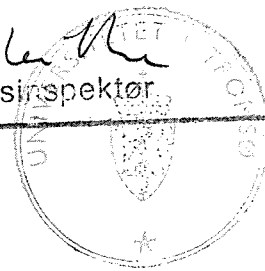


UNIVERSITETSBIBLIOTEKET I TROMSØ  
Institutt for biologi og geologi  
Institutt for fiskerifag  
Bibliotek

Oversendes UD til 9.10.84  
Kan/kann ikke utlænes.

S. F. Leithe  
Eksamensinspektør

Universitetsbiblioteket  
i Tromsø



ENZYMATISK AVSKINNING AV  
SILD (Clupea harengus)

KANDIDATOPPGAVE I FISKERIKJEMI

AV

KRISTJAN G. JOAKIMSSON

INSTITUTT FOR FISKERIFAG  
UNIVERSITETET I TROMSØ  
JANUAR 1984

FORORD.

Det arbeidet som her er fremlagt er utført ved Institutt for fiskerifag, Universitetet i Tromsø i tidsrommet januar 1983 til januar 1984.

Jeg vil takke min veileder, professor Jan Raa for et inspirerende og lærerikt kandidatår. Videre vil jeg takke Dr. sci. Asbjørn Gildberg for veiledning gjennom hele arbeidet med oppgaven.

2. TITTEL

Tromsø

Januar 1984

Kristján G. Jöakimsson

3. FORFATTERS ANNETT

3.1. Forord

3.2. Innledning

3.3. Oppgavens innhold

I N N H O L D S F O R T E G N E L S E

<u>Seksjon</u>	<u>Side</u>
1 OPPGAVENS PROBLEMSTILLING.	1
2 INNLEDNING OG LITTERATURSTUDIUM.	3
2.1 Skinn/bindevev.	3
2.2 Muskel/bindevev.	7
2.3 Denaturering.	8
2.4 Enzymmekanisme.	10
3 ENZYMATISK AVSKINNING.	15
3.1 Innledning	15
3.2 Materiale og metoder	17
3.3 Resultater.	21

<u>Seksjon</u>	<u>Side</u>
3.4 Diskusjon	26
4 ENZYMPREPARAT	30
4.1 Innledning	30
4.1.1 Fordøyelsesproteaser	30
4.1.2 Ensilage	30
4.2 Enzymrensing	32
4.2.1 Fremstilling av torske pepsin preparat	35
5 PILOTANLEGG	38
5.1 Avskinningsprosessen.	38
5.2 Oppskalering.	44
5.3 Modning av sildefileter.	46



<u>Seksjon</u>	<u>Side</u>
6 SAMMENDRAG.	49
7 LITTERATURLISTE.	51

## 1 OPPGAVENS PROBLEMSTILLING.

Sild og sildeprodukter mistet mye av sin betydning i Norge på begynnelsen på 70-tallet, ettersom den atlanto-skandiske sildebestanden på det nærmeste var blitt utryddet. Etter streng regulering i over 10 år ser bestanden nå ut til å være i vekst. Derfor kan vi se for oss økte sildefangster i årene som kommer. Av den grunn er det aktuelt å gjeninnføre teknologien for produksjon av sild og å forbedre denne. En aktuell forbedring er å utvikle metoder for avskinning av sild, særlig med hensyn på å bevare filetenes sølvhinne på skinnsiden.

I dag er det utviklet flere typer skinnemaskiner, beregnet for sild. Ikke alle disse maskinene er like velegnet for sild, som kan være av meget variabel type. Råstoffvariantene er fet og mager, fersk og gammel, saltet og krydret sild.

Det stilles store krav til en maskin som skal dekke dette råstoffspekter. Skinnemaskinene kan benyttes med varierende hell på silderåstoff. Flere bedrifter som har skinnemaskin har derfor lagt opp produksjonen med skinning for hand. Bedriftene hevder at det går like fort å skinne for hand, og da blir utbyttet høyere. En del av de skinnemaskinene som benyttes i dag, krever manuell betjening og ofte med etterrensing og kontroll av fisken (Tangstad, 1983).

I denne oppgaven undersøkes muligheten for bruk av enzymer til avskinning av sild. Målet er å øke utbyttet og bevare filetenes sølvhinne på skinnsiden.

Det er hovedsaklig bindevevsproteinet kollagen som gir fiskeskinns mekanisk styrke. Over 50% av tørrvekten av silde-skinns kolliderer kollagen (Hughes, 1963). Kollagen kan i nativ tilstand brytes ned enzymatisk av bare en bestemt type enzymer, kollagenaser. Dersom man derimot denaturerer kollagenet, for eksempel ved å senke pH og/eller heve temperaturen, vil skinn- et miste mye av sin mekaniske styrke. Da vil flere proteaser

klare å degradere skinnet (Harper, 1980). Dette er strategien for de forsøkene som beskrives i denne oppgaven; syrebehandling kombinert med enzymatisk oppløsning av denaturert kollagen.

## 2 INNLEDNING OG LITTERATURSTUDIUM.

### 2.1 Skinn/bindevev.

Fiskens hud består, som hos andre vertebrater, av to lag, epidermis og dermis (Figur 1). Epidermis er en tynn ytre hinne, sammensatt av flere enkeltceller, som hele tiden ødelegges av slitasje og erstattes av nye celler som dannes i cellelaget under. Dermis er mye tykkere og mer komplekst bygd opp enn epidermis. Dermis er vanligvis delt opp i stratum spongiosum, som ligger like under epidermis, og under det er det et mer kompakt lag, stratum compactum. I dermis finnes det nerver, blodkar, muskler og bindevevsfibriller som krysser hverandre (Bond, 1979).

Mellom muskel og skinn hos sild ligger en tynn sølvhinne som gir silden den sølvblanke fargen. Sølvhinnen består av fargeløse guaninkrystaller.

Skinn hos kjevefisk er med et sjelden unntak, fullstendig fri for keratin (Hildebrand, 1974).

Skjellene som dannes i dermis er dekket av et meget tynt lag av bindevev og av epidermis, men ofte er dette laget slitt bort, så at skjellene rager litt fram. Den fremste del av skjellet er omgitt av en lymfefylt sekk (skjellposen), mens den bakerste del er nøye forbundet med den omkringliggende hud. Skjellene er en varig dannelselse, som vokser ved pålæring på undersiden og langs kantene (Boas-Thomsen, 1961).

Det som særmerker bindevevet er det høye innhold av intercellulær substans som består av fibre og grunnsubstans. Den fysiske styrken til bindevev avhenger av den mengde fibre som ligger i grunnsubstansen.

#### A. Fibrene.

Fibrene er av tre typer: kollagene, retikulære og elastiske.

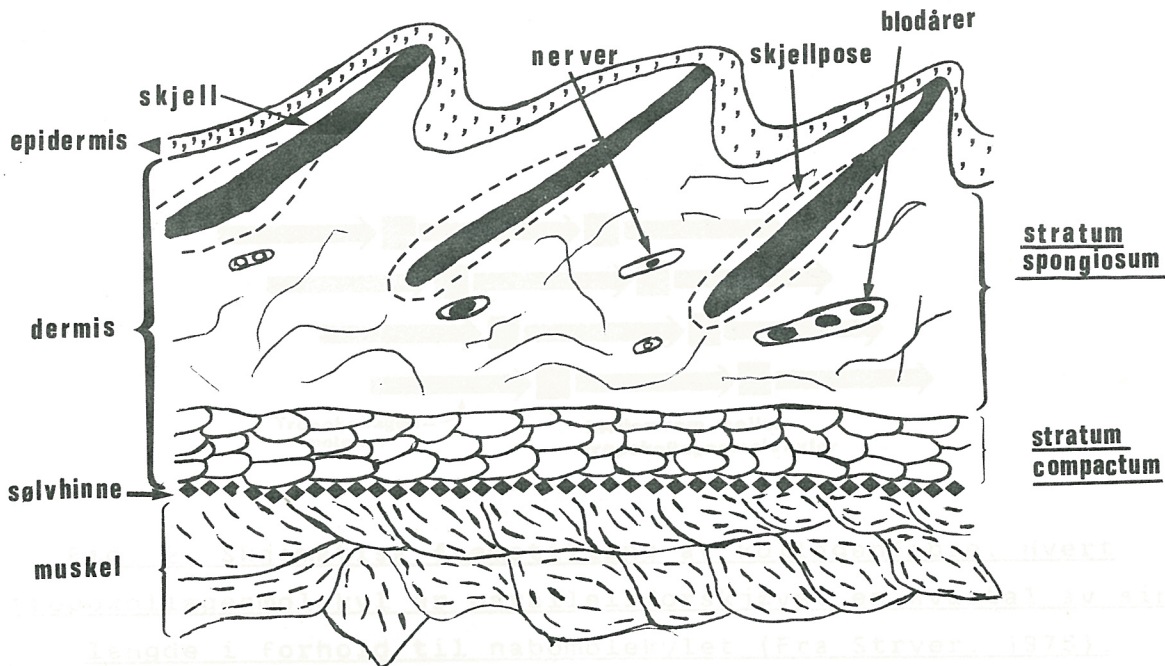


Fig. 1. Snitt gjennom huden av en beinfisk med skjell.

