

Vinnsla og vörupróun
Processing and Product
Development

Líftækni
Biotechnology



Matvælaöryggi
Food Safety



Oxun í fiskvöðva – Hlutverk fosfólípíða, próteina, andoxunarefna og áhrif suðu á oxun í fiskvöðva

Rósa Jónsdóttir
Margrét Bragadóttir
Guðrún Ólafsdóttir

Líftækni

Skýrsla Matís 08-08
Apríl 2008

ISSN 1670-7192

Titill / Title	Oxun í fiskvöðva - Hlutverk fosfólípíða, próteina, andoxunarefna og áhrif suðu á oxun í fiskvöðva		
Höfundar / Authors	Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir ¹ , Guðrún Ólafsdóttir ² ¹ Menntasvið og Leikskólasvið Reykjavíkurborgar ² Rannsóknáþjónustan Sýni ehf		
Skýrsla / Report no.	08 - 08	Útgáfudagur / Date:	Apríl 2008
Verknr. / project no.	2416-1667		
Styrktaraðilar / funding:	Rannsóknasjóður RANNÍS		
Ágrip á íslensku:	<p>Markmið verkefnisins var að auka skilning á áhrifum oxunar í fiskvöðva sem rýra bragðgæði og næringargildi fisks. Metin voru áhrif viðbættra náttúrulegra þrávarnarefna eða andoxunarefna til að bæta stöðugleika fiskafurða og þannig auka möguleika á notkun fisks í tilbúna rétti. Fosfólípíða líkan úr þorski var notað til að skoða áhrif þráhvata (blóðrauða úr þorski og bleikju) og þráhindra í vökvafasa úr loðnu og úr íslenskum þörungum. Einnig voru skoðuð áhrif suðu og viðbættra þrávarnarefna á bragðeiginleika og myndun svokallaðs upphitunarbragðs í soðnu fiskhakki.</p> <p>Áhrif oxunar á himnubundin fosfólípíð og prótein í fiskvöðvalíkani og í fiskhakki við hitun og geymslu voru mæld með skynmati, litmælingum, hefðbundnum þránunarmælingum (TBA), gasgreinimælingum til að bera kennsl á rokgjörn lyktarefni og hárpípu rafdrætti (capillary electrophoresis, CE) til að greina peptíð og aminosýrur sem áhrif hafa á bragð og lífvirkni. Skoðuð voru tengsl á milli þessara þátta til að skýra og skilja betur oxunarferli í fiskvöðva og þá þætti sem takmarka geymsluþol tilbúinna fiskafurða. Helstu neikvæðu áhrif oxunar á gæði fisks voru myndun lyktarefna, aðallega aldehyða, sem eru niðurbrotsefni fitusýra. Himnubundna fitan í mögnum fiski getur því haft mikil áhrif á bragðgæði tilbúinna matvæla þrátt fyrir að vera í litlu magni. Oxunarhvatari eins og blóð í holdi og suða leiddu til hraðari oxunar, sem sýnir að með réttri blóðgun og mildri hitameðferð mætti takmarka oxun og viðhalda betur bragðgæðum fisks. Auk þess má draga úr oxuninni með notkun á andoxunarefnum. Mælingar á andoxunarvirkni loðnusoðs í fiskvöðvalíkani sýndu að breytilegir ytri þættir eins og árstíðasveiflur og meðhöndlun loðnuháefnis geta haft áhrif á andoxunarvirkni. Nýnæmi í þessu verkefni eru grunnrannsóknir á áhrifum þráhindra úr loðnu og þörungum ásamt breytingum sem verða á niðurbrotsefnum við suðu sem hafa bein áhrif á bragðgæði vörunnar. Rannsóknnum á þessu sviði er haldið áfram í nýjum verkefnum þar sem lögð er áhersla á að skoða betur náttúrleg andoxunarefni úr loðnu og þörungum, sem og heilsuþætandi áhrif þeirra.</p>		
Lykilorð á íslensku:	Oxun, andoxunarefni, þráhvatari, bragðgallar í soðnum fiski, þorskur, loðna		

Summary in English:

The aim of the project was to study the effect of heating on oxidation of phospholipids, and the role of antioxidants in fish muscle to influence sensory quality and nutritional value. A phospholipid model from cod was used to study the effect of pro-oxidants (hemoglobin from cod and trout) and antioxidants in aqueous fraction of capelin and in seaweed extracts. The effect of heating and the addition of antioxidants on the sensory quality and the development of warmed-over-flavour (WOF) in fish mince were also studied.

The development of degradation compounds in washed cod model system during storage and heating was studied by sensory analysis, colour measurements, traditional lipid oxidation analysis (TBA) and gas chromatography analysis to identify volatile compounds. Capillary electrophoresis (CE) was applied for the analysis of peptides and amino acids that influence the sensory quality and bioactivity. The correlation between these analyses was studied to better understand the oxidation processes in fish muscle and to explain factors reducing the shelf life of ready-to-eat fish products. Quality defects related to oxidation of polyunsaturated fatty acids and formation of volatile compounds like aldehydes contributing to rancidity and colour changes were enhanced by pro-oxidative effects of blood and cooking. Membrane bound phospholipids are therefore of concern as precursors for off flavour and quality defects in lean fish despite of low fat content. Capelin broth appeared to have antioxidant effects in fish model system whereas press juice from whole capelin exhibited pro-oxidant effects. The outcome of this project is increased knowledge on oxidation in fish muscle to underpin the development of healthy and tasteful fish products of high sensory quality and nutritional values fulfilling the needs of consumers. Continued studies have been established in new projects to further characterise the antioxidant properties and possible health effects of capelin and seaweed extracts.

English keywords: *oxidation , antioxidants, pro-oxidants, warmed over flavour (WOF), cod, capelin*

EFNISYFIRLIT

INNGANGUR	1
MARKMIÐ	2
STAÐA ÞEKKINGAR	2
RANNSÓKNARHUGMYND VERKEFNISINS	13
RANNSÓKNARAÐFERÐIR	13
VERKÞÆTTIR OG NIÐURSTÖÐUR	15
Fosfólípíða módelkerfi úr þorski (<i>Gadus morhua</i>) – Þráahvatar úr blóði bleikju og þorsks	16
Áhrif andoxunarefna úr vökvafasa loðnu í fósólípíða módelkerfi úr þorski	18
Skilgreining á innihaldsefnum og andoxunavirkni í vökvafasa loðnu og þorsks	19
Áhrif suðu, upphitunar og viðbættra þráahindra í þorskhakki og þorskvöðvamódeli.....	21
ÁLYKTANIR OG UMRÆÐUR - ÁVINNINGUR	22
HEIMILDASKRÁ*	26
VIÐAUKI I	33
Skrá yfir greinar í vísindarit, bókarkafla, birtar skýrslur, fyrirlestra og veggspjöld	34
VIÐAUKI II	42
Research methods and materials	43
Methods for preparation of washed cod muscle and phospholipids model system	43
Bleeding of fish	43
Preparation of hemolysate	43
Quantifying hemoglobin levels in hemolysate	43
Washed cod muscle and phospholipids model system.....	43
Preparation of oxidation system.....	44
Heating of oxidation system.....	44
Chemical analysis.....	44
Proximate analyses	44
pH	45
TVC.....	45
TVB-N.....	45
Methods to monitor lipid oxidation.....	45
Peroxide value	45
Measurement of red color (a^*).....	45
Thiobarbituric Reactive Substances (TBARS)	46
Sensory analysis	46
Gas Chromatography analysis	47

Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) / Gas Chromatography analysis (GC-O and GC-FID)	47
TENAX pre-concentration and Gas Chromatography-Mass Spectrometry	47
Gas Chromatography-Olfactometry	48
Gas Chromatography-Mass Spectrometry	48
Optimization and validation of the SPME method	48
Data analysis	49
Capelin	50
Proximate analyses of capelin	51
TVN - total volatile nitrogen	51
Protein content of aqueous fractions	51
Antioxidant assays	51
Chelating capacity	51
DPPH radical scavenging capacity	52
Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)	52
Peptide analysis by Capillary Electrophoresis (CE)	53
Materials	53
Preparation of the low-molecular-weight peptide and free amino acid fraction	53
Capillary electrophoresis analysis (CE)	54
VIÐAUKI III	55
Mælingar á lyktarefnum í þorskvöðvamódeli og þorsksoði. Bestun (optimisation) og mat á aðferð fyrir HS-SPME-GC-O og GC-FID	56
VIÐAUKI IV	64
Analysis of amino acids and peptides using capillary electrophoresis _	65
VIÐAUKI V	72
The effect of heating and the use of antioxidants in washed cod muscle system and cod mince	73
The effect of thermal treatment on oxidation in washed cod model system	73
Antioxidant activity of seaweed in cooked cod fish mince	75

INNGANGUR

Neysla á tilbúnum matvælum hefur aukist mjög í Evrópu á undanförunum árum. Neytendur gera síauknar kröfur um framboð á tilbúnum matvælum án þess þó að varan glati mikilvægum eiginleikum eins og næringarinnihaldi og bragðgæðum. Jafnframt því eru auknar kröfur gerðar um ferskleika og aukið geymsluþol. Til þess að matvælafyrirtæki eigi auðveldara með að sinna kröfum markaðarins um framboð á hollum fiskréttum er ljóst að afla þarf meiri þekkingar á stöðugleika tilbúinna fiskréttanna og áhrif suðu á gæði afurða. Það sem einkum er takmarkandi við notkun á fiski í forhitaða tilbúna rétti er að fiskur er mjög viðkvæm vara vegna háa hlutfalls af fjölómettuðum fitusýrum (FÓFS) sem geta oxast og valda óbragði.

OXIFISH verkefnið var styrkt af Rannsóknasjóði Rannís og unnið í tengslum við Evrópuverkefnið LIPIDTEXT sem er hluti af SEAFOODplus verkefninu í 6.RÁ ESB (www.seafoodplus.org). Rannsóknarhugmynd verkefnisins er nátengd rannsóknum í LIPIDTEXT verkefninu sem fjalla um hvernig koma megi í veg fyrir þránun í fiski til að viðhalda gæðum bæði hvað varðar næringarþætti og gæðaeiginleika. Matís (áður Rf) er þátttakandi í verkefninu, en einungis er um að ræða samskiptastyrk en ekki fjármagn til rannsókna. Hugmyndin var því sú að móta rannsóknarverkefni með íslenskum fisktegundum, rannsóknaráherslum og niðurstöðum til hagnýtingar fyrir íslenskan fiskiðnað og jafnframt styðja við uppbyggingu á rannsóknatengdu námi. Sérstaða þessa verkefnis umfram áherslur LIPIDTEXT verkefnisins felst í eftirfarandi:

- Aukinn skilningur á oxunarbreytingum í fiskvöðva þar sem áhersla er lögð á grunnrannsóknir á virgni þráhvata (úr blóðrauða bleikju og þorsks) og þráhindra eða andoxunarefna í vökvafasa loðnu og í þörungum sem ekki hafa verið skoðaðir áður með þessum hætti.
- Grunnrannsóknir á oxunarbreytingum við suðu, sem hafa bein áhrif á lykt og bragðgæði vörunnar fyrir neytendur, er skref umfram þær rannsóknir sem gerðar hafa verið í LIPIDTEXT verkefninu.
- Mælingar á rokgjörnum efnum til að fylgjast með framvindu oxunar í fosfólípíðamódelkerfi og greining á þeim efnum sem áhrif hafa á myndun bragð og lykt tengdum suðu og hvataðri oxun er sérstaða í okkar rannsóknum.

Hluti af niðurstöðum verkefnisins hafa nú þegar verið birtar eða eru í birtingarferli sem greinar í vísindaritum, í skýrslum og sem erindi og veggspjöld á alþjóðlegum ráðstefnum (sjá Viðauka I). Í þessari lokaskýrslu verkefnisins er gerð grein fyrir stöðu þekkingar, verkþáttum verkefnisins, helstu niðurstöðum og vísað í birtar greinar, en auk þess eru niðurstöður frá síðasta ári verkefnisins og samantekt og mat á rannsóknaraðferðum í viðaukum. Ennfremur er hér gerð grein fyrir ávinningi verkefnisins og næstu skrefum.

MARKMIÐ

Markmið verkefnisins var að skoða áhrif oxunar á himnubundin fosfólípíð, prótein og þráahindra/þráahvata í fiskvöðva sem hafa áhrif á bragðgæði og næringargildi fisks. Einnig að kanna áhrif ytri þátta eins og suðu og notkun viðbættra þráavarnarefna eða andoxunarefna á oxun og myndun bragðgalla í soðnum þorski.

STAÐA ÞEKKINGAR

Þránun í kjöti og fiski er almennt álitin byrja í himnubundinni fitu (Decker og Xu, 1998) og rannsóknir Undeland, Hultin og Richards (2002) benda þar að auki til þess að oxun í fiski sé óháð fituinnihaldi fisksins því viðbót þríglýseríða í fosfólípíða-módeli af þvegnu þorskhakki (FMPÞ) hraðaði ekki hemóglóbín-hvataðri oxun. Hins vegar fundu sömu höfundar út að oxun jókst í FMPÞ við þvottinn á þorskhakkinu (Undeland, Ekstrand og Lingnert, 1998; Undeland, Hultin og Richards, 2003) sem benti til þess að þvotturinn skolaði út andoxunarefnum úr vöðvanum. Í rannsókn Undeland o.fl. (2003) kom fram að vökvafasi sem unninn var úr hvítum þorskvöðva dró verulega úr hemóglóbínhvataðri oxun eða hindraði hana algerlega. Efnin sem höfðu þessa hindrandi virkni voru stöðug gagnvart hita en virkni þeirra var örlítið minni við lækkað pH. Sömu andoxunareiginleikar fundust í hituðum vökvafasa úr ýsu, sandkola og vetrarkola (*Pleuronectes americanus*). Nýlega komu svo fram niðurstöður sem benda til þess að þráahindrandi efni úr vökvafasa síldarvöðva séu hitaþolin og því ekki af ensímtoga (Sannaveerappa, Undeland og Sandberg, 2004).

Þessar niðurstöður koma heim og saman við íslenskar niðurstöður á vatnsleysanlegum efnum úr loðnumjöli sem er hitað við vinnslu (Margrét Bragadóttir, 2001). Þrátt fyrir hitunina inniheldur loðnumjöl fituleysanleg andoxunarefni en þó mun minna en fersk loðna (Bragadóttir, Pálmadóttir og Kristbergsson, 2000). Vatnsleysin efni úr loðnumjöli sýndu

andoxunarvirkni í línolsýrumódeli og nánari mælingar á þeim sýndu að þau reyndust innihalda virk vatnsleysanleg andoxunarefni af flokki fenóla (Margrét Bragadóttir, 2004). Fenólsambönd finnast oft í miklu magni í jurtaríkinu og eru einna þekktust í kryddjurtum, tei og rauðvíni. Vaxandi áhugi á þessum efnum tengist ekki bara andoxunareiginleikum í matvælum heldur einnig í lifandi frumum og víðtækum áhrifum á heilbrigði fólks. Því er áhugavert að rannsaka áhrif fenólsambanda á oxun í fiski og sérstaklega ef þau finnast náttúrulega í vökvafasa fiska eins og loðnu. Fersk loðna er auk þess áhugaverð til rannsókna vegna þess að hún hefur ólíkt öðrum sambærilegum uppsjávartegundum mjög langt geymsluþol í frysti (Jangaard, 1974; Shaw og Botta, 1977; Botta, Lauder, Downey og Saint, 1983).

Hingað til hefur FMBÞ módelið einkum verið prófað til þess að fylgjast með oxun sem er hvötuð af blóðrauða (hemoglóbíni) úr regnbogasilungi en einnig hefur verið prófaður blóðrauði úr tveimur uppsjávartegundum; makríl (*Scomber scombrus*) og meinhaddi (*Brevoortia tyrannus*), auk ufsa (*Pollachius virens*) og vetrarkola (*Pleuronectes americanus*) (Undeland, Kristinsson og Hultin, 2004). Áhugavert er að prófa módelið með blóðrauða úr tveimur íslenskum eldisfisktegundum; bleikju og þorski, með það að markmiði að rannsaka hvort blóðrauði úr þessum ólíku fisktegundum framkalli mismunandi myndefni oxunar og/eða mismikla oxun. Í þessu verkefni var kannað hvort þorskur innihaldi vatnsleysanleg andoxunarefni og hvort þau misstu virkni sína við suðu. Einnig voru gerðar rannsóknir á andoxunarvirkni í ferskri loðnu sem ólíkt flestum feitum uppsjávarfiskum er þekkt fyrir stöðugleika og langt geymsluþol gagnvart oxun.

Vökvafasi, sem unninn er úr fiskvöðva, inniheldur leysanleg prótein (sarcoplasmic próteins), ensím, fjölpeptíð, amínósýrur, blóðþætti, amín (trimethylamine oxide og biogenísk amín), nukleótíð og ólífræn steinefni, en mörg þessara efna hafa andoxunarvirkni (Hultin, 1992a, 1994; Undeland 1997a) (Tafla 1). Carnosine, anserine og ophidine eru dípeptíð sem eru meðal þeirra fáu peptíða sem fundist hafa í fiski-extracti. Þau innihalda öll histidine og hafa sum sýnt þráhindravirkni (Decker og Xu, 1998). Glutapíon er þrípeptíð (γ -Glu-Cys-Gly) sem einnig er þekkt sem þráhindrar. Carnosine, anserine og glútanpíon verða ekki fyrir miklum áhrifum hitameðferðar en minnka við geymslu á makríl, vígabláma (bluefish) og kalkún (Decker og Xu, 1998). Fjölamínin putrescine, spermidine og spermine, sem finnast í nær öllum vefjum dýra, hindra þránun og eykst virknin með auknum fjölda amínhópa (t.d.

spermine>spermidine> putrescine). Þvagsýra er efnasamband sem inniheldur amín og hefur þráavarnarvirkni. Hlutverk fjölamína og þvagsýru sem þráahindra er lítt þekkt. Auk þráahindra og/eða þráahvatavirkni geta bæði aminosýrur og peptíð gefið bæði sætt og beiskt bragð.

Tafla 1. Þættir sem eru til staðar í fiskvöðva og hvetja eða hindra oxun .

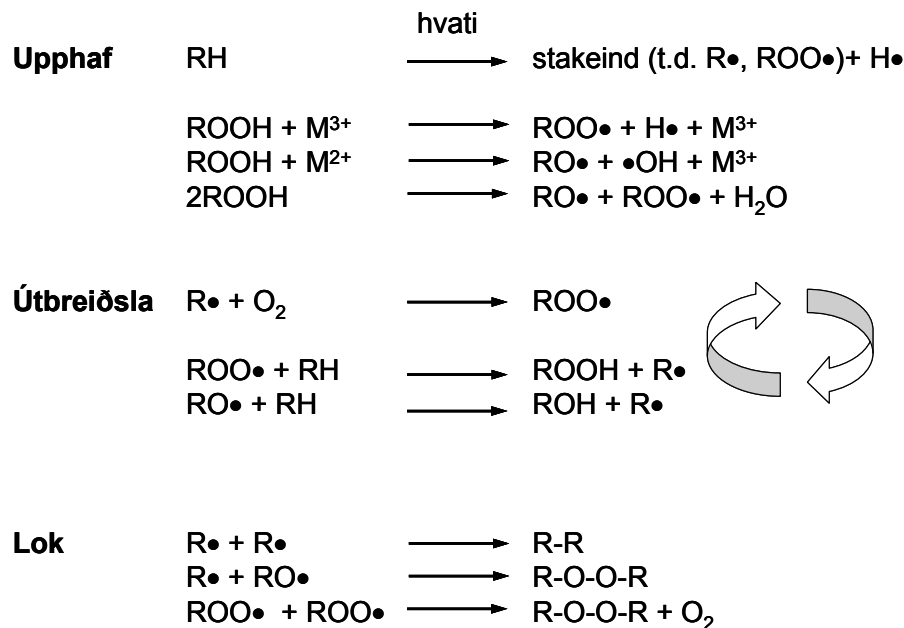
Hvarfefni fyrir oxun	Hvatar	Hindrar / Andoxunarefni
Ómettaðar fitusýrur	Málmar (Fe/Cu) Ensím (t.d. lipoxygenasi LOX)	<i>Fitusæknir þráahindrar</i> (Lipophilic antioxidants) <ul style="list-style-type: none"> • Fenólsambönd • α-tocopherol • carotenoids
Prótein	Prótein sem innihalda járn (Hemoglóbín, myoglobín)	<i>Vatnssæknir þráahindrar</i> (hydrophilic antioxidants) <ul style="list-style-type: none"> • Fenólsambönd • Glutathione • C vítamin (ascorbate) • Peptíð, fjölamín carnosine (β-alanyl-L-histidine) anserine (β-alanyl-1-methyl-L-histidine), ophidine (β-alanyl-3-methyl-L-histidine) • fríar aminosýrur (histidine) • Þvagsýra (urea)
Súrefni		<i>Þráahindraensím</i> <ul style="list-style-type: none"> • superoxide dismutase. • glutathione peroxidase o.fl. geta fjarlægt virka súrefnis radicala, vetnisperoxíð og fituperioxíð <ul style="list-style-type: none"> • Q-10 (ubiquinone)

Oxun - víxlverkun fitu og próteina í fiskvöðva

Breytingar af völdum oxunar eða þránunar lípíða eru oft ein helsta ástæða fyrir gæðarýrnun matvæla. Þránun veldur þráabragði og ólykt auk þess sem æskileg bragð- og lyktareinkenni tapast. Þránun veldur einnig breytingum á lit, dregur úr næringargildi og veldur myndun stakeinda (free radicals) sem geta haft heilsufarsleg skaðleg áhrif vegna hvarfgirni sinnar (Grey, Gomaa og Buckley, 1996).

Í upphafsfasa oxunar myndst lípíðstakeind sem hvarfast við súrefni og myndar fitusýrustakeind (RO•) sem síðan getur hvarfast við aðra fitusýru og myndað hydroperoxíð (ROOH) í útbreiðslufasanum (Mynd 1). Hydroperoxíðin, sem kallast 1^o myndefni fituoxunar, eru lyktarlaus en brotna auðveldlega niður í 2^omyndefni eins og aldehyð, alkóhól og ketóna sem valda lykt. Í síðasta skrefi útbreiðslufasans myndast lípíðstakeind (R•) og þar með er

kominn grundvöllur fyrir keðjuverkandi efnahvörf. Lokastig oxunar er efnahvarf tveggja stakeinda með myndefni sem ekki getur fódrað útbreiðslufasann.



Mynd 1. Upphaf, útbreiðsla og lok sjálfoxunar. RH = fitusýra; R• (fitusýrustakeind); ROO• (peroxíð stakeind); H• = vetnisstakeind; ROOH = hydroperoxíð; M = málmur, t.d. járn (Fe) eða kopar (Cu).

Oft hefur verið litið á *post mortem* breytingar á fitu og próteinum í vöðva sem aðskilin vandamál en í raun er um víxlverkun á milli próteina og fitu að ræða. Oxun himnubundinnar fitu getur leitt til oxunar á öðrum efnum eins og próteinum og þrávarnarefnum í vöðva. Slík efnahvörf eyðileggja ekki aðeins fitu, prótein og þrávarnarefni heldur geta myndað rokgjörn efni sem valda þráalykt, virkja próteasa (mýkja vöðva), krossbinda prótein og mynda litarefni. Bæði innri og ytri þættir hafa áhrif á umfang þessara víxlverkana. Dæmi um innri þætti eru hlutfall eðlissviptra próteina, skautun lípíða og magn fjölómattaðra fitusýra. Af ytri þáttum skiptir geymsluhiti mestu máli (Belitz og Grosch, 1987; Undeland, 1997b). Óæskileg myndun fiski- og þráalyktar/bragðs sem myndast vegna þessara efnahvarfa draga úr möguleikum á vinnslu og geymslu ýmissa fiskrétta og fiskafurða.

