 258-261.

Bragadóttir M, Reynisson E, Þórarinsdóttir KA, Arason S (2007). Stability of fish powder from saithe (*Pollachius virens*) as measured by lipid oxidation and functional properties. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **16**(1), 115-136

Bray GA (2000). Afferent signals regulating food intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, **59**, 373-384.

CIE (1976). Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), CIE publication no. 15, Bureau Central de la CIE, Vienna, Austria.

Eide O, Borresen T, Strom T (1982). Minced fish production from capelin (*Mallotus villosus*). A new method for gutting, skinning and removal of fat from small fatty fish species. *Journal of Food Science*, **47**, 347-349.

Engvang K, Nielsen HH (2000). *In situ* activity of chymotrypsin in sugar-salted herring during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1277-1283.

FitzGerald RJ, O'Cuinn G (2006). Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotechnology Advances*, **24**(2), 234-237.

Johnson LRE, Copeland EM, Dudrick SJ (1978). Luminal gastrin stimulate growth of the distal intestine. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, **13**(49), 95.

Kristinsson HG, Rasco B (2000). Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**(3), 657-666.

Li B, Chen F, Wang X, Ji B, Wu Y (2007). Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chemistry*, **102**(4), 1135-1143.

Liang Y, Kristinsson HG (2005). Influence of pH-induced unfolding and refolding of egg albumen on its foaming properties. *Journal of Food Science*, **70**, C222-C230.

Marco GJ (1968). A rapid determination method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **45**, 594-598.

Margrét Geirsdóttir, Guðmundur Óli Hreggviðsson, Lárus Freyr Þórhallsson, Rósa Jónsdóttir, Patricia Hamaguchi (2007). Einangrun, hreinsun og rannsóknir á blóðþrýstingslækkandi peptíðum úr fiskpróteinum. Skýrsla Matís nr. 48-07. 49 bls.

Martinez I, Riscardo MA, Franco JM (2007). Effect of salt content on the rheological properties of salad dressing-type emulsions stabilized by emulsifier blends. *Journal of Food Engineering*, **80**, 1272-81.

Miller R, Groninger HS (1976). Functional properties of enzyme-modified acylated fish protein derivatives. *Journal of Food Science*, **41**, 268-272.

Morales FJ, Jimenez-Perez S (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, **72**, 119–125.

Morr CV, German B, Kinsella JE, Regenstein JM (1985). A Collaborative Study to Develop a Standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, **50**, 1715-1718.

Nielsen HH (2004). Persónulegar upplýsingar. Danish Institute for Fisheries Research. Dept. of Seafood Research. DTU, Lyngby, Danmörk.

Pripp AH, Ardö Y (2007). Modelling relationship between angiotensin-(I)-converting enzyme inhibition and the bitter taste of peptides. *Food Chemistry*, **102**(3), 880-888.

Ravallec-Plé R, Van Wormhoudt A (2003). Secretagogues activities in cod (*Gadus morhua*) and shrimp (*Penaeus aztecus*) extracts and alcalase hydrolysates determined in AR4-2J pancreatic tumour cells. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B* **134**(4), 669-679.

Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W (2005). Fractionation of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein *in vitro* gastrointestinal digests. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85**, 399-405.

Webb NB, Ivey FJ, Craig HB (1970). The measurement of emulsifying capacity by electric resistance. *Journal of Food Science*, **35**, 501-504.