Kollagenmolekylet består av tre, ganske like polypeptidkjeder, som har omtrent 1000 aminosyrer. Hver peptidkjede ( $\alpha$ -kjede) danner en venstredreid spiral og tre slike "spiraler" foldes om hverandre og danner en høyredreid trippelheliks (tropokollagen). Hver trippelheliks har MW 300.000 og er omtrent 300 nm lang og 1,4 nm tykke. I hver ende av trippelheliksen (teleopeptidregionene) er  $\alpha$ -kjedene ikke tvunnet om hver andre. I denne teleopeptidregionen er hver  $\alpha$ -kjede på 10 - 20 aminosyrer (Mohr, 1971a). I bindevev ligger de "stavformete" tropokollagenmolekyler ved siden av hverandre med aksene parallelt. De er forskjøvet 1/4 av sin lengde i forhold til hverandre i lengderetningen og danner kollagenfibrer (Figur 2). Kollagen i pattedyr og fisk har i hovedtrekk samme oppbygning (Mohr, 1971a).

Mellom endene på tropokollagenmolekylene som ligger etter hver andre finnes det ikke bindinger, men et mellomrom på ca. 400 Å. De enkelte kollagenmolekyler er bundet sammen av intermolekulære bindinger, det vil si hydrogenbindinger og sterke kovalente kryssbindinger mellom peptidkjedene.

Aminosyresammensetningen av kollagenmolekylet er karakterisert ved et høyt innhold av glycin (30%), alanin (10 - 20%) og prolin (20%). Glycin, alanin, og prolin utgjør omtrent 60 -

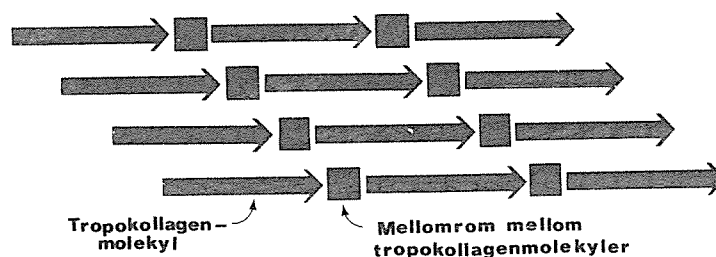


Fig. 2. Skjematisk fremstilling av kollagenfibre. Hvert tropokollagenmolekyl er parallellforskjøvet en kvartal av sin lengde i forhold til nabomolekylet (Fra Stryer, 1975).

65% av aminosyrene til kollagen (Galloway, 1975). Det har et lavt innhold av tryptofan og tyrosin, og inneholder praktisk talt ikke cystein eller cystin. Videre inneholder kollagen hydroksyprolin og hydroksylisin som er modifiserte aminosyrer (Rawn, 1983).

Den spesielle aminosyrerekkefølgen vi finner i kollagen bidrar til å stabilisere molekylet. Analyser har vist at typisk rekkefølge er:

gly - x - y - gly - pro - y - gly - x - hyp - gly (Rawn, 1983).

Også vanlig rekkefølge er:

gly - pro - hyp - gly (Mohr, 1971).

Denne rekkefølgen gjør at peptidkjedene blir stive, fordi det ikke er fri rotasjon rundt nitrogenatomet i ringen i prolin og hydroksyprolin (Figur 3) (Mohr, 1971a).

Antall kovalente kryssbindinger i kollagenstrukturen spiller også en betydelig rolle for kollagenfiberens mekaniske styrke. Disse er av to hovedtyper, nemlig intramolekulære kryssbindinger mellom  $\alpha$ -kjedene i tropokollagenmolekylet, og intermolekulære kryssbindinger mellom tropokollagenmolekyler

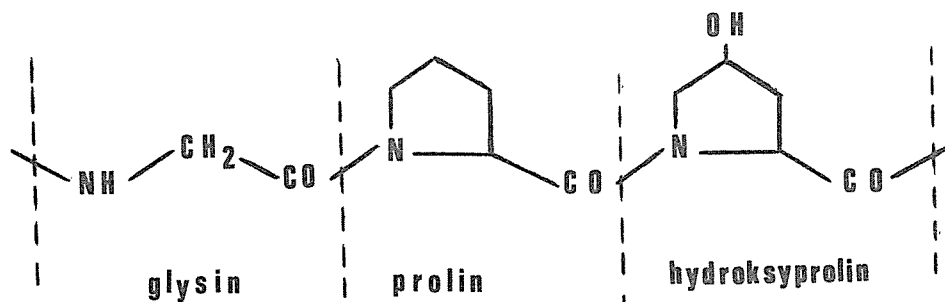


Fig. 3. De tre mest vanlige aminosyrene i kollagen.

(Figur 4) (Rucker and Murray, 1978).

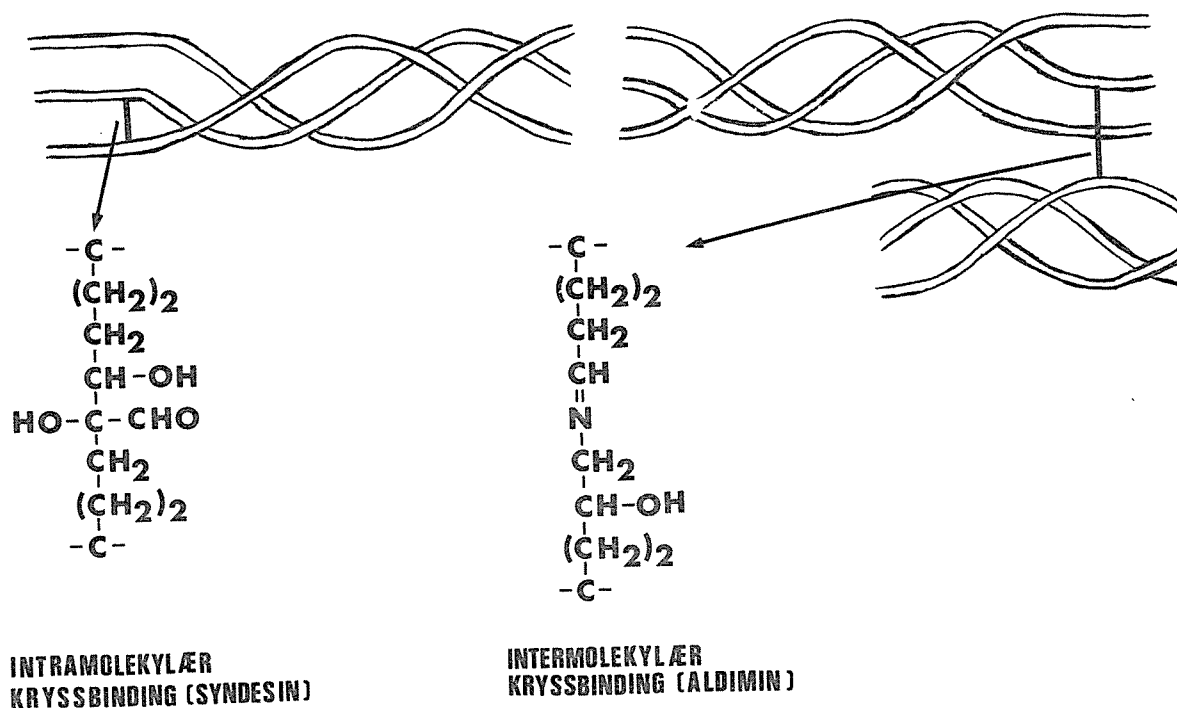


Fig. 4. Struktur for intra- og intermolekylære kryssbindinger i kollagen.

I kollagen hos fisk er størstedelen av kryssbindingene intermolekylære (aldimin type). Videre er det påvist at kollagenet hos fullvoksen torsk nesten utelukkende har intermolekylære kryssbindinger av aldimintype (Mohr, 1971a).

De intermolekylære kryssbindingene er essensielle for den mekaniske styrken i bindevev. Det vil si at ødeleggelse av aldiminbindinger i fiskekollagen medfører betydelig reduksjon i styrke. Aldiminbindinger lar seg lett ødelegge ved syre

og/eller varmebehandling.

De retikulære fibre regnes som et forstadium til kollagenfibre. De er mye kortere og ikke så elastiske, men har samme kjemiske sammensetning.

De elastiske fibre danner et uregelmessig nettverk. Fibrene er meget elastiske, og motstår behandling med både kokende vann og syrer og baser. Karakteristisk for elastin er at 95% av aminosyrene er polare. Det er uvanlig at protein har et så lavt innhold av hydrofile sidekjeder (Mohr, 1971a).