Tichivangana og Morrissey (1982) sýndu fram á að bæði þríglyseríð og fosfólípíð oxast í fiskvöðva og geta valdið myndun svokallaðs upphitunarbragðs (warmed over flavor, WOF) við geymslu eftir suðu. Makrill, sem er feitur fiskur, þránaði mest og upphitunarbragð var greinilegra eftir suðu í samanburði við magra fiska eins of þorsk, ýsu, lýsing og millifeita

fiska eins og leirslabba (e. bream), kola og regnbogasilung. Magur fiskur, eins og þorskur, getur líka orðið fyrir þránun því hann inniheldur hlutfallslega meira af himnubundnum fosfólípíðum í vöðva og þar með meira af löngum fjölómettuðum fitusýrum sem eru viðkæm fyrir þránun. Fosfólípíð eru einn helsti flokkur himnubundinna lípíða og innihalda mjög hátt hlutfall langra fjölómettaðra fitusýra. Þau eru því viðkvæmari fyrir þránun heldur en þríglýseríð í forðafitu, sérstaklega þegar búið er að vinna fiskinn á einhvern hátt því þá hafa súrefni og hvatar, eins og járn úr blóði, meira aðgengi að fitusýrunum (Hultin og Kelleher, 2000; Frankel, 1998).

Uppsöfnun óbundinna fitusýra við geymslu í frysti getur haft neikvæð áhrif á gæði fisks (Hultin, 1992b). Uppsöfnun óbundinna fitusýra frá þríglýseríðum eða fosfólípíðum hefur verið tengd við eðlissviptingu próteina og áferðabreytingar, sérstaklega við frostgeymslu. Óbundnar fitusýrur frá þríglýseríðum eða fosfólípíðum eru viðkvæmari fyrir oxun en estraðar fitusýrur. Óbundnar fitusýrur geta valdið myndun aukabragðs, eyðileggingu ákveðinna vítamína og aminosýra, breytingum á áferð og vatnsbindigetu ásamt því að breyta ferli lípíðoxunar.

Hvötuð oxun við suðu - upphitunarbragð

Myndun upphitunarbragðs (WOF) hefur verið rannsakað mikið í kjöti, frosnu hökkuðu kjöti og unnum kjötvörum en hefur lítið verið skoðað í fiski. Upphitunarbragð er bragðgalli sem kemur einkum fram í upphituðu kjöti og fiski eftir undanfarandi geymslu í kæli í 48 klst eða minna. Upphitunarbragð er lýst sem skemmdarlykt, sem minnir á pappa, málningarlykt eða þráa (Love, 1988).

Hitun veldur hvötnun á oxun fosfólípíða með því að; a) afmynda himnur sem í óhituðum frumum binda fosfólípíð og þráhvata, b) losa virkt járn frá mýóglóbíni og öðrum próteinum sem innihalda járn, c) breyta mýóglóbíni í gerð sem veldur oxun, d) örva niðurbrot vetnisperoxíða og loks með því að e) afmynda ensímatísk andoxunarkerfi (Mielche og Bertelsen, 1994). Í kjöti sem inniheldur hátt hlutfall af fjölómettuðum fitusýrum (FÓFS) er líkleggra að myndist upphitunarbragð samkvæmt Cross, Leu og Miller (1987) sem sýndu fram á að hraði myndunar á upphitunarbragði í eftirfarandi afurðum var í beinu sambandi við innihald þeirra af FÓFS: fiskur > kjúklingar > svínakjöt > nautakjöt > lambakjöt. Jafnframt hefur verið sýnt fram á að mismunandi mikil tilhneiging milli tegunda til þránunar í forsoðnu kjöti megi einnig rekja til mismunar í innihaldsmagni á járn og náttúrulegum þráhindrum eins og α -tókóferóli auk mismunar í fjölómettuðum fitusýrum (Mielche og Bertelsen, 1994).

Sumar rannsóknir benda til þess að með suðu sé ensímvirkni hindruð og geymsluþol geti því orðið lengra en fyrir ferskan fisk (Refsgaard, Brockhoff og Jensen, 1998; 2000). Fleiri rannsóknir benda hins vegar til aukinnar oxunar eftir suðu m.a. vegna þess að við suðu rofna frumuhimnur, himnubundin prótein eðlissviptast og fitusýrurnar verða aðgengilegri fyrir t.d. súrefni, járn og aðra þráahvata, en jafnframt eyðileggjast ensím og annars konar oxunarferlar fara í gang eins og áður var lýst. Talið er að þessi áhrif geri “heme” einingu hemóglóbíns opnari og því virki afmyndun þess með suðu þráahvetjandi (Hardy, 1980; Flick, Hong og Knobl, 1992; Undeland o.fl., 1998). Óbundið járn getur þá auðveldlega oxast ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$) og um leið myndast óbundnar stakeindir úr fitusýrum.

Rannsóknir á hitun eða suðu á fiski hafa sýnt mismunandi áhrif á þránun (Hardy, 1980; Undeland o.fl., 1998). Undeland o.fl. (1998) fundu út að forsuða óvirkjaði þráahvetjandi ensím í hakkraðri síld. Hins vegar dró úr virkni þráahindra og virkni hemópróteina örvaðist, og almennt kom fram hitaörvandi hvötun á þránun. Undantekningin var hitun undir 60 °C en þar leit út fyrir að meirihluti vatnsleysanlegra þráhvata af ensímatískum uppruna væri óvirkjaður án þess að hemprótein afmynduðust. Rannsóknir á kjúklingum hafa einnig sýnt minni þránun við hitastig undir 60°C (Skipsted, Mikkelsen og Bertelsen, 1998). Hins vegar getur lægsta hitastig til þess að koma í veg fyrir upphitunarbragð mögulega valdið vandamálum varðandi öryggi af völdum örvera. Hitun við hærra hitastig en 100°C dregur úr upphitunarbragði, vegna myndunar á brúnum efnunum af Maillard gerð sem hafa andoxunarvirkni (Bailey, 1988). Aftur á móti getur matseld við hátt hitastig dregið úr öðrum gæðabáttum sem gætu haft öfug áhrif á skynmat vegna minni vatnsbindieiginleika og mikillar brúnunar.

Rokgjörn lyktarefni

Fiskibragð/lykt, málmbragð/lykt og upphitunarbragð/lykt er notað til að lýsa aukabragði/lykt af völdum oxunar í mismunandi tegundum matvæla (Jacobsen, 1999). Niðurbrotsefni oxunar á fjölómettuðum fitusýrum hafa verið tengd við myndun þessara lyktareinkenna og hafa mikið verið rannsökuð í ferskum og frystum fiski en minna í soðnum fiski. Stungið hefur verið upp á ýmsum efnunum til að fylgjast með framgangi oxunar og myndun upphitunarbragðefna í tengslum við þráabragð í soðnu kjöti t.d. pentanali, hexanali og 2,4-dekadienali (St Angelo, Vercelotti, Dupuy og Spanier, 1987). Í fiski hafa *cis*-4-heptenal (McGill, Hardy, Burt og Gunstone, 1974; Hardy, 1980), 2,4-dekadienal og 2,4,7-dekatrienal verið tengd við lýsisþráabragð í fiski og fiskafurðum (Meijboom og Stroink, 1972; Karahadian og Lindsay,

1989), en ljóst er að um samspil margra efna er að ræða sem einkenna bragðgalla vegna áhrifa oxunar (Lindsay, 1990; Ólafsdóttir og Fleurence, 1998).

Nokkrar rannsóknir á rokgjörnum niðurbrotsefnum í hitameðhöndluðum fiski hafa verið gerðar með það að markmiði að greina niðurbrotsefni sem gefa bestu vísbendingu um þrúnun. Medina, Satue-Gracia og Frankel (1999) fundu að magn af 2-ethylfuran reyndist best til að spá fyrir um oxun í fiski sem mælt var með hefðbundnum þrúnunarmælingum. Milo og Grosch (1995) skoðuðu áhrif frystigeymslu (-13 °C) á myndun bragðgalla í soðnum þorski og silungi og greindu mismunandi efni í þessum tegundum (acetaldehyde, dimethyl sulphide, dimethyl trisulphide og (Z)-1,5-octadien-3-one) í soðnum þorski (*Gadus morhua*) og acetaldehyde, propionaldehyde, methional, 1-octen-3-one og (Z)-1,5-octadien-3-one í soðnum silungi (*Salmo fario*). Þetta er áhugavert þar sem samsetning þessara tegunda er ólík, einkum hvað varðar fitusýrusamsetningu og hugsanlega þráhindra/hvata virkni í vöðva þessara tegunda. Þannig reyndust bragðgallar í þorski tengjast trimethylamine, butane-2,3-dione, methylpropanal og 2- og 3-methylbutanal (niðurbrotsefni frá aminosýrum), en í silungi voru það acetaldehyde, propionaldehyde, butane-2,3-dione, pentane-2,3-dione, og myndefni oxunar á fjölómettuðum fitusýrum (C6, C8, og C9 karbonýl sambönd) sem áttu þátt í bragðgöllum. Helsta bragðgallanum í þorski var lýst sem “malty” sem var tengt við aukningu í 3-methylbutanal sem er niðurbrotsefni frá aminosýrunni iso-leucine (Milo og Grosch, 1996).

Rannsóknir á niðurbrotsefnum oxunar eru gagnlegar til þess að skilja hvarfgang oxunar. Þannig er hægt að rekja niðurbrot ákveðinna fitusýra eða annarra efna út frá því hvaða niðurbrotsefni myndast og síðan út frá lyktareiginleikum og magni þessara efna eru bein tenging við bragð og lyktareiginleika sem metin eru með skynmati. Mörg lyktarefni í fiski eru til staðar í mjög litlu magni og erfitt er að greina þau nema að notast við lyktargreiningu (GC-O) þar sem lyktarskynfæri okkar eru mun næmari en skynjarar gasgreina. Á Mátis hafa verið stundaðir rannsóknir á rokgjörnum efnum í ferskum fiski (Guðrún Ólafsdóttir, Heiða Pálmadóttir, Rögnvaldur Ólafsson, Emilía Martinsdóttir og Rán Jónsdóttir, 1993; Ólafsdóttir, Martinsdóttir og Jónsson, 1997; Ólafsdóttir, Jónsdóttir, Lauzon, Luten og Kristbergsson, 2005), verkuðum hrognum (Jónsdóttir, Ólafsdóttir, Martinsdóttir og Stefánsson, 2004), bragðefnum úr sjávarfangi (Jónsdóttir, Ólafsdóttir, Hauksson og Einarsson, 2007) og í reyktum laxi (Jónsdóttir, Ólafsdóttir, Haugen og Chaine, 2008). Borin hafa verið kennsl á einkennandi efni sem áhrif hafa á lyktareinkenni þessara afurða bæði með GC-O og GC-MS.

Viðbætt andoxunarefni

Eins og hér hefur verið rakið eru margir þættir sem hafa áhrif á oxun í fiskvöðva (Tafla 1). Notkun andoxunarefna í kjöti er betur þekkt en í fiski, t.d. notkun á nitríti. Þráavörn nitríts er álitin vera tilkomin vegna þess að það skapar stöðugleika í frumhimnum, það bindur járn og veiðir stakeindir í gegnum virkni nítríðoxíðs (Mielche og Bertelsen, 1994). Margar rannsóknir hafa sýnt að blanda af fjölfosfötum og askorbati hefur reynst hindra myndun upphitunarbragðs í kjöti með samvirkandi (synergískum) hætti (Bailey, 1988), en askorbat eitt og sér hafði þveröfug áhrif í soðnum hökkuðum fiski (Ramanathan og Das, 1992). Mörg þráavarnarefni hafa verið prófuð, bæði efnaframleidd og náttúruleg, með mjög misgóðum árangri (Bailey, 1988; Mielche og Bertelsen 1994). Fjöldi rannsókna hafa verið gerðar á virkni náttúrulegra andoxunarefna sem eru á markaði og seld til notkunar í tilbúnað kjötvörur. Sem dæmi má nefna, t.d. Grindox 1021 sem var prófað ásamt rosemary, rutine (glykosíð af quercetin flavonoli og tvísykrunni rutinose), erythroate (iso-askorbinsýra) og askorbinsýru til þess að draga úr þránun í þurrgerjuðum pylsum (Balev, Vulkova, Dragoev, Zlatanov og Bahtchevanska, 2005). Grindox dró mest úr þránun mælt sem PV og TBA, á meðan rutine dró helst úr hækkun PV og erythroate úr TBA. Annað dæmi er Herbalox, 250 ppm og Duralox, 200 ppm (blanda af kryddi, tókóferóli og sítrónusýru) frá Kalsec Inc sem voru prófuð í hakkað nautakjöt (Formanek, Kerry, Higgins, Buckley, Morrissey og Farkas, 2001). Kjötíð var af dýrum sem fengu E-vítamín í fóðri. Til samanburðar var BHA/BHT (10 ppm af hvoru). Bæði Duralox og Herbalox reyndust draga úr þránun í líku mæli og BHT/BHA.

Virgni andoxunarefna getur verið ólík við mismundandi aðstæður (Decker, Warner, Richards og Shahidi, 2005; Jacobsen, Let, Nielsen og Meyer, 2008). Andoxunarefni sem virkar vel í hreinni olíu getur virkað annan hátt við aðrar og flóknari aðstæður, eins og í þorskvöðva, þar sem eru til staðar fosfólípíð, vökvafasi, andoxunarefni og -hvatar (Tafla 1), en vinnsla eins og hökkun og suða breytir líka aðstæðum verulega og getur dregið úr virkni andoxunarefna. Þetta torveldar val á andoxunarefnum til notkunar í kjöti og fiski en reynslan sýnir að oft þarf að blanda saman þráhindrum með mismunandi virkni til þess að koma í veg fyrir þráhvötun og auka líkur á samvirkni þeirra.

Efnaframleidd, fituleysanleg andoxunarefni hafa ekki reynst draga verulega úr myndun upphitunarbragðefna í kjöti (Bailey, 1988) nema þá í mjög háum styrk (St Angelo o.fl. 1987). Það hefur litla hagnýta þýðingu því að í soðinn fisk má ekki nota efnaframleidd

andoxunarefni, nema tókóferól, askorbínsýru, sítrónusýru og sölt af þessum sýrum. Engin hámarksgildi eru fyrir þessi efni en gæta skal góðra framleiðsluhátta (GFH) við notkun aukefna (Reglugerð um aukefni í matvælum nr. 285/2002).

Virkni vatnsleysanlegra og náttúrulegra andoxunarefna eins og fenólsambanda og flavoníða, sem finnast oft í miklu magni í kryddjurtum, er líkt og með önnur andoxunarefni mismunandi eftir aðstæðum. Í rannsókn á soðnum hökkuðum makríl (*Scomberomorus commersoni*) (Ramanathan og Das, 1992) reyndust bæði fenólsambönd og flavoníðar (200 mg/kg) draga verulega úr þránun. Ef vatnsleysanleg andoxunarefni draga úr oxun í soðnum, feitum fiski eins og makríl er áhugavert að skoða það nánar, því fenólsambönd finnast náttúrulega í sjávarlífverum. Í íslenskri rannsókn (Margrét Bragadóttir, 2003) kom fram að þörungar innihalda fenólsambönd. Líklega má rekja fenólinnihald í vatnsleysanlegum efnunum í loðnumjöli til fæðu loðnunnar en hún lifir að mestu á rauðátu og krabbaflóm sem nærast á plöntusvifi í sjónum (Vilhjálmsson, 1994). Fenólsambönd hafa einnig fundist í ýmsum skeldýrum, en uppruni efnanna er talinn vera frá þörungum eða plöntusvifi (Pasquel og Babitt 1991). Í OXIFISH verkefninu og í framhaldsrannsóknum í tengslum við doktorsverkefni hefur athyglinni verið beint að andoxunarvirkni íslenskra þörungna.

Í rannsóknum í LIPIDTEXT verkefninu hafa verið prófuð ýmis fenólsambönd, bæði efnaframleidd (synthetic); propyl gallate (PG), buthylatedhydroxytoluene (BHT) og náttúruleg; cinnamic acid og catechin. Tafla 2 er yfirlit um virkni andoxunarefna og sýnir einnig byggingu þeirra sem útskýrir hæfileika þeirra til að hindra oxun. Niðurstöður frá Institute of Marine Research CSIC á Spáni sýndu áhugaverða virkni þessara efna í hakki af hestamakríl. Þegar prófuð voru andoxunarefni með ólíka efnabyggingu, sýndu niðurstöður að caffeic, catechin og PG (100 ppm) drógu mest úr þránun (mæld með TBA) í hökkuðum hestamakríl (4% fita) við 4°C. Nánari prófun á cinnamic sýruafleiðum sýndi að caffeic og ferulic sýrur (10 ppm) drógu mestu úr þránun (TBA) í hökkuðum hestamakríl (1,5% fita) við 4°C. Niðurstöður sýndu að mólíkúlbygging efnanna skiptir miklu máli fyrir þráavörnina (óbirtar niðurstöður, LIPIDTEXT). Þannig er catechol hópur mikilvægastur og aukinn fjöldi galloyl hópa minnkar virknina.

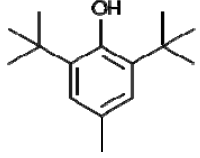
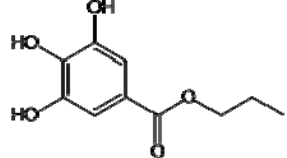
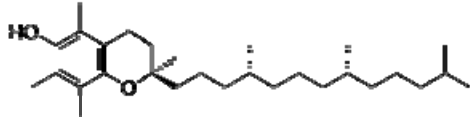
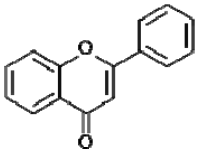
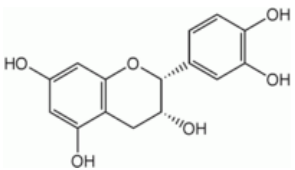
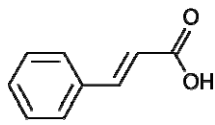
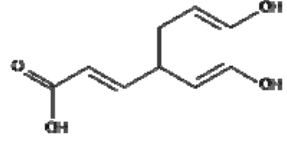
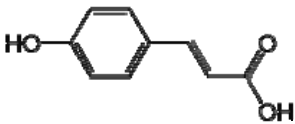
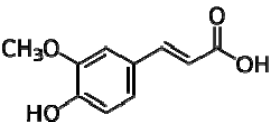
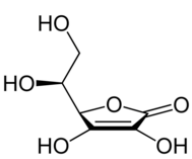
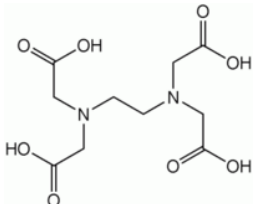
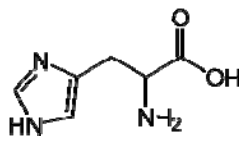
Erythroate og önnur vatnsleysin þráavarnarefni hafa einnig verið prófuð til þess að draga úr þránun í fiskafurðum. Fylgst var með oxun í vinnslu og við geymslu á síldarpróteinum sem unnin voru við pH 2.7 (Undeland, Hall, Wendin, Gangby og Rutgersson, 2005). Niðurstöður sýndu að erythroate með eða án fosfats (STPP-sodium tripolyphosphate) eða EDTA dró úr

þránun við vinnsluna. Við geymslu á ís dró mest úr þránun ef þráavarnarefnum var bætt út í síldarpróteinin bæði við vinnslu og geymlu og EDTA var notað í stað fosfats. Erythrobat og fosfat var notað í 200 ppm styrkleika en EDTA í 44 ppm.

Rannsókuð voru áhrif þráavarnarefna á oxun í hakkaðri og soðinni sardínu sem geymd var við 2 °C í 14 daga (Jittrepotch, Ushio og Ohshima, 2006). Viðbót EDTA (2500 ppm) jók oxun jafnt og þétt á meðan nítrít (10 ppm) og askorbat (2000 ppm) hindraði þránun verulega samkvæmt mælingum með PV og TBA. Þessi dæmi sýna að virkni andoxunarefna er mismunandi eftir ytri aðstæðum eins og pH og samvirkni andoxunarefna. Auk þess hefur komið í ljós í LIPIDTEXT verkefninu að virkni andoxunarefna eins og caffeic sýru er breytileg í mismunandi módelkerfum eins og þvegnu fiskhakki, ýrulausnum og lípósómum og þá skiptir líka máli leysanleiki þráhindra í vatns- eða fitufasa og burðarefni þeirra t.d. etanól (óbirtar niðurstöður).

Enn skortir verulega á skilning á andoxunarvirkni margra efna. Í Bandríkjunum hefur verið hafist handa við að mæla andoxunarvirkni matvæla á markaði með ORAC aðferð í þeim tilgangi að geta metið andoxunarvirkni fæðisins í heild (Wu, o.fl., 2004). Til eru ýmsar aðferðir til að mæla andoxunarvirkni og hver þeirra hefur sínar takmarkanir. Ólíkum aðferðum ber oft ekki fyllilega saman þar sem þær byggjast á mismunandi nálgunum og eru því takmarkaðar. Bent hefur verið á mikilvægi þess að þróa áreiðanlegar aðferðir sem geta metið og borið saman andoxunarvirkni mismunandi efna í viðeigandi módelkerfum (Decker o.fl., 2005; Laguerre, Lecomte og Villeneuve, 2007). Sum próf meta hversu vel andoxunarefni binda hvarfgjarna radikala (t.d. DPPH og ORAC) og önnur meta virkni til að binda málmjónir og einnig eru módelkerfi þar sem viðkvæm efni eins og beta-karótín oxast. Þetta módel hefur m.a. verið prófað á Matís með góðum árangri, en það hefur þann galla að einungis er verið að meta hvetjandi/letjandi áhrif efna á oxun einnar fitusýru (línólsýru).

Tafla 2. Virkni fyrsta og annars stigs andoxunarefna og dæmi um algeng efnaframléidd og náttúruleg andoxunarefni.

Virgkni 1° andoxunarefna (radical scavengers)	Virgkni 2° andoxunarefna
<p>Hremma fríar stakeindir (free radical scavengers) Veita auðveldlega vetnisatómum og mynda stöðugar stakeindir A• vegna “resonance” áhrifa</p> <p> $ROO\bullet + AH \rightarrow ROOH + A\bullet$ $RO\bullet + AH \rightarrow ROH + A\bullet$ $ROO\bullet + A\bullet \rightarrow ROOA$ $RO\bullet + A\bullet \rightarrow ROA$ </p> <p>Efnaframléidd andoxunarefni / þráhindrar:</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>BHT (butylated hydroxy toluene)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Propyl gallate</p> </div> </div> <p>Náttúruleg andoxunarefni / þráhindrar:</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>α-tocopherol</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Flavone</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Epicatechin (flavan-3-ol)</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Cinnamic sýra</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Caffeic sýra</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Coumaric sýra</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Ferulic sýra</p> </div> </div>	<p>Verka óbeint með því að: Hremma málma (metal chelators) Endurvirkja andoxunarefni með H+ Afoxa og óvirkja hvata (ekki radikala) Hremma súrefni (oxygen scavengers)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dæmi: EDTA, sítrónusýra, polyfosföt, ascorbic sýra (C-vít.), prótein, aminosýrur og polysaccharide - Allt eru þetta vatnsleysin efni - C-vítamín (ascorbic sýra) hefur margþætta virkni er t.d.: elektrónugjafi, málmhremmir, hremmir O₂ <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Ascorbic sýra</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>EDTA</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>Histidine</p> </div> <ul style="list-style-type: none"> - Dæmi um aminosýru með mikla andoxunarefni, sem tengist hæfni til að hremma málma og auk þess getur imidazole hringurinn bundið singlet súrefni.

