

**Fileter fra oppdrettstorsk produsert pre- og post-
rigor og lagret med og uten skinn. Vekttap og
proteinnedbrytning under islagring i 14 dager.**

Håvard Håkonsen

Masteroppgave i fiskerifag

Studieretning marine næringsmidler (60 stp)

Institutt for marin bioteknologi

Norges fiskerihøgskole

Universitetet i Tromsø

Mai 2008



Forord

Forord

Denne mastergradsoppgaven markerer slutten på fiskerifagstudiet ved Norges fiskerihøgskole og fem fine år i Tromsø. Tiden har gått meget fort her i Tromsø og jeg har hatt det fint både faglig og sosialt. Det er mange som har hjulpet meg med å komme i mål med masteroppgaven min og slik fortjener en stor takk. Først og fremst vil jeg takke min veileder professor Ragnar L. Olsen for inspirasjon og gode råd underveis i arbeidet. Deretter vil jeg takke Pål A. Wang for gode råd og hjelp på laboratoriet. I tillegg fortjener også Silje Kristoffersen, Birthe Vang og Hanne Mæhre en stor takk for hjelpen i det praktiske laboratoriearbeidet.

Jeg vil også takke Thomas M. Robertsen og Ida J. Jenssen for to fine år på marine næringsmidler. For gode kollokviegrupper før eksamener og lunsjpauser i kantina. En takk går også til med student Stig M. Aas.

Jeg vil i tillegg takke min familie for støtte både mentalt og økonomisk gjennom årene her på NFH. Spesiell takk til min bestemor og nå avdøde bestefar. Uten dere hadde dette vært umulig!

Håvard Håkonsen

Tromsø, mai 2008

Sammendrag

Sammendrag

Atlantisk torsk (*Gadus morhua* L.) er en relativt ny og lovende art i Norsk oppdrett. Til nå har oppdrettstorsk blitt eksportert som sløyd fisk. Dersom produksjonsvolumet får den forventede økningen i fremtiden så må man tenke på foredling som filetering, før eksport og salg. Filetering av velfødde torskefisker som oppdrettstorsk, er ingen enkel sak. Dersom slik fisk fileteres til vanlig tid, det vil si etter dødsstivhet er gått ut (post-rigor filetering), blir filetkvaliteten oftest dårlig med mye filetspalting og bløthet. Nye slaktemetoder med levendekjøling og minst mulig stress før slakting har imidlertid ført til at det tar lengre tid til oppdrettstorsken går inn i dødsstivhet. Slik er det praktisk mulig å filetere fisken før dødsstivhet (pre-rigor). Filet av oppdrettstorsk har imidlertid dårligere evne til å holde på muskelvæske og pre-rigor filetering gir derfor høyt drypptap (vekttap) under påfølgende islagring. Det ene hovedmålet med oppgaven var å undersøke om dette vekttapet kunne reduseres ved å produsere fileter med skinn, ikke skinnfrie fileter som er vanlig for torsk. Det andre hovedmålet var å undersøke om myosin som utgjør nesten halvparten av myofibrillproteinene i muskel, degraderes under islagring av fiskemuskel etter slakting.

Resultatene i oppgaven bekrefter at islagring av sløyd oppdrettstorsk ikke forandrer vekt når fisken går gjennom fasen med dødsstivhet. Skinnfrie fileter produsert pre-rigor kan derimot ha et vekttap på opptil 10 % ved islagring i 14 dager etter slakting. Siden fisk selges på vektbasis så kan dette gi et betydelig økonomisk tap og vil også kunne påvirke sensoriske egenskaper. I oppgaven ble det funnet at skinnfileter fra oppdrettstorsk fikk vekttapet redusert med 25 – 30 % og i tillegg blir vektutbytte 5 – 7 % høyere på grunn av at skinnen sitter på fileten.

Ved å bruke antistoff mot myosin tung kjede er det vist at molekylet brytes ned i betydelig grad under islagring. Siden myosin er det kvantitativt dominerende proteinet i muskel så kan en slik degradering klart ha betydning for muskelkvaliteten etter lagring.

Summary

Summary

Atlantic cod is a new and promising species in cold water fish farming. Up to date farmed Atlantic cod has been mostly exported as whole gutted fish. If the production volume reaches the expected volume in the future it must be considered to produce fillets for sale and export. Filleting of gadoids in good biological condition like farmed Atlantic cod, often results in poor fillet quality. If such fish is filleted at the usual time after the resolution of *rigor mortis* (post-rigor filleting) the fillet quality will be poor with gaping and soft muscle. New improved slaughtering procedures with live chilling and minimum of *ante mortem* stress have made it possible to fillet before onset of rigor mortis (pre-rigor). Filleting like this will improve the quality of the fillet especially with regard to fillet gaping. Fillets of farmed Atlantic cod have poor water holding capacity and pre-rigor filleting will result in high liquid loss during the storage period. One of the main goals of this thesis was to investigate if the liquid loss could be reduced by producing skin-on fillets instead of the usual fillets without skin. The other main goal was to investigate degradation of myosin which accounts for almost half of the myofibrillar proteins in the muscle, during ice storage.

The results in this thesis confirm that ice storage of gutted farmed Atlantic cod does not lead to weight changes during the rigor mortis period. Skinless fillets on the other hand could lose approximately 10 % weight during ice storage for 14 days after slaughter. Since fish is sold by weight this would lead to a great loss economically for the producer and it may also affect sensory attributes. If the fillets are produced as skin on fillets this loss could be reduced by 25 – 30 % and the fillet yield will be increased with 5 – 7 % since the skin is left on fillets.

Use of antibody against myosin heavy chain showed that the molecule is heavily degraded during ice storage. Since myosin is the quantitative dominant protein in muscle this degradation could be of importance of the muscle quality after ice-storage.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
2	Generell bakgrunn.....	3
2.1	Muskelmetabolisme postmortem.....	3
2.1.1	Generell muskelstruktur.....	3
2.1.2	Oppbygging av muskelceller.....	7
2.1.3	Muskelens evnen til å holde på vann.....	10
2.1.3	Enzymer i fiskemuskel og enzymatisk degradering.....	11
3	Materialer og metoder.....	12
3.1	Torsk.....	12
3.2	Lagring av fileter.....	12
3.3	Lagring av muskelprøver.....	12
3.4	Vanninnhold.....	13
3.5	Proteininnhold.....	13
3.6	Muskel pH.....	13
3.7	Protein ekstraksjon.....	13
3.8	SDS-PAGE.....	14
3.9	Western blott.....	14
3.10	Statistiske analyser av resultatene.....	15
4	Resultater.....	16
4.1	Biologiske data til råstoffet.....	16
4.2	Vektforandring hos pre-rigor produserte fileter lagret med og uten skinn.....	18
4.3	Vektforandring hos post-rigor produserte fileter lagret med og uten skinn.....	22
4.4	Vekttap for fileter med og uten skinn produsert pre- og post-rigor.....	26
4.5	Filet kontraksjon.....	27
4.6	Proteininnhold i dryppvæsken.....	28
4.7	Proteindegradering under islagring av muskel.....	29
4.7.1	Sarkoplasmaproteiner – SDS-PAGE.....	29
4.7.2	Myofibrillproteiner – SDS-PAGE.....	31
4.7.3	Myofibrillproteiner – SDS-PAGE og Western blotting.....	32
4.7.4	Sarkoplasmaproteiner – SDS-PAGE og Western blotting.....	36
5	Diskusjon.....	37
6	Konklusjon.....	43
7	Litteraturliste.....	44

Innledning

1 Innledning

Eksporten av oppdrettstorsk var i 2007 på cirka 4100 tonn til en verdi av 166 mill. kr. Mesteparten av dette kvantumet gikk til Frankrike og Danmark. Mer enn 95 % gikk som sløyd fisk (blanktorsk), resten som filet (Eksportutvalget For Fisk). Noen tror at oppdrettstorsk i løpet av 15 – 20 år vil oppnå samme produksjonsvolum som laks i dag (600 000 tonn) (Rosenlund & Skretting 2006). Dersom dette skjer så kan en forvente at en større andel må eksporteres eller selges som filet.

Torsk har i århundrer vært den viktigste arten i de kommersielle Nord-atlantiske sesongfiskeriene, det vil si fra desember til april (Duun & Rustad 2007). Torsk er nå en relativt ny og lovende art innen oppdrett (Tilseth 1990; Rosenlund & Skretting 2006). Oppdrett kan føre til en jevnere råstofftilgang av fersk torsk til industri og marked (Duun & Rustad 2007).

Utviklingen av *rigor mortis* (RM) er biokjemiske prosesser og avhenger av flere faktorer som behandling før slakt, *ante mortem* stress, fiskeslag, temperatur og biologisk status (Lowe *et al.* 1993; Sigholt *et al.* 1997). Vanlig praksis i dag er ofte at fisken bløgges, sløyes og ises i kar med vann og is til utløp av RM. Dette gjøres for å hindre trykkskader, sår og andre mekaniske skader av muskelen mens den er i RM. Fisken kan da distribueres som fersk sløyd eller en må vente til RM løses opp for å prosessere fisken (Skjervold *et al.* 2001a). Når fisken slaktes vil sirkulasjonssystemet opphøre, dette vil føre til mangel på energi og tilslutt vil RM inntre (Delbarre-Ladrat *et al.* 2006). Det er i industrien vanlig at fisken ligger iset mellom tre til fem dager (gjennomgår RM fasen) før den produseres (Skjervold *et al.* 2001a; Skjervold *et al.* 2001b; Einen *et al.* 2002; Kristoffersen *et al.* 2006).

De senere år har industrien tatt i bruk nye metoder for å forlenge tiden før oppdrettsfisken går inn i RM. Disse er levende kjøling og unngå *ante mortem* stress før slakting. Fisken kjøles i sjøvann før den slaktes, ofte i 1 °C i en time før slakt (Skjervold *et al.* 1999). Andersen *et al.* (1994) rapporterte at laks burde prosesseres innen 7 timer etter slakt. En slik forlengelse av pre-rigor perioden fører til at fisken i praksis kan fileteres før dødsstivhet inntre. Det er flere fordeler med å filetere oppdrettstorsk pre-rigor. Disse er blant annet lavere transportkostnader siden filetutbytte bare ligger på cirka 50 % av rundvekt. Man trenger heller ikke la fisken ligge iset på lager og slipper unna dyre lagringskostnader. Filetene når dessuten markedet på et stadium hvor de er mye ferskere for konsumenten. I tillegg kommer det at pre-rigor filetering av torsk gir mindre filetpalting enn post-rigor filetering (Kristoffersen *et al.* 2006).

Innledning

Dersom muskelen får gå inn i RM uten at den er festet i ryggspylen, vil muskelen trekke seg kraftig sammen. Pre-rigor filetering av laks er rapportert å gi 8 – 15 % sammentrekning (Sørensen *et al.* 1997; Einen *et al.* 2002). Oppdrettstorsk synes å trekke seg kraftigere sammen. Kristoffersen *et al.* (2007) fant forkortelser hos oppdrettstorsk helt opp i 27 % av opprinnelig filetlengde.

Vann og fett utgjør i hovedsak 80 % av muskelen. Muskel kan både slippe og ta opp vann avhengig av egenskaper og behandling av muskelen. Dette er av økonomisk interesse siden fisk og kjøtt selges etter vekt (Offer & Trinick 1983). Torsk er mye dårligere til å holde på vannet i muskelen enn for eksempel laks med samme lave muskel pH (Ofstad *et al.* 1996). Det er tidligere funnet betydelig veskeslipp hos oppdrettstorsk. Kristoffersen *et al.* (2007) fant et gjennomsnittlig veskeslipp hos pre- og post-rigor produserte fileter på henholdsvis 10 % og 5 % av opprinnelig filettvekt etter 11 dagers lagring. Pre-rigor filetering fører til større vekttap enn post-rigor filetering fordi muskeloverflaten er eksponert over lengre tid enn når torsken fileteres post-rigor (Zarate & Zaritzky 1985; Kristoffersen *et al.* 2006).

Post mortem forandringer i muskelen som fører til RM er godt forstått, men de prosesser som fører til oppløsningen av RM ikke er fullt ut forstått og man vet ikke helt hvilke proteiner og enzymer som inngår i disse prosessene (Bandman & Zdanis 1988). Det er foreslått flere faktorer som kan inngå i denne prosessen. Disse prosessene er oppløsning av Z-linje, svakere bindinger mellom aktinomyosin komplekset, degradering av desmin, titin og nebulin og degradering av bindevev. Hvilken påvirkning disse prosessene har på *post mortem* degradering av muskel er ikke kjent, men at protolytiske enzymer spiller en vesentlig rolle er sikkert (Goll *et al.* 1983; Zeece *et al.* 1986).

Denne masteroppgaven var to-delt der den ene delen gikk på å studere drypptap fra fileter og den andre delen omhandlet proteindegradering i fileter og muskelprøver.

1. Studere om vekttapet som følge av pre-rigor filetering kan reduseres ved å lagre filetene med skinn på.
2. Undersøke proteindegradering med spesiell vekt på myosin under islagring av fileter.

2 Generell bakgrunn

2.1 Muskelmetabolisme postmortem

Mørning av fersk fisk *post mortem* er vanligvis ikke ønskelig fordi det gir dårligere produkt egenskaper. Dette står i kontrast til muskel av animalsk opprinnelse hvor mørning er nødvendig for å få et bra kjøtt. (Ladtrat *et al.* 2003; Delbarre-Ladtrat *et al.* 2006).

Når fisk slaktes vil blodomløpet stanse og oksygentilgangen stopper opp. Da vil karbohydratene (glykogen) i muskelen bli anaerobisk nedbrutt og som en følge av dette vil pH synke til en verdi mellom 6,2 – 6,8 avhengig av glykogenmengden. Mitokondrier og sarkoplasmisk retikulum forringes på grunn av pH fall og at osmotisk trykk forandres. Dette fører til at Ca^{2+} ioner vil frigjøres i cytosol og konsentrasjonen kan komme opp i 0,2mM fri Ca^{2+} . Når energirike forbindelser spaltes og forsvinner fra muskelen vil dette føre til RM. Når det er mindre enn 2 μ M ATP vil aktin og myosin danne et permanent aktinomyosin kompleks. Uten ATP vil aktomyosin komplekset ikke løses opp og fisken går inn i RM. Tiden før fisken går inn i RM er meget avhengig av *ante mortem* stress og temperatur (Delbarre-Ladtrat *et al.* 2006).

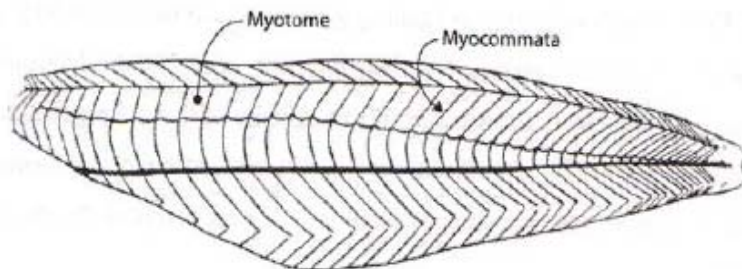
2.1.1 Generell muskelstruktur

Skjelettmuskulaturen utgjør mellom 50 og 70 % av vekten til de fleste fisker og er den delen av fisken som i hovedsak er av kommersiell betydning. Fiskens muskel består av to differensierte typer muskel. Den hvite muskelen som brukes til hurtig svømming og kan kun benyttes i kort tid. Den røde muskelen brukes til vanlig svømming over lengre tid. Dette fordi det er stor forskjell i oppbygningen av muskeltypene. Den røde muskelen består av mindre muskelfibre og inneholder store mengder mitokondrier og blod kapillærer. Samt inneholder den røde muskelen opplagsnæring og er derfor godt egnet til aerob metabolisme. Den hvite muskelen består av cirka 90 % myofibriller. De resterende 10 % består av glykogenkorn, sarkoplasmisk retikulum og spredte mitokondrier. Blodtilførselen til den hvitemuskulaturen er meget liten noe som fører til anaerob metabolisme ved bruk av denne muskulaturen (Kryvi & Totland 1997). Der disse musklene går sammen er det et mosaikkmønster med blanding av disse to typene muskelvev (Luther *et al.* 1995).

Muskulaturen er delt opp i segmenter kalt myotomer eller muskelsegmenter (Love *et al.* 1969; Kryvi & Totland 1997). Disse er avskilt av intramuskulært bindevev som består av

Generell bakgrunn

myocomata, perimysium og endomysium (Bremner & Hallett 1985; Offer & Knight 1988). Myocomata er et kollagennett som deler fisken inn i myotomer. Muskelsegmentene kan se ut som en liggende W der spissene peker caudalt på fisken (Bremner & Hallett 1985; Kryvi & Totland 1997).



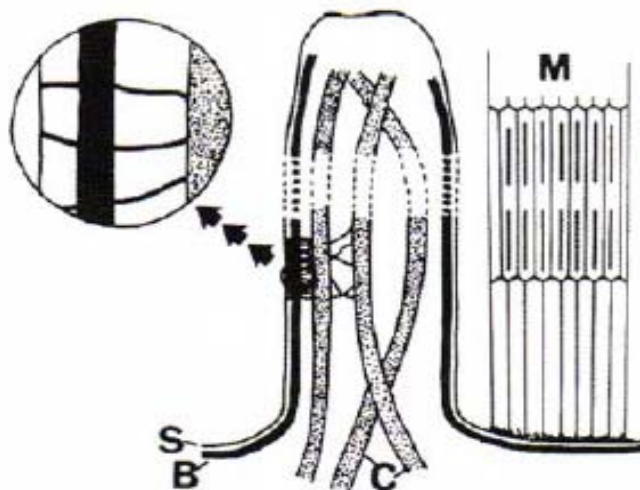
Figur 1. Illustrasjon av en torskefilet etter at den er separert fra skjelettet. Stripene i figuren representerer myocommata og muskelsegmentene er det hvite mellom dem (Love 1970).

Normalt er det like mange myotomer som det er ryggvirvler (*vertebrae*) i virvelsøylen (*columna vertebralis*) og hver ryggvirvel er bundet til to myotomer. (Kryvi & Totland 1997). Hver myotom er omgitt av myocommata som fester fileten til virvelsøylen og skinnet (Bremner & Hallett 1985). Samt at myocommata deler fileten i en epaxial (dorsal) og en hypaxial (ventral) del (figur 1) (Bremner & Hallett 1985; Kryvi & Totland 1997).

Myotomene består av parallelt langsgående muskelfibere som går langs fiskens lengdeakse. Hver myotom er bundet til myocommata på begge sider av myotomene i knutepunkter av fine kollagennett. Det er innbuktinger (figur 2) som er dekket med kollagennett der muskelfibrillene knyttes fast med fine filamenter (Bremner & Hallett 1985).