B Grunns substansen.

Grunns substansen er en gelaktig væske som rommer bindevevsfibre og celler, hvor fibre skilles ut av cellene. Bindevev med mye grunns substans blir løst og mykt. Grunns substansen er bygget opp av polysakkarider som er koplet til protein. Komplekser mellom protein og karbohydrat har gått under forskjellige tegnelser. I dag skiller en mellom to typer, nemlig glykoproteiner og proteoglykaner. Et glykoprotein defineres som et protein med ett eller flere oligosakkarider tilkoblet kovalent, hvor antallet sukkerenheter er lavt. Proteoglykanene, som utgjør det meste av grunns substansen, er proteiner som har lange sukkerkjeder koblet kovalent til seg (Gottschalk, 1970).

## 2.2 Muskel/bindevev.

Fiskemuskel er bygget opp av parallelt løpende celler som er festet i hver andre til bindevevshinner (myocommata), og hver muskelcelle er omgitt av et kollagennettverk som gir mekanisk styrke. Det foreligger observasjoner som tyder på at kollagenfibre i cellehylsteret rundt muskelcellene har et høyere innhold av varrestabile kryssbindinger (syndesin type), enn kollagenfibre i skinn og bukepitel (Eide et al., 1980). Dette antyder muligheten av å bryte ned bindevev i skinnet uten å skade muskelbindevev.

Gildberg og Raa (1979), har vist at forskjellen i løslighet



mellom loddeskinn- og muskel er størst ved pH 4, hvor loddemuskelen er minimalt løselig (Figur 5). Degradering av skinn kan derfor trolig utføres ved pH 4 uten vesentlig tap av muskelprotein.

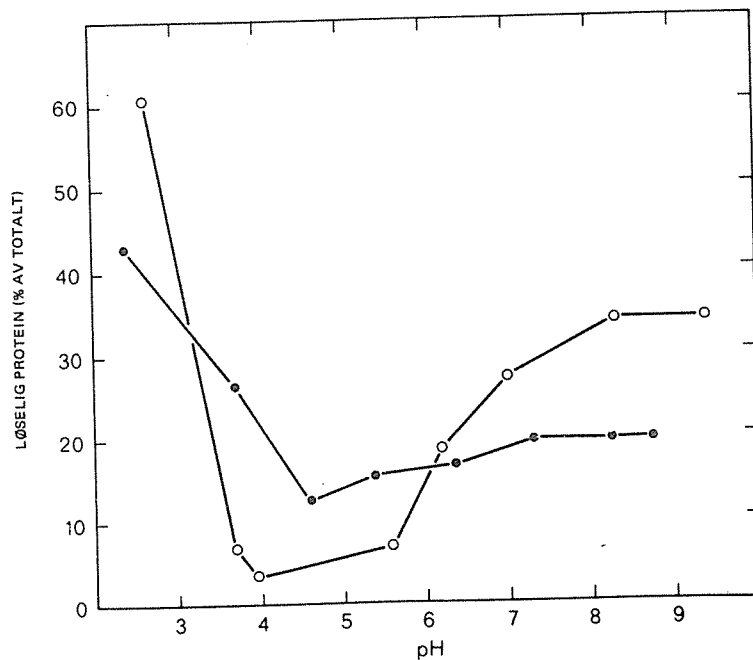


Fig. 5. Løselig protein fra loddemuskel (O) og skinn (●) ved forskjellig pH i 20 timer ved 8 C (Fra Gildberg og Raa, 1979).

### 2.3 Denaturering.

Denaturering er en prosess hvor den native proteinkonformasjon utsettes for vesentlige forandringer uten å påvirke primærstrukturen. Konformasjonen til et makromolekyl er den detaljerte tredimensjonale struktur som er et resultat av bindingenes vinkel og styrke. Enhver forandring i atomenes koordenering i proteinstrukturen kan man kalle konformasjonsforandring (Lapanje, 1978).

Tidligere forestilte man seg en rigid modell hvor denaturering ble sett på som fullstendig disorganisering; det vil si et "enten eller"-prinsipp for proteindenaturering hvor proteinmolekyler enten er i nativ tilstand eller fullstendig denaturert, uten mellomformer. Nyere forestillinger gir rom

for større fleksibilitet. Molekylet vil reagere på moderat stress med mindre forandringer.

Denaturering vil gå fram trinnvis, hvor små deler av molekylet blir utfoldet en etter en. Disse trinnene vil da følge "enten eller"-prinsippet i den forstand at små deler av molekylet utfoldes fullstendig ved hvert trinn som går. Hvis folding av polypeptidkjeder til dannelsen av et proteinmolekyl er styrt av lover for kjemisk likevekt, vil det kunne gå i begge retninger, det vil si at det vil være fullstendig reversibelt.

Med reversibilitet i termisk sammenheng, menes det at et system går tilbake til dets opprinnelige tilstand, når betingelsene er som de opprinnelige.

Betingelser som forskjellige pH verdier, eller tilstedeværelse av tilsatsstoffer, vil kunne resultere i endring av tertiærstrukturen mens sekundærstrukturen av molekylet beholdes intakt (Mihalyi, 1972).

Denaturering kan skje ved oppvarming, forandringer av pH eller ved behandling med forskjellige detergenter (urea, guanide, o.a.).

Ved å utsette protein for pH verdier fjernt fra det isoelektriske punkt, vil man favorisere denaturering. Da dannes det en elektrostatisk påvirkning mellom like ladninger, som resulterer i en tendens til utfolding. Oppførselen av enkelte proteiner er meget forskjellig: Enkelte er meget stabile, helt ned til pH 1,5 og andre gjennomgår forandringer i konformasjon ved pH 3 og lavere (Lapanje, 1978).

Dersom kollagen blir denaturert ved at pH senkes og/eller temperaturen heves, vil kollagenet (og dermed skinn) miste mye av sin mekaniske styrke. Intramolekylære bindinger mellom de tre peptidkjedene i molekylet brytes. Peptidkjedene inntar da en mer tilfeldig konformasjon, det dannes gel (Figur 6). Labile intermolekylære bindinger brytes også ved varme eller syrepåvirkning (Mohr, 1971a).

Vi vet ikke i dag om frysedenaturering i fisk gjenspeiler en

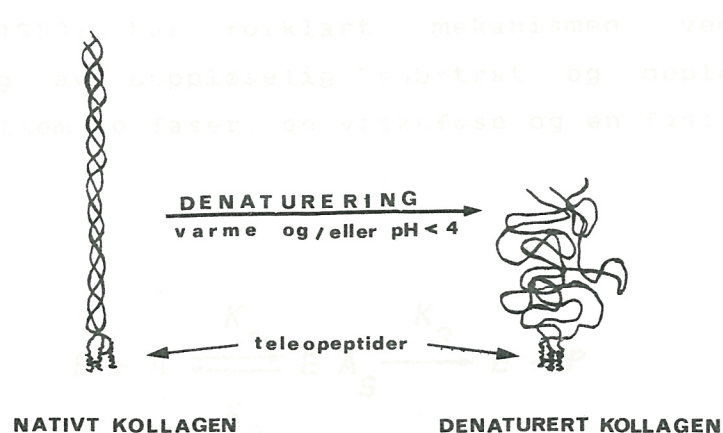


Fig. 6. Denaturering av kollagen. Teleopeptider og kryssbindingene er varme- og syrestabile.

proteindenaturering i ordets egentlige forstand, det vil si spalting av kryssbindinger og en utfolding av peptidkjeder. Det er i midlertid mye som tyder på at under frysedenaturering dannes nye bindinger mellom proteiner (Mohr, 1971a).

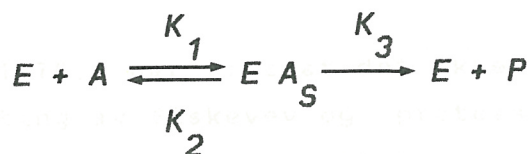
#### 2.4 Enzymmekanisme.

Ved enzymatisk avskinning foreligger substratet (skinn) i uopløselig form, mens enzymet er oppløst i vannfasen. Enzymreaksjonen innebærer da i hvert fall to trinn: For det første bindes enzymmolekylet til substratet (skinn). For det andre hydrolyseres (skinn) og oppløselige peptider settes fri.

I et lite rensset enzympreparat (et preparat som inneholder flere forskjellige enzymer) er det vanskelig å si hvilke(-t) enzym som er hovedansvarlig for degradering av skinnet. Det kan tenkes at proteiner som inngår som strukturelementer i et vev har en ganske annen affinitet overfor enzymer enn løselige proteiner. Dette er spørsmål som illustrerer kompleksiteten av skinndegraderingsprosessen på enzym-substrat nivå.