RANNSÓKNARHUGMYND VERKEFNISINS

Rannsóknarhugmynd verkefnisins byggir á því að afla grunnþekkingar á oxun fiskvöðva sem nýtist til að tryggja bragðgæði og næringargildi fiskafurða og uppfylla þannig þarfir neytenda um hollan og bragðgóðan mat. Rannsóknin felst í því að nota fosfólípíðamódelkerfi til að skoða oxun í fiski vegna hvötunar frá blóðrauða og áhrif vatnsleysanlegra andoxunarefna. Einnig að skoða áhrif suðu sem hvetjandi þáttar við myndun bragðgalla í soðnum þorski.

Af hverju fosfólípíða módelkerfi?

Oxun fitu í matvælum er flókið fyrirbæri og margir þættir sem geta haft áhrif. Þess vegna er erfitt að rannsaka oxun, en til að einfalda er í staðinn stuðst við módelkerfi. Módelkerfi eru einsleit, oft byggð eingöngu á þriggjaþingum eða fitusýrum (oleic-, linoleic- og linolenic sýrur og EPA) og endurspegla því oft ekki oxun í flóknum kerfum eins og matvælum t.d. fiskvöðva.

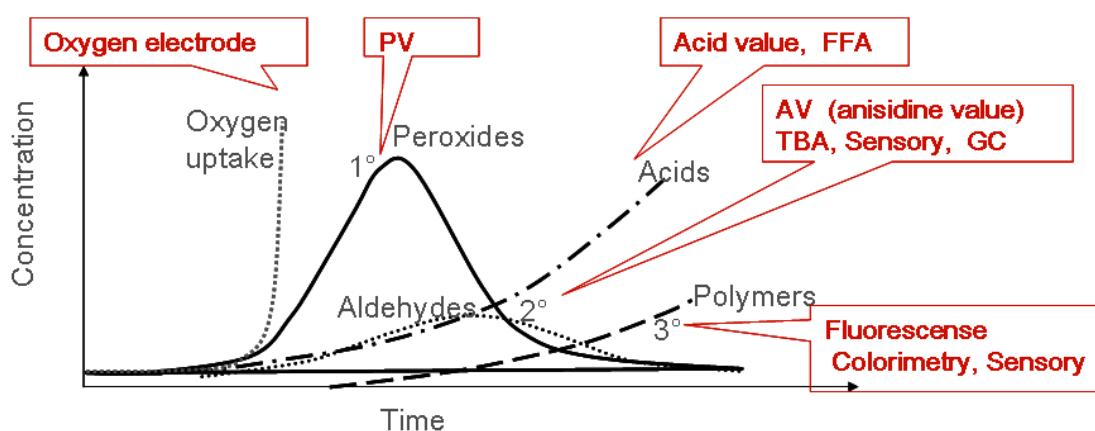
Tilgátur um framgang og hraða oxunar eru byggðar á módelkerfum sem síðan eru sannreynðar í matvælum. Oxun himnubundinnar fitu í vöðva er um margt frábrugðin því sem gerist í einföldum módelkerfum byggð á fitu. Fosfólípíð í vöðva eru oft tengd próteinum, kolvetnum, ensímum, söltum, vítamínum og öðrum efnem sem geta virkað sem pro- eða antioxidantar. Þorskvöðvamódelið er vel skilgreint fosfólípíð módelkerfi sem inniheldur náttúrulega fitu úr þorskvöðva sem líkist raunverulegum aðstæðum og hentar því vel til að skoða oxun í mögnum fiski (Richards og Hultin, 2001; Undeland, o.fl., 2004; Decker o fl., 2005).

RANNSÓKNARAÐFERÐIR

Niðurbrotsefni í fiskvöðva sem myndast við hitun, geymslu og upphitun vegna oxunar, vatnsrofs og annarra efnabreytinga í fiskholdi voru mæld með skynmati, hefðbundnum þránunarmælingum (TBA), gasgreinimælingum til að bera kennsl á rokgjörn lyktarefni og hárpípurafdrætti (capillary electrophoresis, CE) til að greina peptíð og amínósýrur sem áhrif hafa á bragð og lífvirkni. Skoðuð voru tengsl á milli þessara þátta til að skilja betur oxunarferli í fiskvöðva og til að skýra betur hvaða bragðþættir takmarka geymsluþol tilbúinna fiskrétta (sjá ítarlega samantekt á aðferðum í Viðauka II).

Af hverju er þörf á mismunandi aðferðum til að meta oxun?

Oxun er mjög flókið ferli og nauðsynlegt er að beita mismunandi aðferðum til að fylgjast með framgangi oxunar og myndun niðurbrotsefna, sérstaklega þegar um er að ræða flókið kerfi eins og fiskvöðva (sjá mynd 2).



Mynd 2. Dæmi um framgang oxunar og niðurbrots á fitu og mismunandi mæliaðferðir. Súrefnisupptaka með Oxipres eða súrefniselektroðu. Fyrsta stigs niðurbrotsefni eru mæld sem peroxíðgildi (PV peroxide value). Mælingar á óbundnum fitusýrum gefa sýrugildi. Annars stigs myndefni (aldehyðar) eru mæld með TBA, skynmati og gasgreinimælingum (GC). Þriðja stigs myndefni eru fjölliður sem hægt er að mæla með flúrljómun, litamælingum og skynmati

Hefðbundnar oxunarmælingar:

Fylgst var með þránun með hefðbundnum mælingum á myndun annars stigs myndefna oxunar, TBA-gildi (TBARS-thiobarbituric reactive substances). Myndun peroxíða var mæld með ljósgleypnimælingum á útfjólubláa sviðinu við 232 nm, sem er mælikvarði á konjúgeraða díena (conjugated dienes, CD) og við 268 nm, sem er mælikvarði á konjúgeraða tríena (conjugated trienes-CT). Síðastnefnda aðferðin um mælingar á fitu á útfjólubláasviðinu hefur reynst gagnlegri en hefðbundin mæling á peroxíðgildi, því aðferðin er svo næm að hægt er að vinna með mjög lítið magn af fitu, eins og er um magrar fiskafurðir.

Gasgreinimælingar: Mælingar á lyktarefnum

Notaðar voru “headspace” einangrunaraðferðir þar sem rokgjörnum efnum er safnað á gildru (TENAX) og tveir gasgreinar (HP5890; HP GCD G1801C) með mismunandi nemum voru notaðir til að bera kennsl á lyktarefnin. Notaður var gasgreinir með massagreini (gas chromatography mass spectrometry, GC-MS) til að fá massaróf efnanna og þannig bera kennsl á þau. Lyktargreining með "sniffer" (gas chromatography olfactometry, GC-O) sem byggist á því að lykta af efnum þegar þau koma af gasgreinisúlunni var notuð til að bera kennsl á lyktarefni sem eru til staðar í mjög litlu magni en valda einkennandi þráa- og fiskilykt. Mörg lyktarefni í fiski eru til staðar í mjög litlu magni og erfitt er að greina þau nema að notast við lyktargreiningu við gasgreinimælingar (GC-O) þar sem lyktarskynfæri okkar eru mun næmari en skynjarar gasgreina. Fyrir þessar mælingar var gerð bestun og mat á aðferð (sjá viðauka III).

Greining á rokgjörnum lyktarefnum til að fylgjast með framvindu oxunar í fofólípíðamódelkerfi er nýnæmi þar sem sambærilegar rannsóknir hafa einungis skoðað framgang oxunar með hefðbundnum þránunarmælingum.

Skynmat var notað til að greina þránun þar sem þröskuldsgildi myndefna þránunar eru mjög lág og lyktarskynfæri fólks mun næmari en ýmiss tæki geta greint. Samanburður skynmats og efnamælinga á myndefnum lípíðoxunar er nauðsynlegur þáttur í slíkum rannsóknum.

VERKÞÆTTIR OG NIÐURSTÖÐUR

Verkefninu var skipt í fjóra megin hluta:

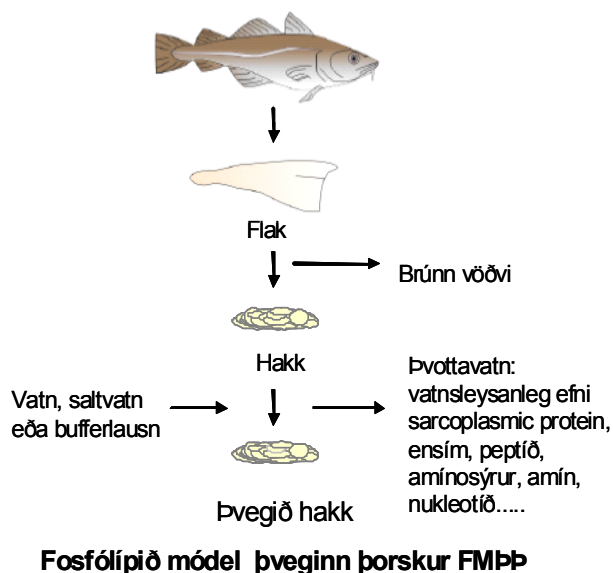
- Fosfólípíða módelkerfi úr þorski (*Gadus morhua*) – Þráahvatar úr blóði bleikju og þorsks (Verkþáttur 1)
- Áhrif andoxunarefna úr vökvafasa loðnu í fofólípíðamódelkerfi úr þorski (Verkþáttur 1)
- Skilgreining á innihaldsefnum og andoxunarvirkni í vökvafasa loðnu og þorsks (Verkþáttur 2)
- Áhrif suðu og viðbættra þráahindra úr loðnu og þörungum í fosfólípíðamódeli og í þorskhakki (Verkþáttur 3)

Fosfólípíða módelkerfi úr þorski (*Gadus morhua*) – Þráahvatar úr blóði bleikju og þorsks

Markmið þessa verkþáttar var að rannsaka oxun í þorskvöðva þar sem notast var við fosfólípíða-módelkerfi úr þorski til að ákvarða áhrif hvata úr blóði bleikju og þorsks á oxun í mögrum fiski. Þorskvöðva-módelið inniheldur þvegið hakk af þorski, þar sem búið er að fjarlægja allan brúnan vöðva af flakinu (Mynd 3). Þetta módelkerfi gefur grunn sem samanstendur af vöðvapróteinum og himnum og inniheldur náttúrulega himnubundna fitu úr þorskvöðva. Það líkist því raunverulegu ástandi án þess að hafa vatnsleysanlega þætti eins og þráahindra/-hvata sem fyrirfinnast náttúrulega í þorski. Eftir þessa meðferð má bæta þráahvötum (blóðrauða) út í módelið og fylgjast með þránun fosfólípíðanna sem eftir verða í frumhimnum þorsksmódelins. Þetta módel ætti að endurspegla þær breytingar sem geta orðið vegna oxunar við geymslu þorsks.

Blóðrauði úr tveimur íslenskum eldisfisktegundum frá Hólum; bleikju og þorski var notaður sem oxunarhvati, með það að markmiði að rannsaka hvort blóðrauði úr þessum ólíku fisktegundum framkalli mismunandi myndefni þránunar og/eða mismikla þránun.

Það er nýnæmi að skoða áhrif blóðrauða úr þessum tegundum í módelkerfi og þáttur í uppbyggingu íslenskra rannsókna á þessu sviði.



Mynd 3. Undirbúningur fosfólípíðamódelis úr hvítum bvegnum þorskvöðva

Hráefni í tilraunirnar var valið m.t.t. árstíma og ástands fisksins (tími frá hrygningu, áta o.fl) því þekkt er að breytingar verða m.a. á fituinnihaldi, óbundnum aminosýrum þorsks og loðnu eftir árstíma. Ástand þorsks er best á haustin og voru tilraunir með fiskvöðvamódel og hakk gerðar á haustmánuðum. Notaður var hakkaður magur fiskur (þorskur) sem hefur hátt hlutfall af fjölómettuðum fitusýrum í vöðva sem eru sérstaklega viðkvæmar gagnvart þránun. Með því að

hakka fiskinn og útbúa þannig safnsýni, fæst ekki einungis einsleitara sýni heldur hvetur hökkunin þránun og eykur líkur á að fá mælanlegar niðurstöður.

Niðurstöður: Blóðrauði hafði greinilega þráahvatavirkni og reyndist blóðrauði úr þorski hafa meiri virkni en úr bleikju. Þorskmóðelsýnin einkenndust af sætri, jarðar-, agúrku-, blóma- og þráalykt. Sterkasta lyktin var karamella og smjörlykt sem áttu uppruna sinn í acetoin, 3-metyl butanal og 2,3-pentandione, graslykt af hexanali, lykt af soðnum kartöflum (eða fiskilykt) sem er einkennandi fyrir cis-4-heptenal, sveppalykt frá 1-octen-3-ol, sæt, sítruslykt frá 2,4-heptadienali og agúrkulykt sem líklegast var af völdum 2,6-nonadienal. Þessi þrjú síðustu lyktarefni myndast við oxun á fitu.

Niðurstöður þessarar rannsóknar voru birtar í Journal of Aquatic Food Product Technology og á alþjóðlegri ráðstefni TAFT 2006 í Quebec í Kanada (sjá lista yfir útgefið efni í viðauka I).

Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir, Guðrún Ólafsdóttir. (2007). The role of volatile compounds in odor development during hemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. Journal of Aquatic Food Product Technology, Vol. 16(4) 2007: 67-86.

Guðrún Ólafsdóttir, Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir. (2006). The role of volatile compounds in odor development during haemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. Erindi flutti á 2nd Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference. Oct. 29 - Nov. 1st. Quebec City, Kanada. http://www.aftc.ca/TAFT2006/PPOINT_PRESENTATIONS/097.pdf .

Áhrif andoxunarefna úr vökvafasa loðnu í fósólípíða módelkerfi úr þorski

Í verkefninu var könnuð andoxunarmarkni í ferskri loðnu, sem ólíkt flestum feittum uppsjávarfiskum er þekkt fyrir stöðugleika og langt geymsluþol gagnvart þránun. Fyrri rannsóknir á Rf hafa sýnt að vatnsleysin efni úr loðnumjöli höfðu andoxunarmarkni í línolsýrumódeli og nánari mælingar á þeim sýndu að þau reyndust innihalda virka vatnsleysanlega þráhindra af flokki fenóla. Möguleg nýting loðnu í verðmætar afurðir felst m.a. í þessum áhugaverðu andoxunareiginleikum vatnsleysanlegra þátta í loðnu sem sýnt hefur verið fram á að eru til staðar í loðnumjöli. Hugsanlega mætti einangra þráhindra einnar fisktegundar (loðnu) til að auka stöðugleika annarrar tegundar (þorsks). Þetta gæti stuðlað að þróun nýrra þráhindra úr fiskafurðum. Rannsóknarspurningin var sú hvort að hægt væri að nýta andoxunarmarkni úr vökvafasa úr loðnu til að hindra oxun í þorskvöðva.

Hráefni í tilraunir var fengið í 5. og 9. viku ársins. Ástand loðnu er ákjósanlegast í ársbyrjun, en hér skiptir máli að fituinnihald fellur mjög hratt á þessum tíma og breytileiki er á samsetningu loðnunnar vegna hrygningar. Aðstæður við veiðar, vinnslu og meðhöndlun eins og kæling hefur mikil áhrif á gæði hráefnis. Uppruni hráefnis sem notað var í tilraunirnar og meðhöndlun þess var því vel skilgreint og mælingar gerðar á fitu, próteini, vatni, pH og TVB-N.

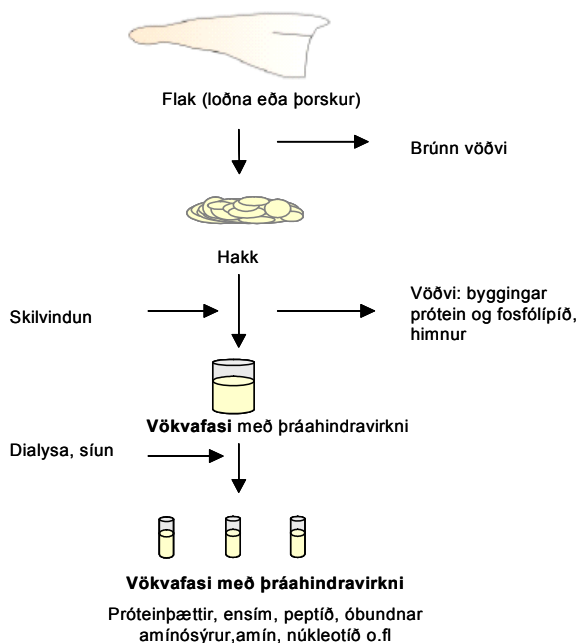
Niðurstöður: Loðnusoð og pressuvökvi úr loðnu var skoðað í fósólípíða módelkerfi úr þorski. Loðnusoðið í 9. viku sýndi andoxunarmarkni en pressuvökvinn þráhvatarmarkni miðað við módelkerfi án viðbætts vökvafasa úr loðnu. Loðnusoðið innihélt hærra magn próteins en hrár pressuvökvinn og CE niðurstöður bentu til þess að loðnusoðið innihéldi meira magn af peptíðum eins og anserine sem getur útskýrt andoxunarmarkni þess. Pressuvökvinn í 9.viku var útbúinn úr heilli loðnu, með blóði og innyflum sem getur skýrt þráhvatarmarkni hans. Mest einkennandi lyktarefni oxunar voru graslykt (hexanal), sveppalykt (1-octen-3-ol), þráa-, kartöflulykt (*cis*-4-heptenal og heptanal) og gúrkulykt. Niðurstöður tilrauna frá 5. viku þar sem notuð var hausskorin loðna án innyfla sýndu ekki eins afgerandi áhrif soðvökva og hrás pressuvökva í fósólípíðamódeli og skýringuna má hugsanlega rekja til mismunandi meðhöndlunar og ástands loðnuhráefnis (ferskara og fitumeira hráefni í 5. viku). Nú liggja fyrir drög að grein um þessa rannsókn sem áætlað er að birta í ritrýndu tímariti.

Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir, Guðrún Ólafsdóttir. (2007). Antioxidant effect of aqueous phase of capelin (*Mallotus villosus*). 5th Euro Fed Lipid Congress and 24th Nordic Lipid Symposium Oils, Fats and Lipids: From Science to Applications - Innovations for a better World - 16-19 September 2007, Gothenburg, Sweden. (Veggspjald, sjá samantekt í viðauka I)

Guðrún Ólafsdóttir, Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir. (2008). The effect of aqueous extracts from capelin (*Mallotus villosus*) on hemoglobin mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. In preparation.

Skilgreining á innihaldsefnum og andoxunarvirkni í vökvafasa loðnu og þorsks

Markmið þessa verkþáttar var að skilgreina efnainnihald vökvafasa fisks til að fá upplýsingar



Mynd 4. Undirbúningur vökvafasa úr loðnu (heil eða flök) og þorskflökum

um hvaða þættir búa yfir andoxunarvirkni. Vökvafasinn inniheldur leysanleg prótein (sarcoplasmic prótein), ensím, pólýpeptíð, aminosýrur, blóðþætti Hb/Fe, amín (TMAO og bíógenísk amín), nukleotíð og ólífræn steinefni. Vökvafasi þorsks og loðnu var einangraður með skilvindu eftir að allur brúni vöðvinn hafði verið fjarlægður og mælingar gerðar á mismunandi þáttum eftir mólþunga (sjá Mynd 4). Uppleyst efni í vökvafasa hafa áhrif á bragð og lyktareiginleika fisks og hugsanlega einnig þráahindra- og/eða þráahvatavirkni.

Andoxunarvirkni getur t.d. tengst dípeptíðum (carnosine og anserine) og

einnig er þekkt að aminosýrur geti haft andoxunarvirkni. Auk þess eru aðrir próteinþættir sem geta haft þráhindravirkni. Mælingar á þessum efnum í mismunandi þáttum vökvafasans eftir mólþunga með hárpípu rafdráttartækni (capillary electrophoresis, CE) var liður í því að skilgreina betur í hverju þráahindrunin er fólgin. Aðferðin byggist á því að sýni, uppleyst í

fosfatbuffer lausn við mjög lágt pH, er látið ferðast eftir hárpípusúlu við háa spennu. Aðskilnaður mólíkúla byggist síðan á stærð þeirra og hleðslu. Amínósýrur og peptíð geta haft biturt bragð og neikvæð áhrif á afurðina, en einnig jákvæð áhrif eins og sætt bragð og lífvirkni t.d. andoxunavirkni. Nýnæmið og jafnframt óvissan í þessum verkþætti fólst m.a. í uppsetningu og aðlögun aðferða fyrir nýjan CE tækjabúnað til að greina þessa þætti (sjá viðauka IV). Mikill áhugi er á heilsuþætandi áhrifum lífvirkra peptíða og nýtast þessar aðferðir því jafnframt vel í öðrum verkefnum til að skoða samsetningu peptíða í fiski.

Í verkefninu voru settar upp aðferðir og mæld andoxunavirkni í bæði ferskum og hituðum vökvafasa úr loðnu og þorski. Nokkrar aðferðir voru notaðar til að skilgreina andoxunareiginleika loðnu með því að meta hæfni til að binda DPPH radíkal, járnbindigetu og með súrefnis-radíkal gleypni (ORAC) (sjá viðauka II). Þessar aðferðir eru hver um sig takmörkunum háðar til að mæla heildar andoxunavirkni í flóknum kerfum eins og matvælum. Ólíkum aðferðum ber oft ekki fyllilega saman, en með því að nota samhliða mismunandi aðferðir sem byggjast á hæfni til að meta mismunandi eiginleika má fá gagnlegar upplýsingar um andoxunavirkni.

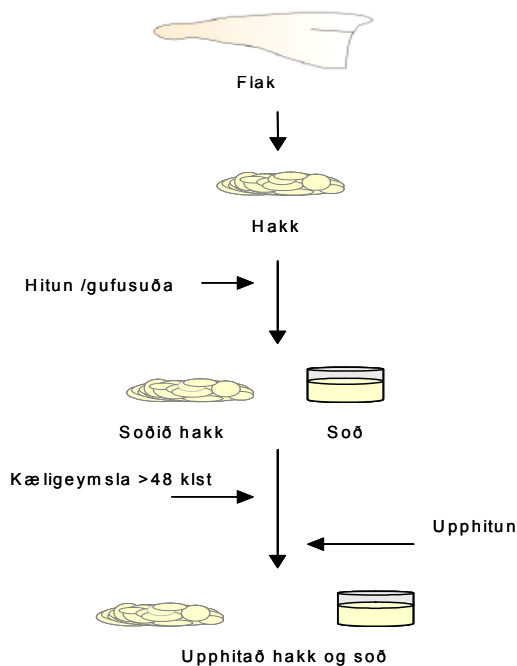
Niðurstöður: Hrásafi eða pressuvökvi (vatnsútdrættir úr hráu sýni) unninn úr heilli loðnu, svo og úr slægðri og hausaðri loðnu, var borinn saman við soð (vatnsútdrættir úr soðnu sýni). Þessi þrjú próf á andoxunavirkni DPPH radíkal, járnbindigeta og súrefnis-radíkal gleypni (ORAC) gáfu sambærilegar niðurstöður. Meiri andoxunavirkni mældist í slægðri og hausaðri loðnu sem veidd var í 5. viku ársins en í heilli loðnu sem veidd var í 9. viku ársins. Þetta er ekki í samræmi við niðurstöður í fosfólípíðamódelkerfinu og er í samræmi við það sem margir hafa bent á að andoxunavirkni efna metið með einhliða prófum gefur ekki endilega upplýsingar um hegðun þeirra í flóknari kerfum (Jacobsen o.fl., 2008). Frekari rannsóknir eru fyrirhugaðar í framhaldi af þessu þar sem mismunandi mólþættir verða skoðaðir betur. Niðurstöður úr þessari rannsókn birtust í Rf skýrslu 37-06.