Generell bakgrunn

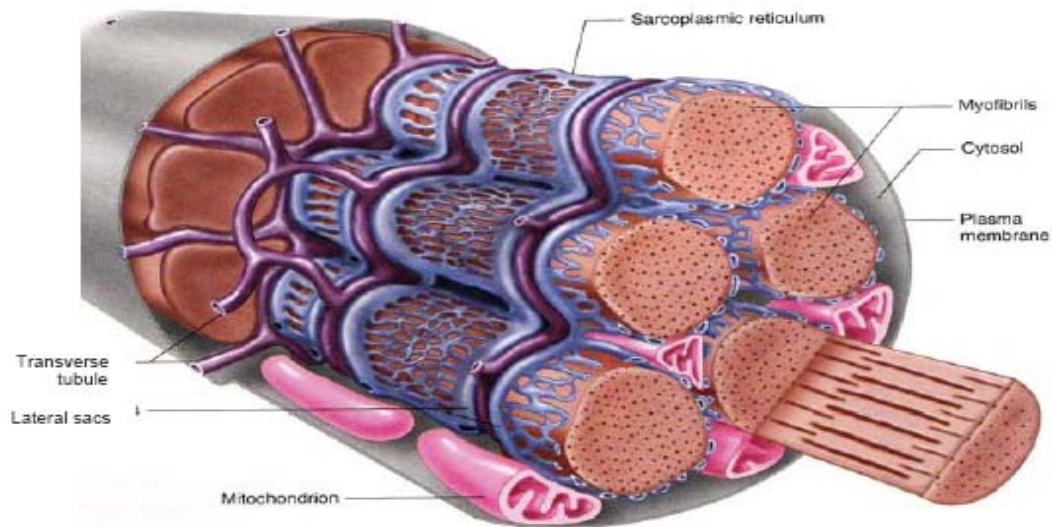
Hver myofiber er dekket av et lipidlag som kalles for sarkolemma (cellemembran) og bader i sarkoplasma omgitt av sarkoplasmatisk retikulum. Sarkoplasmatisk retikulum omgir hver myofibrill som en sylinder og omfavner transvers tubulu systemet (T-tubular).



Figur 2. Viser en myofibrill festet til basalmembranen i et hulrom som hvor det er et nettverk av kollagen. M = myofibrill. S = sarkolemma B = baslmembran. C = kollagen fibre (Hallet & Bremner 1988).

T-tubular systemet ligger ofte plassert over Z-linjen eller det kan ligge plassert ved I-bandene eller A-bandene. De omgir hver myofibrill og har en membranlik struktur (Luther *et al.* 1995).

Generell bakgrunn

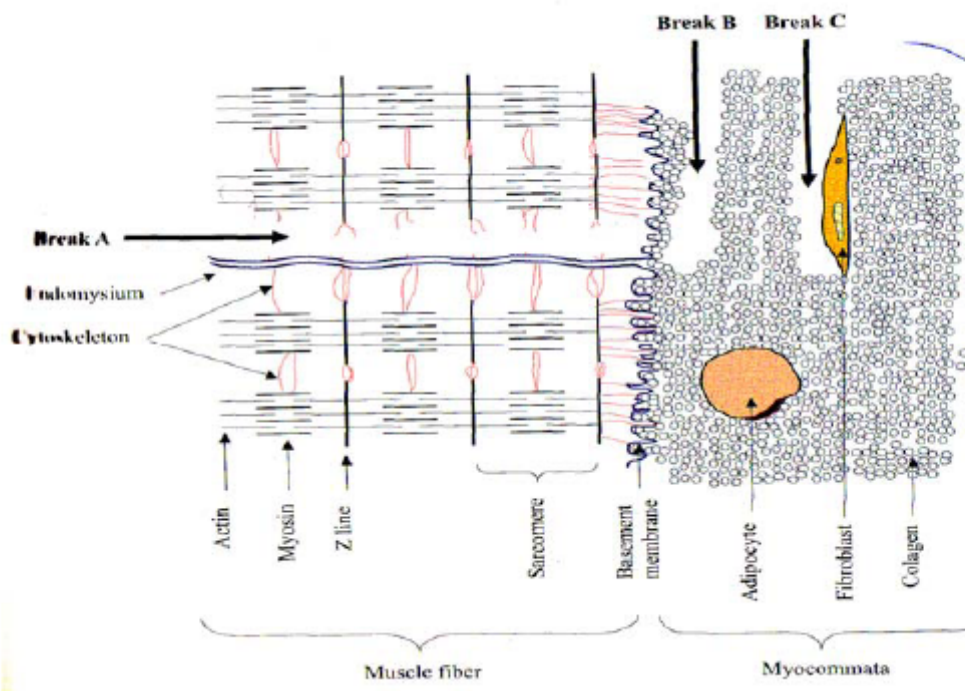


Figur 3. Viser en muskelcelle som består av flere langsgående myofibriller, og transvers tubulu som går rundt hver myofiber ved Z-linjene. Man kan også se mitokondier, sarkoplasmiskretikulum, cytosol og plasmembranen. (Widmaier *et al.* 2004)

På utsiden av myofibrene finnes det et nett som kalles for ”intramuscular connective tissue” (IMCT). Dette består i hovedsak av kollagen, glycoproteiner, og protoglykaner og celler for eksempel fibroblaster, adipocytter og makrofager. Et lag tynt bindevev går rundt hver eneste muskelcelle som ofte binder endomysium (kollagen I og V) til perimysium som er bundet til myocomata. Det finnes både kollagen I og V i IMCT hos fisk, men i myocomata er det kollagen I som er dominerende (Love *et al.* 1969; Love 1970; Bremner & Hallett 1985).

Generell bakgrunn

Man tror at i fisk degraderes kollagen V til dels hurtig, mens kollagen I er mer stabilt under islagring (Sato *et al.* 1991; Sato *et al.* 1997).

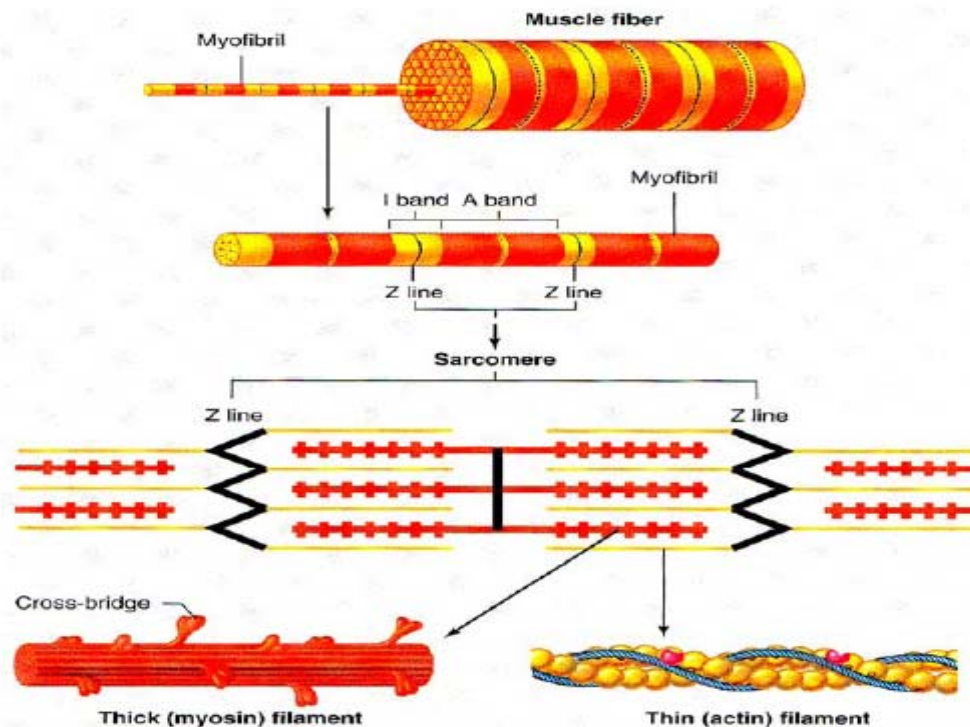


Figur 4. Illustrasjon av to muskelfiber festet til en myocommata, med to brudd i kollagenlaget i myocommata. Det er også brudd mellom myofibrillene i skissen (break A). Begge deler er bakgrunnen for filetgaping (Skjervold 2002)

2.1.2 Oppbygging av muskelceller

Muskelceller er lange flerkjernede celler som strekker seg fra myocommata til myocommata (figur 4, 5 og 6). En sarkomer er det området som går fra Z-linje til Z-line og er bygd opp av tykke og tynne filamenter. De tykke filamentene er i hovedsak bygd opp av det kontraktile proteinet myosin og finnes midt i en sarkomer. Disse danner de mørke A-bandene i sarkomeren. De tynne filamentene er bygd opp av aktin, troponin og tropomyosin og danner de lyse I-bandene. Det mørke feltet midt i I-bandet er Z-linjen. Aktin bindes til Z-linjen med kryssbindinger med α -aktinin (Huff-Lonergan & Lonergan 2005; Luther *et al.* 1995).

Generell bakgrunn



Figur 5. Viser en muskelfiber og en myofibrill som er dratt ut av denne. Forstørret er en sarkomer med A- og I-band samt Z-linjer. Den viser også et myosinmolekyl og et actinmolekyl med sin vridde struktur (Widmayer *et al.* 2004).

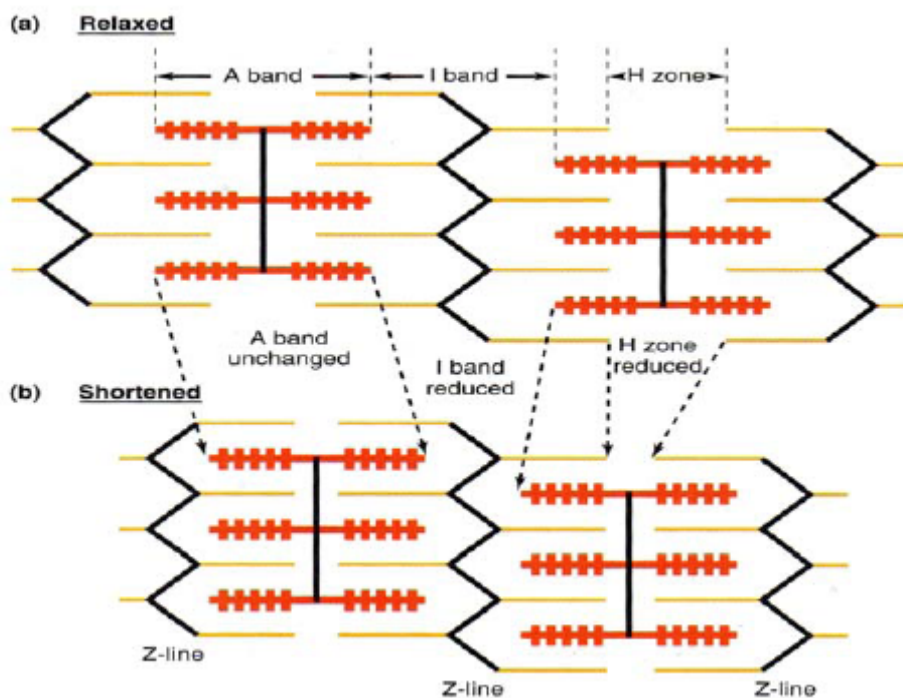
H-sonen ligger midt i A-bandet av sarkomeren og består av området mellom to lyse band som kan sees i elektromikroskop (figur 6). H-sonen består av sammenhengende myosin filamenter som er plassert som nevnt ovenfor. Midt i sarkomeren er det et mørkt band som kalles for M-linjen. Myosin er knyttet til nærliggende filamenter i midten av A-bandet med kryssbindingsstruktur. Titin (connectin) et gigantisk protein som går fra M-bandet til Z-linjen. I den regionen som I-bandene befinner seg tror man titin former svært tynne elastiske fibre som hjelper å opprettholde strukturen og å holde A-bandene i normal posisjon i en sarkomer (Offer & Knight 1988; Luther *et al.* 1995).

Myosin er et heksamerisk protein bestående av 4 lettekjeder og to tungekjeder. Myosin halen (staven) er en helikstruktur med globulære molekyler kalt for hoder (Luther *et al.* 1995; Huff-Lonergan & Lonergan 2005). Myosinhodene er de som arbeider med aktin innad i en myofibrill og det er disse som har ATPase aktivitet og det er da disse som gir opphav til muskel kraft ved kontraksjon (Luther *et al.* 1995; Huff-Lonergan & Lonergan 2005). Under utviklingen av skjelettmuskulatur har pattedyr, fugler, amfibier og fisk utviklet ulike myosin tungekjeder (Martinez & Pettersen 1992).

Generell bakgrunn

Aktinfilamenter (figur 5) er oppbygd av vridde strenger med globulære actinmolekyler sammen med en lang stavlignende del tropomyosin og det Ca^{2+} bindende komplekset troponin (Luther *et al.* 1995).

Når sarkolemma / T-tubuli systemet frigjør Ca^{2+} vil det føre til at muskelen trigges til muskelaktivitet ved at Ca^{2+} ioner binder seg til troponin. Dette skjer hvis konsentrasjonen av Ca^{2+} er over 10^{-5}M og det er troponin-C komponenten av troponin som binder Ca^{2+} ionene. Dette fører til at den normale inhiberende effekten av troponin-I frigjøres. Uansett hvilke strukturelle endringer som inngår i denne prosessen vil det bli overført til den tredje komponenten av troponin, troponin-T som er sterkt bundet til tropomyosin. Man tror dette hjelper det lange tropomyosinmolekylet til å gli på overflaten av de tynne aktinfilamentene. Da aktiveres de tynne filamentene slik at myosinhodene slipper de tynne filamentene og spalter ATP til P_i og ADP (Luther *et al.* 1995).



Figur 6. Viser A-, I-band og Z-linjer i en sarkomer i tillegg til H-soner. Figuren viser også hva som skjer ved kontraksjon av muskelcellene der H-sonen trekkes sammen og blir mindre i kontrahert muskel (Widmaier *et al.* 2004).

Generell bakgrunn

2.1.3 Muskelens evnen til å holde på vann

Vann er et molekyl med dipol noe som fører til at det lett binder seg til molekyler med ladning. Protein er molekyler med ladning og vann er derfor tett bundet til proteiner i muskelen. Mye av vannet i muskelen er i selve strukturen til muskelen og muskelcellene. Spesifisert er det vann bundet inn i selve muskelcellen, inni myofibrillene, mellom myofibrillene samt mellom myofibrillene og cellemembranen (Huff-Lonergan & Lonergan 2005). Muskel består av fett, vann, proteiner, karbohydrater, vitaminer og mineraler. Som tommelfingerregel kan man si at vann og fett utgjør 80 %, proteiner utgjør 20 %, karbohydrater utgjør 1 % og vitaminer og mineraler er ofte omtalt som askefraksjonen ved analyser og utgjør 1 % (cirka tall) (Huff-Lonergan & Lonergan 2005). I muskelen er det fire forskjellige typer vann man snakker om. Det er i hovedsak bundet vann, fastbundet vann, immobilisert vann og fritt vann.

Bundet vann er vann som er bundet til strukturer i muskelen som ikke er av flytende opprinnelse som for eksempel proteiner og dette vannet er vanskelig å fjerne fra muskelen ved frysing, tørking eller varmebehandling (Huff-Lonergan & Lonergan 2005).

Fastbundet vann er en meget liten fraksjon av vannet i muskelen fordi dette vannet er tett bundet til proteiner. Det beregnes cirka 0,5g vann pr gram protein og siden det er rundt 20 % proteiner i muskel blir denne mengden under 10 % av vannet i muskel. Denne fraksjonen endres lite eller ikke i det hele tatt i *post mortem* muskel (Offer & Trinick 1988; Huff-Lonergan & Lonergan 2005).

Immobilisert vann blir holdt i muskelen av enten rom i muskelen eller bundet til bundet vann. Dette vannet holdes innen strukturen til muskelen, men er ikke bundet til proteiner. Tidlig i *post mortem* muskel flyter ikke dette vannet fritt, men kan lett bli fjernet ved for eksempel tørking eller fryses til is. Det er dette vannet som blir mest påvirket av RM prosessen og omdanningen fra muskel til kjøtt. Dette vannet kan lett mistes som drypp under forandring av muskelcellene og når pH går ned (mot det isoelektriske punkt).

Kristoffersen *et al.* (2007) brukte en sentrifugeringsmetode beskrevet av Rørå *et al.* (2003) og fant ut at evnen til å holde på vann var betydelig mindre hos pre-rigor produserte fileter. Selv om disse hadde tapt nesten dobbelt så mye veske som post-rigor produserte fileter på samme tid *post mortem*. De fant også at vanninnholdet var høyere i post-rigor produserte fileter og dette er i henhold til tidligere undersøkelser gjort av Kristoffersen *et al.* (2006). Undersøkelsen i 2007 var utført på oppdrettstorsk, mens forsøket i 2006 var utført på oppforet og villfanget torsk (Kristoffersen *et al.* 2006; Kristoffersen *et al.* 2007).

Generell bakgrunn

Kristoffersen *et al.* (2007) fant et drypptap på cirka 10 % for pre-rigor produserte fileter og 5 % for post-rigor produserte fileter 11 dager etter slakting. Dette er betydelig mer enn det som man har funnet i laks for både pre- og post-rigor produserte fileter (Einen *et al.* 2002).

2.1.3 Enzymer i fiskemuskel og enzymatisk degradering

Når fisk mister sin ferskhets er det en kombinasjon av biokjemiske, kjemiske og fysiske prosesser. Autolytiske prosesser inkluderer blant annet protolytisk nedbrytning av proteiner og bindevev samt fett hydrolyse. Disse prosessene er etterfulgt av mikrobiologisk bederelse av fisken (Delbarre-Ladrat 2006).

Delbarre-Ladrat *et al.* (2006) foreslår to hovedmåter i muskeldegradering, en lysosomal måte der katepsiner er involvert og en måte i cytosol som er Ca^{2+} avhengig der kalpainer er involvert. De mener også at metalloproteinaser kan være involvert i degradering av bindevev.