Polypeptidkjeder er innbyrdes kryssbundet og bundet til polymerer. Derfor bør man, samtidig som man leter etter enzymer som degraderer skinn også sørge for å finne et enzym som har høy affinitet for proteiner i skinn.

McLaren (1963) har forklart mekanismen ved enzymatisk degradering av uoppløselig substrat og oppløst enzym som fordelt mellom to faser, en væskefase og en fast fase.



Enzymet (E) forutsettes å bindes til substratets tilgjengelige overflate (A) i en raskt innstilt likevekt, med hastighetskonstantene  $k_1$  og  $k_2$  og danner et enzym-substratkompleks ( $E A_s$ ). Dette komplekset hydrolyseres deretter, med hastighetskonstant  $k_3$  og gir fritt enzym og reaksjonsprodukter (P). Starthastigheten for hydrolysen,  $v_0$  blir :

$$v_0 = \xrightarrow{k_3} E A_s$$

Dette vil si at for uoppløselig substrat system er hastigheten ved 1. ordens reaksjon ikke direkte proporsjonal med mengde enzym, som i løselig substrat -løselig enzym system.

Det er alminnelig antatt at proteiner nedbrytes hurtigere enzymatisk, og i større grad når det foreligger denaturert enn i nativ tilstand. Forutsetningen er at proteinene ikke aggregerer ved denaturering (Mihaly 1972).

Som tidligere beskrevet, er bindevev kjemisk svært komplisert sammensatt. Vi kan forestille oss vevet som et flettverk av forskjellige typer av polypeptidkjeder og polysakkaridkjeder. Polypeptidkjedene er innbyrdes kryssbundet og bundet til polysakkaridkjedene. Dette flettverket har en rekke bindingstyper som bare kan spaltes av bestemte enzymer. Under autolyse av vev er det derfor sannsynligvis et stort antall forskjellige enzymer som virker sammen, samtidig og etter hverandre. Noen

enzymer virker fortrinnsvis inni peptid- eller polysakkaridkjede, andre spalter av aminosyrer eller monosakkarid fra enden av kjedene. Den siste type vil være virksam når nedbrytingen av vevet er kommet et stykke på vei. Rask ødeleggelse av et vevs fysiske egenskaper skyldes den første typen enzymer og muligens i særlig grad enzymer som spalter polysakkarid-kjedene fra proteinene.

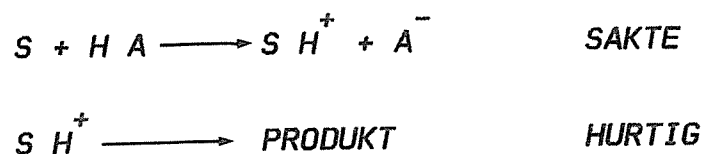
Nicolaysen, 1976, har vist at det ikke er en klar sammenheng mellom nedbryting av fiskevev og proteaseaktivitet målt med modellsubstrat. Han har foreslått at sukkerspaltende enzymer (glykosidaser) har betydning for degradering av intakt fiskevev. Dette er basert på at protein i vev er koplet til sukkerer, som bidrar til vevets mekaniske styrke. Dette vil si at urene enzympreparater som inneholder både proteaser og glykosidaser degraderer protein i intakt fiskevev raskere enn hva rene proteaser gjør.

Nativ kollagen lar seg ikke bryte ned av de fleste vanlige proteolytiske enzymene, men brytes hurtig ned av en spesiell gruppe proteaser, kollagenaser. I motsetning til dette vil gelatin lett la seg hydrolysere av de fleste proteaser (Mihaly, 1972).

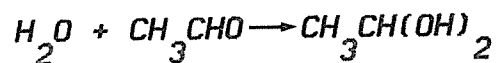
Mohr og Hanto (1973 sitert av Langmyhr, 1981) undersøkte virkningen på hydrolysen av forskjellige prøver av torskefilet forbehandlet på forskjellig måte. Råstoffets tilstand med hensyn på ferskhet (pre rigor eller post rigor), partikkelstørrelse (oppmalt eller homogenisert) og hvorvidt råstoffet hadde vært frosset eller ei hadde tilsynelatende liten innflytelse på hydrolysehastighet og utbytte.

Om det ofte kan være vanskelig å sammenlikne forskjellige kommersielle proteaser på grunn av forskjellig renhet er det en vanlig erfaring at endopeptidaser fra mikrober og planter med et bredt spektrum av spesifisitet er mer effektive ved degradering av fiskeprotein enn de som har en høy spesifisitet av animalsk opprinnelse. Under like betingelser vil proteaser med et bredt spektrum ha tendens til å gi produkt med lavere molekylvekt enn de høyt spesifikke enzymer.

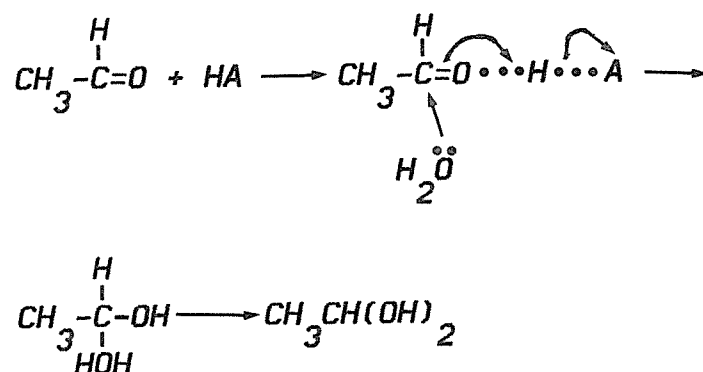
Fullstendig forklaring på meget høy katalytisk effektivitet av enzymer har man ikke funnet. Enzymer bruker utvilsomt både kjemiske og fysiske faktorer til å senke aktiveringsenergien og derved katalysere reaksjonen. De fleste reaksjoner innebærer en serie av trinn med det mest saktegående trinnet (rate determining step (RDS)) som bestemmer hastigheten på hele reaksjonen. Hvis RDS innebærer proton forflytning av noen slag, vil mekanismen være mottakelig for syre-base katalysering, for eksempel :



Forutsetter man hydrolyse av acetataldehyd :



Denne reaksjonen kan katalyseres av syre :



Syren katalyserer med H-binding til karbonyl-gruppen og derved gjør C-atomet mer positivt og lettere tilgjengelig for vann. Dette er et eksempel på generell syre-katalyse, siden mange syrer kan virke som effektive katalysatorer. Hvis kun  $H^+$  vil



virke, da kalles mekanismen enkel syre katalyse. Reaksjonen i overnevnte likning kan også katalyseres av baser (Little, 1981).

Ulempen ved enkel syre-base katalyse er at frie  $H^+$  eller  $OH^-$  ioner trenges til å drive reaksjonen. Mange enzymer er mest virksomme ved nøytralt pH hvor nivået av slike ioner er meget lavt. Ved bruk av generell syre-base katalyse, vil et enzym kunne oppnå samme resultat ved pH verdier utenfor det optimale som ved optimal pH (Rawl, 1983).

Ved forandring i pH foregår det hurtig konformasjonsforandringer i proteiner. I fleste tilfeller trenges det dog ekstreme betingelser. Når det gjelder proteasenes egenskaper til å degradere et substrat (e<sup>+</sup> protein i nativ eller denaturert form) kan det være vanskelig å skille mellom effekter fra selve enzymet eller effekten av antall  $H^+$  ioner ved hydrolyse av proteinet. Dette på grunn av at for å denaturere protein ved forandring i pH trenges ekstreme pH verdier. Slike ekstreme pH verdier vil også virke på enzymatisk aktivitet og på selve enzymet. Separering av effektene av enzym og effektene på substrat er mulig i prinsippet ved å undersøke enzymatiske egenskaper på substratet som ikke er påvirket av syre eller base i separerte eksperimenter (Mihalyi, 1972).

Fordøyelse av nativ og denaturerte proteiner med pepsin viser denne effekt. Fordøyelse av varme- og ureadenaturert egg albumin over vidt pH spekter viser maksimum ved pH 1,5 til 2,0. I motsetning til dette ble nativt protein fordøyd sakte ved pH 2,0, men hastigheten økte betraktelig ved surgjøring og nådde maksimum ved pH 1,0. Ved denne pH verdi var hastigheten nøyaktig den samme som ved denaturert protein. Forskjellen i pH profil kan forklares ved at økning i konsentrasjonen av hydrogenioner fører til økt fordøyelse av det denaturerte protein (Mihalyi, 1972).

avskinningsprosessen er tenkt hovedsakelig å foregå i tre trinn.

### 3 ENZYMATISK AVSKINNING.

#### Trinn 1 SYREBEHANDLINGEN

Denaturering av fibrilkollagen, samtidig med fjerning av

#### 3.1 Innledning

En lang rekke faktorer har betydning for enzymatisk degradering av skinn. Degraderingen er blant annet avhengig av type og renhet av enzymer som benyttes, graden av denaturering, denatureringsmiddel og type skinn. Effekten vil også avhenge av betingelser som pH, temperatur, saltkonsentrasjon, enzymkonsentrasjon, degraderingstid og tilsetningsstoffer. Alle variasjoner i disse betingelser vil virke inn på avskinningseffekten.