Margrét Bragadóttir, Judith Reichert, Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir. (2006). Characterisation and antioxidant properties of aqueous extracts from capelin (*Mallotus villosus*). Rf skýrsla 37-06, 26 bls. http://www.matis.is/media/utgafa/matra/Skyrsla_37-06.pdf

Áhrif suðu, upphitunar og viðbættra þráahindra í þorskhakki og þorskvöðvamódeli

Markmið þessa hluta verkefnisins var að kanna áhrif ytri þátta eins og suðu, upphitunar og notkun viðbættra þráavarnarefna á oxun og myndun upphitunarbragðs (warmed over flavor WOF) í soðnum þorski, bæði í þorskvöðvamódeli og í fiskhakki. Markmiðið var að skoða áhrif suðu á þorskvöðva-módelið og bera saman við stöðugleika í ósoðnu módeli til að rannsaka áhrif suðu á myndefni þránunar og hvarfgang. Líklegt er að suðan hafi áhrif á stöðugleika hemoglobins og einnig rofna frumuhimnur þannig að oxun ætti að hvatast við suðuna.

Betri hugmynd fæst um eðli og virkni þráahindra með því að skoða áhrif suðu í fiskhakki þar sem eru til staðar allir þráahvetjandi og þráahindrandi þættir fiskvöðva. Bæði gæti suðan haft áhrif á að hembundið járn verið virkari þráhvati, en einnig gæti suðan eyðilagt virkni þráahindrandi þátta. Rannsóknir á soðnu þorskhakki miða að því að sannreyna niðurstöður rannsókna á módelkerfi.



Mynd 5. Undirbúningur sýna til að meta áhrif suðu og upphitunar í þorskhakki

Takmarkaðar rannsóknir hafa farið fram á áhrifum suðu og upphitunar á myndun rokgjarnra niðurbrotsefna í fiski. Oxunarbreytingar sem eiga sér stað við suðu, kæligeymslu og endurupphitun geta valdið svokölluðu upphitunarbragði í fiski. Tengsl milli skynmats og niðurstöður gasgreini mælinga á lyktarefnum gefa mikilvægar upplýsingar um hvaða efni valda mestum braðgöllum og gefa einnig vísbendingar um mögulegan hvarfgang oxunar og hvaða fítusýrur eru forverar lyktarinnar.

Skoðuð voru áhrif íbættra þráahindra af náttúrulegum toga (úr þörungum, tókóferól og askorbati) á oxun.

Niðurstöður: Áhrif suðu á oxun í fosfólípíða módelkerfi úr þorski var skoðað og var suðan greinilega þráahvetjandi (sjá viðauka V). Niðurstöður um áhrif suðu á oxun verða birtar í bókarkafli um Volatile Aroma Compounds í Handbook of Seafood Products. CRC Press -

Taylor and Francis Group, LLC. Að lokum var oxun í soðnu þorskhakki, með viðbættum andoxunarefnum, skoðað. Andoxunarefnin voru askorbínsýra, tókóferól og frostþurrkaður vatnsútdráttur úr bóluþangi og úr sölvum. Askorbínsýra virtist þráahvetjandi í þessu magni (200 ppm) en hin efnin, þ.á.m. þörungaútdrættirnir, sýndu andoxunarvirkni í soðnu hakki (Viðauki V). Þörungar voru valdir út frá niðurstöðum á andoxunarvirkni íslenskra þörunga (Wang et al. 2007) þar sem í ljós kom að sérstaklega bóluþang og söl sýndu áhugaverða andoxunareiginleika. Bóluþang reyndist hafa mjög hátt innihald af fjölfenólum og mikla andoxunarvirkni skv. ORAC og DPPH prófum, en söl eru áhugaverð þar sem þau sýndu mesta hæfni til að binda málmjónir. Áframhaldandi rannsóknir á þörungum og eiginleikum phlorotannina (fjölfenóla) er hluti af doktorsverkefni Wang Tao við Matvæla og næringarfræði, HÍ.

Tao Wang, Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir. (2007). Screening of antioxidant activity in Icelandic seaweed. 5th Euro Fed Lipid Congress and 24th Nordic Lipid Symposium Oils, Fats and Lipids: From Science to Applications - Innovations for a better World - 16-19 September 2007, Gothenburg, Sweden. (Veggspjald)

Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir, Margrét Bragadóttir. (2007). The effect of thermal treatment on oxidation in cod model system. María Guðjónsdóttir kynnti niðurstöður fyrir hönd verkefnahópsins á fundi Lipidtext verkefnisins innan SEAFOODplus í Lissabon, Portúgal 23. október 2007.

Guðrún Ólafsdóttir, Rósa Jónsdóttir. (2008). Volatile Aroma Compounds í Handbook of Seafood Products. Fidel Toldra , Leo Nollet (Eds) CRC Press - Taylor and Francis Group, LLC (Í birtingarferli)

ÁLYKTANIR OG UMRÆÐUR - ÁVINNINGUR

Rannsóknir á oxun fosfólípíða í módelkerfi leiddu í ljós að ákveðin lyktarefni eru einkennandi fyrir oxun í mögrum fiski. Þetta eru efni líkt og *cis*-4-heptenal og heptanal sem myndast vegna niðurbrots fjölómattaðra fitusýra í frumuhimnu fiskvöðva. Oxunarhvatar líkt og blóðrauði og hitameðferð leiddu til aukinnar oxunar í módelkerfunum. Mælingar á andoxunareiginleikum loðnu sýndu að breytilegir ytri þættir eins og árstíðasveiflur, meðhöndlun og ástand hráefnis höfðu áhrif á andoxunarvirkni sem þarf að hafa í huga ef nýta á slíkt hráefni til vinnslu á verðmætum andoxunarefnum. Í framhaldinu hefur verið unnið að

frekari rannsóknum á mismunandi mólþáttum til að skilgreina betur hugsanlega andoxunareiginleika mismunandi peptíða, amínósýra eða annarra vatnsleysanlegra þátta í loðnu með mögulega nýtingu afurða í huga.

Þær rannsóknir sem gerðar hafa verið í verkefninu hafa aukið skilning okkar á efnahvörfum og breytingum sem verða vegna oxunar og áhrif mismunandi andoxunarefna í þorskvöðva. Niðurstöðurnar hafa gefið mjög jákvæðar vísbendingar um andoxunarvirkni í vökvafasa loðnu og í útdráttum úr þörungum og hafa lagt grunn að frekari rannsóknum sem eru nauðsynlegar áður en hægt er að hagnýta niðurstöður verkefnisins þ.e. nota andoxunarefni úr loðnuhráefni og þörungum í afurðir.

Rannsóknir verkefnisins hafa styrkt uppbyggingu okkar á sviði lípíðoxunar í fiskvöðvmódelkerfi, aðferðum til að meta andoxunarvirkni og vinnslu á andoxunarefnum úr mismunandi hráefnum. Þessi rannsóknarsérhæfing hefur gert okkur kleift að vinna í nánnum samskiptum við aðra vísindamenn á þessu sviði með aðild okkar að LIPIDTEXT verkefninu í Seafood plus 6.RÁ ESB. Þær lögðu einnig grunn að frekari rannsóknum á andoxunarvirkni þörunga sem er hluti af doktorsnámi Wang Tao við Matvæla og næringarfræði HÍ með styrk frá Sjávarútvegsskóla Sameinuðu þjóðanna.

Ávinningur felst fyrst og fremst í uppbyggingu þekkingar og grunnrannsókna á oxun í fiski sem er grundvöllur fyrir frekari rannsóknir á þessu sviði.

- aukin þekking á oxun og niðurbrotsefnum sem myndast í fiskvöðva vegna breytinga á himnubundnum fosfólípíðum og próteinum
- aukinn skilningur á virkni þráahindra og -hvata í vökvafasa í fiski
- niðurstöður um áhrif suða á bragðgæði og næringargildi fisks og virkni viðbættra þráahindra

Aukinn skilningur á oxunarbreytingum í fiskvöðva getur auðveldað val á andoxunarefnum og aðferðum til að draga úr eða koma í veg fyrir oxun og stuðlar að því að tryggja bragðgæði og næringargildi fiskafurða til að uppfylla þarfir neytenda um hollan og bragðgóðan mat. Fáar heimildir eru til um þau áhrif sem suða og upphitun hefur á gæði fisks, en með því að afla þekkingar um áhrif þess á afurðir verður auðveldara fyrir íslenska framleiðendur að sinna kröfum markaðarins um að vinna afurðir sem eru tilbúnar til neyslu. Þekking á áhrifum andoxunarefna í fiskvöðvamódeli ætti að nýtast matvælaframleiðendum við þróun tilbúinna fiskrétta.

Tilbúnir réttir – neytendur og fiskneysla: Hagrænn ávinningur verkefnisins felst í því að auka verðmæti sjávarafurða. Neysla á tilbúnum matvælum hefur aukist mjög í Evrópu á undanförunum árum. Til þess að matvælafyrirtæki eigi auðveldara með að sinna kröfum markaðarins er ljóst að afla þarf meiri þekkingar á stöðugleika tilbúinna fiskrétta og áhrif suðu á gæði afurða. Neytendur gera síauknar kröfur um framboð á tilbúnum matvælum án þess þó að varan glati mikilvægum eiginleikum, s.s. næringarinnihaldi og bragðgæðum. Jafnframt því eru auknar kröfur gerðar um ferskleika og aukið geymsluþol. Það sem einkum er takmarkandi við notkun á fiski í tilbúna rétti er að fiskur er mjög viðkvæm vara vegna hás hlutfalls af fjölómettuðum fitusýrum (FÓFS) sem geta oxast og valda óbragði.

Niðurstöður verkefnisins hafa sýnt fram á hvataða oxun í fiskhakki við suðu og aukið skilning á hvaða rokgjörnu niðurbrotsefni fjölómattaðra fitusýra valda bragðgöllum. Einnig liggja fyrir niðurstöður um að mögulegt sé að nýta andoxunarvirkni afurða úr loðnu og þörungum til að koma í veg fyrir myndun þessara bragðgalla í fiskafurðum.

Rannsókn á næringarinnihaldi mismunandi skyndibita á markaði í Japan sýndi fram á að skyndibitafæði sem byggt er á fiski og hefðbundnum japönskum réttum hafði mun meiri heilsuþætandi áhrif heldur en skyndibitafæði að vestrænni fyrirmynd sem var byggt á pasta, hamborgurum og pizzu. Þar sem neytandinn hefur almennt trú á heilsuþætandi áhrifum fisks er líklegt að tilbúnir réttir með fiski eigi góða markaðsmöguleika. Það er því mikilvægt fyrir fiskframleiðendur að hafa staðgóðar upplýsingar um áhrif meðhöndlunar á hráefnið til að geta komið í veg fyrir myndun á óæskilegu bragði. Næringargildi fisks hefur löngum verið tengt við heilsuþætandi áhrif n-3 fitusýra í sjávarfangi og margar rannsóknir hafa sýnt fram á jákvæð áhrif lýsisneyslu á hjarta- og æðasjúkdóma. Hins vegar hefur minna verið rannsakað hvort fiskneysla og þar með þættir eins og prótein með lífsnauðsynlegum aminosýrum og lífvirkum peptíðum eigi stóran þátt í heilsuþætandi áhrifum fisks. Rannsóknir á tilvist og magn peptíða í íslenskum fisktegundum í verkefninu er liður í uppbyggingu rannsókna sem tengjast lífvirkni og hlutverki þessara þátta í heilsuþætandi áhrifum fisks.

- Uppsetning aðferða til að greina lífvirk peptíð með CE tækni og mat þeim aðferðum er grunnur fyrir áframhaldandi rannsóknir, sérstaklega greining á lífvirkum þáttum (amínósýrur og peptíð) bæði í hvítum fiski (þorski) og í loðnu

- Upplýsingar um samsetningu efna í vökvafasa getur nýst við þróun á fiskbragði ekstrakts úr vökvafasa fisks, sem er uppsprettan af bæði rokgjörnum lyktarefnum og bragðefnum. Vísbendingar voru um að jákvæðir bragðeiginleikar í vökvafasa loðnu tengdust þáttum minni en 1KDa
- Þekking á niðurbrotsefnum í vökvafasa og tengsl þeirra við bragð og lyktareinkenni gæti nýst við þróun fljótvirkra aðferða til að meta gæði fisks. Áhugavert væri að fylgja þessu eftir í sambandi við þróun á “smart sensor” tækni fyrir neytendur.
- Niðurstöður sýndu að magn hexanals (~800 ng/g) var um tífalt hærra en annarra ómettaðra aldehyða (~20-80 ng/g) sem myndast við oxun og auðvelt reyndist að mæla hexanal með SPME. Há fylgni ($r^2 = 0.9$) var á milli hexanals og cis-4-heptenals og er því raunhæft að nota hexanal sem gæðavísi í mögrum fiski.
- Í verkefninu voru gerðar mælingar á TMAO/TMA/DMA og NH₃ með CE tækni þar sem sett var upp mæliaðferð og hún aðlöguð. Niðurstöður benda til að slík aðferð geti verið gagnleg sem fljótverk mæling á rannsóknarstofu en ytri þættir eins og salt truflar slíkar mælingar.

Næstu skref í rannsóknum

Rannsóknir á náttúrulegum andoxunarefnum úr þörungum verða eitt af meginverkefnum næstu ára og tengjast meðal annars doktorsverkefni Wang Tao. Sérstök mólíkúlbygging phlorotannina úr þörungum er frábrugðin fjölfenólum í plöntum og talið er að það geti útskýrt mikla andoxunarvirkni brúnþörunga, sem áhugavert er að skoða nánar.

Þáttun á loðnusoði í minna en 3 KDa, minna en 1 KDa og milli 1 og 3 KDa gáfu til kynna að um svipaða peptíð samsetningu væri að ræða og svipuð blóðþrýstingslækkandi áhrif þáttanna mælt með ACE hindra virkni. Til að einangra betur þau efni sem hugsanlega hafa andoxunarvirkni eru næstu skref að ensím-hydrolysera loðnusoð og þátta með ultra og nano filtrun til að skima betur fyrir andoxunarvirkni loðnufasans. Meta þarf andoxunarvirknina með andoxunarprófum og með því að bæta í mismunandi módelkerfi.

Ljóst er að andoxunarefni virka mismunandi í mismunandi fæðutegundum, t.d. hvort þau eiga að vera í fitufasa, vatnsfasa eða ýrulausnum. Því er nauðsynlegt að skoða betur náttúruleg andoxunarefni í mismunandi módelkerfum til að meta virkni þeirra við mismunandi aðstæður.

HEIMILDASKRÁ*

- AOAC (1990). Official methods of analysis, 15th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA.
- AOAC (2000). Measurements of TVB-N in fish and fishmeal 920 17th ed. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA.
- AOCS (1997). Official method BA 3-38 and application note Tecator no. AN 301. Firestone D, (Ed.). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 5th ed.: American Oil Chemists Society Champaign, IL, USA.
- Bailey, M. E. (1988). Inhibition of warmed-over flavor with emphasis on Maillard reaction products. *Food Techno.*, 42, 123-126.
- Balev, D., Vulkova, T., Dragoev, S., Zlatanov, M. og Bahtchevanska, S. (2005). A comparative study on the effects of some antioxidants on the lipid and pigment oxidation in dry-fermented sausages. *Int. J Food Sci. Technol.* 40, 977-983.
- Belitz, H. D. og Grosch, W. (1987). Lipids. Í *Food Chemistry* (bls. 128-200). Berlin: Springer-Verlag.
- Benjakul, S., Visessanguanb, W., Phongkanpaia, V. og Tanakac M. (2005). Antioxidative activity of caramelisation products and their preventive effect on lipid oxidation in fish mince. *Food Chem.*, 90, 231-239.
- Botta, J. R., Lauder, J. T., Downey, A. P. og Saint, W. (1983). Chemical and sensory assessment of nonspawning capelin (*Mallotus villosus*) subjected to long term frozen storage. *J Food Sci.*, 48, 1512-1515, 1536.
- Bragadóttir, M., Pálmadóttir, H. og Kristbergsson, K. (2000). Effect of fish meal processing on endogenous anti- and prooxidants in capelin (*Mallotus villosus*). Proceedings of the 3rd Meeting of the European Section of AOCS and Lipidforum seminar Oils, Fats from Basic Research to Industrial Applications 18-21 June, Helsinki, Finland.
- Cross, H. R., Leu, R. og Miller, M. F. (1987). Scope of warmed-over flavor and its importance to the meat industry. Í A. J. St Angelo og M. E. Bailey (ritstjórar), *Warmed-Over Flavor of Meat*. New York: Academic Press, Inc.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C. og Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 48-54.

- Decker, E. A. og Xu, Z. (1998). Minimizing rancidity in muscle foods. *Trends Food Sci Technol.*, 9, 241-248.
- Decker, E. A., Warner, K., Richards, M. P. og Shahidi, F. (2005). Measuring Antioxidant Effectiveness in Food. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4303-4310.
- Flick, G. J., Hong, G. P. og Knobl, G. M. (1992). Lipid oxidation of seafood during storage. Í A.J. St Angelo (ritstjóri). *Lipid oxidation in food* (bls. 183-207). ACS Symposium Series 500.
- Formanek, Z., Kerry, J. P., Higgins, F. M., Buckley, D. J., Morrissey, P. A. og Farkas, J. (2001). Addition of synthetic and natural antioxidants to α -tocopheryl acetate supplemented beef patties: effects of antioxidants and packaging on lipid oxidation. *Meat Sci.*, 58 (4), 337-341.
- Frankel, E. M. (1998). *Lipid oxidation*. Dundee: The Oily Press,
- Grey, J. I., Gomaa, E. A. og Buckley, D. J. (1996). Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Sci.*, 43, No. S, S111-123.
- Guðrún Ólafsdóttir, Heiða Pálmadóttir, Rögnvaldur Ólafsson, Emilía Martinsdóttir og Rán Jónsdóttir (1993). *Þróun nema sem greina ferskleika fisks. Gasgreinmælingar á rokgjörnum efnum í karfa*. (Hlutaskýrsla fyrir Rannís). Reykjavík: Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins.
- Hardy, R. (1980). Fish lipids. Part 2. Í J. J. Connell (ritstjóri), *Advances in Fish Science and Technology* (bls 103-111). Surrey: Fishing News Books Ltd. Farnham
- Hultin, H. O. (1992a). Lipid oxidation in fish muscle. Í G. J. Flick og R. E. Martin (ritstjórar), *Advances in Seafood Biochemistry. Composition and Quality* (bls. 99-122). Lancaster: Pennsylvania Technomic Publishing Company.
- Hultin, H. O. (1992b). Trimethylamine-N-oxide (TMAO) demethylation and protein denaturation in fish muscle. Í G. J. Flick og R. E. Martin (ritstjórar), *Advances in Seafood Biochemistry. Composition and Quality* (bls. 25-42). Lancaster: Pennsylvania Technomic Publishing Company.
- Hultin, H. O. (1994). Oxidation of lipids in seafoods. Í F. Shahidi og J. F. Botta (ritstjórar), *Seafoods: Chemistry, processing technology and quality* (bls. 49-74). Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- Hultin, H. O. og Kelleher, S. D. (2000). Surimi Processing from Dark Muscle Fish. Í J. W. Park (ritstjóri), *Surimi and Surimi Seafood* (bls. 59-78). New York: Marcel Dekker, Inc.

- ISO (1999). Animal feeding stuffs - Determination of moisture content method 6496; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
- ISO (2002). Method for analysing ash in fish meal and feed.5984; (E). International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
- ISO (2005). Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content method (E) 5983 - 2; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
- ISO (1993). Sensory analysis - general guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 1: Selected assessors method 8586-1; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland.
- Jacobsen, C. (1999). Sensory impact of lipid oxidation in complex food systems. *Fett/Lipid*, 101, 484-492.
- Jacobsen, C., Let, M. B., Nielsen, N. S. og Meyer, A. S. (2008). Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: A comparative evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 76-93.
- Jangaard, P. M. (1974). Prospects for utilizing capelin (*Mallotus villosus*) for human consumption. Í R. Kreuzer (ritstjóri), *Fishery Products* (203-206). Surrey: Fishing News (Books) Ltd.
- Jittrepotch, N., Ushio, H. og Ohshima, T. (2006). Effects of EDTA and a combined use of nitrite and ascorbate on lipid oxidation in cooked Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*) during refrigerated storage. *Food Chem.*, 99, 70-82.
- Jónsdóttir, R., Olafsdóttir, G., Martinsdóttir, E. og Stefansson, G. (2004). Flavor Characterization of Ripened Cod Roe by Gas Chromatography, Sensory Analysis, and Electronic Nose. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 6250-6256.,
- Jónsdóttir R., Bragadóttir M. og Arnarson G. Ö. (2005). Oxidatively derived volatile compounds in microencapsulated fish oil monitored by solid-phase microextraction (SPME). *J. Food Sci.*, 70(7), C433-C440.
- Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., Hauksson, S. og Einarsson, J. E. (2007). Flavorants from Seafood Byproducts. Í Y. H. Hui (ritstjóri) *Handbook of Food Products Manufacturing: Health, Meat, Milk, Poultry, Seafood, and Vegetables, Volume 2* (bls. 931-945). New Jersey: John Wiley & Sons.

- Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., Haugen, J. E. og Chaine, E. (2008). Volatile Compounds Suitable for Rapid Detection as Quality Indicators of Cold Smoked Salmon (*Salmo salar*). *Food Chemistry*, 109, 184–195.
- Karahadian, C. og Lindsay, R. C. (1989). Evaluation of compounds contributing fishy flavors in fish oils. *J Am Oil Chem Soc.*, 66 (7), 953.
- Laguerre, M., Lecomte, J. og Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244–282.
- Layne, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology* (3. útgáfa). New York: Academic press, Inc.
- Lindsay, R. C. (1990). Fish Flavors. *Food Rev. Int.*, 6 (4), 437-455.
- Love, J. (1988). Sensory analysis of warmed-over flavor in meat. *Food Technol.*, 42, 140-143.
- Margrét Bragadóttir. (2001). On the Stability of Icelandic Capelin Meal. MS ritgerð. Háskóli Íslands, Raunvísindadeild.
- Margrét Bragadóttir. (2003). *Áhrif þörunga og lækningajurta á geymsluþol loðnulýsis*. (Verkefnaskýrsla 29-03). Reykjavík: Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins.
- Margrét Bragadóttir. (2004). *Ákvörðun á stöðugleika fiskimjöls*. (Lokaskýrsla til Rannís). Reykjavík: Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins.
- McGill, A. S., Hardy, R., Burt, J. R. og Gunstone, F. D. (1974). Hept-*cis*-4-enal and its Contribution to the Off-flavour in Cold Stored Cod. *J Sci Food Agric.*, 25, 1477-1489.
- Medina, I., Satue-Gracia, M. T. og Frankel, E. N. (1999). Static headspace gas chromatographic analyses to determine oxidation of fish muscle lipids during thermal processing. *J Am Oil Chem Soc.*, 76, (2), 231-236.
- Meijboom, P. W. og Stroink, T. B. A. (1972). 2-trans,4-cis,7-cis-decatrienal, the fishy off-flavor occurring in strongly autoxidized oils containing linolenic acid or n-3,6,9 etc fatty acid. *J Am. Oil Chem. Soc.*, 49, 555.
- Mielche, M. M. og Bertelsen, G. (1994). Approaches to the prevention of warmed-over flavour. *Trends Food Sci. Technol.*, 5, 322-927.
- Milo, C. og Grosch, W. (1995). Detection of odor defects in boiled cod and trout by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. *J Agric. Food Chem.*, 43(2), 459-462.
- Milo, C. og Grosch, W. (1996). Changes in the odorants of boiled salmon and cod as affected by the storage of the raw material. *J Agric Food Chem.*, 44(8) 2366-2371.