Det finnes ulike protolytiske systemer i muskelcellen. Det multikatalytiske systemet som degraderer hormoner, antigenene og transkripsjonsfaktorer. Katepsiner er proteaser som er aktiv ved sur pH og disse finner man ofte i lysosomene. Disse er ofte inaktive i levende vev, men de kan frigjøres fra lysosomene for eksempel under tining og frysing av fileter eller ved skader og sår. I tillegg kan man anta at de frigjøres som følge av generell degradering når muskel lagres *post mortem*. Lysosomene inneholder minst 13 forskjellige katepsiner og de er ofte forskjellige i deres aktive sete og deres substratspesifikke virkemåte samt er de meget følsomme for inhibitorer. Man kjenner best til katepsin B, D, L og H som er de mest vanlige katepsinene i fisk (Delbarre-Ladrat 2006).

Kalpainer er cysteinavhengige og er mest aktiv ved nøytral pH og disse enzymene er avhengige av kalsium. Så har vi matrix metalloproteaser som i hovedsak degraderer bindevev. Dette er en stor familie med strukturlike endopeptidaser og er klassifisert i fire sub familier kollagenaser, gelatinaser, stromelysin og membrantyper. Disse er sink og kalsium avhengige og er i stand til å bryte nede kollagen og proteiner som knytter sarkolemma til ekstracellulært matrix (Delbarre-Ladrat 2006).

Det er delvis mye degradering av strukturelle proteiner i fiskemuskel *post mortem*. Dette inkluderer proteiner som dystrofin, α -aktinin, tropomyosin, og desmin (Delbarre-Ladrat 2006). Proteindegradering *post mortem* inkluderer myofibrillproteiner som makroproteinene titin og nebulin (Astier *et al.* 1991). Det hevdes ofte at det ikke er degradering av myosin, men degradering mellom aktomyosin komplekset. Dette på bakgrunn av ATPase aktiviteten til myosin ikke forandres under lagringsperioden (Goll & Robson 1967).

3 Materialer og metoder

3.1 Torsk

Oppdrettstorsken (*Gadus morhua* L.) som ble brukt i forsøket hadde god markedsvekt (2,7 kg \pm 0,6 kg rund vekt). Fiskene (n = 24) ble slaktet på Sjøanlegget til Havbruksstasjonene i Skulgambukt cirka 3 mil nord for Tromsø i september – oktober. Torsken hadde de siste 6 – 10 månedene gått på marint fôr fra Skretting (Amber 1300, 9mm). Dette er et fôr som også inneholder vegetabiliske proteinkilder (www.skretting.no).

Fiskene ble håvet enkeltvis fra merden og slått kraftig i hodet med en jernstang. Etter at gjellearteriene var skåret over fikk fisken blø ut i 30 minutter i et kar med is og ferskvann. Den ble deretter veid, målt og sløyd. Vekt på lever, gonader samt sløyd vekt med hodet ble registrert før den ble fraktet i kasser med is til Norges Fiskerihøgskole (NFH).

Det ble beregnet Fultons kondisjonsfaktor, hepatosomatiskindeks (HSI) og gondosomatiskindeks (GSI) etter følgende formler: Fultons kondisjonsfaktor = (total kroppsvekt (g) / gaffellengde (cm)³ x 100), HSI = (levervekt (g) / total kroppsvekt (g) x 100) og GSI = (gonadevekt (g) / total kroppsvekt (g) x 100).

3.2 Lagring av fileter

En gruppe fisk ble håndfiletert pre-rigor fire timer etter slakting mens en annen gruppe ble håndfiletert post-rigor fire dager etter slakting. For hver fisk ble høyrefiletten lagret med skinn mens venstrefiletten ble lagret uten skinn. Filetene ble lagt enkeltvis i doble lynlåsposer i kasser med is. Fisken som skulle produseres post-rigor ble lagt ned i kasser med is på forskriftsmessig måte. Snute til hale med buken ned i kasser med is og lokk. Kassene med fisk og filet ble oppbevart på kjølerom. Filetene ble veid og målt samt at det ble samlet opp drypptap hver dag fra dag 0 / 4 til dag 14 etter slakting. Dryppvæsken ble veid og frossent ned i det røret som tilhørte den aktuelle fileten. Muskel pH ble målt 4 og 14 dager etter slakting.

3.3 Lagring av muskelprøver

Muskelprøver (cirka 3g) av pre-rigor produserte fileter som hadde vært frosset i cirka 5 - 6 mnd (-55 °C), ble tint og behandlet med 10ml 0,02 % NaN₃ i 30 minutter. Dette for å hemme

Materialer og metoder

bakterievekst under den påfølgende islagringen. Kontrollprøvene ble behandlet tilsvarende lenge med ddH₂O.

Prøvene ble tatt opp med en pinsett og overflødig veske fikk dryppe av. Deretter ble prøvene lagt i rør som stod på is i kjøleskap i 14 dager. Muskelprøver på cirka 0,2g ble tatt ut og proteiner ekstrahert ved 0 og 18 timer, 2, 4, 8, 11 og 14 dager.

3.4 Vanninnhold

Prøver på cirka 1g muskel ble tørket i varmeskap ved 105 °C i 24 timer for å bestemme tørrstoffinnholdet. Det ble laget 3 paralleller av hver prøve og gjennomsnittet av disse ble brukt til å beregne vanninnholdet i muskelen.

3.5 Proteininnhold

Til proteinbestemmelse ble Bio-Rads, (Herkules, CA, USA) proteinkitt D_C Protein Assay brukt, med mikrotitterplater og plateleser (Spectra MAX 190 / ASYS UVM 340). Bovine serum albumin ble brukt til å sette opp standardkurvene.

3.6 Muskel pH

Muskel-pH ble målt med et WTW pH-meter (pH 330, Wissenschaftlich-Technische Werkstatt GmbH, Weilheim Germany) med en Hamilton dobbelt poret glasselektrode (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz Switzerland). Muskel pH ble målt ved å stikke elektroden i nakkeregionen av fileten (på dag 4 og 14).

3.7 Protein ekstraksjon

Protein i muskel ble ekstrahert med en litt modifisert metode beskrevet av Cao *et al.* (2006). Hver muskelprøve (0,2g) ble homogenisert i fire deler iskald 20mM Na-fosfatbuffer, pH 7,5 med en ultra turrax (ULTRA TURRAX® T25 basic) i ca 30 sekunder. Homogenatet ble sentrifugert (Eppendorf centrifuge 5417R) på 6800g i 10 minutter. Supernatanten som inneholder sarkoplasmaproteiner, ble frosset ned på -55 °C.

Pelleten løses opp og vaskes med den samme bufferen. Dette gjentas fire ganger med samme sentrifugeringsbetingelser som over. Deretter ble myofibrillproteinene ekstrahert med

Materialer og metoder

0,5M NaCl i 20mM Na-fosfatbuffer pH 8,0. Etter sentrifugering ved 6800g i 10 minutter ble myofibrillproteinene frosset ned på -55 °C.

3.8 SDS-PAGE

SDS-PAGE ble utført i henholdt til Laemmli (1970) med 10 % og 7,5 % akrylamidgeler i et Mini Protean 3 elektroforeseapparat (Bio-Rad). Både sarkoplasmaproteinene og myofibrillproteinene ble analysert.

Sarkoplasmaproteiner ble blandet direkte med samplebuffer (0,06M Tris-HCl pH 6,8, 25 % glyserol, 3 % SDS, 4 % mercaptoethanol og 0,1 % bromfenol blått) i forholdet 1:1. Som molekylvektsstandard ble "pre-stained" standarder fra Bio-Rad i sample buffer brukt (broad range Mw 200, 116.25, 97.4, 66.2, 45, 31, 21.5, 14.4 og 6.5 kDa og low range 97.4, 66.2, 45, 31, 21.5 og 14.4 kDa). Prøvene ble kokt i 2 minutter før 10µl ble applisert.

Myofibrillproteiner ble blandet direkte med sample buffer i forholdet 1:1. Som standard ble Seablue® Pre-Stained Standard (Mw 250, 148, 98, 64, 50, 36, 22, 16, 6 og 4 kDa) fra Invitrogen (Berkely, CA, USA) benyttet. Prøvene ble kokt i 2 minutter før 10µl ble applisert.

I dette siste lagringsforsøket var proteinmengden justert til 0,3µg/µl med fysiologiskvann (0,9 % NaCl). Det ble applisert slik at brønnene inneholdt 3µg protein og Seablue® ble benyttet som molekylvektsstandard.

Alle gelene ble farget med 0,1 % comassie brilliant blue i 45 % metanol med 8 % eddiksyre og avfarget med 10 % metanol i 8 % eddiksyre.

3.9 Western blott

Etter avsluttet SDS-PAGE ble de separerte proteinene elektroforetisk overført til en PVDF-membran med en modifisert metode opprinnelig beskrevet av Towbin *et al.* (1979). Det ble brukt en Power PAC 1000 elektroforese maskin (Bio Rad) og overføringen ble foretatt ved 400mV i 90 minutter. Etter blottingen ble membranene vasket 2 x 5 – 10 minutter i TBS-buffer (20mM Tris-HCl pH 7,5 og 500mM NaCl). Membranene ble blokkert med blokkeringsbuffer TTBS (TBS tilsatt 0,05 % Tween 20) inneholdende 5 % tørrmelk, i 30 minutter ved romtemperatur. Før de ble innkubert med primært antistoff i blokkeringsbuffer enten en time i romtemperatur eller over natt ved 4 °C. Antistofffortynning var 1:40 000. Det primære antistoffet (antiserum) var rettet mot myosin tung kjede isolert fra røyemuskel og var

Materialer og metoder

gitt av Iciar Martinez, SINTEF (Martinez & Pettersen 1992). Membranene ble deretter vasket 3 x 5 minutter med TTBS og innkubert med sekundært antistoff (goat anti-rabbit IgG-HRP) Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz CAL, USA fortynnet 1:10 000 i en time i romtemperatur. Membranene ble så vasket med TTBS 3 x 5 minutter med en påfølgende vask i 5 minutter med MilliQ vann, før membranene ble innkubert med 750µl Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrat (Pierce). Membranene ble så eksponert ovenfor røntgenfilm før fremkalling (Wang *et al.* 2007).

3.10 Statistiske analyser av resultatene

Det ble brukt Microsoft Excel og t-test til å beregne signifikant forskjell mellom de ulike gruppene i forsøket.

Resultater

4 Resultater

4.1 Biologiske data til råstoffet

De biologiske data til oppdrettstorsken (n = 24) brukt i oppgaven er gitt i tabell 1. Gaffellengden var $59,8\text{cm} \pm 4,4\text{cm}$. Rund vekt var på $2705\text{g} \pm 629\text{g}$. Dette ga en k-faktor på $1,25 \pm 0,2$. Sløyd vekt (med hodet) var på $2165\text{g} \pm 455\text{g}$. Dette resulterte i et sløydutbytte på $80,6\% \pm 4,1\%$ av rund vekten. HSI og GSI var på henholdsvis $10,7\% \pm 3,3\%$ og $1,4\% \pm 1,0\%$.

Tabell 1 Biologiske data for oppdrettstorsken (n = 24).

	Oppdrettstorsk (n = 24)
Gaffellengde (cm)	$59,8 \pm 4,4$
Rund vekt (g)	2705 ± 629
K-faktor	$1,25 \pm 0,2$
Sløyd vekt (g) dag 0	2165 ± 455
Sløydutbytte (%)	$80,6 \pm 4,1$
HSI (%)	$10,7 \pm 3,3$
GSI (%)	$1,4 \pm 1,0$

Tabell 2 viser at etter slakting var rund vekt for fisk som skulle fileteres pre-rigor $2748\text{g} \pm 470\text{g}$ og sløyd vekt var på $2224\text{g} \pm 384\text{g}$. Etter slakting var rund vekt for fisk som skulle fileteres post-rigor $2819\text{g} \pm 746\text{g}$ og sløyd vekt var på $2209\text{g} \pm 508\text{g}$.

Tabell 2 Sløyd vekt og filetutbytte basert på rundvekt for gruppene filetert pre- og post-rigor. Vekt av filetene er multiplisert med 2 som om begge filetene fra hver fisk var produsert enten med eller uten skinn.

	Pre-rigor (n = 12)	Post-rigor (n = 10)
Rund vekt (g) dag 0	2748 ± 470	2819 ± 746
Sløyd vekt (g) dag 0	2224 ± 384	2209 ± 508
Sløyd vekt ved fileteringstidspunkt (g) dag 4	-	2203 ± 508
Vekt filet med skinn (g) x 2	838 ± 163	826 ± 229
Vekt filet uten skinn (g) x 2	648 ± 152	669 ± 177
Filetutbytte med skinn (%)	$30,4 \pm 2,5$	$29,5 \pm 3,8$
Filetutbytte uten skinn (%)	$23,4 \pm 3,2$	$24,1 \pm 3,8$

Resultater

Ved en feiltakelse ble bare 10 av fiskene som skulle fileteres post-rigor veid i sløyd form på dag 4. I tabell 2 er derfor $n = 10$ i denne gruppen.

Sløyd vekt på dag 4 for fiskene som ble produsert post-rigor var på $2203\text{g} \pm 508\text{g}$. Fra hver sløyd fisk ble en filet produsert med skinn og en uten skinn. Vekten til hver filet ble multiplisert med 2 for å simulere en produksjon av skinnfrie fileter og av fileter med skinn. Vekt for pre-rigor produserte fileter med skinn (x2) var på $838\text{g} \pm 163\text{g}$ (basert på rund vekt ga dette et filetutbytte på $30,4\% \pm 2,5\%$). Filetvekten uten skinn (x2) var på $648\text{g} \pm 152\text{g}$ (filetutbytte på rund vekt basis ble på $23,4\% \pm 3,2\%$). For fileter produsert post-rigor var filetvekten med skinn (x2) $826\text{g} \pm 229\text{g}$ (filetutbytte på rund vekt basis ble på $29,5\% \pm 3,8\%$). Uten skinn var filet vekten (x2) på $669\text{g} \pm 177\text{g}$ (filetutbytte på rund vekt basis ble på $24,1\% \pm 3,8\%$).

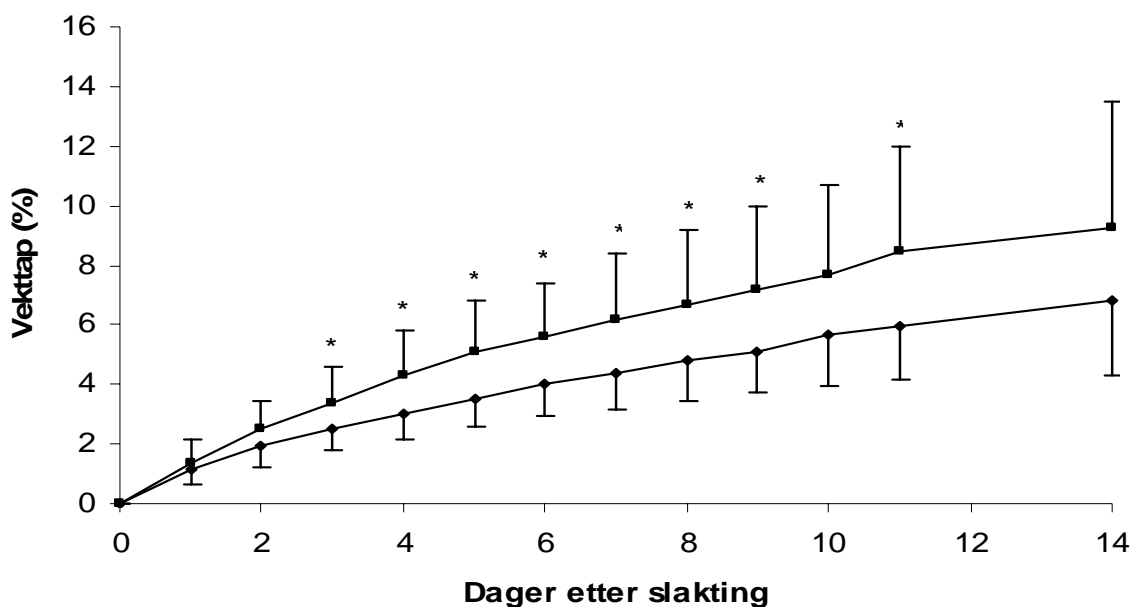
Det skjedde ingen vektforandring under islagringen av den sløyde fisken som ble filetert post-rigor. Noen fisker hadde tilsynelatende gått litt opp i vekt, mens andre hadde gått litt ned i vekt og noen var vektstabile.

Resultater

4.2 Vektforandring hos pre-rigor produserte fileter lagret med og uten skinn

Figur 7 viser drypptap hos pre-rigor produserte fileter med og uten skinn. Pre-rigor produserte fileter med skinn taper mindre væske enn pre-rigor produserte fileter uten skinn. Denne forskjellen var signifikant fra dag tre til dag ni under islagringen (0 °C), samt at det var signifikant forskjell på dag 11.

14 dager etter slaktning og filetering hadde filetene uten skinn i gjennomsnitt tapt $9,3 \pm 4,2$ % i vekt mens de med skinn hadde tapt $6,8 \pm 2,5$ %.



Figur 7. Vekttap (%) av pre-rigor produserte fileter med (◆) og uten (■) skinn i løpet av 14 dager etter slaktning (n = 12). * Signifikante forskjell (p < 0,05) mellom filettypene ved samme dag under islagringen. På grunn av stort standardavvik er avvikssøylene vist bare en vei.

Tabell 3 viser egenskaper til pre-rigor produserte fileter med og uten skinn under lagringsperioden. På fileteringstidspunktet ble vanninnhold i muskelen målt til 78,3 % for både fileter med og uten skinn (n = 9). Etter 14 dagers lagring var vanninnholdet redusert til $78,1 \% \pm 0,5 \%$ i fileter med skinn. Vanninnholdet var redusert til $77,8 \% \pm 0,7 \%$ for fileter uten skinn og dette var signifikant forskjellig i forhold til dag 0. Det er imidlertid ikke signifikant forskjell mellom vanninnholdet i filetene med og uten skinn etter 14 dagers lagring. Muskel pH var på dag fire $6,28 \pm 0,09$ for fileter med skinn.

Resultater

Tabell 3 Egenskaper til pre-rigor produserte fileter med skinn (n = 12) og uten skinn (n = 12) og dryppvæsken. (vanninnhold er beregnet ut fra n = 9).

Dager <i>post mortem</i>	Pre-rigor med skinn	Pre-rigor uten skinn
Vanninnhold (%) dag 0	78,3 ± 0,4	78,3 ± 0,3 ^a
Vanninnhold (%) dag 14	78,1 ± 0,5	77,8 ± 0,7
Muskel pH dag 4	6,28 ± 0,09 ^b	6,30 ± 0,09
Muskel pH dag 14	6,35 ± 0,07	6,32 ± 0,09
Drypptap g dag 14	12,28 ± 7,42	16,19 ± 8,83
Proteininnhold mg/ml (dag 14)	117,8 ± 23,4	142,4 ± 33,7
Vekttap g / 100g filet (% , dag 14)	6,8 ± 2,5	9,3 ± 4,2

a = signifikant forskjell i vanninnhold mellom dag 0 og 14 for fileter uten skinn $p < 0,05$ (n = 9),

b = signifikant forskjell mellom pH på dag 4 og 14 for fileter med skinn $p < 0,05$ (n = 12).