De fleste produsenter av enzympreparater bruker degraderingen av et definert substrat ved bestemte betingelser som mål på enzymaktiviteten. Disse substratene og betingelsene vil være forskjellig hos forskjellige produsenter. En enkel sammenlikning av aktiviteten av kommersielle enzymer kan derfor bli villedende ved valg av preparat. Videre vil betingelsene for oppgitt aktivitet av preparat sjelden være de samme som for degradering av skinn. Det kan tenkes at enzymene har forskjellig affinitet overfor skinn og et modellsubstrat. I praksis vil dette si at man ikke burde ta for stort hensyn til produsentens varedeklarasjoner. I stedet bør man basere valget på egne forsøk. Slike laboratorieforsøk bør likne mest mulig på de betingelser avskinningsprosessen er tenkt og forventes å foregå ved i oppskalert form.

Ved optimal avskinning legges hovedvekt på følgende momenter:

- a) Avskinningen bør foregå uten å skade sølvhinne og/eller kjøtt.
- b) Avskinningen bør gå raskt.
- c) Avskinningen skal gå ved lavest mulig temperatur.



Avskinningen er tenkt hovedsaklig å foregå i tre trinn.

#### Trinn 1. SYREBEHANDLINGEN.

Denaturering av skinn(kollagen), samtidig med fjerning av skjell.

#### Trinn 2. ENZYMBEHANDLING.

Sild behandles i enzymløsning, slik at enzym kan degradere det denaturerte skinn, uten å skade sølvhinne og/eller kjøtt.

#### Trinn 3. VASKING.

Eventuelle skinnrester og enzym vaskes bort fra sildens overflate, slik at enzymatisk degradering stoppes.

I laboratoriet har arbeidet gått ut på å prøve seg frem til egnete enzympreparater. Siden har innvirkning av pH, salt, temperatur, enzymkonsentrasjoner og tid på degraderingen av skinn vært undersøkt. Effekten av forskjellige syrer og betingelser i syrebad ble også undersøkt.

Ved undersøkelsene må det taes forskjellige hensyn hvis enzymatisk avskinning skal brukes innen næringsmiddelindustrien. Disse er blant annet av økonomisk, teknisk og lovbestemt karakter. I Vest-Tyskland er bruk av enzymer tillatt, hvis det er bevist at det ikke er avgrenset eller totalt forbudt av spesielle bestemmelser. De Tyske bestemmelsene bygger på et FAO/WHO dokument fra 1971, "Specification for the identity and purity of some enzymes and certain other substances". Innholdet av dette dokument er et resultat av overveieringer fra "Joint FAO/WHO Expert committee on Food Additives", som holdt sitt møte i Roma den 16.-24. juni 1971 (Grampp, 1982). Videre blir det slått fast at ved bruk av hjelpestoffer, som syre og enzympreparater bør stoffene være godkjente av Helsedirektoratet.

I Norge finnes det ikke lov- eller regelverk for bruk av enzymer innen fiskindustrien.

Bestemmelser om tilsetningsstoffer og definisjoner på slike stoffer fremgår av forskrifter om tilvirkning og omsetning av næringsmidler, gitt ved kgl. res. av. 3. mai 1935.

Forskriftene sier blant annet:

"Næringsmidler som omsettes, må ikke inneholde andre tilsetningsstoffer enn slike som til enhver tid er godkjent av helsedirektøren."

Forskriftene definerer tilsetningsstoffer slik:

"Med tilsetningsstoffer forstås syntetiske og naturlige stoffer som ikke tilfører varen noen vesentlig næringsverdi, men som i små mengder blir tilsatt i den hensikt å forbedre varens holdbarhet, konsistens, utseende, lukt eller smak, eller som hjelpestoff under teknisk fremstilling av varen som fremdeles er til stede i den ferdige varen i forandret eller uforandret form. Som tilsetningsstoffer regnes ikke vann, koksalt, sukkerarter, etylalkohol, eddik, naturlige krydder eller stoffer som tilføres ved røyking med tre uten tilsetning av kjemikaljer eller andre hjelpemidler, og heller ikke vitaminer og mineraler" (Anonym, 1981).

### 3.2 Materiale og metoder

Forsøksmateriale. Sild (Clupea harengus) fanget i nærheten av Tromsø ble benyttet i forsøkene. Her er det brukt sild som har vært fryselaagret og fersk sild. Silden er av variert størrelse (Lengden var 15 - 35 cm).

Aminosyreanalyse. Tørrstoff med et proteininnhold tilsvarende ca. 2 mg protein ble hydrolysert i forseglet pyrexrør med 2 ml 6 N HCl ved 110 °C i 24 timer. Etter hydrolysen ble rørene åpnet og syren ble dampet bort ved 30 - 40 °C i en "Rotawapor". Tørrstoff ble løst i 10 ml citratbuffer og filtrert gjennom

Whatmanfilter.

Citratbuffer: tris-Natriumcitrat 2H <sub>2</sub> O	19,6 g
vann	980 ml
kons. HCl (37%)	16,5 ml
thiodglycol	5,0 ml
pentachlorphenolløsning (50 mg pentachlorphenol løst i 10 ml 96% ethanol)	0,1 ml

pH er justert til 2,2 med HCl/NaOH

Analysen ble foretatt i en automatisk aminosyreanalysator (Jeol; JLC - 6AH)

#### Proteaseaktivitet med hemoglobin som substrat.

Enzym: Enzympreparat fra ensilage (torske pepsin) og Sigma pepsin ble brukt i konsentrasjon 50 mg/l.

Substrat: 8 g hemoglobin (Sigma, type II) ble suspendert i 50 ml destilert vann. Etter dialyse i 1 døgn ved 4 °C ble løsningen fortynnet til 100 ml.

Inkubasjon: Inkubasjonsblandingen (prøven) består av 0,5 ml Johnson/Lindsay buffer (Johnson og Lindsay, 1939), 0,25 ml enzymløsning og 0,25 ml 8% hemoglobin (substrat). Prøven ble inkubert i 1 time ved 25 °C og reaksjonen ble stoppet ved å tilsette 5 ml 6% TCA. Prøvene ble sentrifugert i 10 min ved 3000rpm i en "Wifug" bordsentrifuge. Som referanse ble benyttet prøve hvor TCA ble tilsatt før enzymløsningene.

Proteaseaktivitet: Folin positivt materiale løselig i TCA ble bestemt som beskrevet av Barret (1972). Proteaseaktivitet uttrykkes som differanse i absorpsjon ved 700 nm mellom prøve og referanse.

Gjennomføring: 1 ml av TCA supernatanten ble tilsatt 4,0 ml kopper/alkali reagens. Etter 30 min henstand i romtemperatur ble 0,25 ml Folin-Ciocalteu reagens blandet i og inkubert ved romtemperatur i 30 min før absorpsjon ved 700 nm ble målt i "Spectronic 20".

Avskinningsforsøk. Silden ble behandlet rund i syrebad. Den ble vasket før filetering. Filetene ble siden kappet opp i 25 - 30 g biter. Disse bitene ble så behandlet i enzymløsning, det vil si en bit i 100 ml enzymløsning. Syren som er brukt i enzymløsningene er eddiksyre.

Til syrebadet ble det først forsøkt med tre forskjellige syrer: eddiksyre ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH}$ ), sitronsyre ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) og askorbinsyre ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ). Disse er prøvd i forskjellige konsentrasjoner. Tilsats av salt i forskjellige mengder i syrebad er prøvd (bordsalt, jodsalt, grovt sjøsalt). Syrebadets temperatur er undersøkt.

På de forskjellige enzympreparatene er det undersøkt innvirkning av følgende faktorer: pH (justert med  $\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH}/\text{NaOH}$ ), saltkonsentrasjon, temperatur og enzymkonsentrasjon.

Følgende enzympreparater er utprøvd:

CARBOXYPEPTIDASE A, aus Rinderpankreas, from bovine pancreas. (Suspension) 103225. Boehringer Mannheim GmbH, W-Germany.

COLLAGENASE, from Cl. histolyticum type I. Equiv. to first 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Fraction of Maudl, et.al., J.Clin.Invest. 32, 1323 ('53). Contains protease and peptidase activity.

220 Units/mg solid. 1 unit liberate Amino Acids from Collagen equivalent in Ninhydrin color to 1.0 uMole of L-Leucine in 18 hrs. at pH 7.4, 37 C. Sigma Chemical Company.

ELASTASE, No.0127, (Pancreatopeptidase E; E.C.No. 3.4.21.11) from Porcine Pancreas type III. Chromatographically Purified. Lyophilized, water soluble powder.