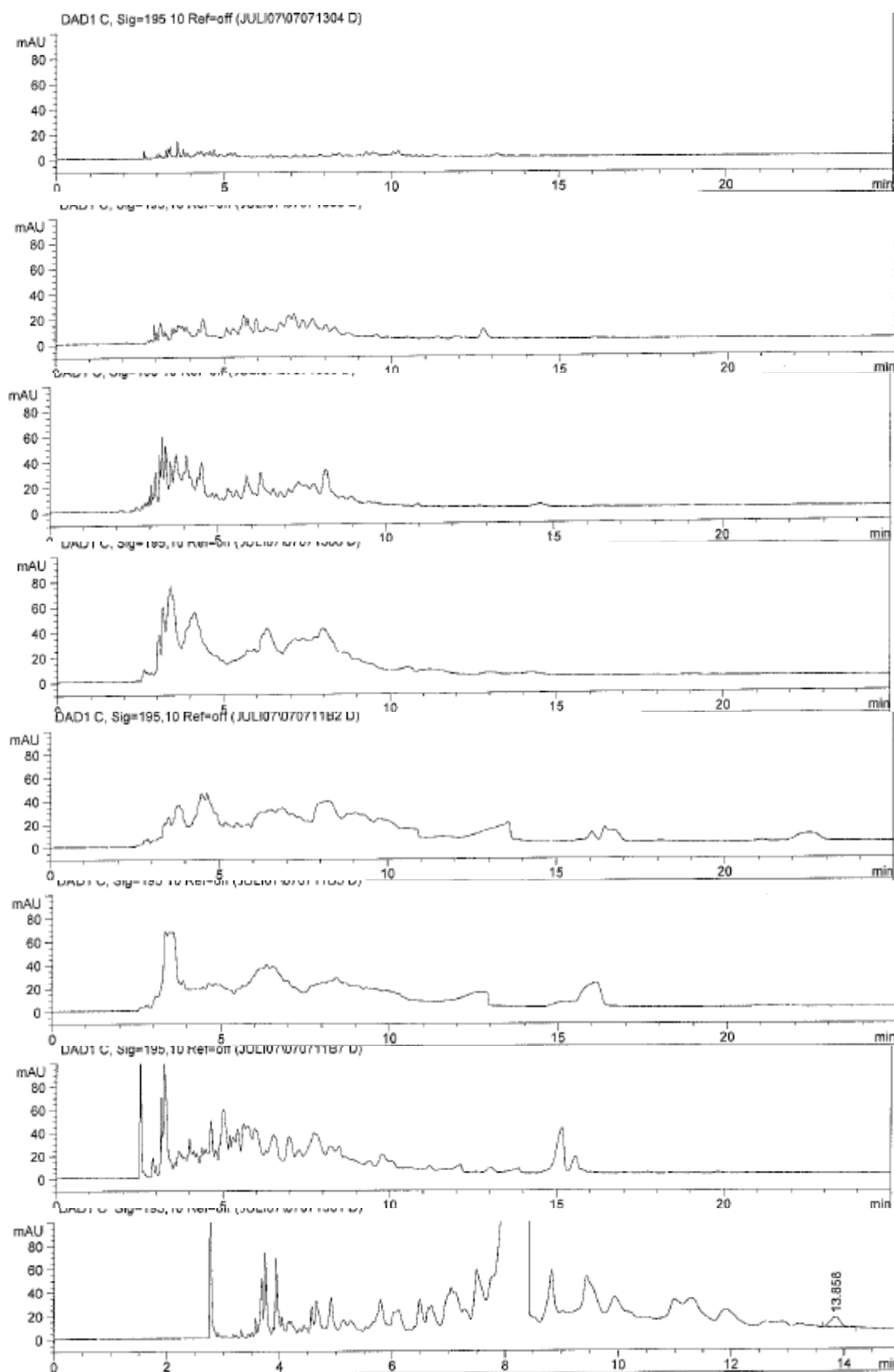
Yasumatsu K, Sawada K, Moritaka S (1972). Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agricultural and Biological Chemistry*, **36**(5), 719-727.