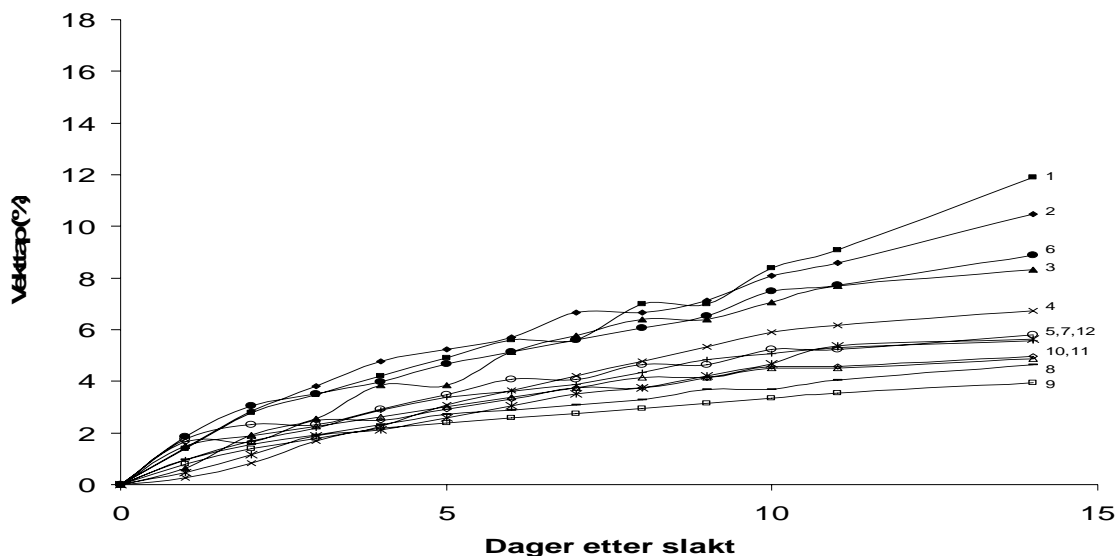
På dag 14 var pH signifikant forskjellig med en økning til $6,35 \pm 0,07$. For fileter uten skinn ble det ikke registrert økning i pH under lagringen.

Drypptapet i g var for fileter med skinn $12,28g \pm 7,42g$ etter 14 dager, mens det var på $16,19g \pm 8,83g$ for fileter uten skinn. Proteinkonsentrasjon i dryppvesken ble målt til $117,8mg/ml \pm 23,4mg/ml$ for fileter med skinn. For fileter uten skinn ble den målt til $142,4mg/ml \pm 33,7mg/ml$. Vekttapet i g/100g filet på $6,8g \pm 2,5g$ for fileter med skinn og $9,3g \pm 4,2g$ for fileter uten skinn.

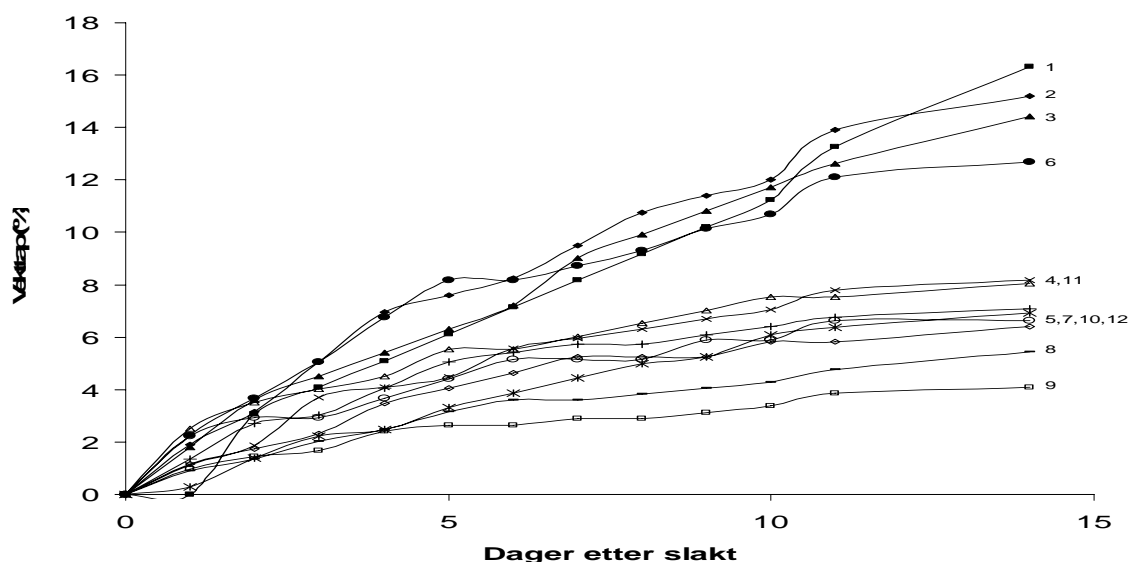
For å undersøke det store standard avviket observert hos de pre-rigor produserte filetene (figur 7) ble vekttapet også uttrykt for hver enkelt filet (figur 8 og figur 9). Her kommer det frem ganske store individuelle forskjeller i væskeslipp. Filetene både med og uten skinn fra fisk nr 1, 2, 3 og 6 hadde alle til dels betydelig høyere væskeslipp enn filetene fra de andre fiskene (nr. 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 og 12).

Resultater

Standardavvikene er i storgrad tydeligvis forankret i at noen fisker (1, 2, 3 og 6) taper relativt mer væske enn de andre 8 (4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 og 12) gjennom hele lagringsforløpet. Kjønnen til fiskene er oppgitt i figurtekst.



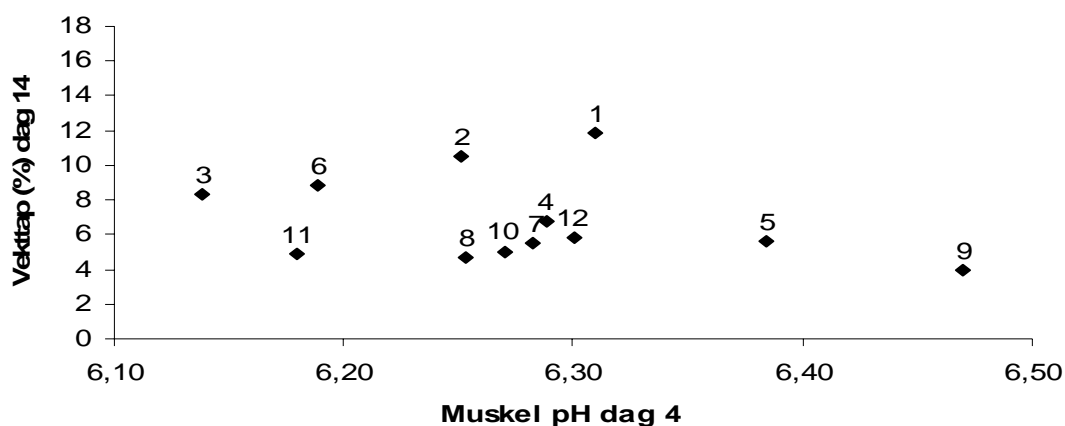
Figur 8. Viser vekttapet for enkeltfiletene (pre-rigor produsert) med skinn under hele lagringsperioden. Fileten er merket med filetnummer i henhold til det som ble brukt under lagringen. Filet 1 (■,♀), filet 2 (◆,♀), filet 3 (▲,♂), filet 4 (x,♀), filet 5 (*,♂), filet 6 (●,♀), filet 7 (+,♂), filet 8 (-,♂), filet 9 (□,♂), filet 10 (◇,♂), filet 11 (△,♀) og filet 12 (○,♂).



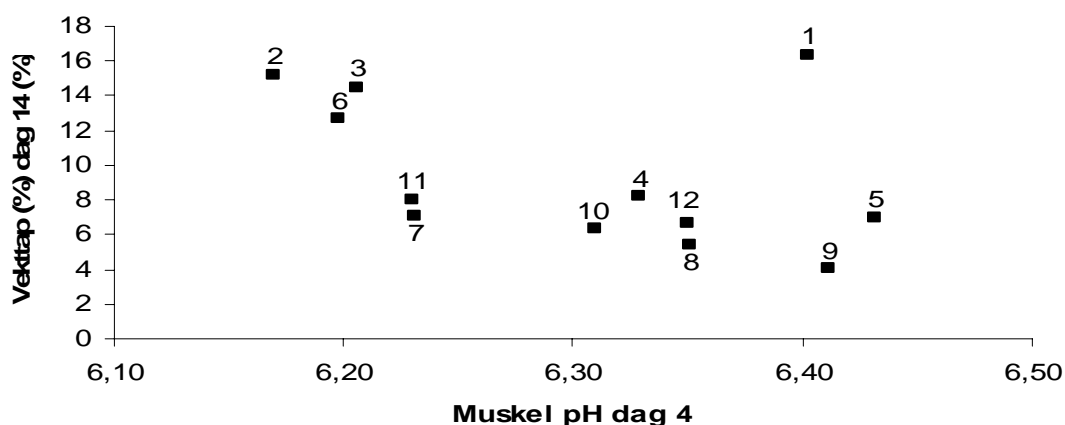
Figur 9. Viser vekttapet for enkeltfiletene (pre-rigor produsert) uten skinn under hele lagringsperioden. Fileten er merket med filetnummer i henhold til det som ble brukt under lagringen. Filet 1 (■,♀), filet 2 (◆,♀), filet 3 (▲,♂), filet 4 (x,♀), filet 5 (*,♂), filet 6 (●,♀), filet 7 (+,♂), filet 8 (-,♂), filet 9 (□,♂), filet 10 (◇,♂), filet 11 (△,♀) og filet 12 (○,♂).

Resultater

For å undersøke en eventuell sammenheng ble vekttapet dag 14 plottet mot muskel pH dag 4 (figur 10 og 11). Resultatene viser at filetene fra fisk 3 og 6 som hadde høyt væskeslipp, hadde lav muskel-pH ($\leq 6,20$). Skinnfilet fra fisk 2 hadde pH = 6,25 mens den skinnfrie filetene fra samme fisk hadde pH = 6,18 (figur 10 og 11) Den fjerde fisken med høyt væskeslipp (fisk nr 1) hadde henholdsvis muskel-pH ved dag 4 på 6,31 og 6,40 for skinnfilet og skinnfri filet. Muskel-pH dag 14 ble også sammenlignet med vekttap dag 14 uten at noen tydelige sammenhenger kom frem (resultater ikke vist).



Figur 10. Viser sammenheng mellom pH og dryp tap for pre-rigor produserte fileter med skinn. Filetene er merket med samme nummer som de hadde under islagringen.

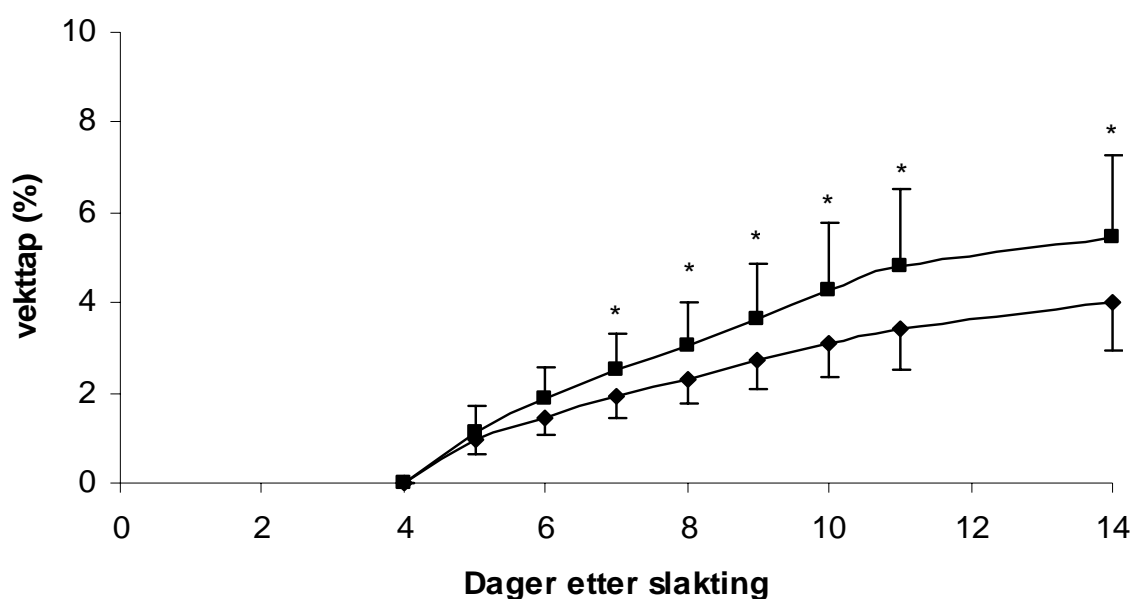


Figur 11. Viser sammenheng mellom pH og dryp tap for pre-rigor produserte fileter uten skinn. Filetene er merket med samme nummer som de hadde under islagringen

Resultater

4.3 Vektforandring hos post-rigor produserte fileter lagret med og uten skinn

Figur 12 viser vekttap hos post-rigor produserte fileter med skinn og uten skinn. Filetene med skinn tapte mindre væske enn fileter uten skinn. Denne forskjellen var signifikant fra dag syv til dag fjorten etter slakt. Fjorten dager etter slakting hadde filetene uten skinn i gjennomsnitt tapt $5,5 \pm 1,8$ % i vekt mens de med skinn hadde tapt $4,0 \pm 1,1$ %.



Figur 12. Vekttap (%) hos post-rigor produserte fileter med (◆) og uten (■) skinn i løpet av 14 dager etter slakting (n = 12). * Signifikante forskjell ($p < 0,05$) mellom filettypene ved samme dag under islagringen. På grunn av stort standardavvik er avvikssøylene vist bare en vei.

Tabell 4 viser egenskaper til post-rigor produserte fileter med og uten skinn under lagringsperioden. På fileteringstidspunktet (dag 4 etter slakting) ble vanninnhold i muskelen målt til $79,1 \% \pm 0,6 \%$ for fileter med skinn og til $80,1 \% \pm 0,8 \%$ for fileter uten skinn. Etter 14 dagers lagring ble vanninnholdet i fileter med skinn målt til $78,9 \% \pm 0,6 \%$. For fileter uten skinn var vanninnholdet fra dag 4 til dag 14 blitt redusert til $78,5 \% \pm 0,6 \%$ ($p < 0,01$).

Resultater

På dag 4 var muskel-pH $6,25 \pm 0,09$ for fileter med skinn. På dag 14 var pH signifikant økt til $6,36 \pm 0,06$. For fileter uten skinn ble det registrert en økning fra $6,26 \pm 0,07$ til $6,31 \pm 0,07$. Drypptapet i gram etter 14 dagers islagring var for fileter med skinn $4,35 \pm 1,95$ g etter 14 dager, mens det var på $6,97 \pm 3,19$ g for fileter uten skinn. Dette var signifikant forskjellig mellom fileter med og uten skinn.

Tabell 4 Egenskaper til post-rigor produserte fileter med skinn (n = 12) og uten skinn (n = 12) og dryppvæsken. (vanninnhold er beregnet ut fra n = 9 i begge grupper).

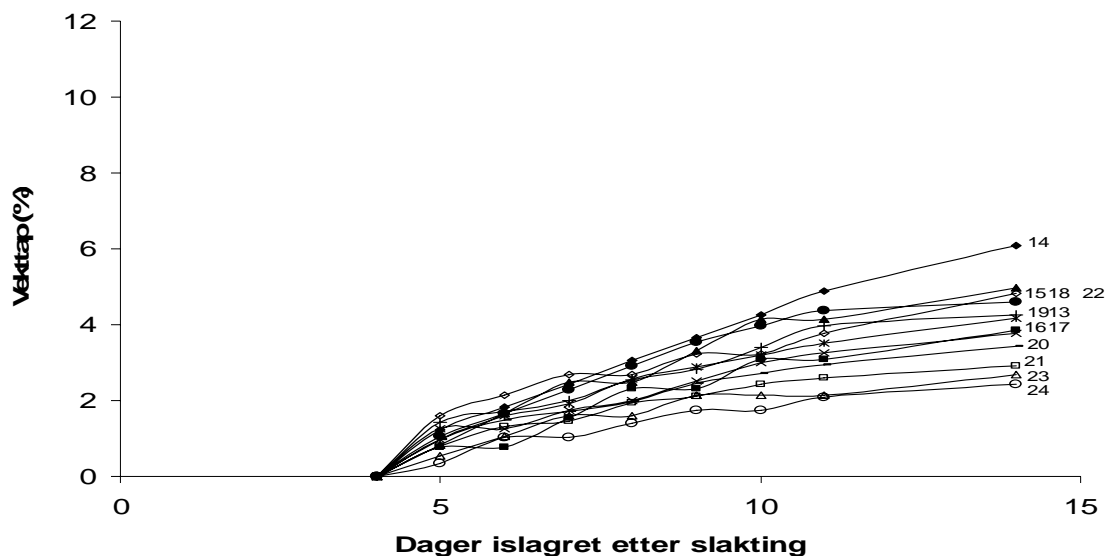
Dager <i>post mortem</i>	Post-rigor med skinn	Post-rigor uten skinn
Vanninnhold (%) dag 4	$79,1 \pm 0,6^a$	$80,1 \pm 0,8^b$
Vanninnhold (%) dag 14	$78,9 \pm 0,6$	$78,5 \pm 0,6$
Muskel pH dag 4	$6,25 \pm 0,09^c$	$6,26 \pm 0,07$
Muskel pH dag 14	$6,36 \pm 0,06$	$6,31 \pm 0,07$
Drypptap g dag 14	$4,35 \pm 1,95^d$	$6,97 \pm 3,19$
Proteininnhold mg/ml (dag 14)	$120,3 \pm 17,0$	$132,3 \pm 27,4$
Vekttap g / 100g filet	$4,0 \pm 1,1^e$	$5,5 \pm 1,8$

a = signifikant forskjell mellom vanninnhold på dag 4 for fileter med og uten skinn (n = 9) $p < 0,01$. **b** = signifikant forskjell mellom vanninnhold på dag 4 og 14 (n = 9) $p < 0,01$. **c** = signifikant forskjell mellom pH dag 4 og 14 for fileter med skinn (n = 12) $p < 0,01$. **d** = signifikant forskjell mellom gram drypptap under lagringstiden som filet (n = 12) $p < 0,05$. **e** = signifikant forskjell mellom proteintap g / 100g filet (n = 12) $p < 0,01$.