- Ólafsdóttir, G., Martinsdóttir, E. og Jónsson, E. H. (1997). Gas sensor and GC measurements of volatile compounds in capelin (*Mallotus villosus*). Í J. B. Luten, T. Børresen, og J. Oehlenschläger (ritstjórar), *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality* (bls. 507-520). Amsterdam: Elsevier.
- Ólafsdóttir, G. og Fleurence J. (1998). Evaluation of fish freshness using volatile compounds - Classification of volatile compounds in fish. Í G. Ólafsdóttir, J. Luten, P. Dalgaard, M. Careche, V. Verrez-Bagnis, E. Martinsdóttir og K. Heia (ritstjórar) *Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry* (bls. 55-69). Paris: International Institute of Refrigeration.
- Ólafsdóttir, G., Jónsdóttir, R., Lauzon, H. L., Luten, J. og Kristbergsson, K. (2005). Characterization of Volatile Compounds in Chilled Cod (*Gadus morhua*) Fillets by Gas Chromatography and Detection of Quality Indicators by an Electronic Nose. *J. Agric. Food Chem.*, 53(26), 10140 -10147.
- Pasquel, L. J. og Babbitt, J. K. (1991). Isolation and partial characterization of a natural antioxidant from shrimp (*Pandalus jordani*). *J Food Sci.*, 56, 143-145.
- Ramanathan, L. og Das, N. P. (1992). Studies on the control of lipid oxidation in ground fish by some polyphenolic natural products. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 17-21.
- Refsgaard, H. H. F., Brockhoff, P. B. og Jensen, B. (1998). Sensory and chemical changes in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) during frozen storage. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3473-3479.
- Refsgaard, H. H. F., Brockhoff, P. B. og Jensen, B. (2000). Free polyunsaturated fatty acids cause taste deterioration of salmon during frozen storage. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3280-3285.
- Reglugerð um aukefni í matvælum nr. 285/2002. Viðauki II, Aukefnalisti.
- Richards, M. P. og Hultin, H. O. (2000). Effect of pH on lipid oxidation using trout hemolysate as a catalyst: a possible role for deoxyhemoglobin. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3141-3147.
- Richards, M. P. og Hultin, H. O. (2001). Rancidity development in a fish model system as affected by phospholipids. *J. Food Lipids*, 8, 215-230.
- Sannaveerappa, T., Undeland, I. og Sandberg, A. S. (2004). WEFTA Conference 12-15 sept. 2004. Lübeck, Germany.

- Shaw, D. H. og Botta, J. R. (1977). Chemical and sensory changes in round inshore male capelin (*Mallotus villosus*) during prolonged storage for 24 months at -23 °C. *J. Fish Res. Board Can.*, 34, 209-214.
- Skibsted, L. H., Mikkelsen, A. og Bertelsen, G. (1998). Lipid-derived off-flavours in meat. Í F. Shahidi (ritstjóri), *Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods* (bls. 217-256). London: Blackie Academic & Professional.
- St Angelo, A. J., Verceletti, J. R., Dupuy, H. P. og Spanier, A. M. (1987). Assessment of beef flavor quality: A multidisciplinary approach. *Food Technol.*, 42, 133-139.
- Sørensen, G. og Jørgensen, S. S. (1996). A critical examination of some experimental variables in the -thiobarbituric acid (TBA) test of lipid oxidation in meat products. *Lebensm. Wiss. u Technol.*, 202, 205-210.
- Tichivangana, J. Z. og Morrissey, P. A. (1982). Lipid oxidation in cooked fish muscle. *Irish J Food Sci. Technol.*, 6(2), 157-164.
- Torten, J. og Whitaker, J. R. (1964). Evaluation of the biuret and dye-binding methods for protein determination in meats. *J. Food Sci.*, 29, 168-174.
- Undeland, I. (1997a). Lipid oxidation in fish - causes, changes and measurements. Í G. Ólafsdóttir, J. Luten, P. Dalgaard, M. Careche, V. Verrez-Bagnis, E. Martinsdóttir og K. Heia (ritstjórar) *Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry* (bls. 241-257). Paris: International Institute of Refrigeration.
- Undeland, I. (1997b). Lipid-Protein Interactions in Fish During Cold Storage. Í G. Ólafsdóttir, J. Luten, P. Dalgaard, M. Careche, V. Verrez-Bagnis, E. Martinsdóttir og K. Heia (ritstjórar) *Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry* (bls. 258-262). Paris: International Institute of Refrigeration.
- Undeland, I., Ekstrand, B. og Lingnert, H. (1998). Lipid Oxidation in Minced Herring (*Clupea harengus*) during Frozen Storage. Effect of Washing and Precooking. *J Agric Food Chem* 46, 2319-2328.
- Undeland, I., Hultin, H. O. og Richards, M. P. (2002). Added triacylglycerol do not hasten hemoglobin-mediated lipid oxidation in washed minced cod muscle. *Agric. Food Chem.*, 50, 6847-6853.
- Undeland, I., Hultin, H. O. og Richards, M. P. (2003). Aqueous extracts from some muscles inhibit hemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. *Agric. Food Chem.*, 51, 3111-3119.

- Undeland, I., Kristinsson, H. G. og Hultin, H. O. (2004). Hemoglobin-mediated oxidation of washed minced cod muscle phospholipids: Effect of pH and hemoglobin source. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4444-4451.
- Undeland, I., Hall, G., Wendin, K., Gangby, I. og Rutgersson, A. (2005). Preventing lipid oxidation during recovery of functional proteins from herring (*Clupea harengus*) fillets by an acid solubilization process. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5625-5634.
- Vilhjálmsson, H. (1994). *The Icelandic capelin stock*. J. Mar. Res. Inst., XII(1), 1-281.
- Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz D. B., Gebhardt S. E., Beecher G. og Prior, R. L. (2004). Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 407-422
- Yen, G. C. og Wu, J. Y. (1999). Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem.* 65, 375-379.

* Heimildaskrá á einnig við um heimildir í viðaukum

VIÐAUKI I

**Skrá yfir greinar í vísindarit, birtar skýrslur, fyrirlestrar og
veggspjöld og ágríp**

Skrá yfir greinar í vísindarit, bókarkafli, birtar skýrslur, fyrirlestra og veggspjöld

Greinar í vísindarit:

Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir, Guðrún Ólafsdóttir. (2007). The role of volatile compounds in odor development during hemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, Vol. 16(4), 67-86.

Guðrún Ólafsdóttir, Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir. (2008). The effect of aqueous extracts from capelin (*Mallotus villosus*) on hemoglobin mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. In preparation.

Bókarkafli:

Guðrún Ólafsdóttir, Rósa Jónsdóttir. (2008). Volatile Aroma Compounds í Handbook of Seafood Products. Fidel Toldra , Leo Nollet (Eds) CRC Press - Taylor and Francis Group, LLC (Í birtingarferli)

Skýrslur:

Margrét Bragadóttir, Judith Reichert, Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir. (2006). Characterisation and antioxidant properties of aqueous extracts from capelin (*Mallotus villosus*).Rf skýrsla 37-06, 26 bls. http://www.matis.is/media/utgafa/matra/Skyrsla_37-06.pdf

Erindi:

Guðrún Ólafsdóttir, Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir. (2006). The role of volatile compounds in odor development during haemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. 2nd Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference. Oct. 29 - Nov. 1st. Quebec City, Kanada. http://www.aftc.ca/TAFT2006/PPOINT_PRESENTATIONS/097.pdf

Margrét Bragadóttir, Guðrún Ólafsdóttir, Rósa Jónsdóttir. (2005). Oxidation in fish – the role of phospholipids, proteins, pro- / and antioxidants and the effect of thermal treatment Kynning á verkefningu á fundi LIPIDTEXT verkefnisins innan SEAFOODplus í París, Frakklandi,febrúar, 2005.

- Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir, Margrét Bragadóttir. (2006). Oxidation in fish – the role of phospholipids, proteins, pro- / and antioxidants and the effect of thermal treatment
Kynning á niðurstöðum verkefnisins á fundi LIPIDTEXT verkefnisins innan SEAFOODplus í Tromsø, Noregi 1. júní 2006.
- Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir, Margrét Bragadóttir. (2007). OXIFISH. Kynning á niðurstöðum verkefnisins á fundi LIPIDTEXT verkefnisins innan SEAFOODplus í Bilbao, Spáni 7. júní 2007.
- Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir, Margrét Bragadóttir. (2007). The effect of thermal treatment on oxidation in cod model system. María Guðjónsdóttir kynnti niðurstöður fyrir hönd verkefnahópsins á fundi LIPIDTEXT verkefnisins innan SEAFOODplus í Lissabon, Portúgal 23. október 2007.
- Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir, Margrét Bragadóttir. (2008). The effect of thermal treatment on oxidation in cod model system. Kynning á niðurstöðum verkefnisins á fundi LIPIDTEXT verkefnisins innan SEAFOODplus í Gautaborg, Svíþjóð 3. apríl 2008.

Veggspjöld:

- Tao Wang, Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir. (2007). Screening of antioxidant activity in Icelandic seaweed. 5th Euro Fed Lipid Congress and 24th Nordic Lipid Symposium Oils, Fats and Lipids: From Science to Applications - Innovations for a better World - 16-19 September 2007, Gothenburg, Sweden.
- Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir, Guðrún Ólafsdóttir. (2007). Antioxidant effect of aqueous phase of capelin (*Mallotus villosus*). 5th Euro Fed Lipid Congress and 24th Nordic Lipid Symposium Oils, Fats and Lipids: From Science to Applications - Innovations for a better World - 16-19 September 2007, Gothenburg, Sweden.

The Role of Volatile Compounds in Odor Development During Hemoglobin-Mediated Oxidation of Cod Muscle Membrane Lipids

Rósa Jónsdóttir
Margrét Bragadóttir
Guðrun Ólafsdóttir

ABSTRACT. The effect of hemoglobin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) on formation of volatile compounds in washed cod model system was studied by GC analysis during chilled storage. Pro-oxidative effect of cod hemoglobin compared to char hemoglobin was observed as higher initial levels of hexanal, *cis*-4-heptenal and 2,4-heptadienal contributing to higher rancid odor sensory scores. This was in agreement with TBARS and changes in color indicating faster initial oxidation catalyzed by cod hemoglobin. The aldehydes appeared to decline towards the end of the storage time in agreement with TBARS; however, levels of 2,4-hepta-

Rósa Jónsdóttir, MSc, Margrét Bragadóttir, MSc, and Guðrun Ólafsdóttir, PhD, were affiliated with the Icelandic Fisheries Laboratories, Skulagata 4, 101 Reykjavík, Iceland.

Address correspondence to: Rósa Jónsdóttir (E-mail: rosa@matis.is).

The authors thank The Research Fund of the Icelandic Centre for Research for partly financing the project. The staff at IFL is thanked for their contribution to chemical and microbial analysis of samples and Dr. Helgi Thorarensen, at Hólar Agricultural College in Iceland for kindly providing blood samples. The collaboration with the Lipidtext project of the EU funded SEAFOODplus project, in particular valuable assistance from Dr. Ingrid Undeland and Thippeswamy Sannaveerappa at Chalmers University in Göteborg is acknowledged.

Journal of Aquatic Food Product Technology, Vol. 16(4) 2007

Available online at <http://jafpt.haworthpress.com>

© 2007 by The Haworth Press, Inc. All rights reserved.

doi:10.1300/J030v16n04_07

67

68

JOURNAL OF AQUATIC FOOD PRODUCT TECHNOLOGY

dienal were considerably higher after 4 days of storage in the arctic char hemoglobin catalyzed system. doi:10.1300/J030v16n04_07 [Article copies available for a fee from The Haworth Document Delivery Service: 1-800-HAWORTH. E-mail address: <docdelivery@haworthpress.com> Website: <<http://www.HaworthPress.com>> © 2007 by The Haworth Press, Inc. All rights reserved.]

KEYWORDS. Volatile compounds, odor, fish muscle, SPME, gas chromatography, sensory analysis, TBARS

Reference:

Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir, Guðrún Ólafsdóttir. (2007). The role of volatile compounds in odor development during hemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, Vol. 16(4) 2007: 67-86.

The effect of aqueous extracts from capelin (*Mallotus villosus*) on hemoglobin mediated oxidation of cod muscle membrane lipids

Abstract: Aqueous extracts from minced raw and cooked whole capelin (*Mallotus villosus*) was explored for a possible application as natural antioxidants using three tests for antioxidant activities. Fat, protein, water content and TVB-N value of capelin was determined by traditional methods and capillary electrophoresis (CE) was used to study peptides. Results from the three tests for antioxidant activity agreed quite well. Higher antioxidant activities were observed in samples from gutted capelin harvested in week 5 compared to whole capelin from week 9. Variation in protein content and amino acid/peptide profiles obtained by capillary electrophoresis did not appear to affect the antioxidant activities of the samples as measured by these three tests. More prooxidant activity due to higher hemoglobin content in whole capelin (week 9) could most likely counteract the antioxidant activity of all aqueous samples derived from this sample. The results indicate that extrinsic factors like seasonal changes and handling influence the antioxidative properties. Antioxidant activity of the capelin broth in the cod model system was confirmed by all methods tested. The broth contained higher protein content than the raw juice (96.2 mg/ml and 51.1 mg/ml, respectively) and CE results suggested that the broth contained higher levels of peptides like anserine which may explain higher antioxidant activity of the broth. The raw aqueous phase was found to have a pro-oxidant trend possibly related to the use of whole capelin including blood and viscera.

Manuscript in preparation:

Guðrún Ólafsdóttir, Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir. (2008). The effect of aqueous extracts from capelin (*Mallotus villosus*) on hemoglobin mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. In preparation.

Characterisation and antioxidant properties of aqueous extracts from capelin (*Mallotus villosus*)

Abstract: Möguleg nýting loðnu í verðmætar afurðir felst m.a. í áhugaverðum andoxunareiginleikum vatnsleysanlegra þátta í loðnu, sem sýnt hefur verið fram á að eru til staðar í loðnumjöli. Nokkrar aðferðir voru notaðar til að skilgreina andoxunareiginleika loðnu með því að meta hæfni til að binda DPPH radíkal, járnbindigetu og með súrefnis-radíkal gleypni (ORAC). Hrásafi eða pressuvökvi (vatnsútdrættir úr hráu sýni) sem unninn var úr heilli loðnu, svo og úr slægðri og hausaðri loðnu, var borinn saman við soð (vatnsútdrættir úr soðnu sýni), sem einnig var greint í þætti samkvæmt mólþunga. Þessi þrjú próf á andoxunarvirkni gáfu sambærilegar niðurstöður.

Meiri andoxunarvirkni mældist í slægðri og hausaðri loðnu sem veidd var í 5. viku ársins en í heilli loðnu sem veidd var í 9.viku ársins. Breytileiki í próteininnihaldi og aminosýru/peptíð samsetningu sýnanna mælt með hárpípurafdrætti virtist ekki hafa áhrif á andoxunarvirkni eins og hún var mæld með þessum þremur prófum. Meiri þráahvatavirkni vegna hærra hemóglóbín innihalds í heilu loðnunni (frá 9. viku) gæti hafa dregið úr andoxunarvirkni allra vökvasýna sem unnin voru úr þessu sýni. Niðurstöðurnar sýna að breytilegir ytri þættir eins og árstíðasveiflur og meðhöndlun geta haft áhrif á andoxunarvirkni. Auk þess er áhugavert að skoða nánar mismunandi mólþætti til að skilgreina betur hugsanlega andoxunareiginleika mismunandi peptíða, aminosýra eða annarra vatnsleysanlegra þátta í loðnu með mögulega nýtingu afurða í huga.

Heimild:

Margrét Bragadóttir, Judith Reichert, Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir. (2006). Characterisation and antioxidant properties of aqueous extracts from capelin (*Mallotus villosus*). Rf skýrsla 37-06, 26 bls. http://www.matis.is/media/utgafa/matra/Skyrsla_37-06.pdf

THE ROLE OF VOLATILE COMPOUNDS IN ODOR DEVELOPMENT DURING HAEMOGLOBIN-MEDIATED OXIDATION OF COD MUSCLE MEMBRANE LIPIDS

Gudrun Olafsdottir*, Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir
Icelandic Fisheries Laboratories, Skulagata 4, 101 Reykjavik, Iceland
Fax: +354 530 8601, Phone: +354 530 8600

Keywords: Volatile compounds, odor, fish muscle, SPME, gas chromatography, sensory analysis, TBARS.

**Contact:* Dr Gudrun Olafsdottir, e-mail: gudrun@rf.is

Abstract

The aim of the project OXIFISH is to study the effect of heating and oxidation on phospholipids, proteins and antioxidants in fish muscle, influencing sensory quality. A phospholipid model systems from cod has been used to study the effect of pro-oxidants (hemoglobin from cod and trout) and antioxidants in aqueous fraction of fish muscle (cod and capelin).

The development of volatile degradation compounds in the model system during chilled storage in ice were studied by sensory analysis, traditional lipid oxidation analysis (TBARS) and extraction of volatiles by solid phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography analysis (GC-O, GC-FID, GC-MS) to identify volatile compounds.

The most potent odors detected in the model system were malty, sweet and caramel like odors contributed by 3-methylbutanal, 2,3-pentandione and 1-penten 3-ol, grass odor contributed by hexanal, rancid, potato like odor by cis-4-heptenal and heptanal, mushroom odor caused by 1-octen-3-ol. Furthermore, rancid, fatty, soapy and lemon like odors indicated the presence of well known oxidation products like 2,4-heptadienal. Cucumber like, sweet, floral and rancid odors were dominating the aroma profile of the cod muscle system but the identity of all the compounds has not yet been established. The correlation between these analysis will be studied to better understand the kinetics of oxidation processes leading to rancidity in fish muscle and to explain factors reducing the shelf life of chilled fish products.

The outcome of the project is increased knowledge on oxidation in fish muscle to underpin the development of healthy and tasty fish products of high sensory quality and nutritional value to fulfill the needs of consumers.

Reference:

Guðrún Ólafsdóttir, Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir. (2006). The role of volatile compounds in odor development during haemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. 2nd Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference. Oct. 29 - Nov. 1st. Quebec City, Kanada.
http://www.aftc.ca/TAFT2006/PPOINT_PRESENTATIONS/097.pdf

Screening of antioxidant activity in Icelandic seaweed

Tao Wang^{1,2}, Rósa Jónsdóttir¹, Guðrún Ólafsdóttir²

¹Mátis, Food Research, Innovation and Safety, Reykjavik, Iceland

²University of Iceland, Reykjavik, Iceland

5th Euro Fed Lipid Congress and 24th Nordic Lipid Symposium Oils, Fats and Lipids: From Science to Applications - Innovations for a better World - 16-19 September 2007, Gothenburg, Sweden.

The objective was to screen for antioxidant activity in various types of edible Icelandic seaweed and evaluate the efficiency of different solvents to extract antioxidants.

Materials and Methods: Water and 70% acetone extracts were prepared from brown algae (*Fucus vesiculosus*, *F. serratus*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria hyperborea*, *L. saccharina*, *L. digitata*, *Alaria esculenta*), red algae (*Palmaria palmata*, *Chondrus crispus*) and green algae (*Ulva lactuca*) and total amount of polyphenols was evaluated. Antioxidant activity was screened by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity, Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and ferrous ion chelating capacity.

Results: 70% aqueous acetone was more effective to extract the antioxidants from the seaweed compared to water extraction. Significant difference was found both in polyphenols (phlorotannins) contents and antioxidant activities among different species ($p < 0.05$). The highest polyphenol content was found in Fucaceae which consequently exhibited the highest antioxidant activities among the tested seaweeds. High correlation ($R^2 > 0.98$) was found between the total polyphenolic contents of the seaweed extracts and their antioxidant activities evaluated as DPPH-scavenging capacity and ORAC value. The water extracts had higher ferrous ion chelating activity but no correlation was found with total polyphenolic content, indicating that other components such as low molecular weight polysaccharides, pigments, proteins or peptides may also contribute to the observed antioxidant activity of the extracts. Research is progressing to characterize the antioxidant compounds in the seaweed extracts and their antioxidant activity in food model systems.

References:

- Brand-Williams W., Cuvelier M. E. and Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 28: 25–30.
- Dávalos A., Gómez-Cordovés C., Bartolomé B. (2004). Extending applicability of oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 48-54.
- Decker E.A., Welch B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem* 38 (3): 674–677.
- Turkmen N., Sari F. and Velioglu Y.S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry* 93: 713–18.
- Yan X.J., Nagata T. and Fan X. (1998). Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 52: 253–262.

Antioxidant effect of aqueous phase of capelin (*Mallotus villosus*)

Rósa Jónsdóttir, Margrét Bragadóttir, Guðrún Ólafsdóttir.

5th Euro Fed Lipid Congress and 24th Nordic Lipid Symposium Oils, Fats and Lipids: From Science to Applications - Innovations for a better World - 16-19 September 2007, Gothenburg, Sweden.

The objective was to explore the possible application of aqueous extracts from minced raw and cooked whole capelin (*Mallotus villosus*) as natural antioxidants.

Methods: Fat, protein, water content and TVB-N value of capelin was determined by traditional methods and capillary electrophoresis (CE) was used to study peptides. Hemoglobin mediated oxidation in washed cod model system with added aqueous fractions of raw and cooked capelin was monitored during storage on ice by measuring color changes (Minolta Chromameter), sensory analysis, TBARS, and analysis of volatile compounds by gas chromatography (SPME-HS-GC/O and HS-GC/MS) during chilled storage on ice.

Results: Antioxidant activity of the capelin broth in the cod model system was confirmed by all methods tested. The broth contained higher protein content than the raw juice (96.2 mg/ml and 51.1 mg/ml, respectively) and CE results suggested that the broth contained higher levels of peptides like anserine which may explain higher antioxidant activity of the broth. The raw aqueous phase was found to have a pro-oxidant trend possibly related to the use of whole capelin including blood and viscera. The most intense oxidized odors were grass like odor (hexanal), mushroom odor (1-octen-3-ol), rancid, potato odor (*cis*-4-heptenal and heptanal) and cucumber like odor.

References:

- Jonsdottir, R., Bragadóttir, M., Olafsdóttir, G. (2007). The role of volatile compounds in odor development during hemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. Accepted in Journal of Aquatic Food Product Technology.
- Richards M. P., Hultin H.O. (2001). Rancidity development in a fish model system as affected by phospholipids. J Food Lipids 8: 215-230.
- Undeland I, Hultin H O, Richards, M P. (2003). Aqueous extracts from some muscles inhibit hemoglobin-mediated oxidation of cod muscle membrane lipids. Agric Food Chem 51, 3111-3119.

VIÐAUKI II

RESEARCH METHODS AND MATERIALS

Samantekt á aðferðum sem notaðar hafa verið í verkefninu

Research methods and materials

Methods for preparation of washed cod muscle and phospholipids model system

Bleeding of fish

Farmed Arctic char (*Salvelinus alpinus*) and cod (*Gadus morhua*) obtained from the Department of Aquaculture (Hólar Agricultural College, Iceland) were anesthetized in phenoxy ethanol (0.5 g/L) for 3 minutes. The fish was held with belly up and 1 mL of blood drawn from the caudal vein with disposable syringe, preloaded with 1 mL of 150 mM NaCl and sodium heparin (30 units/mL).

Preparation of hemolysate

Hemolysate was prepared within 24 h of blood collection according to the method of Richards and Hultin (2000). The heparinized blood was washed with four volumes of 1.7% NaCl in 1 mM Tris, pH 8.0. The plasma was removed by centrifugation at 700g for 10 min at 4 °C. The red cells were then washed three times with ten volumes of the same buffer and centrifuged between washes as before. The cells were lysed in three volumes of 1 mM Tris, pH 8.0, for 1 h. The stroma was removed by adding 1/10 volume of 1 M NaCl before final centrifugation at 28000g for 15 min at 4 °C. All materials and samples were kept on ice during preparation. The washed hemoglobin was stored at -80 °C until used as catalyst for oxidation of cod muscle phospholipids.