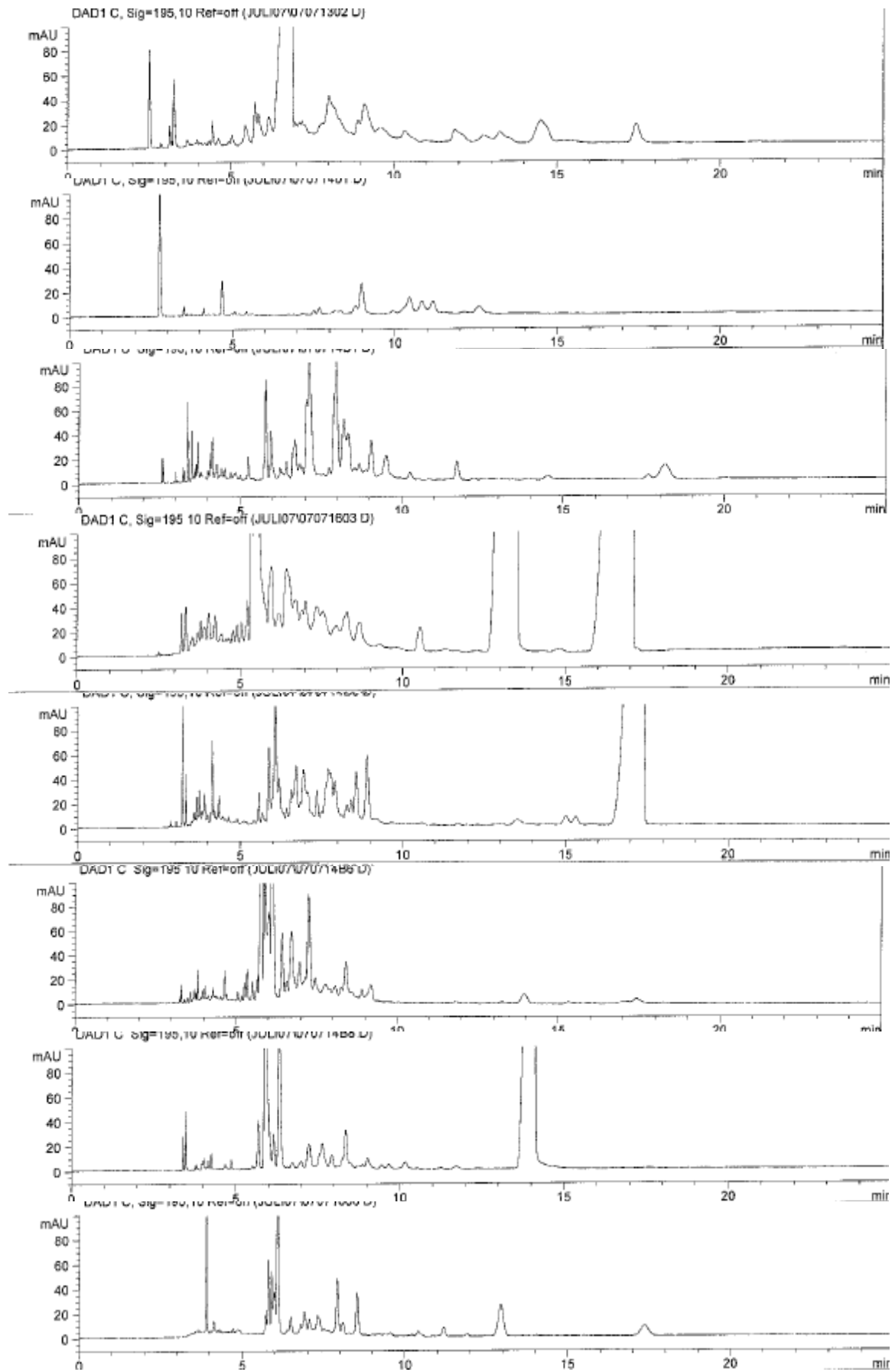
VIÐAUKI

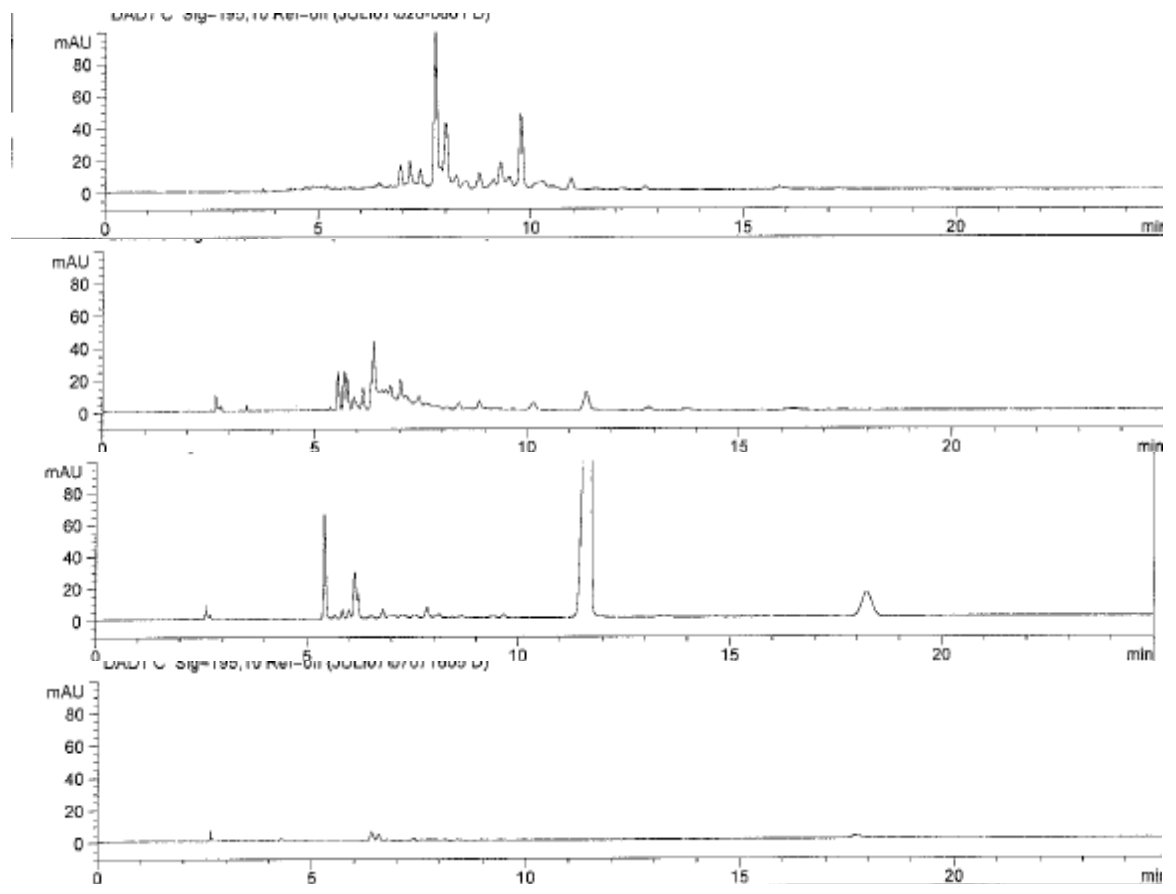
I – Capillary electrophoresis

II – Skynmat, matsblað

195 nm







Nafn: _____

Dags. _____

Fiskiprótein

Þið fáið 6 sýni. Munið að hvíla á milli sýna, fá ykkur kex og vatn.

Lykt: Lyktaðu af sýninu. Notið einkunnaskalann hér fyrir neðan til að gefa einkunn fyrir harðfisklykt og fiskilykt

einkunn	Lýsing
0	engin
1/2	á mörkum
1	vottur
2	lítill
3	greinileg
4	mikil

Bragð: Bragðaðu af sýninu. Notið einkunnaskalann hér fyrir neðan til að gefa einkunn fyrir harðfiskbragð, fiskibragð og beiskt bragð.

einkunn	Lýsing
0	ekkert
1/2	á mörkum
1	vottur
2	lítið
3	greinilegt
4	mikið

Skráið einkunnir fyrir eftirfarandi skynmatsþætti.

Sýni nr.	Harðfisk-lykt	Fiski-lykt	Harðfisk-bragð	Fiski-bragð	Beiskt bragð	Annað (skrifið lýsingu)

Annað:

Matsþáttur	Skilgreining
Harðfisklykt	harðfiskur, TMA lykt
Fiskilykt	soðinn fiskur (ýsa), roðlykt, ekki skemmdarlykt
Harðfiskbragð	harðfiskur, TMA bragð
Fiskibragð	soðinn fiskur (ýsa), roðbragð, ekki skemmdarbragð
Beiskt bragð	beiskt bragð, oft aftarlega á tungu
Annað	annað einkenni, t.d. sápa. Skrifið lýsingu og gefið einkunn.