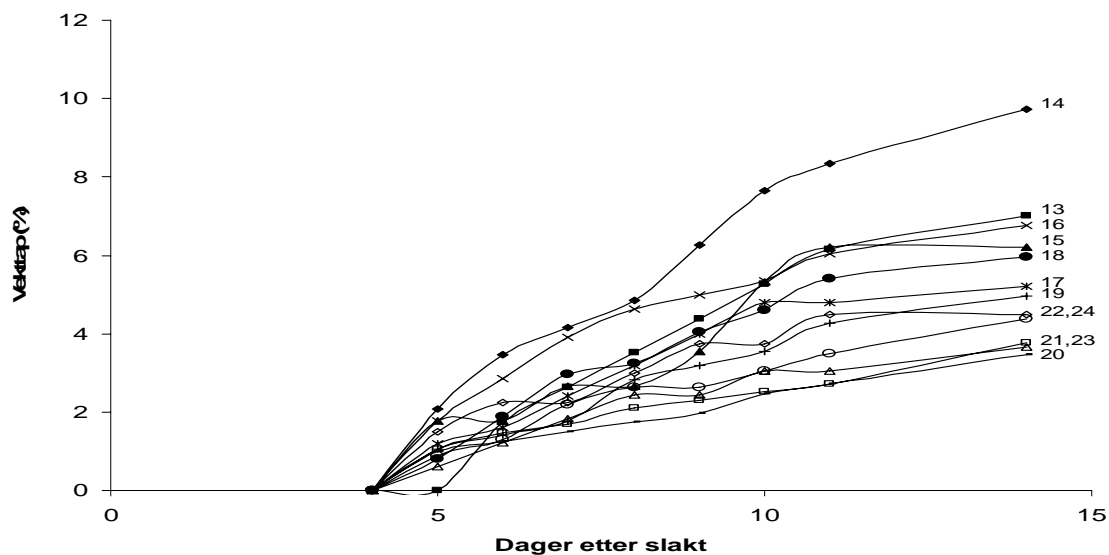
Proteinkonsentrasjon i dryppvesken ble målt til $120,3\text{mg/ml} \pm 17,0\text{mg/ml}$ for fileter med skinn. For fileter uten skinn ble den målt til $132,3\text{mg/ml} \pm 27,4\text{mg/ml}$. Vekttapet i g/100g filet på $4,0\text{g} \pm 1,1\text{g}$ for fileter med skinn som var signifikant forskjellig fra fileter uten skinn som hadde et tap på $5,5\text{g} \pm 1,8\text{g}$. Som for de pre-rigor produserte filetene ble vekttapet for de individuelle filetene produsert post-rigor også uttrykt (figur 12 og 13). Resultatene ble tilsvarende det man fant for de pre-rigor produserte filetene.

Resultater

De store standardavvikene er i storgrad forankret i at det er mer variasjon mellom fiskene. Dette gjelder figur 13 og 14. Kjønnen til fiskene er oppgitt i figurtekst.



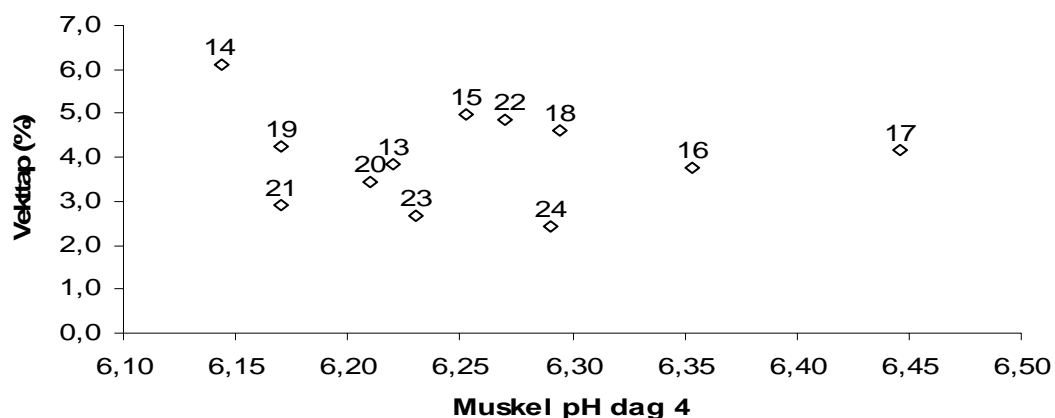
Figur 13 Viser vekttapet for enkeltfiletene (post-rigor produsert) med skinn under hele lagringsperioden. fileten er merket med filetnummer i henhold til det som ble brukt under lagringen. Filet 13 (■,♂) filet 14 (◆,♀) filet 15 (▲,♂) filet 16 (x, ♂) filet 17 (*,♂) filet 18 (●,♀) filet 19 (+,♂) filet 20 (-,♂) filet 21 (□,♂) filet 22 (◇,♂) filet 23 (△,♀) og filet 24 (○,♂)



Figur 15 Viser vekttapet for enkeltfiletene (post-rigor produsert) uten skinn under hele lagringsperioden. Fileten er merket med filetnummer i henhold til det som ble brukt under lagringen. Filet 13 (■,♂) filet 14 (◆,♀) filet 15 (▲,♂) filet 16 (x, ♂) filet 17 (*,♂) filet 18 (●,♀) filet 19 (+,♂) filet 20 (-,♂) filet 21 (□,♂) filet 22 (◇,♂) filet 23 (△,♀) og filet 24 (○,♂)

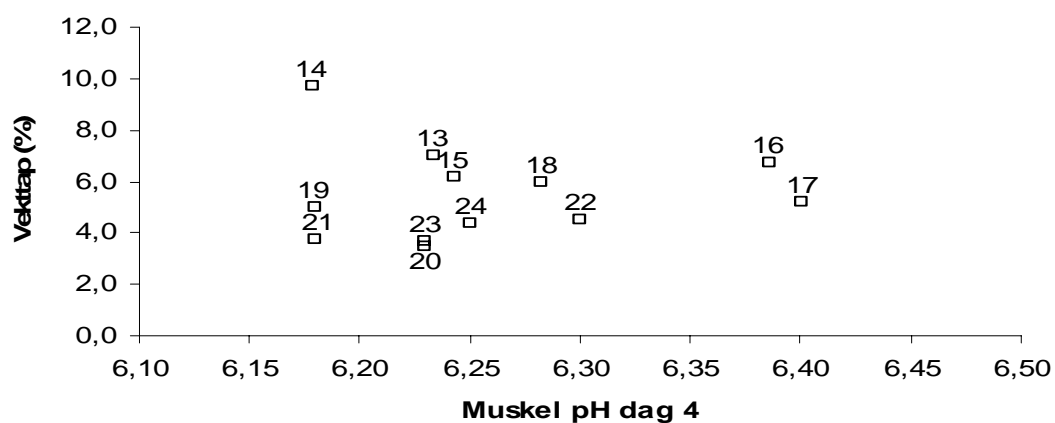
Resultater

Heller ikke hos de post-rigor fileterte filetene med skinn gir noen klar sammenheng mellom pH og vekttap. Da fileter med omentrent samme pH både gir mye og lite vekttap.



Figur 14. Viser sammenheng mellom pH og drypptap for post-rigor produserte fileter med skinn. Filetene er merket med samme nummer som de hadde under islagringen.

Det kan se ut som om det ikke er noen sammenheng mellom pH og vekttap her heller da kun filet 14 skiller seg ut med høyt vekttap. Filet 16 og 17 skiller seg ut med høyere pH enn de andre filetene i figuren. Det kan også sees at filet 14, 19 og 21 har omentrent samme lave pH men drypptapet er til dels ganske forskjellig.

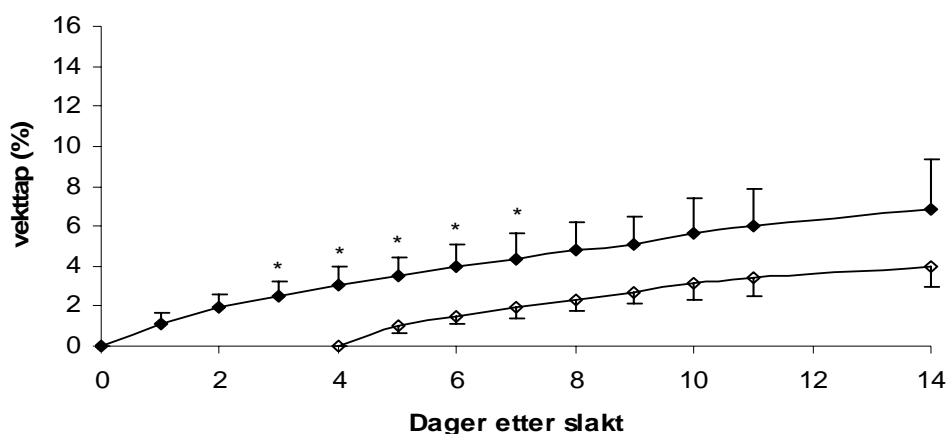


Figur 16 viser sammenheng mellom pH og drypptap for post-rigor produserte fileter med skinn. Filetene er merket med samme nummer som de hadde under islagringen.

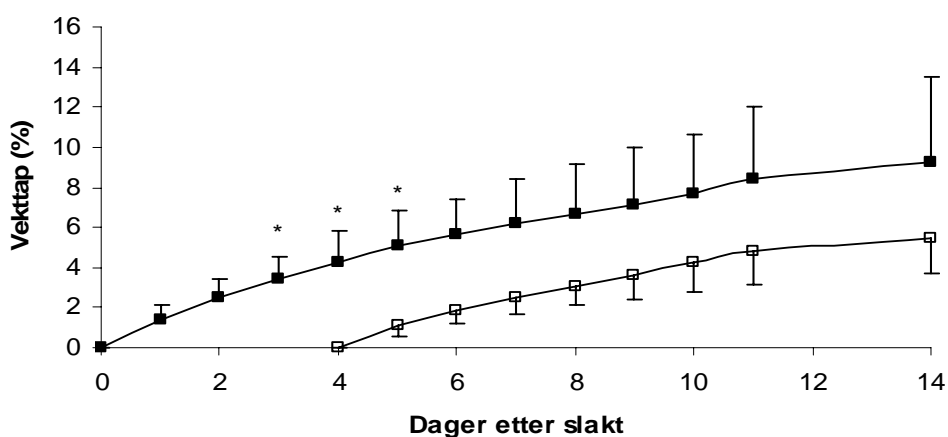
Resultater

4.4 Vekttap for fileter med og uten skinn produsert pre- og post-rigor

For å lettere kunne sammenligne vekttap ved pre- og post-rigor filetering settes vekttapet mot hverandre. Det kommer klart fram at pre-rigor filetering gir høyere vekttap enn post-rigor filetering både for fileter med skinn og uten skinn (figur 17 og 18). Vekttapet for pre- og post-rigor produserte fileter med skinn var henholdsvis $6,8 \% \pm 2,5 \%$ og $4,0 \% \pm 1,1 \%$ ($p < 0,01$). Tilsvarende tall for pre- og post-rigor produserte fileter uten skinn $9,3 \% \pm 4,2 \%$ og $5,5 \% \pm 1,8 \%$ ($p < 0,01$).



Figur 17. Viser vekttap (%) av pre-rigor produserte fileter med skinn (◆) og post-rigor produserte fileter med skinn (◇) ($n = 12$). * signifikant forskjell mellom pre- og post-rigor ($p < 0,05$). På grunn av stort standardavvik er avvikssøylene vist bare en vei.



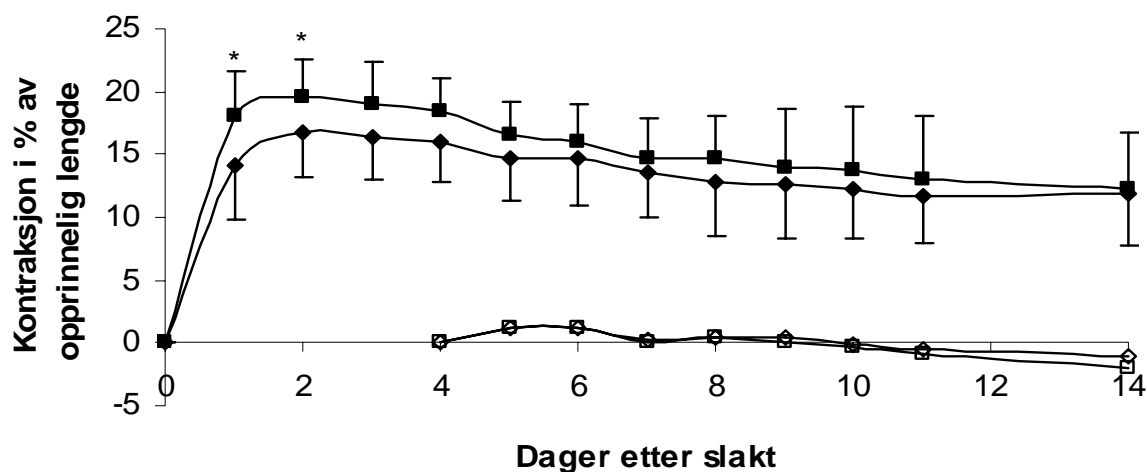
Figur 18. Viser vekttap (%) av pre-rigor produserte fileter uten skinn (■) og post-rigor produserte fileter uten skinn (□) ($n = 12$). Samt de dagene hvor vekttapet var signifikant forskjellig ($p < 0,05$). På grunn av stort standardavvik er avvikssøylene vist bare en vei.

Resultater

4.5 Filet kontraksjon

Det er vel kjent at muskel som får gå i dødsstivhet uten å være festet til ryggspylen blir permanent forkortet. Et spørsmål blir om kontraksjonen påvirkes av om skinnen sitter på eller ikke. Resultatene viser at kontraksjonen ble mindre kraftig hos skinnfileter enn hos skinnfrie fileter (figur 19). Ved dag 1 og 2 etter slakting og filetering hadde skinnfileter signifikant mindre kontraksjon enn skinnfrie fileter. Ved dag 1 var kontraksjonen henholdsvis på $14,1 \pm 4,2 \%$ og $18 \pm 3,7 \%$ mens den ved dag to var $16,7 \pm 3,6 \%$ og $19,6 \pm 3,0 \%$ for skinnfileter og skinnfrie fileter. Videre utover i lagringsperioden ble begge filettypene litt lengre og etter 5 – 6 dager syntes de å være kontrahert omentrent like mye.

Lengdeforandringen ble også målt for filetene produsert post-rigor. Disse ble funnet å være noe lik hos både fileter med og uten skinn.

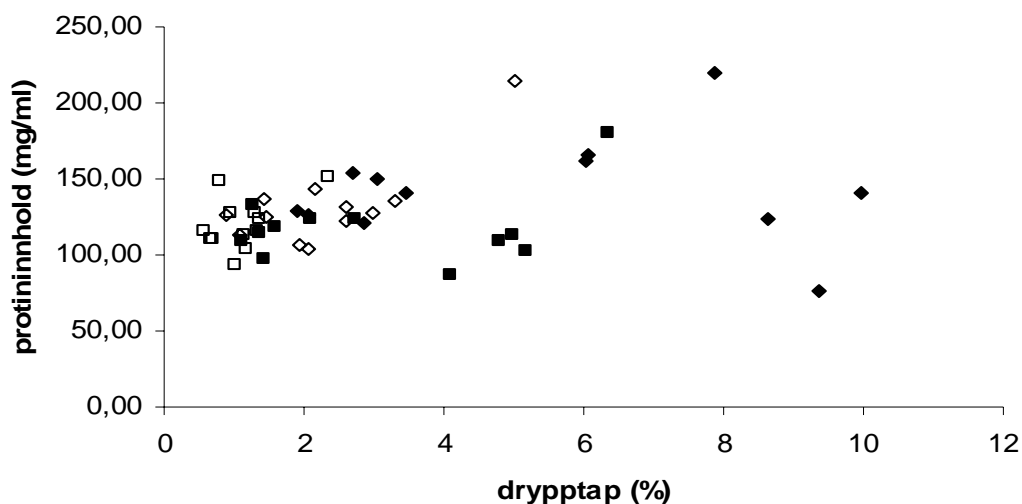


Figur 19 Viser kontraksjon (%) av pre-rigor produserte fileter med (◆) og uten (■) skinn. Samt post-rigor produserte fileter med (◇) og uten (□). * Signifikante forskjell ($p < 0,05$) mellom pre-rigor produserte fileter ved samme lagringsdag.

Resultater

4.6 Proteininnhold i dryppvæsken

Fileter fra forskjellige fisker hadde til dels ulikt drypptap. Et nærliggende spørsmål var om proteintapet korrelerte med drypptap. Resultatet i figur 20 viser at proteinkonsentrasjonen i væsken som ble frigjort fra muskelen var relativt konstant uavhengig av mengden drypp.



Figur 20 Viser sammenheng mellom proteinkonsentrasjonen (mg/ml) i drypptapet og mengden drypptap (%) fra filetene, ved forsøkslutt (dag 14). Pre-rigor med skinn (■), pre-rigor uten skinn (◆), post-rigor med skinn (□) og post-rigor uten skinn (◇).