120 Units/mg solid. One unit will solubilize 1 mg of Elastin in 20 min at pH 8.8 at 37 C. Sigma Chemical Company.

HYALURONIDASE, type I. From Bovine testes. Lyophilized powder. Sodium Content 0.06% by weight. 460 NF Units/mg. Sigma Chemical Company.

PAPAIN from Carica papaya (3.4.22.2). purum. -1U/mg (1350 acc.NF Fluka AG, Chem. Fabrik CH-9470 Buchs.

PEPSIN (E.C. No. 3.4.4.1). 1900 Units/mg Protein. One unit produces an increase in OD of 0.001 per minute at pH 2.0 at 37 ° C as TCA-soluble products. Final volume = 16 ml Hemoglobin substrate. Sigma Chemical Company.

PEPSIN, "crude" preparat rensed fra torskeslog ved IFF. Aktivitet: 1200 umol Tyrosinekvivalenter /mg/min ved pH 2 og 25 ° C.

PRONASE, Protease (Ex Strep. griseus). Calbiochem-Behring Corp. La Jolla, CA 92037.

TRYPSIN, Pancreatic. NOVO- industri, Denmark. The preparation is derived from porcine pancreas. The major enzymatic component is trypsin (E.C.3.4.21.4.) chymotrypsin (E.C.3.4.21.1) may be present as a minor constituent.

TRYPSIN (EC.3.4.21.4) type III. 2xCrystallized (pfs). From bovine pancreas. Dialyzed and lyophilized. Essentially salt-free. Activity: 11000 BAEE units per mg protein. Sigma Chemical Company.

Innvollshomogenat fra sild, torsk og akkar.

På grunn av mangel på en direkte målemetode på oppløsning av intakt skinn er det for det meste brukt visuell bedømmelse av resultatet. Graden av oppløst skinn ble målt ved at fileten (25 - 30 g/bit) ble tatt opp fra enzybadet og plassert horisontalt med skinnsiden opp 15 cm under en spring. Utløpet på springen hadde en diameter på 10 mm og vannstrålens trykk var lavt. Når rester av oppløst denaturert skinn lett lot seg spyle vekk, uten at sølvhinnen ble skadet ble silden regnet for å være avskinnnet.

### 3.3 Resultater.

Tabell 1 viser aminosyresammensetningen av skinn hos sild. Som fremkommer av tabellen er aminosyresammensetningen karakteristisk for kollagen; høyt innhold av glycin, alanin, hydroksyprolin og prolin. Det er fravær av cystein og cystin.

	mg/g	%
lysin	23,637	2,8
histidin	2,573	0,3
arginin	51,253	6,1
hydroksyprolin	59,731	7,1
asparbinsyre	64,384	7,6
threonin	31,278	3,7
serin	66,414	7,9
glutaminsyre	45,185	5,3
prolin	81,928	9,7
glycin	236,608	28,0
alanin	85,764	10,2
cystein/2	-	-
valin	30,070	3,5
methionin	15,990	1,9
leucin	29,161	3,5
isoleucin	11,736	1,4
tyrosin	8,160	1,0

Tabell 1. Aminosyresammensetning i skinn fra sild.

Syrebehandling. Sammenlikning av syre (eddiksyre, sitronsyre og askorbinsyre) viser at eddiksyre er mest effektiv. Behandling i 5% eddiksyre i 6 - 8 minutter ga best resultat. Temperaturen bør være under 10<sup>o</sup> C. Dette med hensyn på sildens kvalitet og bevarelse av sølvhinne. Syrebehandling i sterkere syre enn 5% og/eller forlenget tid utover 10 minutter resulterer i skadet sølvhinne og delvis denaturering av muskel.

Enzymbehandling. De komparative undersøkelsene viser at de rensede enzympreparatene har omtrent samme degraderingsevne som Sigma pepsin (Figur 7 og 8). Dog viser collagenase og

elastase lavest effektivitet. Homogenat (fortynnet 1/100) fra akkarlever, silde- og torskeinnvoller viser adskildig høyere effektivitet ved avskinningen enn de rensede enzympreparatene (Figur 7 og 8).

Skinn fra fersk sild lar seg lettere bryte ned enn skinn fra sild som har vært innfrossen (Figur 7, 8 og 9).

Som et resultat fra disse undersøkelsene ble det valgt å gå videre med to typer enzympreparater. De er Sigma pepsin og torske pepsin.

Syre. For å få til en rask avskinning viser det seg nødvendig med små mengder syre i enzymløsningene (Figur 7). Det fremkommer at for fersk sild går avskinningen raskere enn for sild som har vært innfrossen. Sigma pepsin trenger større mengde syre for å få raskt degradert skinnet enn hva torske pepsin gjør (Figur 7).

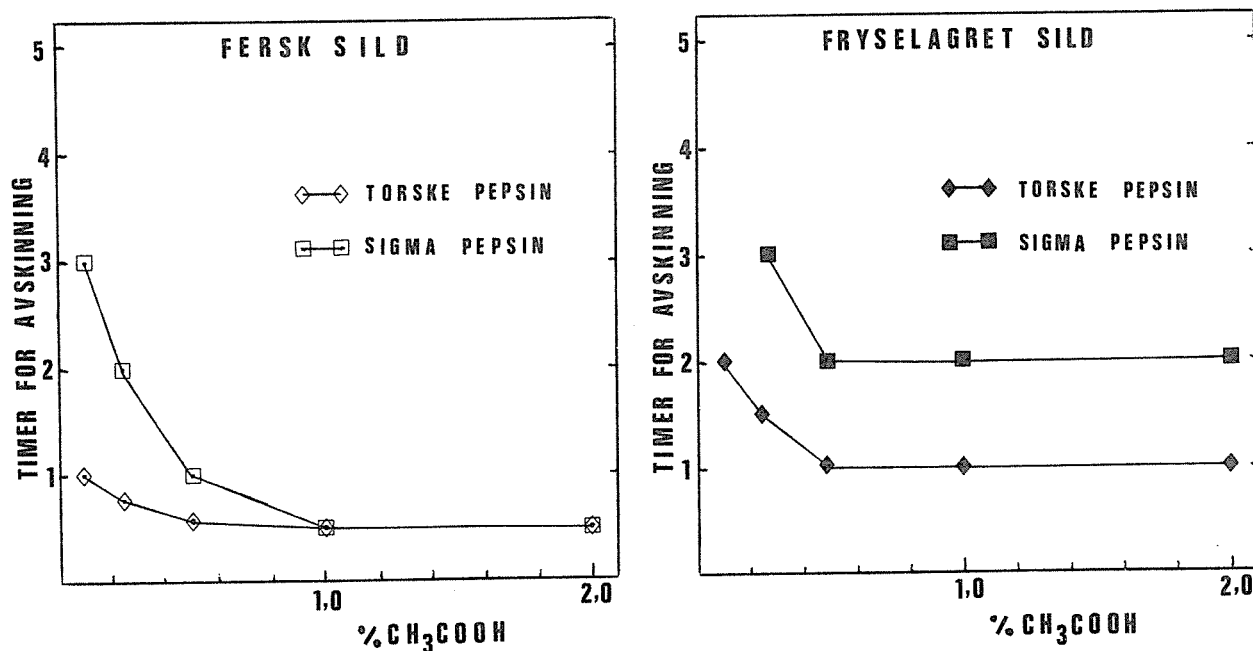


Fig. 7. Syrekonsentrasjonens innvirkning på avskinnings-effekten. Inkubasjonstemperatur er 18°C og enzymkonsentrasjonen er 100 mg/l.

Enzymkonsentrasjon. Avskinningen som funksjon av forskjellige

enzymkonsentrasjoner er vist i Figur 8. Ved lavere konsentrasjoner enn 50 mg/l av sigma pepsin øker avskinnings-tiden betraktelig. Torske pepsin tåler reduksjon i enzym-konsentrasjon ned til 30 mg/l uten at det går betydelig utover avskinningstiden.