Quantifying hemoglobin levels in hemolysate

The concentration of hemoglobin was determined by the HemoCue system of plasma/low Hb microcuvettes and photometer (Hemocue, Ängelholm, Sweden), using a method based on Vanzetti's reagents and spectrophotometric determination of azide-methemoglobin at 570 nm. Samples were measured against a standard curve of bovine hemoglobin (Sigma). Samples and standards (0 - 30 µmol/L) were diluted with 50mM tris buffer, pH 8.6.

Washed cod muscle and phospholipids model system

Fillets from cod (*Gadus morhua*) obtained from a local supplier were skinned and all dark muscle was removed. The rest of the fillets were minced in mincer (diameter 4.5 mm). The mince was washed based on the method of Richards and Hultin (2001). All materials and samples were kept ice during preparation. The mince (600 g) was washed with Milli-

Q water (1:3, w/w) by stirring with a plastic paddle for 2 min, then it was allowed to stand for 15 min before dewatering on a plastic sieve. Low temperature of the sample was ensured by placing a glass bowl with ice on top. Next wash was in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3), using same proportions, stirring and sieving as before. The final wash was done in centrifuge containers with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.3) at the same 1:3 (w/w) ratio and homogenized using a Ultra-Turrax homogenizer (type T25, IKA Werke, Staufen, Germany), at medium speed for 1 min. Then it was allowed to stand for 15 min prior to centrifugation 15000g for 20 min at 4 °C. The washed fish muscle system was divided into small plastic bags and frozen in thin packages at -80 °C until used.

Preparation of oxidation system

The oxidation system was based on Richards and Hultin (2001). The model was thawed under running tap water and adjusted to pH 6.5 with 1 M HCl and/or 1 M NaOH. Streptomycin sulfate (200 mg/kg) was added to the model to prevent microbial growth and 20 µmol/kg hemoglobin to induce oxidation, besides a blank sample without hemoglobin. Hemoglobin from Arctic char was used in the first experiment and in the second experiment hemoglobin from both Arctic char and Atlantic cod was used in the washed cod muscle model. The moisture content of the samples was standardized to 89% with Milli-Q water. Samples were prepared by weighing 20 g of the model and spreading it evenly on the bottom of 250 mL Erlenmeyer flasks (bottom diameter 80 mm) with a screw cap. Each sample and blank was prepared in duplicate. The capped samples were stored on ice inside a refrigerator (1-3 °C).

Heating of oxidation system

The oxidation system was steam cooked (90-100°C) for 2 minutes, cooled and kept on ice during the storage experiment. In comparison a raw oxidation model system was prepared and Hb-blank (without hemoglobin).

Chemical analysis

Proximate analyses

Water content was determined by drying in an oven at 102 to 104 °C for 4 h by ISO method 6496 (ISO, 1999). Fat content was determined by the Soxhlet method Ba 3-38

(AOCS, 1997) using petroleum ether (Bp. 30-40 °C) for extraction. Crude protein content was determined with the Kjeldahl method (E) 5983-2 (ISO, 2005) and by multiplying the nitrogen content by 6.25. Salt was determined by the method of Volhard (AOAC, 1990) Ash content was determined by carbonization of the sample prior to heating at 550 °C for 3 h (ISO, 2002).

pH

The pH was measured with an Ag/AgCl combination electrode connected to a pH meter, model PHM80 (Radiometer, Copenhagen). The pH of samples was determined after mixing 1 part of mince with 9 parts of Milli-Q water on a magnetic stirrer.

TVC

Total viable microbial counts were obtained using Plate Count Agar (PCA-Difco) with 0.5% NaCl added. Pour-plate method was used and plates incubated at 22°C for 3 days. Butterfield's buffer was used for all dilutions (APHA, 1992).

TVB-N

Total volatile basic nitrogen was determined on steam distillate of washed cod model (10 g) according to the official magnesium oxide method 920.03 (AOAC, 2000) for samples at the end of the storage time.

Methods to monitor lipid oxidation

Peroxide value

Peroxide value of oils used as reference samples for rancid odor in sensory analysis was measured by iodometric titration according to AOAC official method 965.33 (AOAC, 1990).

Measurement of red color (a^*)

Changes in red color (a^*) of samples and blank were monitored during ice storage. The color was measured by a Minolta CR-300 Chroma meter (Minolta Camera Co., Ltd., Osaka, Japan) in the Lab* measuring mode (CIE 1976) with CIE Illuminant C. Measurements were done by placing the Erlenmeyer flask on top of the free standing

measuring probe. Each sample was measured 9 times while turning the Erlenmeyer flask approximately 36° between measurements.

Thiobarbituric Reactive Substances (TBARS)

Sampling was done according to Undeland, Kristinsson and Hultin (2002). Sample plugs (~1 g) of the model were taken from the Erlenmeyer flasks with the aid of a plastic cylinder (diameter = 10 mm). The sample-plugs were wrapped in aluminum foils and stored at -80 °C until measured. TBARS were determined according to direct extraction method (Sørensen and Jørgensen, 1996) with few modifications. The sample size was reduced to 1 g and homogenized with 6 mL of 7.5% trichloroacetic acid solution containing 0.1% propyl gallate and 1% EDTA. The absorbance of samples and standards were measured at 530 nm. TBARS, expressed as μmol malondialdehyde per kilogram of sample (μmol MDA/kg), was calculated using malondialdehyd-bis-(diethyl acetate) as standard.

Sensory analysis

Four trained panelists evaluated the odor of the washed cod model system samples by sniffing samples in the Erlenmeyer flasks. The panelists had several years of experience in evaluating rancidity of fish and fish oils, and had been trained according to international standards (ISO 1993). The panelists were also given two reference samples with different degree of rancidity. The reference samples were prepared from almost odorless soybean oil (peroxide value (PV): 1 meq/kg) containing 2.5% and 10% oxidized cod liver oil, resulting in a PV of 3.0 and 5.8 meq/kg, respectively, perceived as borderline and considerable rancidity. The reference samples were stored at -80 °C. Fresh reference samples (0.5 mL) were taken from the freezer each day of sampling and served in 25 mL disposable plastic beakers. Evaluation of model samples and reference samples were conducted under standardized conditions, with as little interruption as possible and with samples partially submerged in ice. Capped samples were allowed to rest for 45 min on the ice between panelists sniffing, in order to recover equilibrium in the headspace of the samples. Up to 8 samples were assessed each time. The panelists judged the samples according to intensity of rancid odor on an unscaled line (100 mm long) ranging from not present to strong.

Gas Chromatography analysis

Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) / Gas Chromatography analysis (GC-O and GC-FID)

The SPME device and fiber (polydimethylsiloxane / divinylbenzene PDMS/DVB) were purchased from Supelco (Bellefonte, Pa., USA). Semi-polar (65 μ m) fiber was conditioned prior to use in the GC injection port as recommended by the manufacturer. A blank analysis was performed to verify that no extraneous compounds were desorbed from the fiber.

Washed cod mince sample was weighed (5 g) into a 100 mL Erlenmeyer flask. Duplicate analyses of each sample were done. Heptanoic acid ethyl ester was added as an internal standard to all samples by adding 0.5 mL of 10 μ L/L aqueous solution of the standard. The standard was prepared by dissolving heptanoic acid ethyl ester in water. Samples were kept at 25 °C for about 15 min before sample collection. SPME fiber was inserted through a septum placed on the cap of the Erlenmeyer flask and headspace volatiles collected for 40 min. The fiber was then retracted into the barrel of the syringe and immediately inserted into the injector of the gas chromatograph. Separation and identification of volatile compounds collected by the SPME technique was done by combined GC-O and GC-FID analysis as described earlier (Jónsdóttir, Bragadóttir, Arnarson, 2005).

TENAX pre-concentration and Gas Chromatography-Mass Spectrometry

The washed cod mince sample was prepared in the same way as for the GC-O measurements except that the volatile compounds were collected for 40 min at 100 mL/min using Gilian LFS-113D Air sampler on 250 mg Tenax 60/80 (Alltech, IL, USA) in stainless steel tubes (Perkin-Elmer, Buckinghamshire, UK) for the combined ATD 400 and GC-MS measurements. Volatile compounds were thermally desorbed (ATD 400, Perkin-Elmer, Buckinghamshire, UK) from the Tenax tubes and separated with the same type of column and the same conditions as for the GC O measurements. The mass detector ion range was 35-300 m/z. The identification and quantification of the volatile compounds was done as described earlier (Jónsdóttir, Bragadóttir, Arnarson, 2005).

Gas Chromatography-Olfactometry

Volatile compounds entrapped on the SPME fibers were thermally desorbed for 2 min in the GC using splitless mode, with helium as the carrier gas at linear velocity of 22.9 cm/s. Volatiles were separated on a DB 5ms column (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm, J&W Scientific, Folsom, Ca, USA). Measurements were performed on a GC (HP 5890, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). Helium was used as a carrier gas and the following temperature program was used: 50°C for 7 min, 50 °C to 120 °C at 5 °C/min and from 120 °C to 220 °C at 10 °C/min. Injector temperature was 250 °C and the detector temperature was 280 °C. The end of the column was split 1:1 between flame ionization detector (FID) and an ODO-1 olfactory detector outlet (SGE International Pty. Ltd, Australia). Nitrogen, bubbled through water to add moisture, was used to drive the sample up to the sniffer. Two persons describing the odor sniffed the effluent. Intensity (quality and duration/retention times) of each odor was determined using an intensity from 0 - 5, 0: not present; 5: very strong. The assessors were trained in recognizing characteristic oxidatively derived odors by injecting into the GC-O, mixtures of standard compounds dissolved in ether and sniffing the effluent.

Gas Chromatography-Mass Spectrometry

The washed cod mince sample was prepared in the same way as for the GC-O measurements except that the volatile compounds were collected for 40 min at 100 ml/mL using Gilian LFS-113D Air sampler on 250 mg Tenax 60/80 (Alltech, IL, USA) in stainless steel tubes (Perkin-Elmer, Buckinghamshire, UK) for the combined ATD 400 and GC-MS measurements. Volatile compounds were thermally desorbed (ATD 400, Perkin-Elmer, Buckinghamshire, UK) from the Tenax tubes and separated with the same type of column and the same conditions as for the GC O measurements. The mass detector ion range was 35-300 m/z. These measurements were done for identification of the volatiles.

Optimization and validation of the SPME method

Following standard compounds were used for optimization of the SPME sampling method: hexanal (Sigma), 4-heptenal and 2,4-heptadienal (ACROS Organics), 1-octen-3-ol and 2-nonenal or 2,6-nonadienal (Aldrich). Sample amount, sampling time and temperature were optimized using 2³ fractional factorial design with 2 replicates. The sample used for optimization was an aqueous isolate from cod, boiled in microwave oven

in a glass jar. A boiled cod sample was used to ensure existence of oxidatively derived volatile compounds which are otherwise in low concentration in fresh cod. Precision of the method expressed as relative standard deviation (RSD) was determined by carrying out six analyses over a period of three weeks. The linearity of the response was investigated using 5 sets of dilutions of a stock solution to cover the range of concentrations from 500 to 8000 ng/mL for hexanal, 4-*cis*-heptenal, 1-octen-3-ol, 2,4-heptadienal, 2-nonenal, and 2,6-nonadienal. The stock solution was prepared by adding 1 μ L of each compound into 50 mL aqueous fish extract. Results from the collections of standards were used to prepare a calibration curve for each standard compound. All collections were made in triplicate. Detection limits were determined as 3x noise where the noise was determined from six blank GC-FID analyses and the magnitude of baseline fluctuation determined over a period of 1 min. The distance between minimum and maximum in this period was defined as baseline noise. The response calculated as 3x noise was converted to concentration by use of the calibration curve prepared as described before.

From the results of optimization, the sample amount of 5 g and sampling time of 40 min at 25°C was selected. The precision of the method expressed as relative standard deviation (RSD) of peak area was in the range of 13 - 46%. The limit of detection (LOD) of the FID detector was 1 ng/mL for both hexanal and 1-octen-3-ol, 5 ng/mL and 9 ng/mL for 4-*cis*-heptenal and 2,4-heptadienal, respectively, and slightly higher for 2-nonenal, and 2,6-nonadienal (35 ng/mL and 22 ng/mL, respectively).

(sjá einnig Viðauka III. Mælingar á lyktarefnum í þorskvöðvamódeli og þorsksoði. Bestun (optimisation) og mat á aðferð fyrir HS-SPME-GC-O og GC-FID)

Data analysis

Analysis of variance (ANOVA) was applied to the data using the Number Cruncher Statistical Software (NCSS 2000). Significant differences were determined by One way ANOVA and Duncan's Multiple-Comparison Test was used to determine the statistical difference between samples with added hemoglobin from cod and arctic char at each point of sampling. An effect was considered significant at the 5% level ($p < 0.05$).

Capelin

Preparation of aqueous extracts from capelin

Fish. Two samples of capelin (*Mallotus villosus*) were obtained from the 5th and 9th week of the year, respectively. The 5 week sample was caught in net east of Iceland (Reyðafjarðardjúp, catching zone 462) on the 5th of February 2006. The fish was cooled on board the fishing vessel in seawater tanks and landed the next day. The temperature during landing and transportation to the laboratory ranged from 0 to 5 °C. The 9 week sample was caught in net on February 21st south of Iceland (Reykjanesgrunn, catching zone 372). Temperature of the fish in the hold on board the ship was 7 °C and no cooling was used. The sample was stored in an insulated plastic cooler and shipped by airfreight from Vestmannaíslands on the following day and arrived to the laboratory in the morning February 23rd. Preparation of aqueous extracts from capelin was done on day 3 from catch for both samples.

Capelin aqueous extracts. The 5 week sample was beheaded and gutted and rinsed in cold water, but the 9 week sample was used whole without rinsing. Both samples were coarsely minced in a mixer (Braun electronic) at medium speed. Aqueous extracts were made from raw and cooked capelin. The raw press juice was made by centrifuging minced samples (180 g) in 275 mL centrifuge bottles at 27 500g for 120 min. The press juice was filtered through diaper cloth and stored frozen (-75 °C) until used (PJ-w5 and PJ-w9). The rest of the mince was cooked to make broth in micro oven at highest power for approximately 6 min. The broth from the cooked samples were squeezed out using diaper cloth and stored frozen (-75 °C) until used (B-w5, and B-w9).

Ultra-filtration. The broth from week 5 (B-w5) was ultra-filtrated to make broth with particle size >300 D and 150-300 D, respectively. The ultra-filtration was done in NF-Lab-unit (ROP 970 Type Microlab 80) with PCI membranes, AFC 40 MWCO 150 – 300 D (GEA-Filtration). The total membrane area was 0.094 m² and other operating parameters were 32 °C for the temperature, 35 bars pressure and the flux was 1.25 L/min for the retentate and 0.025 mL/min for the permeate. Samples were stored in freezer until analyzed (-75 °C).

Proximate analyses of capelin

Water content was determined by drying in an oven at 102 to 104 °C for 4 h by ISO method 6496 (ISO, 1999). Fat content was determined by the Soxhlet method Ba 3-38 (AOCS, 1997) using petroleum ether (Bp. 30-40 °C) for extraction. Crude protein content was determined with the Kjeldahl method (E) 5983-2 (ISO, 2005) and by multiplying the nitrogen content by 6.25.

TVN - total volatile nitrogen

Total volatile nitrogen (TVN) was determined on steam distillate of minced capelin (10 g) or broth (16 – 18 g) according to the official magnesium oxide method 920.03 (AOAC, 2000).

Protein content of aqueous fractions

Protein determination of the capelin aqueous phases was done according to the Biuret protein assay (Layne, 1957, Torten and Whitake 1964). Protein content, expressed as mg/mL, was calculated using bovine serum albumin (BSA) as standard. Samples and standards (600 µl) were mixed with 2.5 mL Biuret solution in disposable plastic cuvettes. The samples were mixed and allowed to stand for 35 minutes. Afterwards the absorbance was measured at 540 nm.

Antioxidant assays:

Chelating capacity

The capacity of the samples for chelating ferrous iron was determined according to a modified method of Benjakul and others (2005). The samples were diluted 100 times and measured in the range of 500 nm to 800 nm with UV-Vis spectrometer. A volume of 0.05 mL FeCl₂ (0.2 mM) and 0.1 mL ferrozine (1 mM) were mixed in disposable cuvettes with 1 mL of the diluted sample. Thereafter the mixture was allowed to stand for 10 min before measuring the absorbance. Distilled water was used as control. The areas of the curves were calculated with the following equation:

$$b = \frac{Y_{end} - y_{start}}{x_{end} - y_{start}} \quad a = y_{start} - \left(\frac{Y_{end} - y_{start}}{x_{end} - y_{start}} \right) x_{start}$$

$$\sum \left[\left(\frac{(y_{i+1} + y_i)}{2} \right) - a - \frac{b}{2} (x_{i+1} + x_i) \right]$$

$i =$ start wavelength of the curve

The chelating capacity was calculated according to the following equation:

$$Chelating_capacity(\%) = \frac{area_{control} - area_{sample}}{area_{control}} * 100$$

DPPH radical scavenging capacity

The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method was used to test the radical scavenging capacity of the capelin aqueous extracts. A variation of the method based on Yen and Wu (1999) was applied. The reduction of the DPPH radical was followed by measuring the absorbance of diluted samples ($\times 100$). One mL of the diluted sample was used to measure the turbidity between 400 nm and 800 nm. Subsequently 10 μ L DPPH (10 mM) was mixed with the sample. The mixture was allowed to stand for 40 min before measuring the absorbance again between the two wavelengths. The area of the curves was calculated with the following equation:

$$b = \frac{Y_{650} - y_{454}}{x_{650} - y_{454}} \quad a = y_{454} - \left(\frac{Y_{650} - y_{454}}{x_{650} - y_{454}} \right) x_{454}$$

$$i_1 = 454$$

$$\sum \left[\left(\frac{(y_{i+1} + y_i)}{2} \right) - a - \frac{b}{2} (x_{i+1} + x_i) \right]$$

The DPPH scavenging effect was calculated with the following equation:

$$DPPH_scavenging_effect = \left(\frac{area_{control} - area_{sample}}{area_{control}} \right) * 100\%$$

Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

A modification of the method of Dávalos and others (2004) was used. Mx300 Real-Time PCR System (Stratagene) was used for the fluorescence measurements controlled by MxPro computer program. The capelin samples had a high radical scavenging capacity and therefore the concentration of the 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) and the 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic

acid (Trolox) were increased. All reagents were prepared in 75 mM sodium phosphate-buffer (pH 7). The samples were diluted 100 times and 20 μ L were placed in the well (200 μ L) of a micro-plate (Starstedt). Afterwards 120 μ L fluorescein (70 nM) was added and the mixture was pre-incubated at 37 °C for 15 min. Subsequently, 120 μ L AAPH (0.24 M) were added and placed immediately in the reader. The fluorescence (FAM) was recorded at 37 °C every minute for 80 min. A blank was prepared the same way as the sample, using distilled water instead of a sample. The first data measured after 6 seconds was used as t=0. The antioxidant curves (fluorescence versus time) were normalized. The data from the curves were multiplied by the factor:

$$\frac{\text{fluorescence}_{\text{blank},t=0}}{\text{fluorescence}_{\text{sample},t=0}}$$

The area under the fluorescence decay curve (AUC) was calculated of the normalized curves with the following equation:

$$AUC = 1 + \sum_{i=0,4}^{i=80} \frac{f_i}{f_0}$$

$$f_i = \text{fluorescence_reading_at_time_}i$$

$$f_0 = \text{initial_fluorescence_reading_at_}0.2\text{_min}$$

The net AUC was calculated by subtracting the AUC_{blank} from the AUC_{sample}.

Peptide analysis by Capillary Electrophoresis (CE)

Materials

Gly-Gly-Gly ((Gly)₃), anserine (β -ala-methyl-his), carnosine (β -ala-his), and amino acid standards were obtained from Sigma-Aldrich Inc. All other chemicals were of analytical grade.

Preparation of the low-molecular-weight peptide and free amino acid fraction

Acetone extracts. 2 mL (depending on the protein concentration) of aqueous phase from capelin was suspended in 2 mL acetone and mixed with a Vortex for 20 s; pH of the suspension was adjusted to 4.6 with 4 M HCl. Precipitated protein was removed after 1 hour at room temperature by centrifugation at 4500 rpm for 30 min. The supernatant was filtered through a Whatman filter no. 1 and an internal standard (Gly)₃ added to a final

concentration of 0.1 mg (Gly)₃ ml⁻¹ acetone extract. The extract was concentrated to 500 µL by evaporation of the acetone with nitrogen, and an equal amount of 10 mM phosphate buffer, pH 2.75, was added. The extract: buffer (1:1) was filtered through 0.45 µm filter prior to CE analysis.

Capillary electrophoresis analysis (CE)

All CE separations were performed on an Agilent CE system (Agilent, Germany). Separations were carried out on a standard 50 µm id capillary with an effective length 24.5 cm and an enlarged bubble cell in the detector window. A 100 mM phosphate buffer, pH 2.75, filtered through a 45m filter and degassed, was used as separation buffer. Prior to the first use and after extensive use the capillary was flushed with 1M NaOH (60min), 0.1 M NaOH (15 min), H₂O (5 min), 100 mM phosphoric acid (10 min) and separation buffer (15 min). The capillary was thermostated to 25 °C. Samples (the concentrated ethanol extracts) were injected by pressure at 15 kNsm⁻² and separated at a constant voltage of 15kV. UV absorbance was monitored at 214 nm and 228 nm using Diode Array Detector. The separation time was 30 min between each run the capillary was preconditioned with 100 mM phosphoric acid for 5 min and with separation buffer for 8 min. Separation buffer was renewed each separation. The total corrected peak area was related to the corrected peak area of the internal standard (Gly)₃.

(Sjá einnig Viðauka IV. Mælingar á aminosýrum og peptíðum með capillary electrophoresis - mat á aðferð)

VIÐAUKI III

Mælingar á lyktarefnum í þorskvöðvamódeli og þorskoði

Bestun (optimisation) og mat á aðferð fyrir

HS-SPME-GC-O og GC-FID

Mælingar á lyktarefnum í þorskvöðvamódeli og þorsksoði. Bestun (optimisation) og mat á aðferð fyrir HS-SPME-GC-O og GC-FID

Í þessum hluta eru niðurstöður fyrir bestun og mat á aðferð til ákvörðunar á lyktarefnum í þorksmódelkerfi og þorsksoði við söfnun á loftrými (HS) með SPME og gasgreini GC-sniffi (O) og GC-FID. Notuð voru staðalefni hexanal, 4-heptenal, 2,4-heptadienal, 1-octen-3-ol, 2-nonenal og 2,6-nonadienal, til að skoða aðgreiningarhæfni, staðalkúrfur, samkvæmni, greiningarmörk, mælisvið og næmni aðferðarinnar. Stuðst var við NMKL-prosedyre nr 4 (1996), Validering av kjemiske analysemetoder, við mat á aðferð.

Skammstafanir:

HS, headspace (loftrými)
SPME, solid phase microextraction
GC, gas chromatography (gasgreinir)
O, Olfactometry (sniff)
FID, flame ionization detector
MS, mass spectrometry

1. Bestun á sýnatökuaðferð

Sýni

2 kg af þorskflökum voru fengin frá Fiskbúð Hafliða þann 8. nóvember. Veiðidagur var 5. nóvember og fiskurinn var flakaður 7. nóvember.