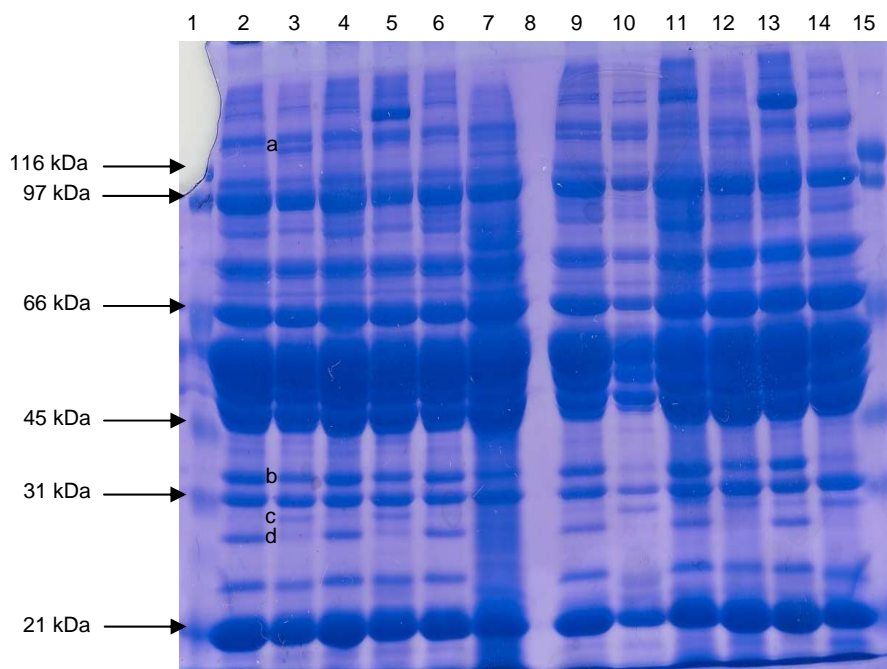
Resultater

4.7 Proteindegradering under islagring av muskel

For å studere proteindegradering under islagring av muskel ble SDS-PAGE med proteinfarging og SDS-PAGE med påfølgende western blotting brukt. Antistoffet var rettet mot myosin tung kjede. Både sarkoplasma- og myofibrillproteiner ble undersøkt.

4.7.1 Sarkoplasmaproteiner – SDS-PAGE

Sarkoplasmaproteiner ekstrahert etter 0 og 14 dager islagring av pre-rigor produserte fileter ble analysert med SDS-PAGE (figur 21).



Figur 21 SDS-PAGE (10 % gel) av sarkoplasmaproteiner fra pre-rigor produserte fileter ekstrahert ved dag 0 og 14 etter slakting. Gelen er farget med Comassie Brilliant Blå Spor 1 og 15 er standard protein og 8 er blank.

Spor 2 og 3: filet 4 med skinn ved tid 0 og 14 dager

Spor 4 og 5: filet 4 uten skinn ved tid 0 og 14 dager

Spor 6 og 7: filet 5 med skinn ved tid 0 og 14 dager

Spor 9 og 10: filet 5 uten skinn ved tid 0 og 14 dager

Spor 11 og 12: filet 6 med skinn ved tid 0 og 14 dager

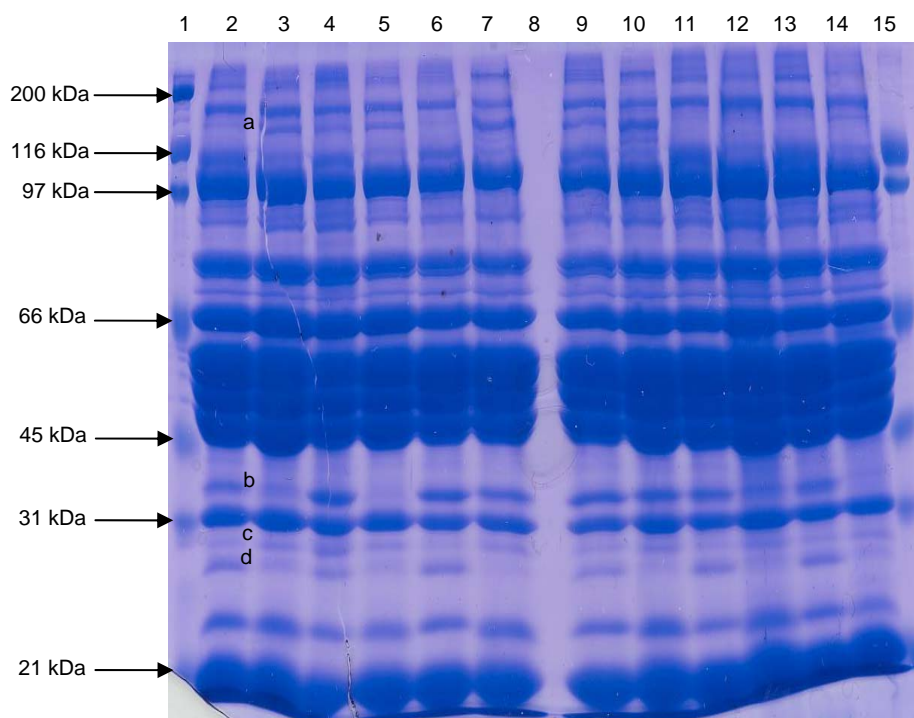
Spor 13 og 14: filet 6 uten skinn ved tid 0 og 14 dager

Resultater

For å få frem forandringene ble mye protein applisert i hver brønn. Proteinkonsentrasjon ble dessverre ikke bestemt i ekstraktene, men vil antakelig være ganske lik fordi ekstraksjonsbetingelsene var like for filetene. Hos noen fileter (filet 5 og 6 uten skinn) synes det som om et bånd med molekylvekt cirka 34 kDa (merket b) reduseres i styrke under islagringen (se spor 9 – 10 og 13 – 14). Tilsvarende ser man en økning hos en av filet (filet 4) av et høymolekylært bånd (merket a).

To forandringer observeres ved alle prøvene. Et band (merket c) med molekylvekt på cirka 30 kDa dannes mens et annet med molekylvekt cirka 27 kDa (merket d) reduseres kraftig under islagringen.

Noenlunde tilsvarende forandringer observeres når sarkoplasmaproteiner fra post-rigor produsert fileter analyseres (figur 22).



Figur 22 SDS-PAGE (10 % gel) av sarkoplasmaproteiner fra post-rigor produserte fileter ekstrahert ved dag 4 og 14 etter slakting. Gelen er farget med Comassie Brilliant Blå Spor 1 og 15 er standard protein og 8 er blank.

Spor 2 og 3: filet 16 med skinn ved tid 4 og 14 dager

Spor 4 og 5: filet 16 uten skinn ved tid 4 og 14 dager

Spor 6 og 7: filet 17 med skinn ved tid 4 og 14 dager

Spor 9 og 10: filet 17 uten skinn ved tid 4 og 14 dager

Spor 11 og 12: filet 18 med skinn ved tid 4 og 14 dager

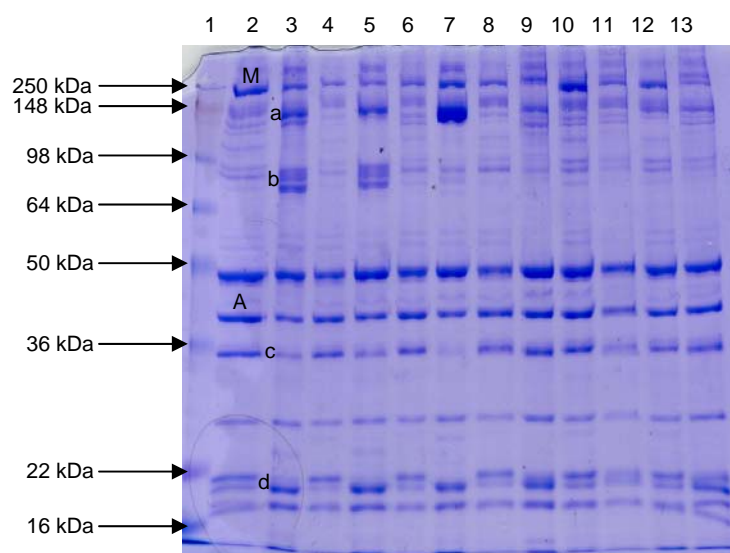
Spor 13 og 14: filet 18 uten skinn ved tid 4 og 14 dager

Resultater

Ved dag 4 observeres imidlertid bånd c hos flere av filetene (filet 16 og 18 uten skinn). Bånd d (Mw 27 kDa) observeres hos alle filetene ved dag 4 men er betydelig redusert ved dag 14. Bånd b (Mw 34 kDa) er blitt redusert fra dag 4 til dag 14 for filet 16 med og uten skinn (spor 2 – 5) og hos filet 18 med og uten skinn (spor 11 – 14). Bånd a har økt i styrke fra dag 4 til dag 14 hos filet 16 med skinn (spor 2 og 3), filet 17 med skinn (spor 6 og 7) og hos filet 18 uten skinn (spor 13 og 14)

4.7.2 Myofibrillproteiner – SDS-PAGE

Myofibrillproteinene ekstrahert fra pre-rigor produserte fileter ved dag 0 og 14 ble også analysert med SDS-PAGE (figur 23). Båndet M indikerer myosin tung kjede (Mw 220 kDa) bånd A indikerer aktin (42 kDa).



Figur 23 SDS-PAGE (10 % gel) av myofibrillproteiner fra pre-rigor produserte fileter ekstrahert ved dag 0 og 14 etter slakting. Gelen er farget med Comassie Brilliant Blå Spor 1 (Seablue) er standard protein.

Spor 2 og 3: filet 9 med skinn ved tid 0 og 14 dager

Spor 4 og 5: filet 9 uten skinn ved tid 0 og 14 dager

Spor 6 og 7: filet 10 med skinn ved tid 0 og 14 dager

Spor 8 og 9: filet 10 uten skinn ved tid 0 og 14 dager

Spor 10 og 11: filet 11 med skinn ved tid 0 og 14 dager

Spor 12 og 13: filet 11 uten skinn ved tid 0 og 14 dager

Heller ikke her ble proteinkonsentrasjonen bestemt, men styrken på aktin båndet kan brukes som indikator for proteinmengden i prøven. Resultatene indikerer at myosin tung kjede (M)

Resultater

degraderes under islagring for de fleste prøvene. Se spor 2, 4, 6, 8, 10, og 12 og sammenlign med henholdsvis spor 3, 5, 7, 9, 11 og 13. Degradasjonsproduktene tyder på å være i størrelsesordenen 130 – 140 kDa (a) og 70 – 90 kDa (b). I tillegg observeres degradering av et protein med Mw på cirka 34 kDa (merket c) og et med Mw på cirka 20 kDa (merket d) hos de fleste prøvene.

4.7.3 Myofibrillproteiner – SDS-PAGE og Western blotting

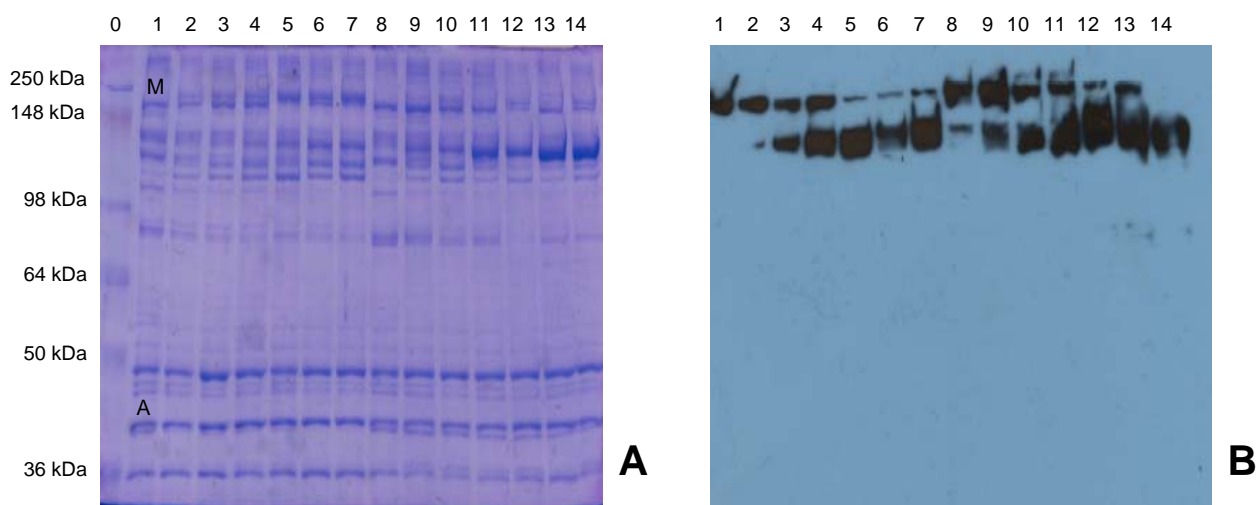
For å undersøke degradering av myosin tung kjede under islagring ble myofibrillproteiner ekstrahert fra muskelprøver på flere tidspunkt og analysert ved hjelp av SDS-PAGE og Western blotting. Ekstraksjonene av muskel ble utført ved 0 og 18 timer og ved 2, 4, 8, 11 og 14 dager etter slakting. Muskelprøvene ble vasket med azidløsning mens de sto på is i 30 minutter og ble så lagret på is i kjøleskap. Totalt ble muskelprøver fra 6 fisker undersøkt (fisk nr 4, 7, 8, 9, 10 og 11).

Figur 24 A viser degradering av myofibrillproteinene fra fisk 4 (spor 1 – 7) og fra fisk 7 (spor 8 – 14) farget for protein. Figur 24 B viser tilsvarende prøver (fisk 4; spor 1 til 7 og fisk 7; spor 8 til 14) blottet mot antistoff mot myosin tung kjede. Proteinfargingen indikerer en økning i mengden proteinbånd med molekylvekt i området 110 – 130 kDa. Det er imidlertid ingen entydig nedgang i det bandet som antas å være myosin tung kjede. Med antistoff mot myosin tung kjede kan man imidlertid se et klarere mønster. I løpet av det første døgnet (figur 24 B spor 1, 2 og 8,9) dominerer det høymolekylære immunreaktive båndet (Mw cirka 220 kDa). Videre utover i lagringen ser man økningen i båndene med Mw 110 – 130 kDa og en nedgang i båndet med Mw cirka 220 kDa. Omentrent tilsvarende mønster ser vi hos fisk 8 og 9 (figur 25) og fisk 10 og 11 (figur 26).

Man kan ut fra figur 23 A og B se lett å se myosindegradering når man har flere dagers islagringsforsøk, her sees to forskjellige pre-rigor produserte fileter og degradering på myofibrillproteinene. Det vises veldig godt at det er band på cirka 120 kDa som blir kraftigere og kraftigere utover lagringsperioden for begge filetene, samt på filet fire ser det ut til at det er et band som kommer høyere og høyere utover lagringsperioden. Dette kan være nedbrytningsprodukter av titin (conectin) eller nebulin. Samt forsvinner et band på noe over 100 kDa under islagringen. På blotene kan man se at myosin degraderes slik at det blir mer og mer myosin med en molekylvekt på cirka 120 kDa, og mindre med en molekylvekt på rundt 220 kDa.

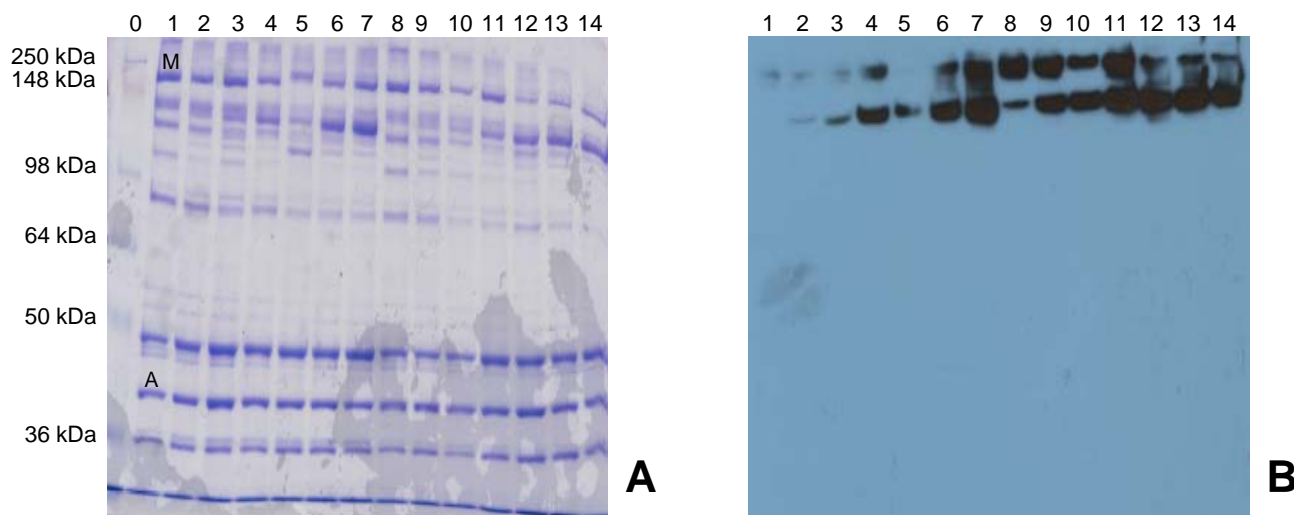
Resultater

Fisk 4 og 7



Figur 24 SDS-PAGE (7,5 % gel) (figur A) og westernblotting (figur B) av myofibrillproteiner ekstrahert under islagring. Antistoff var rettet mot myosin tung kjede. 3 μ g protein applisert i hver brønn. Spor 1 – 7 fisk 4 ekstrahert etter henholdsvis 0 og 18 timer, 2, 4, 8, 11 og 14 dager. Spor 8 – 14 fisk 7 ekstrahert etter henholdsvis 0 og 18 timer, 2, 4, 8, 11 og 14 dager.

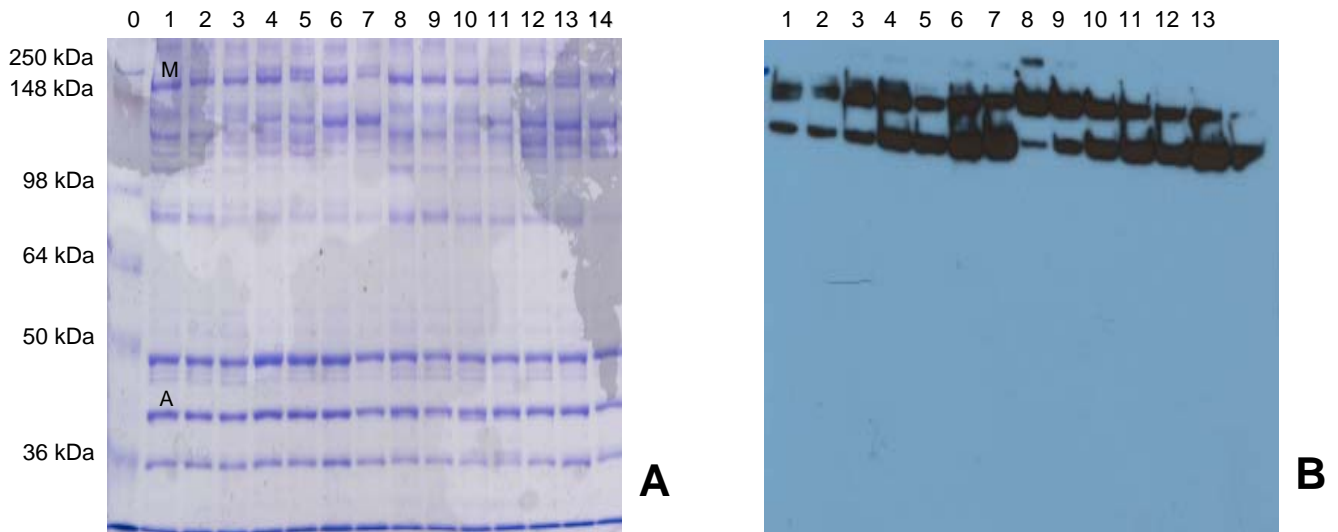
Fisk 8 og 9



Figur 25 SDS-PAGE (7,5 % gel) (figur A) og westernblotting (figur B) av myofibrillproteiner ekstrahert under islagring. 3 μ g protein applisert i hver brønn. Spor 1 – 7 fisk 8 ekstrahert etter henholdsvis 0 og 18 timer, 2, 4, 8, 11 og 14 dager. Spor 8 – 14 fisk 9 ekstrahert etter henholdsvis 0 og 18 timer, 2, 4, 8, 11 og 14 dager.