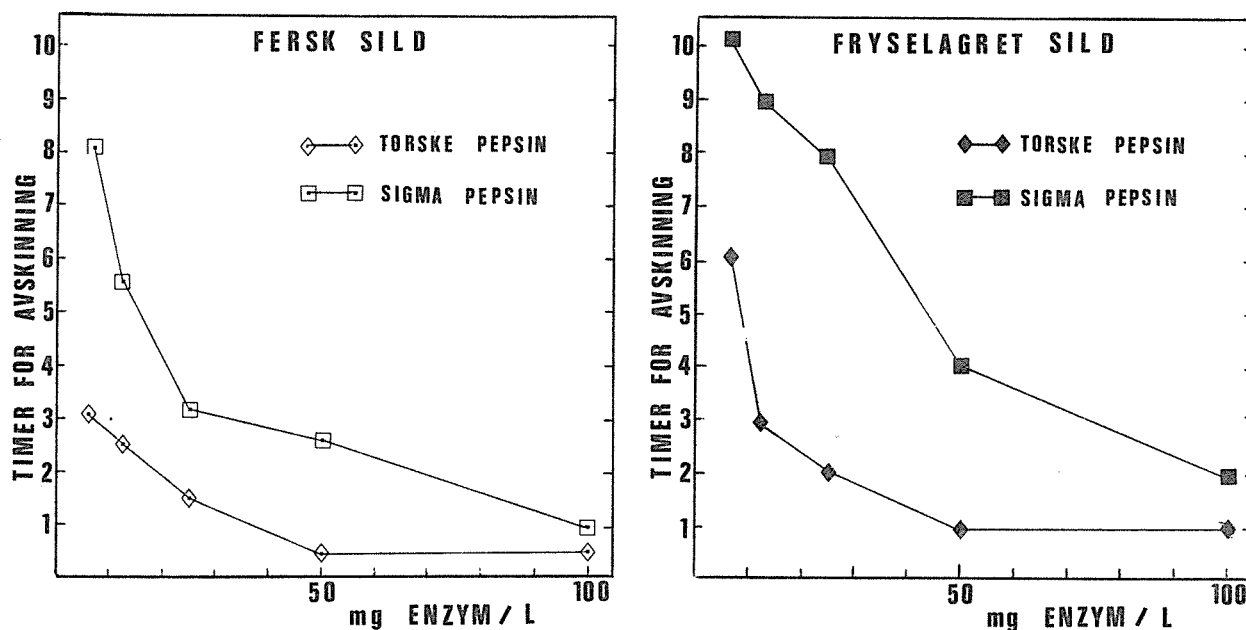


Fig. 8. Enzymkonsentrasjonens innvirkning på avskinnings-effekten. Inkubasjonstemperatur er 18°C og mengde syre i enzymløsning er 0,5%.

Temperatur. Ved temperatur under 18 - 20°C blir Sigma pepsin nærmest uvirksomt. Figur 9 viser virkningen av torske pepsin på degradering av skinn hos sild som har vært innfrosset og fersk sild ved forskjellige temperaturer og mengde syre. Reduksjon i temperatur forlenger degraderingstiden. Skinn hos fersk sild degraderes lettere ved lav temperatur enn skinn hos sild som har vært frosset.

Saltkonsentrasjon. Mengde NaCl i enzymløsningen  $\geq 1,0$  M virker hemmende på enzymenes degraderingsevne på skinn. Konsentrasjoner  $\leq 1,0$  M (0,1; 0,05; 0,01; 0,00 M) viser ingen signifikant forskjell ved degradering av skinn.

Andre undersøkelser har ikke gitt bedre avskinning enn



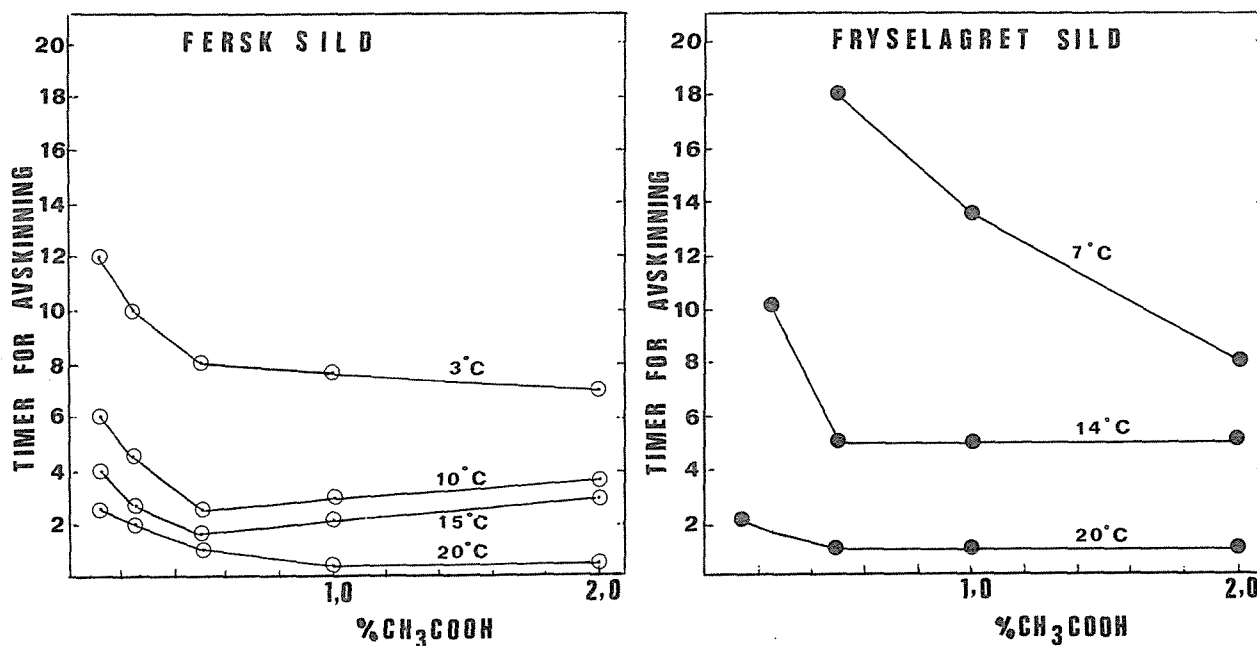


Fig. 9. Temperaturenns innvirkning på avskinnings-effekten hos torskpepsin ved varierende syremengder. Enzymkonsentrasjoner er 100 mg/l.

ovennevnte resultater. Disse er å behandle silden i basiske løsninger i stedet for syrebad. Det er også gjort forsøk på å behandle silden først i basisk løsning og siden i syreløsning og omvendt rekkefølge.

Den enzymatiske degraderingen synes å foregå de første 2 - 3 timene under inkuberingen. Det vil si at hvis ikke silden er ferdig avskinnert på 4 - 8 timer så vil ikke avskinningen foregå som ønsket (se optimal avskinning s. 15).

Avskinningen viser omtrent samme forløp for sild som har vært innfrosset, fersk sild og saltmoden sild. Dog går avskinningen raskest på fersk sild.

Med hemoglobin som substrat har Sigma pepsin høyest aktivitet ved pH under 3,2. Når pH forhøyes over 3,2 til 4,5 har torskpepsin høyere aktivitet (Figur 10).

Enzymstabilitet hos torskpepsin i fortynnet løsning, uten substrat fremkommer i Figur 11.

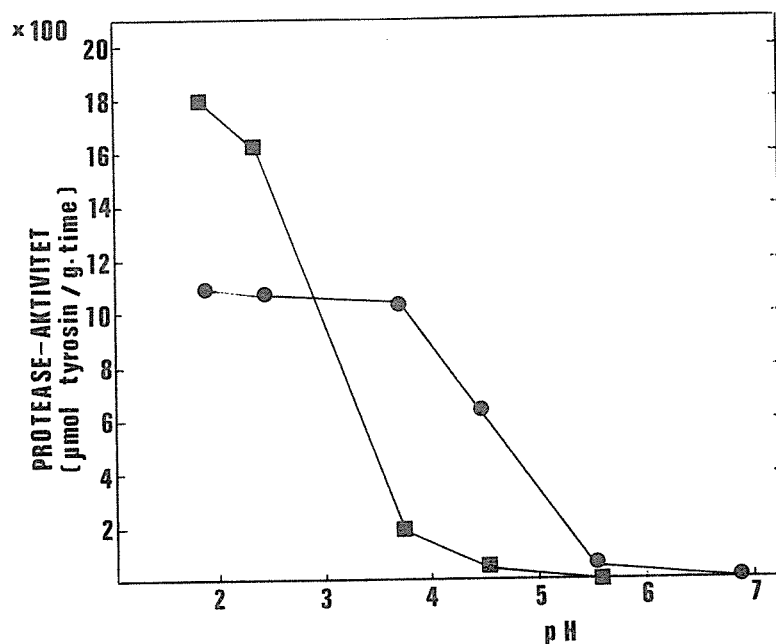


Fig. 10. pH-kurver for torskpepsin (●) og Sigma pepsin (■) bestemt ved 1 times inkubasjon ved 25°C med hemoglobin som substrat.