Sýnaundirbúningur

Fiskurinn var soðinn í Toshiba örbylgjuofni í 2,5 mín (power level 9) í 500 mL glerkrukkum, u.þ.b. 250 g fiskur/krukka. Kælt. Soðvatni safnað saman í eina krukku og síðan skipt í 25 mL GC glös samkvæmt 2^3 Fractional Factorial Design (sjá töflu 1). Í hvert glas var bætt út í 0,5 mL af hexanal staðal ($1\mu\text{L}/500\text{ mL}$ vatn). Fryst $v/-80^\circ\text{C}$ í 25 mL vials fyrir mælingu.

Bestun

Eftirfarandi þættir voru bestaðir:

SPME tími (20/40mín), hitastig (RT/30°C) og sýnastærð (5/10 mL).

Öll sýni mæld (+ tvo miðjusýni) voru mæld þann 9. nóvember fyrir utan tvö sem mæld voru 8. nóvember eftir að hafa verið fryst og þídd aftur.

Tafla 1. 2³ Fractional Factorial Design fyrir bestun á HS-SPME-GC aðferð.

	Time (min)	Temp (C)	Sample size (mL)	Hexanal	Total area
Cube001a	20	RT	10	168879	373155
Cube001b	20	RT	10	62347	240701
Cube002a	40	RT	5	175383	457010
Cube002b	40	RT	5	160465	432371
Cube003a	20	30	5	169626	381183
Cube003b	20	30	5	194524	459473
Cube004a	40	30	10	138199	474960
Cube004b	40	30	10	173179	535022

Niðurstöður

Við útreikninga var miðað við flatarmál hexanal, sem er dæmigert myndefni oxunar og heildarflatarmál (total area). Með *analysis of effects* virtust tími, hitastig og sýnastærð ekki áhrif á magn hexanals (flatarmál) en ef heildarflatarmál allra efnanna var skoðað reyndist marktækur munur í tíma. Út frá þessum niðurstöðum var ákveðið að notast við eftirfarandi skilyrði:

Tími: 40 mín

Hiti: 25°C

Sýnastærð: 5 mL soð eða 5g sýni fyrir þorskmódel.

Prófun á sýnamagni

Við fyrstu mælingar á þorskvöðvamódeli var notast við 20 g sýni í 250 mL Erlenmayer flösku. Til að skoða betur áhrif sýnamagns var þrátt þorskvöðvamódel (geymt í tvo daga til að ná fram þráa) notað til að prófa mismunandi sýnamagn (1g í 25 mL vial, 5 g í 100 mL eða 20 g í 250 mL Erlenmayer flösku). Sýnin voru búin að oxast í 47 tíma áður en þau voru sett í frysti (-80 °C) fram að mælingu. 5 g sýni í 100 mL komu vel út og því notast við það sýnamagn.

2. Mat á aðferð

Við mat á aðferð eru þættir eins og aðgreiningarhæfni, staðalkúrfur, samkvæmni (precision), greiningarmörk, mælisvið og næmni aðferðar metin. Útbúnin voru sýni með staðalviðbótum með því að leysa 6 staðalefni (hexanal, 4-heptenal, 2,4-heptadienal, 1-octen-3-ol, 2-nonenal og 2,6-nonadienal) upp í þorskoði. Bæði fylgnistuðull (corr coeff)

og sveigjustuðull (coefficient of curvature) voru reiknaðir út fyrir staðalkúrfunum. Staðalkúrfurnar voru einnig notaðar til að ákvarða styrksvið eða mælisvið auk þess sem greiningarmörk (LOD), magngreiningamörk (LOQ) og næmni (sensitivity) voru ákvörðuð.

Aðgreiningarhæfni

Staðalefnin hafa mismunandi rástíma og aðgreinast mjög vel.

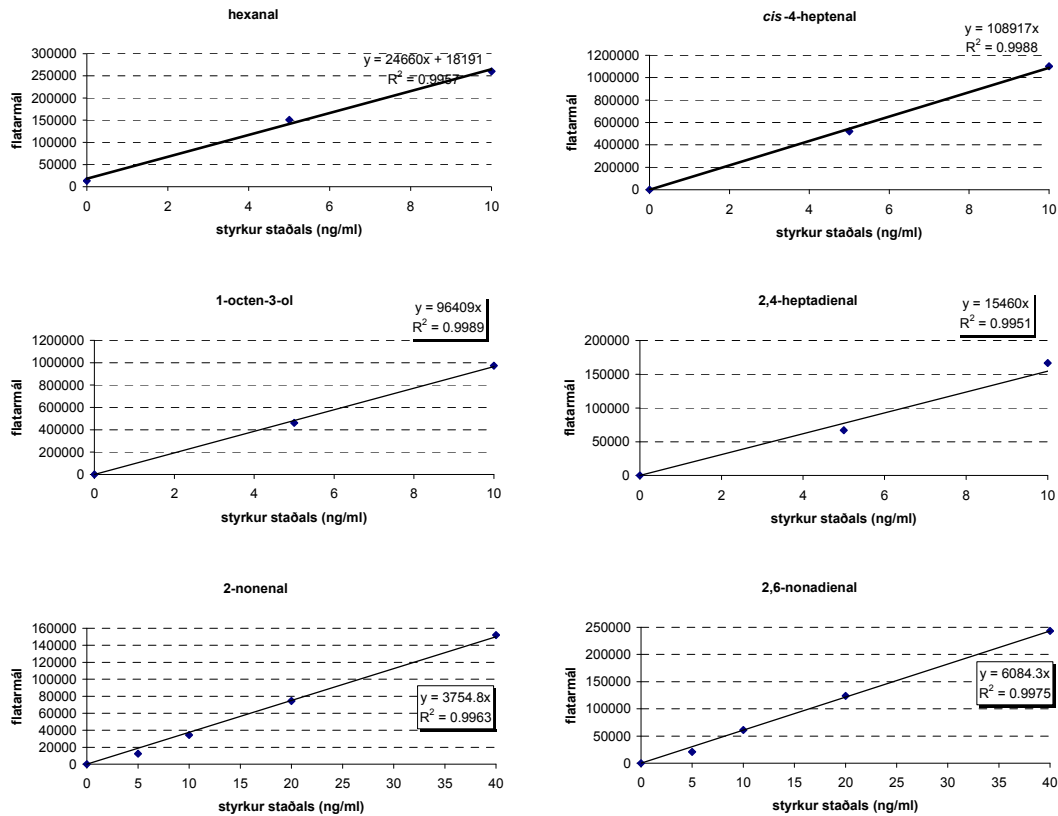
Staðalkúrfur

Útbúnar staðalviðbætur fyrir staðalkúrfur, 5 mismunandi styrkir, jafndreifðir fyrir eftirfarandi efni: hexanal, 4-heptenal, 2,4-heptadienal, 1-octen-3-ol, 2-nonenal og 2,6-nonadienal. Stofnlausn (20 ng/ml) af efnunum var útbúin með því að leysa 1µl af hverjum staðli í 50 mL soðvatn. Síðan voru útbúnir eftirfarandi staðlar í 25 mL vials, þrír af hverjum staðli, sem þynntir voru í soðvatni að 5 mL:

Tafla 2. Magn staðla og soðvatns fyrir mælingar á staðalkúrfum.

ng/ml	ml af stofnlausn	ml soðvatn
80	2,000	3,000
40	1,000	4,000
20	0,500	4,500
10	0,250	4,750
5	0,125	4,875

Mælingar voru gerðar með SPME-GC þar sem hverjum staðli (mælipunkti) var sprautað inn á GC súlu þrisvar sinnum. Fresta þurfti loftdælu-GC-MS vegna bilunar á tæki en staðalviðbæturnar frystar við -80°C fram að mælingu.



Mynd 1. Staðalkúrfa og línuleg aðhvarfsgreining fyrir hexanal, 4-heptenal, 1-octen-3-ol, 2,4-heptadienal, 2-nonenal og 2,6-nonadienal í 5 mL þorskoði mælt með HS-SPME-GC-FID.

Mynd 1 sýnir staðalkúrfur fyrir staðalefnin mæld með GC-FID. Á myndunum eru einnig niðurstöður línulegrar aðhvarfsgreiningar ásamt fylgnistuðli. Fylgnistuðullinn var í öllum tilvikum $R > 0,99$ en samkvæmt kröfum NMKL-prosedyre nr 4 (1996) á fylgnistuðullinn að vera $R > 0,999$. Fyrir rokgjörn efni er mjög erfitt að fá góðar endurtekningar og því $R > 0,99$ mjög ásættanlegt.

Samkvæmni (precision)

Samkvæmni, þ.e. mælikvarði á dreifingu niðurstaðna sem fæst með endurteknum mælingum, er hér gefin upp sem staðalfrávik (s). Þannig er tvímælingagildi (repeatability, r) gefið upp sem s_r og endurtekningahæfni (reproducibility, R) sem s_R . Við útreikninga á samkvæmi (tvímælingagildi, s_r) voru notaðar niðurstöður mælinga á staðalkúrfu.

Tafla 2. Samkvæmni (repeatability, s_r) fyrir hexanal, 4-heptenal, 1-octen-3-ol, 2,4-heptadienal, 2-nonenal og 2,6-nonadienal í 5 mL þorskoði mælt með HS-SPME-GC-FID.

Staðall	styrkur ng/ml	flatarmál meðaltal	s_r	RSD (%)	N
hexanal	0.0	13511	432	3.2	3
	5.0	150851	13061	8.7	3
	10.0	260111	36816	14.2	3
	20.0	319737	36816	4.2	3
	40.0	372938	75047	20.1	3
	80.0	354188	60200	17.0	3
4-heptenal	0.0				
	5.0	520237	49039	9.4	3
	10.0	1101342	106848	9.7	3
	20.0	1690886	106848	11.5	3
	40.0	2205315	448586	20.3	3
	80.0	2832807	402175	14.2	3
1-octen-3-ol	0.0				3
	5.0	461959	7623	1.7	3
	10.0	974130	22349	2.3	3
	20.0	1631728	22349	5.8	3
	40.0	2814780	355783	12.6	3
	80.0	4544687	637966	14.0	3
2,4-heptadienal	0.0				3
	5.0	67109	7847	11.7	3
	10.0	166508	14381	8.6	3
	20.0	305803	14381	14.7	3
	40.0	350372	73927	21.1	3
	80.0	887998	128480	14.5	3
2-nonenal	0.0				3
	5.0	12310	799	6.5	3
	10.0	34452	3379	9.8	3
	20.0	74391	3379	14.9	3
	40.0	152127	21612	14.2	3
	80.0	427823	126278	29.5	3
2,6-nonadienal	0.0				3
	5.0	20940	2399	11.5	3
	10.0	61142	10577	17.3	3
	20.0	124014	10577	17.8	3
	40.0	243321	50226	20.6	3
	80.0	714197	141639	19.8	3

Hlutfallslegt staðalfrávik (RSD) liggur alls staðar á bilinu 3 til 30 % sem er mjög gott og í samræmi við ráðlagt hlutfallslegt staðalfrávik (RSD) fyrir endurtekningahæfi við mismunandi styrk (tafla 3). Þessar upplýsingar eru fengnar úr NMKL procedure No.4 (1996) en koma upphaflega úr Pure & Appl. Chem. 62 (1990) 149-162.

Tafla 3. Ráðlagt hlutfallslegt staðalfrávik (RSD) fyrir endurtekningahæfi við mismunandi styrk.

Styrkur efnis	RSD (%)
100 g/kg	2
10 g/kg	3
1 g/kg	4
100 mg/kg	5
10 mg/kg	7
1 mg/kg	11
100 µg/kg	15
10 µg/kg	21
1 µg/kg	30
0.1 µg/kg	43

Til að meta endurtekningahæfni (reproducibility, R) var notað þrátt þorskvöðvamódel (geymt í tvo daga til að ná fram þráa), 5 g í 100 mL Erlenmayer flösku (Tafla 4). Sýnin voru búin að oxast í 47 tíma áður en þau voru sett í frysti (-80 °C) fram að mælingu. Sýnin voru mæld með þriggja vikna millibili.

Tafla 4. Endurtekningahæfni (reproducibility, s_R) fyrir hexanal, 4-heptenal, 1-octen-3-ol, 2,4-heptadienal, 2-nonenal og 2,6-nonadienal mælt með HS-SPME-GC-FID.

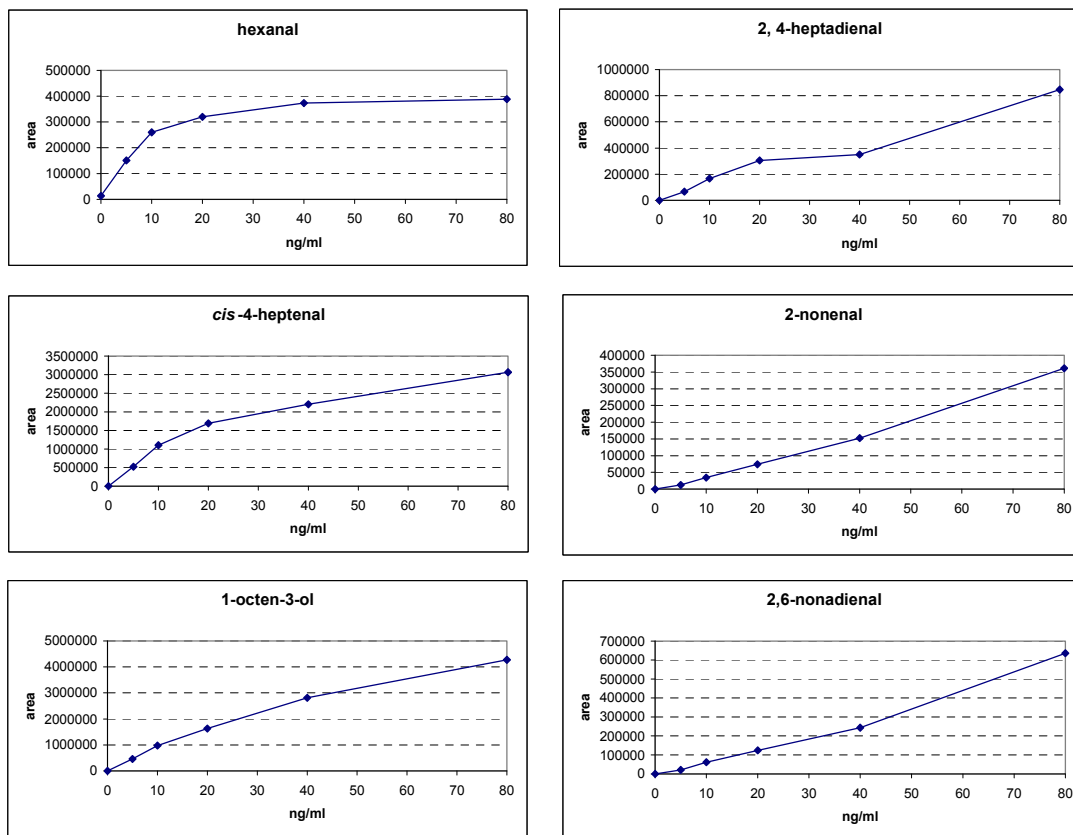
Efni	Flatarmál Meðaltal	S_R	RSD (%)	N
hexanal	133285	21545	16.2	6
4-heptenal	19482	4271	21.9	6
Heptanal	14952	2424	16.2	6
1-octen-3-ol	3807	1756	46.1	3
2,4-heptadienal	2270	296	13.0	3

Hittni (accuracy)

Hittni er mæld t.d. með heimtuþrófi en það hefur ekki verið framkvæmt.

Styrksvið, mælisvið

Mælingar á stöðlum voru gerðar á styrksviðinu 5 til 80 ng/ml. Mynd 2 sýnir staðalkúrfur fyrir staðlana og má sjá að mælingar voru línulegar að 10 ng/ml fyrir hexanal, *cis*-4-heptenal og 1-octen-3-ol, 20 ng/ml fyrir 2,4-heptadienal og 40 ng/ml fyrir 2-nonenal og 2,6-nonadienal.



Mynd 2. Staðalkúrfur fyrir hexanal, *cis*-4-heptenal, 2,4-heptadienal, 1-octen-3-ol, 2-nonenal og 2,6-nonadienal í 5 mL þorskoði mælt með HS-SPME-GC-FID.

Greiningarmörk (LOD, limit of detection) og magngreiningarmörk (LOQ, limit of quantification)

Greiningarmörk eru skilgreind sem sá styrkur sem gefur mælisvörun þrefalt stærri en staðalfrávik blankmælinga (bakgrunnssvörun). Er þá miðað við 99% öryggisstig (confidence level). Magngreiningarmörk er sá styrkur sem er 10 sinnum staðalfrávik bakgrunnsskekkjunnar.

Greiningarmörk voru ákvörðuð með því að ákvarða mælisvörun FID nemans í sex blankmælingum á einni mínútu (milli 14. og 15. mínútu). Fjarlægðin milli lágmarks- og hámarkssvörunar á þessu tímabili var skilgreint sem grunnlína. Þrisvar sinnum svörunin var umbreytt í styrk með staðalkúrfu og greiningarmörk ákvörðuð út frá því.

Greiningarmörk og magngreiningarmörk fyrir staðalefnin voru eftirfarandi:

Staðall	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Hexanal*	0,054	0,178
4-heptenal	0,012	0,040
1-octen-3-ol	0,014	0,046
2,4-heptadienal	0,085	0,285
2-nonenal	0,352	1,172
2,6-nonadienal	0,217	0,723

*Grunngildi fyrir hexanal var 0,737 ng/mL

VIÐAUKI IV

**Mælingar á amínósýrum og peptíðum með capillary
electrophoresis - mat á aðferð**

Analysis of amino acids and peptides using capillary electrophoresis

Method validation

Method validation includes selectivity, linearity, accuracy, precision and limit of detection and quantification. Two validations with 2 different standards were prepared. The standards were dissolved in 10 M phosphate buffer. For the first validation the 3 standards, were used glycine, phenylalanine and anserine in the concentration from 0.015 to 1.5 mg/ml. the standard glycyl-glycyl-glycine (Gly-Gly-Gly) in the concentration between 0.01-5 mg/ml was used for the second validation. This validation was prepared two times with different concentration because of high relative standard deviation and bad linearity in the first validation. The Gly-Gly-Gly standard was utilized as internal standard for the samples. The preparation of the samples for the capillary electrophoresis was made with a modification from the method from Reville and Fox. Table 1 shows the samples which were analyzed.

Table 1. The different samples of aqueous capelin extracts analyzed

Sample	Description	NB
1	Raw press juice-week 5	
2	Broth-week 5	Cloudy solution
4	Broth > 300 dalton	Very cloudy solution
5	Broth: 150-300 dalton	
6	Raw press juice-week 9	
7	Broth-week 9	Cloudy solution

Materials and Method

First Validation

Stock solution: 15 mg glycine, phenylalanine and anserine were dissolved in 10 ml phosphatebuffer (10 M). The other concentrations were prepared in 5 ml volumetric flask (Table 2). The standard concentration 0.15 and 0.015 mg/ml were injected three times in the capillary electrophoresis. The highest standard concentration was measured ten times.

Table 2. Amount of standard solution and buffer for standard curve

Concentration in mg/ml	V stock solution in ml	V buffer in ml
1,5	5	0
0,15	0,5	4,5
0,015	0,05	4,95

Second Validation

The standard was Gly-Gly-Gly and two standard curves were made.

Preparing of the standard I

Stock solution: 50 mg Gly-Gly-Gly was dissolved in 10 ml phosphatebuffer (10 M). The other concentrations were prepared in 5 ml volumetric flask (Table 3). Each standard was measured three times with the capillary electrophoresis.

Table 3. Amount of stock solution and buffer for standard curve

Concentration in mg/ml	V stock solution in ml	V buffer in ml
5	5	0
1	1	4
0,1	0,1	4,9
0,01	0,01	4,99

Preparing of the standard II

Stock solution: 20 mg Gly-Gly-Gly was dissolved in 10 ml phosphatebuffer (10 M). The other concentrations were prepared in 5 ml volumetric flask (Table 4). The highest standard concentration was measured four times with the capillary electrophoresis. The other concentrations were injected three times in the capillary electrophoresis.

Table 4. Amount of stock solution and buffer for standard curve

Concentration in mg/ml	V stock solution in ml	V buffer in ml
2	2	0
1	2,5	2,5
0,5	1,25	3,75
0,1	0,25	4,75

Sample preparation for recovery evaluation

The internal standard and the two standard mixtures were prepared in phosphatebuffer (10 M) in a 10 ml volumetric flask as in Table 5.

Table 5. Chemical composition and concentration of the internal standard, standard mixture 1 and 2

Internal standard		Standard mixture 1		Standard mixture 2	
Substance	C in mg/ml	Substance	C in mg/ml	Substance	C in mg/ml
Gly-Gly-Gly	1	Carnosine	1	Anserine	1
		Lysine	1	Alanine	1
		Glycine	4	Taurine	4

2 ml of each sample was mixed with 2 ml of acetone and stirred with a Vortex for 20s. Then the pH was adjusted to 4.6 with 1 M HCl. The precipitated protein was removed after 1 h at room temperature by centrifugation at 4500 rpm for 30 min. The supernatant was filtered through a Whatman filter no. 1 whereof 1 ml was taken and internal standard and/or standard mixtures added as shown in Table 6. The sample was concentrated to 300 μ l by evaporation of acetone with nitrogen. The amount of 700 μ l buffer was added after this and the extract was filtered through 0.45 μ m filter prior to CE analysis. The standard mixtures were only added for identification.

Table 6. Measurements from the samples

Number of injections	Sample	V _{int. standard}	V _{int. mixture 1}	V _{int. mixture 2}
2	Raw press juice-week 5	100 μ l	/	/
1	Raw press juice-week 5	100 μ l	/	/
1	Broth-week 5	100 μ l	/	/
1	Broth-week 5	/	/	/
1	Broth > 300 dalton	100 μ l	/	/
1	Broth > 300 dalton	/	/	/
1	Broth: 150-300 dalton	100 μ l	/	/
1	Broth: 150-300 dalton	/	/	/
1	Raw press juice-week 9	100 μ l	/	/
1	Raw press juice-week 9	/	/	/
1	Raw press juice-week 9	100 μ l	100 μ l	/
1	Raw press juice-week 9	/	/	/
2	Broth-week 9	100 μ l	/	/
1	Broth-week 9	100 μ l	/	100 μ l
1	Broth-week 9	/	/	/

/ : no addition of standard in samples

Results

First Validation

Standard curve

Figure 1 shows the standard curve and linearity for anserine and phenylalanine at the wavelength 214.1 nm and 195.1 nm. The linearity was $R > 0.999$ for both anserine and

phenylalanine at both wavelengths which is acceptable according to NMKL-prosedyre nr 4 (1996)¹. The standard glycine was only detected by the concentration 1.5 mg/ml and therefore it was not possible to make a calibration.