Resultater

Fisk 10 og 11

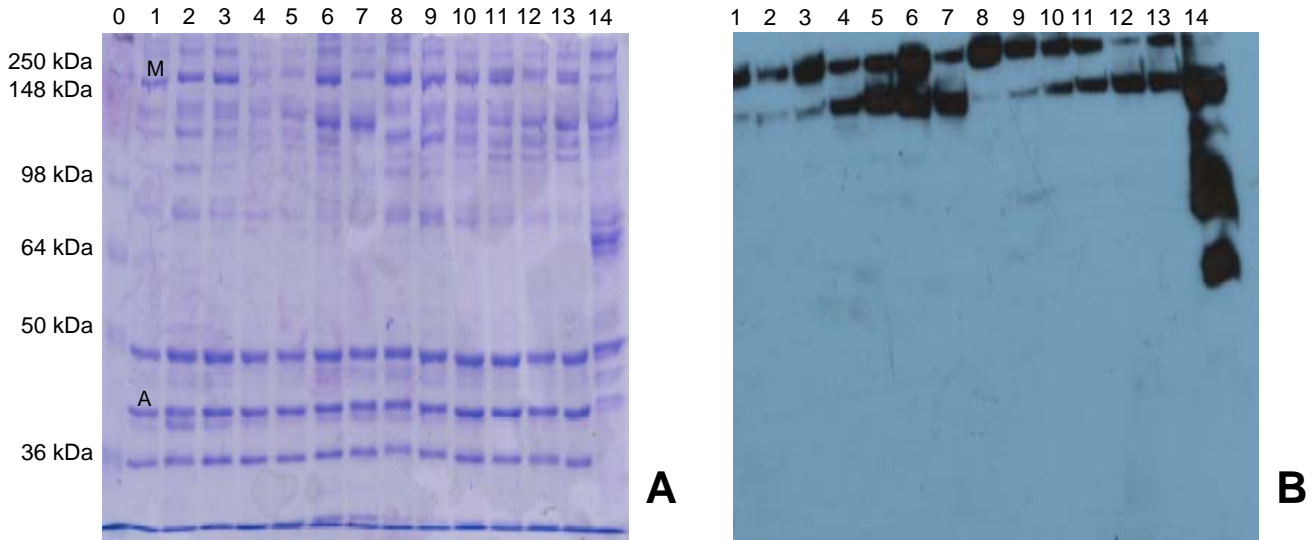


Figur 26 SDS-PAGE (7,5 % gel) (figur A) og westernblotting (figur B) av myofibrillproteiner ekstrahert under islagring. 3 μ g protein applisert i hver brønn. Spor 1 – 7 fisk 10 ekstrahert etter henholdsvis 0 og 18 timer, 2, 4, 8, 11 og 14 dager. Spor 8 – 14 fisk 11 ekstrahert etter henholdsvis 0 og 18 timer, 2, 4, 8, 11 og 14 dager.

Resultater

Kontrollprøver fisk 9 og 10

Muskel biter fra fisk 9 og 10 ble også lagret uten at de hadde vært behandlet med azid (figur 27). Det observerte degraderingsmønsteret er omentrent tilsvarende det man fant for de samme prøvene som var azid behandlet.

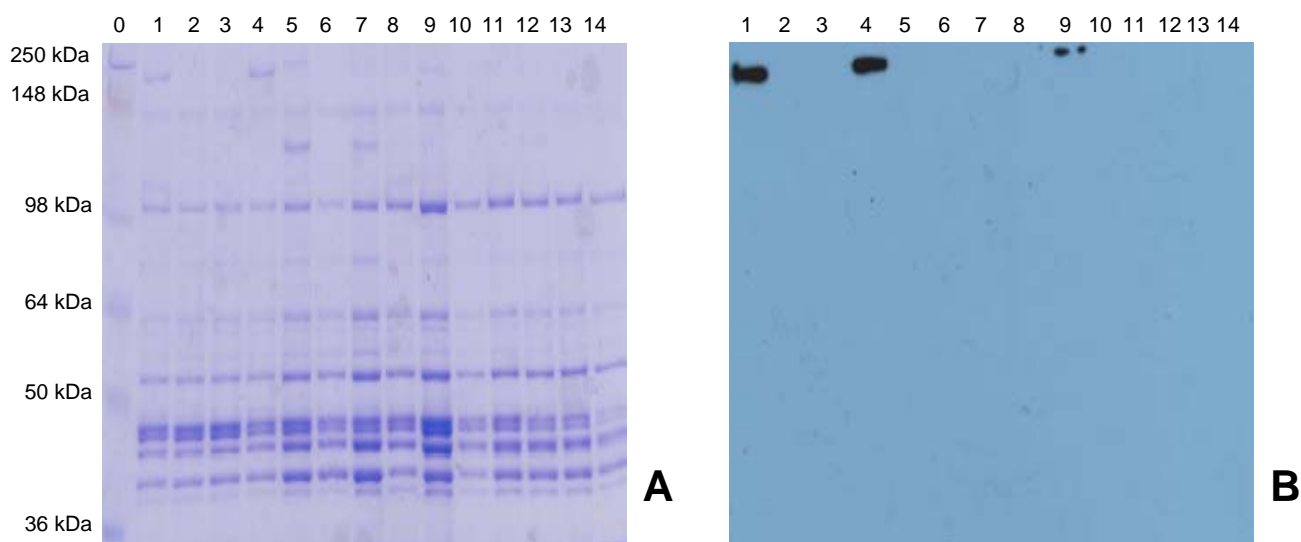


Figur 27 SDS-PAGE (7,5 % gel) (figur A) og westernblotting (figur B) av myofibrillproteiner ekstrahert under islagring. 3 μ g protein applisert i hver brønn. Spor 1 – 7 fisk 9 (kontroll) ekstrahert etter henholdsvis 0 og 18 timer, 2, 4, 8, 11 og 14 dager. Spor 8 – 14 fisk 10 (kontroll) ekstrahert etter henholdsvis 0 og 18 timer, 2, 4, 8, 11 og 14 dager.

Resultater

4.7.4 Sarkoplasmaproteiner – SDS-PAGE og Western blotting

Det ble lett etter myofibrillproteiner i sarkoplasmafraksjonen også for å sikre at det ikke var degraderingsprodukter som ble ekstrahert ut sammen med denne fraksjonen (figur 28). Det var ikke mye myofibrillproteiner som ble ekstrahert ut i sarkoplasmafraksjonen. Det kan sees på blottet at det er ekstrahert ut myosin tung kjede ved tre anledninger, filet 4 etter 0 timer og etter 4 dager, mens på filet 7 ble det ekstrahert ut myofibrillproteiner på dag to i lagringsforsøket. Degraderingsprodukter påvises ikke. Ved proteinfarging kan man se svake bånd tilsvarende immunreaktive bånd (figur 28A). Det ble utført analyser på sarkoplasmafraksjonen fra alle fisker med noe likt resultat som figur 28 (resultater ikke vist).



Figur 28 SDS-PAGE (7,5 % gel) (figur A) og westernblotting (figur B) av sarkoplasmaproteiner ekstrahert under islagring. 3 μ g protein applisert i hver brønn. Spor 1 – 7 fisk 4 ekstrahert etter henholdsvis 0 og 18 timer, 2, 4, 8, 11 og 14 dager. Spor 8 – 14 fisk 7 (kontroll) ekstrahert etter henholdsvis 0 og 18 timer, 2, 4, 8, 11 og 14 dager.

5 Diskusjon

Det er gjort mange studier på muskelens evne til å holde på vann (Offer & Knight 1988; Huff-Lonergan 2005 og referanser her i). Dette er en av de viktigste kvalitetsegenskapene til rått kjøtt og for den saks skyld rå fisk (Huff-Lonergan & Lonergan 2005). Vannbindingsevnen til et produkt kan brukes som et viktig redskap for å beskrive produktets kvalitetsegenskaper (Ofstad *et al.* 1996). Det meste av vannet som påvirkes av omdanningsprosessen hvor muskel blir til kjøtt er det immobiliserte vannet. Faktorer som kan påvirke dette er ladningen til myofibrillproteiner, muskelcellens struktur og komponenter i tillegg til plass i det ekstra cellulære rom (Huff-Lonergan & Lonergan 2005). Ikke mister muskel bare vann, men det er også til dels mye proteiner i dryppvæsken. Mesteparten av proteinene er vannløselige sarkoplasmaproteiner (Huff-Lonergan & Lonergan 2005). Det er flere grunner som gjør at væsketapet er uønskelig. Først og fremst er det av økonomisk betydning siden kjøtt og fisk selges etter vekt. Konsumentene kan miste lysten på produktet når det flyter i vann og væsketapet kan føre til at produktet mister sin saftighet og tekstur (Offer & Trinick 1983). Fisk har ganske ulik muskel oppbygning i forhold til mammalia og det er i hovedsak to faktorer som påvirker drypptapet i oppdrettsfisk. Dette avhenger spesielt av fiskeslag og fôringsregimer (Ofstad *et al.* 1996). Tung fôring av oppdrettet fisk kan føre til redusert filetkvalitet og gadoide fiskeslag har spesielt dårlig vannbindingsevne (Love *et al.* 1969; Ofstad *et al.* 1996; Kristoffersen *et al.* 2006).

Oppdrettstorsken i forsøket hadde god markedsvekt og var i god biologisk kondisjon med en K-faktor på $1,25 \pm 0,2$. Dette er tilsvarende det andre har funnet for oppdrettstorsk (Mørkøre 2006; Kristoffersen *et al.* 2006; Kristoffersen *et al.* 2007). Fisken hadde også høyt leverinnhold (høy HSI). Høy HSI er vanlig å finne hos fôrete gadoider fordi fett lagres i leveren, ikke i muskelen som hos blant annet laks (Jobling 1988). Det var ikke tegn til at fisken i dette forsøket hadde begynt gonadeoppbyggingen. Dette kan sies på grunn av den lave GSI ($1,4 \pm 1,0$) på fisken.

Det ble ikke funnet vektdifferanse mellom dag 0 og 4 hos fiskene som skulle produseres post-rigor. Dette bekrefter at det ikke er vekttap når fisken er iset på forskriftsmessig måte som sløyd fisk og dette ble også funnet av Kristoffersen *et al.* (2007).

Vekten av fileter med skinn var i dette forsøket 5 - 7 % høyere enn for de uten skinn. Hvis det er slik i industrien også er det snakk om til dels mye penger, men filetene var håndskåret slik at det kan ligge varians i dette og det må sees nærmere på i industrien for å kunne si noe sikkert på dette området. I dette forsøket ble bukene skåret av filetene slik at det

Diskusjon

var beinfrie fileter uten blekkhinnen og bukparti. Kristoffersen *et al.* 2007 hadde et høyere filetutbytte (cirka 34 – 39 %) enn det som ble oppnådd i dette forsøket (cirka 30 % for skinnfileter og cirka 24 % for skinnfrie fileter).

Drypptap fra filetene ble redusert ved å beholde skinnen på fileten. Pre-rigor produserte fileter med skinn tapte gjennomsnittelig $6,8 \pm 2,5$ % mot de uten skinn som tapte gjennomsnittelig $9,3 \pm 4,2$ %. Dette er en differanse på 3,5 %. Noe som må sies å være betydelig. Det samme viste seg gjeldene for post-rigor produserte fileter. Der tapte skinnfiletene $4,0 \pm 1,1$ % mot de uten skinn som tapte $5,5 \pm 1,8$ % dette gir en differanse på 1,5 %. Differansen er ikke like stor hos post-rigor produserte fileter, men de tapte i tillegg omentrent halvparten av vekten til de pre-rigor produserte filetene. Disse resultatene korrelerer med det funnet av Kristoffersen *et al.* (2007) hvor de fant henholdsvis 10 % og 5 % for pre- og post-rigor produserte fileter. Kristoffersen *et al.* (2007) hadde bare skinnfrie fileter i deres forsøk. Kristoffersen *et al.* (2006) fant et drypptap på henholdsvis 15 og 11 % for pre- og post-rigor produserte fileter uten skinn. Disse filetene var lagret ved 5 °C i 6 dager. Dette kan tyde på at jo varmer en lagrer filetene jo mer væske vil de slippe. Årsaken til det lavere væskeslippet fra skinnfileter må være at skinnen rett og slett forhindrer muskelen i å tape vann til omgivelsene. Dette så man tydelig når sløyd fisk ble iset til oppløsning av RM. De store standardavvikene i figur 7 er forankret i at fisk 1, 2, 3 og 6 taper mye mer vekt enn de andre filetene og dette ser ut til å være det samme for fileter med og uten skinn. Det antas at dette er grunnen til de store standardavvikene og er skyld i at det ikke ble funnet signifikant forskjell mellom pre-rigor produserte fileter med og uten skinn ved dag 10 og 14 etter filetering. Når man tar for seg de post-rigor produserte filetene med og uten skinn er det et litt annerledes bilde. Der er det mye større variasjon mellom alle enkelt filetene og bare filet 14 har utmerket seg med et spesielt høyt vekttap.

Siden fileter uten skinn taper mest væske under islagringen var spørsmålet om dette kunne påvises ved å måle vanninnhold i filetene etter endt lagring. For begge gruppene uten skinn var det en signifikant reduksjon i vanninnhold fra dag 0 og 4 til dag 14. En slik signifikant reduksjon så man ikke for fileter med skinn. Selv om vanninnholdet syntes å være lavere i fileter uten skinn på dag 14 sammenlignet med skinnfileter, så var den forskjellen ikke signifikant hverken for pre- eller post-rigor produserte fileter. For post-rigor produserte fileter syntes det å være forskjell i vanninnholdet mellom skinnfileter og skinnfrie fileter på dag 4 etter slakting. Filetene uten skinn ble til og med målt til å ha høyere vanninnhold. Årsaken til dette er vanskelig å forklare og det er fristende å tro at resultatet har med målingen å gjøre. Det bør nevnes at det var generelt et lavt vanninnhold i prøvene.

Diskusjon

Det var stor variasjon i væskeslippet hos de ulike filetene og noen av de filetene med høyt væskeslipp hadde lav endelig pH i muskelen, men ikke alle. Lav endelig muskel-pH fører til at proteinene i muskelen nærmer seg sitt isoelektriskepunkt og dette fører til en lavere vannbindingsevne. Muskel-pH ble målt med stikk elektrode og da dessverre på samme punkt i filetene. I ettertid ser man at dette kanskje ikke har vært tilstrekkelig for å få representativt resultat. En annen vanlig metode for å måle muskel-pH er å blande en del (10 – 100g) oppmalt muskel med tilsvarende mengde 0,15M KCl (Esaiassen *et al.* 2008). Med 3 slike prøver kunne man bedre ha fanget opp forskjeller i muskel-pH på ulike deler av fileten. Det synes heller ikke å være klare sammenhenger mellom kjønn og vektta på hos filetene. Det var ikke signifikant forskjell i pH for skinnfrie fileter produsert pre-rigor. Det var signifikant økning fra 6,28 til 6,35 hos pre-rigor produserte fileter med skinn. Det samme ser man for post-rigor produserte fileter. Der er det heller ikke signifikant økning i pH for skinnfrie fileter, men signifikant økning i skinnfilettene fra 6,25 til 6,36 som er omentrent samme trenden man så hos de pre-rigor produserte filetene. Denne økningen kan komme av at skinnet sitter på fileten og at det er en del psykrofile bakterier som har tilhold på skinnet. Slik at disse filetene er mer utsatt for bakteriell bederelse enn filetene uten skinn. Det må mer forskning til på dette området for å få svar på dette.

Kristoffersen *et al.* (2007) fant en kontraksjon hos pre-rigor produserte fileter av oppdrettstorsk på 27 % av opprinnelig filetlengde. Det var ikke like kraftig kontraksjon i dette forsøket. Pre-rigor produserte fileter uten skinn hadde den kraftigste kontraksjonene i forsøket. Disse filetene hadde en gjennomsnittelig kontraksjon på cirka $19,6 \pm 3,0$ % av opprinnelig filetlengde to dager etter filetering. De pre-rigor produserte filetene med skinn hadde noe svakere kontraksjon to dager etter filetering med en gjennomsnittelig lengde reduksjon på cirka $16,7 \pm 3,6$ % av opprinnelig filetlengde. Dette gir en differanse på cirka 3 % slik at det er en betydelig differanse også her. Spesielt med tanke på at mye av vannet i muskel befinner seg innen myofibrillene og mer vann vil bli presset ut jo kraftigere kontraksjon på grunn av volum endringer i myofibrillene. Denne forandringen i muskelen skaper ”kanaler” som fører til at det blir lettere for væske å lekke ut til omgivelsene (Offer & Knight 1988). Noen forskergrupper har til og med referert til disse kanalene som dryppkanaler (Huff-Lonergan & Lonergan 2005). Av figur 19 kan det se ut til at pre-rigor produserte fileter med skinn har senere inngang i RM. Etter to dager begynte filetene å strekke seg ut igjen når RM begynte å løses opp og på slutten av lagringsperioden var kontraksjonen på cirka 12 % for begge filettypene. Årsaken til en svakere og forsinket rigorkontraksjon kan være at det å fjerne skinnet er en fysisk belastning som fører til rasker ATP nedbrytning. I tillegg vil skinnet i seg selv

Diskusjon

hemme kontraksjonen av muskelen. Hos laks er dette et mindre problem siden de ikke trekker seg like mye sammen som torsk (Sørensen *et al.* 1997; Einen *et al.* 2002) og derved endrer ikke miofibrillene seg like mye. En annen ting som det kan være greit å nevne er at laks ofte lagres og selges med skinnet på filetene. Dette kan være en medvirkende faktor til lavere væskeslipp i tillegg til at arten i seg selv slipper mindre væske enn torsk dette er også funnet av Ofstad *et al.* (1996). Forskjeller mellom torsk og laks er ikke kjent, men både muskelsammensetting med et høyt fettinnhold og strukturelle egenskaper kan være av betydning (Ofstad *et al.* 1996; Kristoffersen *et al.* 2007).

Det er kjent at velfød fisk som oppdrettstorsk har raskere og kraftigere proteindegradering i muskelen *post mortem* enn vanlig variant av arten (Ofstad *et al.* 1996). Man har imidlertid ikke full klarhet i hvilke muskelproteiner som degraderes og gir opphav til redusert muskelkvalitet som for eksempel filetspalting og bløt muskel. Tradisjonelt har det vært vanlig å bruke SDS-PAGE med proteinfarging for å undersøke proteindegradering i muskel *post mortem*. Metoden er imidlertid ikke særlig velegnet spesielt på komplekse proteinblandinger slik som sarkoplasmaproteiner. Dette fordi det er vanskelig å identifisere proteinbåndene og hvilke proteiner som degraderes til lavmolekylære bånd. Det er ofte også vanskelig å detektere en reduksjon i proteinmengde med proteinfarging dersom proteinmengden er stor. Det er mye bedre å bruke immunologiske metoder som Western blotting hvor man har antistoff rettet mot spesifikke proteiner. En slik metode er følsom og kan lett identifisere nedbrytningsprodukter (Bandman & Zdanis 1988). Generelt utgjør myofibrillproteinene ofte nærmere 60 % i muskel, 20 – 30 % er sarkoplasmaproteiner mens bindevevsproteiner utgjør resten. Myosin utgjør nesten halvparten av myofibrillproteinene. I oppgaven ble både sarkoplasma- og myofibrillproteinene i løpet av islagringen undersøkt med SDS-PAGE og med Western blotting.

SDS-PAGE analyser av muskel proteiner viste at forandringer skjedde både med sarkoplasmaproteinene og myofibrillproteinene. I sarkoplasmaproteinene bemerkes spesielt dannelsen av et 30 kDa bånd og at et bånd med molekylvekt 27 kDa som ble redusert kraftig under lagringen. Det er identifiserte et degraderings produkt av troponin-T på 30 kDa som kommer frem under lagring av oksekjøtt (Ho *et al.* 1994; Negishi *et al.* 1996). Det antas at det er dette bandet som man ser i sarkoplasmafraksjonen. Det kan likevel ikke sies sikkert siden gelene ikke er blottet med antistoff mot troponin-T. De andre forandringene hos sarkoplasmatiske proteiner er ikke like tydelige hos alle enkelt fisk og det vil derfor bare bli spekulasjoner å si noe om identiteten. Ved analyser av myofibrillproteiner ser man at det dannes flere proteinbånd under lagringen med molekylvekt 130 – 140 kDa og 70 – 90 kDa.

Diskusjon

Dette kan være degraderingsprodukter av myosin tung kjede. I tillegg reduseres et bånd med molekylvekt cirka 36 kDa. Myosin er som nevnt hovedproteinet i myofibrillfraksjon og mulig degradering ble derfor undersøkt i Western blott analyse.

Bandman & Zdanis (1988) fant degraderingsprodukter på mellom 120 og 125 kDa og flere polypeptidkjeder mellom 50 og 95 kDa ved lagring av oksekjøtt ved 37 °C. De konkluderte med at myosindegraderingen i kjøtt er svært temperaturavhengig siden de ikke fant myosindegradering ved 4 °C. Lagring ved så høy temperatur som 37 °C er irrelevant for kjøtt og kylling.

Mange forfatter skriver at det er katepsiner som er ansvarlig for myosindegraderingen i post-mortem muskel. Bandman & Zdanis (1988) mener det i hovedsak er Katepsin B, D, og L som er ansvarlig for nedbrytningen av myosin. Disse resultatene er også funnet i havabbor der man det er på vist at myosin tung kjede ble nedbrutt av Katepsin B, D og L (Ladrat *et al.* 2003). Ikeucho *et al.* (2001) på den andre siden mener at det i hovedsak er katepsin D som forårsaker myosindegraderingen. Dette på bakgrunn av at de har innkubert myosin med katepsin D og dette ga stort sett samme resultat som når degraderingen fikk gå ved 37 °C. Det er flere forfattere som hevder myosin tung kjede er relativt stabilt under *post mortem* lagring av fiskemuskel (Astier *et al.* 1991; Verrez-Bagnis *et al.* 2001; Jasra *et al.* 2001). Når det gjelder kjøtt er det også mange som mener at myosin er stabilt ved lagring under kjøletemperatur (Bandman & Zdanis 1988; Ikeucho *et al.* 2001). Begge disse forskningsgruppene fant myosindegradering ved lagring av muskel ved 37 °C.

I denne oppgaven er det ved å bruke antistoff rettet mot myosin tung kjede funnet at denne degraderes under islagringen. Degraderingsmønsteret er ganske likt det som ble rapportert av Bandman & Zdanis (1988) for kjøtt, men de mindre polypeptidkjedene som er rapportert av Bandman & Zdnis (1988) ble ikke funnet i våre prøver. Det kan tenkes at disse ville kommet frem ved sterkere antistofffortynning.

Verrez-Bagnis har studert proteindegradering hos havabbor (*Dicentrarchus labrax*) som er en fisk som liker seg ved temperaturer fra 8 til 24 °C og man kan finne den i våre farvann. De fant titin og nebulin degradering samt 100 % dystrofin degradering. De andre myofibrillproteinene var relativt uforandret opptil 6 døgn etter slakt ved islagring. Jasra *et al.* (2001) hadde studert Karpe (*Labeo rohita*) som er en fisk fra tropiske strøk. Der fant de myosin tung kjede, aktin og tropomyosin var relativt stabilt under lagring i 15 dager. Astier *et al.* (1991) brukte sardiner (*Sardina pilchardus*) som kan finnes hos oss tid om annen og dorado (*Sparus auratus*) som også er en subtropisk fisk. Ved lagring av muskel ved 0 og 20 °C fant de degradering av myosin ved 20 °C. Det må sies at 20 °C er en irrelevant temperatur

Diskusjon

å lagre fisk under. Disse resultatene er i hovedsak funnet ved SDS-PAGE, men Astier *et al.*(1991) blottet med antistoff rettet mot myosin.

Våre analyser på myosin tung kjede hos torsk gir et klart bilde av at myosin tung kjede degraderes ved islagring av torskefileter (0 °C). Torsk er en fisk som ofte lever ved kaldere temperaturer enn de nevnt ovenfor og vokser best i oppdrettssituasjon med en temperatur på litt over 12 °C. Den kan leve ved bortimot 0 °C.

Det vil være forskjeller i enzymsystemet til arktiske og tropiske fisker siden enzymsystemet er tilpasset de naturlige temperatur områdene fisken lever under. Slik vil det bli forskjeller under islagring av arter som er tilpasset subtropiske og tropiske områder i forhold til arktiske arter. Man vil med islagring av varmekjære arter sette enzymsystemet mer ut av spill enn ved islagring av arktiske arter for eksempel torsk.

Konklusjon

6 Konklusjon

Resultatene i oppgaven bekrefter at islagring på forskriftsmessig måte av sløyd oppdrettstorsk som går gjennom RM fasen, ikke forandrer vekt. Skinnfrie fileter derimot kan ha et vekttap på grunn av veskeslipp på opptil 10 % i løpet av 14 dager islagring etter slakting. En måte å redusere dette på er å produsere fileter med skinn. Dette kan redusere vekttapet med 25 – 30 % hos pre-rigor produserte fileter. Antagelig er det ikke bare skinnet på fileten som bidrar, men også det at rigor kontraksjonen synes å bli mindre kraftig hos skinnfileter. Produksjon av skinnfileter gir 5 – 7 % høyere utbytte sammenlignet med skinnfrie fileter. Dette vil også kunne ha økonomisk betydning for produsenter av oppdrettstorsk. Slik filetering gir betydelig bedre kvalitet med henhold på filetspalting.

Ved å bruke antistoff rettet mot myosin tung kjede av myosin er det blitt vist at dette molekylet brytes ned i betydelig grad under islagring. Basert på mindre følsomme metoder har man tidligere trodd at dett ikke var tilfellet. Siden myosin er det kvantitativt dominerende proteinet i muskel så kan en slik nedbrytning klart ha betydning for filetkvaliteten etter lagring.

7 Litteraturliste

1. Andersen, U. B., Strømsnes, A. N., Steinholt, K. & Thomassen, M. S. (1994) Fillet gaping in farmed Atlantic salmon. *Norwegian Journal of Agriculture Science* **8**, 165 – 179.
2. Astier, C., Labbe, J. P., Roustan, C. & Benyamin, Y. (1991) Sarcomeric disorganization in post-mortem fish. *Journal of Biochemistry and Physiology* **100B**, 459 – 465.
3. Bremner, A. H. & Hallett, I. C. (1985) Muscle fiber-connective tissue junctions in the fish blue grenadier (*Marcruronus novaezelandiae*) a scanning electron microscope study. *Journal of Food Science* **50**, 975 – 980.
4. Bandman, E. & Zdanis, D. (1988) An immunological method to assess protein degradation in post-mortem muscle. *Journal of Food Science* **22**, 1 – 19.
5. Cao, M. J., Jiang, X. J., Zhong, H. C., Zhang, Z. J. & Su, W. J. (2006) Degradation of myofibrillar proteins by a myofibril-bound serin proteinase in the skeletal muscle of crucian carp (*Carasius auratus*). *Journal of Food Chemistry* **94**, 7 – 13.
6. Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R. & Verrez-Bangis, V. (2006) trends in postmortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Journal of Food Science and Nutrition* **46**, 409 – 421.
7. Duun, A. S. & Rustad, T. (2007) Quality changes during superchilled storage of cod (*Gadus morhua*) fillets. *Journal of Food Chemistry* **105**, 1067 – 1075.
8. Einen, O., Guerin, T., Fjæra, S. O. & Skjervold, P. O. (2002) Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon. *Aquaculture* **212**, 129 – 140.
9. Esaiassen, M., Dahl, R., Eilertsen, G., Gundersen, B. & Sivertsvik, M (2008) Pre-rigor filleting and brining of farmed cod: influence on quality and storage stability. **41**, 724 – 729.
10. Goll, D. E., Otsuka, Y., Nagainis, P. A., Shannon, J. D., Sathe, S. K. & Muguruma, M. (1983) Role of muscle proteinases in maintenance of muscle integrity and mass. *Journal of Food and Biochemistry* **7**, 137 – 177.
11. Goll, D. E. & Robson, R. M. (1967) Molecular properties of post-mortem muscle. 1. Myofibrillar nucleosidetriphosphatase activity of bovine muscle. *Journal of Food and Science* **32**, 323.

Litteraturliste

12. Hallet, I. C. & Bremner, H. A. (1988) Fine structure of the myocommata – muscle fiber junction in hoki (*Macruronus novaezelandiae*). Journal of the Science of Food and Agriculture **44**, 245 – 261.
13. Ho, C. Y., Stromer, M. H. & Robson R. M. (1994) Identification of the 30 kDa polypeptide in post mortem skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. Biochimie **76**, 369 – 375.
14. Huff-Lonergan, E. & Lonergan, S. M. (2005) Mechanism of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. Meat Science **71**, 194 – 204.
15. Ikeucho, Y., Kamiyama, K., Suzuki, A., Hirose, T., Kim, K., Hayashi, T. & Ito, T. (2001) Monitoring myosin degradation during conditioning in chicken meat using an immunological method. Food Chemistry and Toxicology **66**, 1119 – 1125.
16. Jasra, S. K., Jasra, P. K. & Talesara C. L. (2001) Myofibrillar protein degradation of carp (*Labeo rohita*) muscle after post-mortem unfrozen and frozen storage. Journal of Science of Food and Agriculture **81**, 519 – 524.
17. Jobling, M. (1988) A review of the physiological and nutritional energetics of cod, *Gadus morhua*, with particular reference to growth under farmed conditions. Aquaculture **70**, 1 – 19.
18. Kristoffersen, S., Vang, B., Larsen, R. & Olsen, R. L. (2007) pre-rigor filleting and drip loss from fillets of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Aquaculture Research **38**, 1721 - 1731.
19. Kristoffersen, S., Tobiassen, T., Essaiasen, M., Olsson, G. B., Godvik, L. A. Seppola, M. A. & Olsen, R. L. (2006) Effects of pre-rigor filleting on quality aspects of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Aquaculture Research **37**, 1556 – 1564.
20. Kryvi, H. & Totland, K. G. (1997) *Fiskeanatomi: Muskelsystemet*. Høyskoleforlaget AS – Norwegian Academic Press, Norge.
21. Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. & Fleurence, J. (2003) In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effects of cathepsins B, D and L. Journal of Food Chemistry **81**, 517 – 525.
22. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. Journal of Nature **227**, 680
23. Lambert, I. H., Nielsen, J. H., Andersen, H. J. & Ørtenblad, N. (2001) Cellular modell for induction of drip loss in meat. Journal of Agriculture and Food Chemistry **49**, 4876 – 4883.

Litteraturliste

24. Love, R. M. (1970) The chemical biology of fishes. Academic Press New York.
25. Love, R. M., Lavèty, J. & Steel, P. J. (1969) The connective tissues of fish II. Gaping in commercial species of frozen fish in relation to rigor-mortis. *Journal of Food Technology* **4**, 39 – 44.
26. Lowe, T. E., Ryder, J. M., Carragher, J. F. & Wells, R. M. G. (1993) Flesh Quality in Snapper, (*Pagrus auratus*), Affected by Capture Stress. *Journal of Food Science* **58**, 770 – 773.
27. Luther, P. K., Munro, P. M. G. & Squire, J. M. (1995) Muscle ultra structure in teleost fish. *Micron* **26**, 431 – 459.
28. Martinez I. & Pettersen W. (1992) Temperatur-induced precocious transitions of myosin heavy chain isoforms in the white muscle of the arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Basic Applied Myology* **2**, 89 – 95.
29. Mørkøre, T. (2006) Relevance of dietary oil source for contraction and quality of pre-rigor filleted Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* **251**, 56 – 65.
30. Negishi, H., Yamamoto, E. & Kuwata, T. (1996) The origin of the 30 kDa component appearing during post-mortem ageing of bovine muscle. *Journal of Meat Science* **42**, 289 – 303.
31. Offer, G. & Knight, P. (1988) The structural basis of water-holding in meat capacity in meat. Part 2: Drip losses. i: *Developments in Meat Science* (Lawrie, R. A. ed.) 173 – 243 Elsevier Science Publications, London UK.
32. Offer, G. & Trinick, J. (1983) On the mechanism of waterholding in meat: the swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Science*, **8**, 245 – 281.
33. Ofstad, R., Egelanddal, B., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R. L. & Hermansson, A. M. (1996) Liquid loss as effected by post mortem ultrastructural changes in fish muscle: Cod (*Gadus morhua*) and salmon (*salmo salar*). *Science of Food and Agriculture* **71**, 301 – 312.
34. Rosenlund, G. & Skretting, M. (2006) Worldwide status and perspective on gadoide culture. *ICES Journal of Marine Science* **63**, 194 – 197.
35. Sato, K., Ando, M., Kubota, S., Origasa, K., Kawase, H., Toyohara, H., Sakaguchi, M., Nakagava, T., Makinodan, Y., Ohtsuki, K. & Kawabata, M. (1997) Involvement of type V collagen in softening of fish muscle during short-term chilled storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **45**, 343 – 348.

Litteraturliste

36. Sato, K., Ohashi, C., Ohtsuki, K. & Kawabata, M. (1991) Type V collagen in trout (*salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **39**, 1222 – 1225.
37. Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, S., Nordtvedt, T. S. & Seland, S. (1997) Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science* **62**, 898 – 905.
38. Skjervold, P. O. (2002) Live-chilling and pre-rigor filleting of salmonids – technology affecting physiology and product quality. *PhD thesis, doctor agriculture*. Agricultural University of Norway.
39. Skjervold, P. O., Rørå, A. M. B., Fjæra, S. O., Vegusdal, A., Vorre, A. & Einen, O. (2001a) Effects of pre-, in, or post-rigor filleting of live chilled Atlantic salmon. *Aquaculture* **194**, 315 – 326.
40. Skjervold, P. O., Fjæra, S. O., Østby, P. B., Isaksson, T., Einen, O. & Taylor, R. (2001b) Properties of salmon flesh from different locations on pre- and post-rigor fillets. *Aquaculture* **201**, 91 – 106.
41. Skjervold, P. O., Fjæra, S. O. & Østby, P. B. (1999) Rigor in salmon affected by crowding stress prior to chilling before Slaughter. *Aquaculture* **175**, 93 – 101.
42. Sørensen, N. K., Brataas, R., Nyvold, T. E. & Lauritzen, K. (1997) Influence of early processing (pre-rigor) on fish quality. I Seafood from producer to consumer, Integrated approach to quality (Luten, J. B., Børresen, T. og Oehlenschläger, J. red.) 253 – 263. Elsevier Science B.V Amsterdam The Netherlands.
43. Tilseth, S. (1990) New marine fish species for cold-water farming. *Aquaculture* **85**, 235 – 245.
44. Towbin, H., Staehlin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings National Academy of Science USA* **76**, 4350 – 4354.
45. Verrez-Bagnis, V., Ladrat, C., Morzel, M., Noël, J. & Fleurence, J. (2001) Protein changes in post mortem sea bass (*Dicentrarchus labrax*) muscle monitored by one- and two-dimensional gel electroforesis. *Electrophoresis* **22**, 1539 – 1544.
46. Wang, P. A., Stensvik, J., Larsen, R., Mæhre, H. & Olsen R., L. (2007) Cathepsin D from Atlantic cod (*Gadus morhua*) liver. Isolation and comparative studies. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **147B**, 504 - 511

Litteraturliste

47. Widmaier, R. C., Raff, H. & Strang, K. T. (2004) Muscle. *Vander, Sherman & Luciano's Human physiology, the mechanisms of body function*. (Watnick, M., Meyers, L & Shueller, D. red.). McGraw-Hill Companies Inc., New York.
48. Zarate, J. R. & Zaritzky, N. E. (1985) Production of weep in packaged refrigerated beef. *Journal of Food Science* **50**, 155 – 159.
49. Zeece, M. G., Katoh, K., Robson, R. M. & Parrish, F. C. (1986) Effect of cathepsin D on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature. *Journal of Food Science* **51**, 769 – 773.