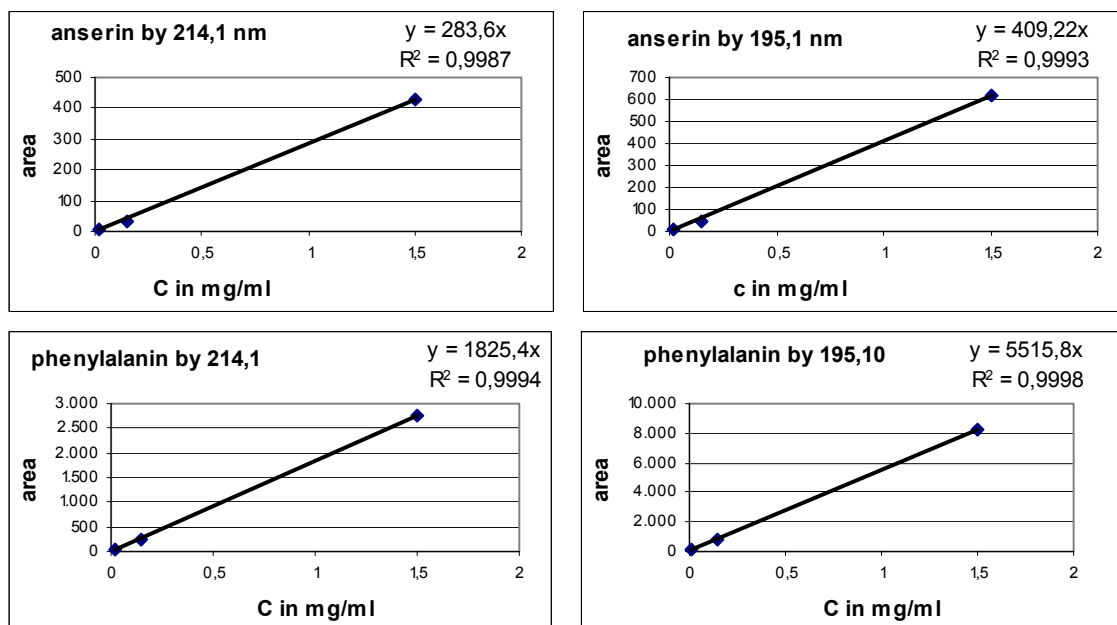


Figure 1. Standard curve and linearity of anserine and phenylalanine by the wavelength 214.1 nm and 195.1 nm measured with capillary electrophoresis

Precision

The relative standard deviation (RSD) was between 7 and 37 % (Tables 7 and 8) which is too high according to recommendations (Table 13). This validation was therefore repeated because of the high RSD and bad linearity.

Table 7. Precision for anserine and phenylalanine by wavelength: 214.1 nm

	concentration in mg/ml	average	sr	RSD (%)	n
Anserine	0,015	4,67	0,34	7,31	3
	0,15	30,56	7,97	26,08	3
	1,5	426,59	57,17	13,40	10
phenylalanine	0,015	45,50	17,08	37,54	3
	0,15	225,08	57,84	25,70	3
	1,5	2.742,72	364,46	13,29	10

Table 8. Precision for anserine and phenylalanine by wavelength: 195,1 nm

	concentration in mg/ml	average	sr	RSD (%)	n
anserine	0,015	7,46	0,92	12,30	3
	0,15	48,98	15,89	32,44	3
	1,5	615,06	81,40	13,23	10
phenylalanine	0,015	146,89	37,37	25,44	3
	0,15	778,82	200,73	25,77	3
	1,5	8.277,88	1.027,55	12,41	10

Second Validation

Standard curve for standard I

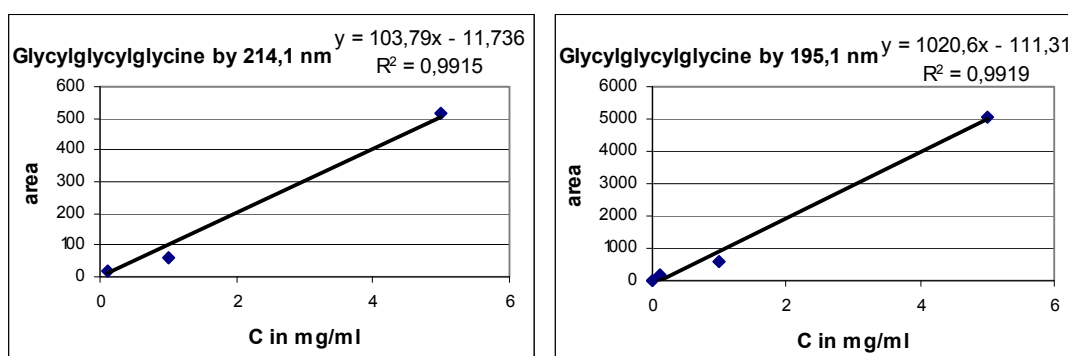


Figure 2. Standard curve and linearity of Gly-Gly-Gly by the wavelength 214.1 nm and 195.1 nm measured with capillary electrophoresis.

Figure 2 shows the standard curve and linearity for Gly-Gly-Gly by the wavelength 214.1 nm and 195.1 nm. The linearity is $R > 0.99$ for Gly-Gly-Gly for both wavelengths.

Precision from the for standard I

The relative standard deviation (RSD) shown in Table 9 and 10 was too high for the concentrations or between 4 and 43 %. Each standard was measured three times with the capillary electrophoresis but the area of the internal standard for one concentration changed too much resulting in to high RSD. The precision is therefore not very good.

Table 9 Precision for Gly-Gly-Gly by Wavelength: 214.1 nm

concentration in mg/ml	average	sr	RSD (%)	n
0,01	0	0	0	3
0,1	15,03	0,65	4,34	3
1	58,64	25,25	43,06	3
5	513,57	195,20	38,01	3

Table 10. Precision for Gly-Gly-Gly by Wavelength: 195.1 nm

concentration in mg/ml	average	sr	RSD (%)	N
0,01	0	0	0	3
0,1	148,70	7,71	5,19	3
1	589,61	251,85	42,71	3
5	5052,01	1725,42	34,15	3

Standard curve for standard II

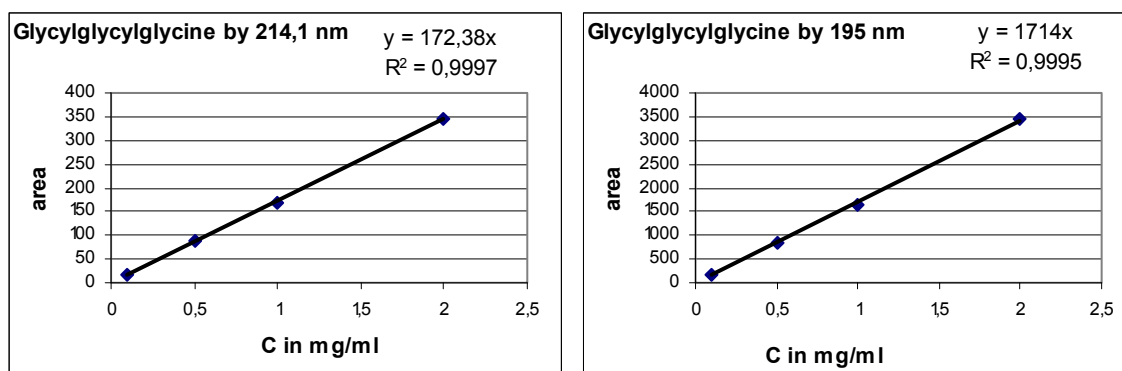


Figure 3 Standard curve and linearity of Gly-Gly-Gly by the wavelength 214.1 nm and 195.1 nm measured with capillary electrophoresis.

Figure 3 shows the standard curve and linearity for Gly-Gly-Gly by the wavelength 214.1 nm and 195.1 nm. It is a good linearity with $R > 0,999$ for Gly-Gly-Gly for both wavelengths.

Precision for standard II

Table 11. Precision for Gly-Gly-Gly by Wavelength: 214.1 nm

concentration in mg/ml	average	sr	RSD (%)	N
0,1	17,75	1,10	6,19	3
0,5	86,70	2,70	3,12	3
1	168,28	2,86	1,70	3
2	346,67	3,58	1,03	4

Table 12. Precision for Gly-Gly-Gly by Wavelength: 195.1 nm

concentration in mg/ml	average	sr	RSD (%)	N
0,1	174,18	5,62	3,23	3
0,5	857,80	34,57	4,03	3
1	1662,88	12,77	0,77	3
2	3453,21	40,55	1,17	4

The precision was much better than in the calibrations before with the relative standard deviation between 1 and 6%.

Table 13. Recommended relative standard deviations (RSD) for reproducibility at different concentration

Concentration	RSD (%)
100 g/kg	2
10 g/kg	3
1 g/kg	4
100 mg/kg	5
10 mg/kg	7

Recovery

Table 14. Overview of samples for recovery evaluation

Sample	int. std.	int. mix. 1	int. mix. 2	Area (mAU*s) int. std
Raw press juice-week 5	Yes	/	/	5,48
Raw press juice-week 5	Yes	/	/	5,62
Raw press juice-week 5	Yes	/	/	9,17
Broth-week 5	Yes	/	/	7,71
Broth > 300 dalton	Yes	/	/	17,09
Broth > 300 dalton	/	/	/	/
Broth: 150-300 dalton	Yes	/	/	8,35
Broth: 150-300 dalton	/	/	/	/
Raw press juice-week 9	Yes	/	/	15,57
Raw press juice-week 9	/	/	/	/
Raw press juice-week 9	Yes	Yes	/	10,61
Raw press juice-week 9	/	/	/	/
Broth-week 9	Yes	/	/	17,97
Broth-week 9	Yes	/	/	20,21
Broth-week 9	Yes	/	Yes	14,6

	area int. Std.in buffer
buffer	19,87
buffer	20,87
average	20,37
std	0,707
RSD	3,471

The Recovery is calculated with the following equation.

$$recovery(\%) = \frac{area_{average_int_std_sample}}{area_{average_int_std_buffer}} * 100 = \frac{20,37}{12,4} * 100 = \underline{\underline{59,08\%}}$$

Reference

NMKL-prosedyre nr 4 (1996), Validering av kjemiske analysemetoder. Versjon 1, 31.12.1996.

Prepared by Judith Reichert
July 2006

VIDAUKI V

The effect of heating and the use of antioxidants in washed cod muscle system and cod mince.

The effect of heating and the use of antioxidants in washed cod muscle system and cod mince.

The effect of thermal treatment on oxidation in washed cod model system

The effect of thermal treatment on hemoglobin mediated oxidation in phospholipids model system from cod muscle was studied by monitoring oxidative changes during chilled storage on ice by sensory analysis, TBARS (thiobarbituric reactive substances), and instrumental color changes.

Materials and methods

See chapter on research materials and methods

Results and discussion

Thermal treatment of cod model system

Thermal treatment of the cod model system increased the oxidation of the model as measured by rapid increase in rancid odor described as rancid, painty and dried fish odors (Figure 1) TBARS (Figure 2) as well as in loss of red color (Figure 3) already on the first day of storage.

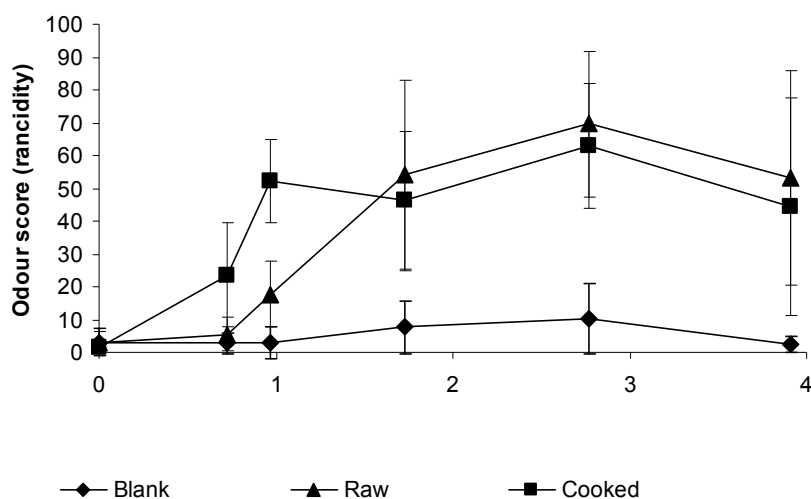


Figure 1. Sensory analysis of rancid odor (odour score) in raw and cooked washed cod model with added hemoglobin and raw without hemoglobin (Blank), stored at 0 °C for 4 days.

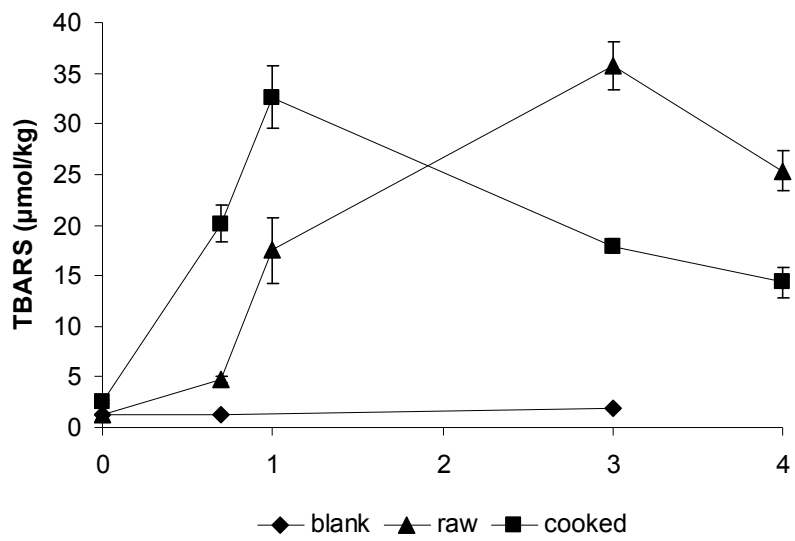


Figure 2. TBARS in raw and cooked washed cod model with and added hemoglobin and raw without hemoglobin (Blank), stored at 0 °C for 4 days.

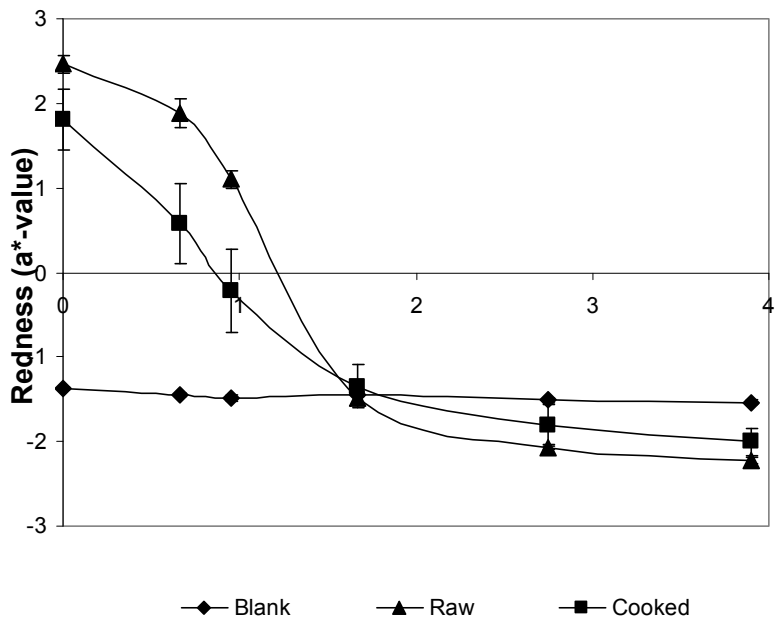


Figure 3. Redness (a* value) in raw and cooked washed cod model with and added hemoglobin and raw without hemoglobin (Blank), stored at 0 °C for 4 days.

Antioxidant activity of seaweed in cooked cod fish mince

The antioxidant activity of seaweed in thermally treated cod mince was studied by monitoring oxidative changes during storage at 4° C by sensory analysis, TBARS (thiobarbituric reactive substances) and instrumental colour changes.

Materials and methods

Preparation of seaweed water extracts

Seaweed was collected in Hvassahraun, coast nearby Hafnarfjordur in Iceland on October 12th, 2007. The freshly collected whole seaweed was washed with clean seawater to remove salt, epiphytes, and sand attached to the surfaces of the samples and transported to laboratory. The samples were carefully rinsed with tap water, wiped with paper towel. For *Lamiharia hyperborea* and *Laminaria saccharina*, the thallus was divided into two parts- new and old growth. About 200 g sample was put into an aluminium box with lid and stored in freezer at -20 °C. The frozen seaweed samples were lyophilized for 72 h, pulverized into powder with Waring blender and stored at -80 °C prior to extraction.

5 g of the ground algal powder was mixed with 100ml of distilled water and placed in shaking incubator (Innova™ 2300 Platform shaker, 200 rpm) for 24 h at room temperature. The mixtures were centrifuged at 3500 rpm for 10 min at 4 °C and filtered with Whatman no. 4 filter paper. The supernatant was freeze-dried into powder and then stored at -80 °C until use.

Samples

Fillets from cod (*Gadus morhua*) obtained from Sjófiskur supplier were skinned and minced. The cod fillets (about 3 kg) arrived early morning December 11th 2007, to Matis ohf. Skúlagata. The odour was neutral but the fillets had blood spots and brown stripes. Commercial antioxidants (ascorbic acid and tocopherol) and seaweed as possible antioxidants (*Fucus vesiculosus* (í: bóluþang) and *Palmaria palmate* (í: söll)) were added into mince (Table 1). The mince with added *Palmaria palmate* had a shrimp like colour. The mince samples were added into aluminium boxes, 50 g/box and steam cooked (90-100°C) for 6 minutes, cooled and kept at 4°C during the storage experiment. The samples were analysed at day 0, 1, 3 and 6.

Table 1. Addition of antioxidants in fish mince: ascorbic acid, tocopherol and seaweed extracts.

Sample group	Antioxidant	Amount of antioxidant (ppm)
Blank		-
Vit - C	Ascorbic acid	200
Vit - E	Tocopherol	200
Bólufang	<i>Fucus vesiculosus</i>	500
Söl	<i>Palmaria palmate</i>	500

Sensory analysis, TBARS, color and pH measurements

Three trained panellists sniffed the samples in the aluminium boxes using an unstructured scale (15 cm) for following odour attributes: seaweed, neutral, fresh, boiled potato like odour, vanilla/boiled milk odour, table cloth, TMA and sour/putrid odour. Only the results for neutral odour and boiled potato odour are shown. TBARS, red color (a*) and pH measurement were done as described in chapter on research materials and methods.

Data Analysis

Calculations were based on three sample preparations of samples ($n = 3$) and standard deviation (SD) calculated. Analysis of variance (ANOVA) was applied to the data using the Number Cruncher Statistical Software (NCSS 2000). Significant differences were determined by One way ANOVA and Duncan's Multiple-Comparison Test was used to determine the statistical difference between samples with added haemoglobin from cod and arctic char at each point of sampling. An effect was considered significant at the 5% level ($p < 0.05$).

Results and discussion

Neutral odour decreased significantly in the blank sample (without antioxidant) already on the first day, compared to samples with both commercial and seaweed antioxidants (Figure 4). The formation of boiled potato odour, oxidatively derived odour, was similar in all sample although higher in sample with ascorbic acid (Figure 4). The TBARS were very low during the whole storage experiment. Addition of seaweed to cod mince increased the red colour of the samples (Figure 6). Colour measurements are perhaps not the best quality parameter to study oxidation in systems with added seaweed.

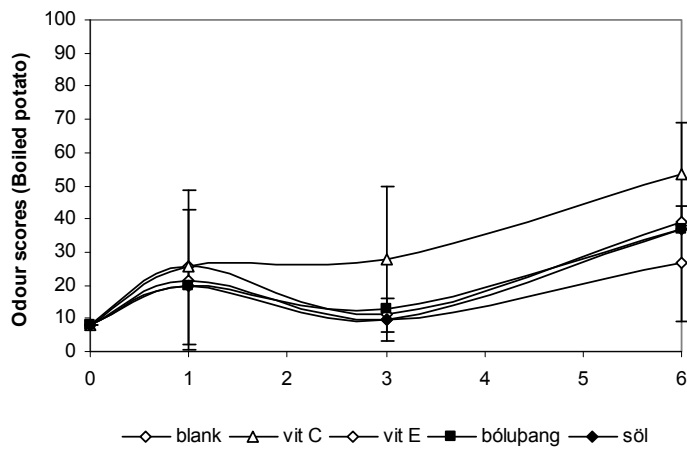
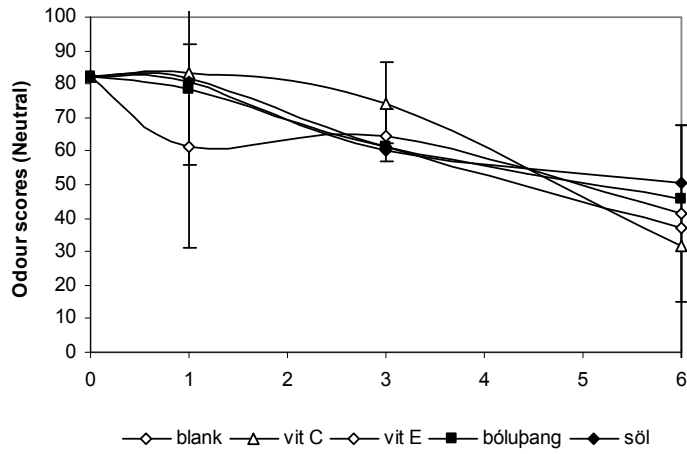


Figure 4. Sensory analysis of neutral odour and boiled potato odour (odour score) in cooked cod mince with added antioxidants, stored at 4 °C for 6 day

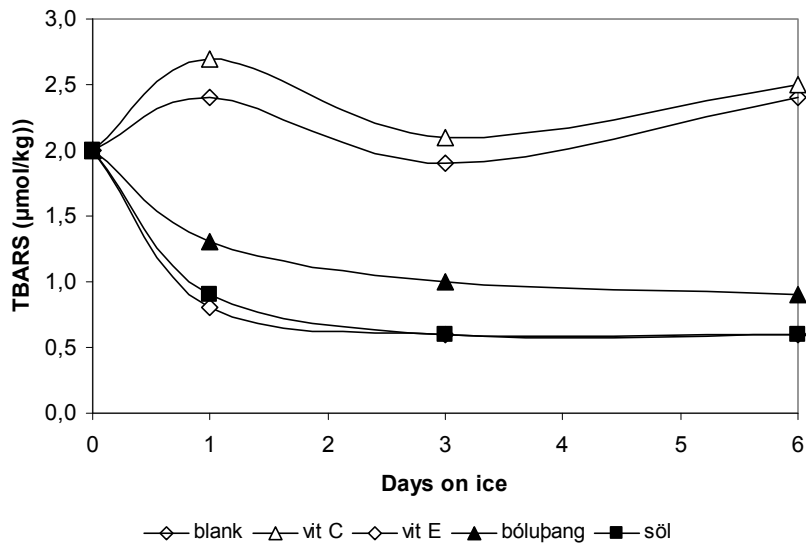


Figure 5. TBARS in cooked cod mince with added antioxidants, stored at 4 °C for 6 days.

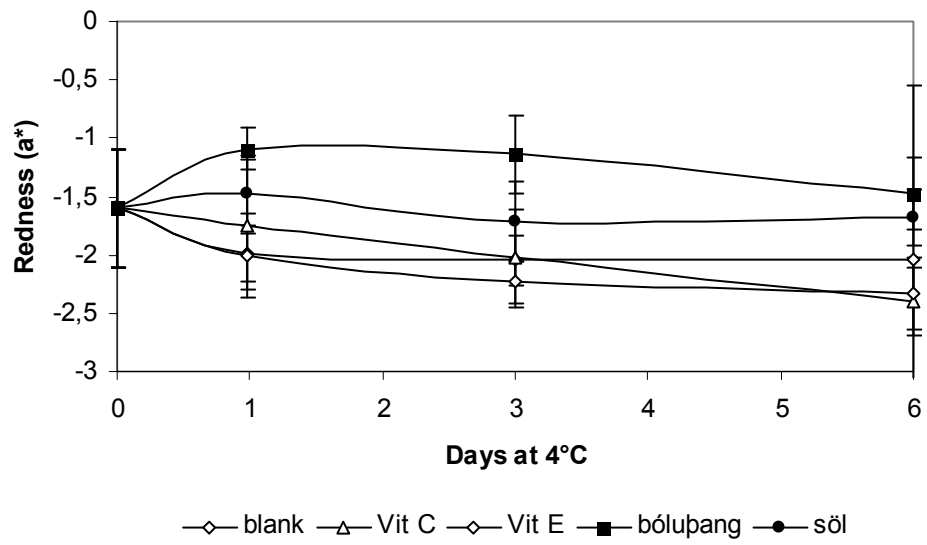


Figure 6. Redness (a^* value) in cooked cod mince with added antioxidants, stored at 4 °C for 6 days.