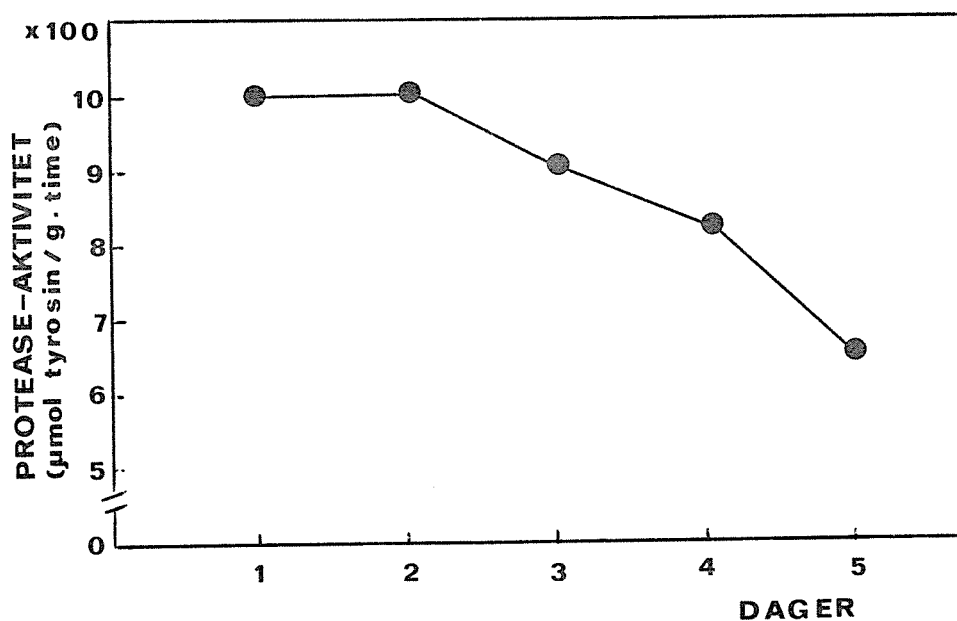


Fig. 11. Stabilitet til torskpepsin i løsnings ved romtemperatur. Enzymaktivitet er målt med hemoglobin som substrat etter 1 times inkubasjon ved 25°C.

Torske pepsinet vises å være stabilt i 2 døgn, men deretter reduseres aktiviteten med ca. 10% pr. dag de neste 3 dagene.

Sildens størrelse innvirker på avskinningseffekten. For fersk sild av størrelse 2 - 3 stk./kg (400 - 500 g) eller større tar avskinningen 60 - 120 min. For fersk sild av størrelse 2 - 3 stk./kg eller mindre tar avskinningen 30 - 60 min. Hvis silden ligger lenger i enzymbadet enn oppgitte tider, blir ryggdelen (sølvhinnen) av filetene oppløst.

Det kan avskinnes to porsjoner sild i hvert enzymbad før avskinningseffekten blir redusert. Det vil si at 1,5 l enzymløsning går til å avskinne 2 kg sild.

### 3.4 Diskusjon

Ved forsøkene er det registrert at når det ikke er blandet syre i enzymløsningene klarer enzymene ikke å bryte ned innerste laget av skinnet, stratum compactum (Figur 1). Antageligvis er stratum compactum ikke blitt nok denaturert eller det har foregått en aggregering under denatureringen, slik at de vanlige proteasene ikke klarer å degradere den. En mulig forklaring er også at en reddenaturering har foregått (Hayashi, 1973). Konformasjonsforandringer i kollagen er reversible (Michalyi, 1972). Hvis det derimot blir brukt små mengder eddiksyre i enzymløsningene, ser det ut for at denne hinnen denatureres sakte (samtidig som enzymatisk degradering foregår), eller at syren holder ved like den denaturerte form.

Det at også trypsin (både Novo og Sigma type) viser større degraderingsevne i nærver av syre kan være en indikasjon på at det finner sted generell syre-katalyse.

Det at små mengder syre katalyserer på denne måten er kjent innenfor enzymologien som generell syre-katalyse (side. 13). Syren virker på den måten at substratet blir lettere tilgjengelig for det frie enzym (syren holder denatureringen ved like).

Dette indikerer at ved enzymatisk degradering har substratets tilstand (grad og type denaturering) veldig mye å si for avskinningseffekten. Modifisering av substrat, det vil si hvordan kollagenet er denaturert har sikkert like mye å si som type proteaser som velges til degraderingen. Betingelsene et bredtspektret enzym er tenkt å degradere ved er også meget viktige.

Tilsetting av syre i enzymbadet fører til senking i pH. Det inneberer at betingelsene i enzymbadet blir mer gunstige for pepsin både når det gjelder stabilitet og aktivitet.

En annen forklaring på økt degraderingsevne hos enzymene i nærver av syre er at eddiksyren fanger opp ioner (eller andre partikler) som virker hemmende på enzymaktiviteten eller "riktig denaturering". Dette kan for eksempel sammenliknes med EDTA (etylendiamintetraeddiksyre) som i noen tilfeller vil virke aktiverende på enzymene. Det vil si at det fanger opp ioner (metaller) som ellers ville hemme, eller inaktivere enzymmolekylet. Ved produksjon av gelatin og glue blir råstoffet (fiskeskin) behandlet i svak syre. Eddiksyre er en av de anbefalte syrene (Kulikov, 1978). Syren er ment å skulle fange opp NaCl ioner. Har en for mye salt til stede vil det nedsette gelegenskapene, det vil si det at denaturerte kollagen vil aggregere. Gelatin er et godt substrat for en rekke generelle proteaser (trypsin, chymotrypsin, kathepsiner, etc.) og vil kunne degraderes ned til peptidnivå (Burleigh, 1977)

Syren i seg selv vil antageligvis føre til sakte degradering.

En annen mulig forklaring er at pepsin eller andre sure proteaser klarer en begrenset degradering av skinn og at de aktiverer latente kollagenaser i skinnet slik at skinnet blir løst opp (Harper, 1980).

Det enzympreparatet som egner seg best til avskinningsformålet er torske pepsin. Dette, både når det gjelder rask avskinning og temperatur. Forklaring på en større effekt hos enzymer ifra innvollshomogenat fra torsk, sild og akkar og videre "crude"

preparat fra torskeslog er sannsynligvis den at enzymer fra dyr tilpasset kalde omgivelser har høyere molekylær aktivitet ved lave temperaturer.

Gildberg og Raa, 1983, har isolert pepsin fra loddemager og funnet at pH optimum er signifikant høyere enn hos varmblodige dyr og annerledes ved forskjellige substrat. Ved pH 5 er pepsin fra lodde i stand til å degradere kollagen. Dette er i overensstemmelse med at torske pepsin klarer å bryte ned skinn ved lavere syrekonsentrasjoner enn enzymer fra varmblodige dyr, mikrober og planter. De har funnet at pepsin fra lodde har forholdsvis høy aktivitet ved lav temperatur.

Nicolaysen 1976, har funnet at salt reduserer enzymaktiviteten til sure proteaser. Det at saltkonsentrasjoner i enzym-løsningene over 1 M hemmer enzymenes evne til å degradere skinn skyldes muligens at saltet fører til aggregering av skinnen slik at enzymene ikke klarer å degradere skinnen.

Det at det går saktere for enzymene å degradere skinn på sild som har vært innfrossen kan skyldes at det er blitt dannet nye bindinger i bindevevsstrukturen under innfrysingen og fryselagringen. Eventuelle latente kollagenaser som medvirker i degraderingen kan bli inaktivert ved frysing slik at deres bidrag i degraderingen blir mindre.

Av Figur 10 fremkommer at torske pepsin har høy aktivitet ved høyere pH enn Sigma pepsin med hemoglobin som substrat. Dette skulle understreke at man ikke bør legge for stor vekt på produsente anførte definisjoner av enzymaktivitet ved valg av enzym for degradering av et annet ikke løselig substrat.

Figur 11 viser at torske pepsin, uten substrat, er stabilt i løsning, som medfører at enzymløsningen kan brukes på to porsjoner sild. Dette innebærer at i praksis er torske pepsin tilstrekkelig stabilt for å kunne brukes på to porsjoner sild. Eksempel på proteaser som regnes for å være ustabile (tape raskt aktivitet) i løsning er trypsin og papain som kan miste mye av sin aktivitet på ned til 1 time (Larsson, 1982).

Grunnen til at det ikke tar like lang tid å degradere skinn

hos sild av forskjellige størrelser kan være at antallet av stabile intermolekulære kryssbindinger i skinnets bindevev gjerne øker med fiskens alder (Mohr, 1971b).

## 4 ENZYMPREPARAT

### 4.1 Innledning

#### 4.1.1 Fordøvelsesproteaser

Ved fordøyelse av animalsk vev spiller proteaser en viktig rolle. Dersom i midlertid lipider og polysakkarider også inngår som viktige strukturelle komponenter i vev, vil vevsdegraderingen kunne antas å være et samspill mellom flere forskjellige enzymgrupper. Fettstoffer, som beskytter proteiner for proteaseangrep, kan bli degradert av lipaser som siden muliggjør proteolytisk degradering av proteiner. Polysakkarider som inngår i bindevevsproteinene kan angripes av polysakkaridaser (Gildberg og Raa, 1976). Gildberg og Raa, 1976, har videre undersøkt proteaseaktivitet, lipaseaktivitet og aktiviteten av N-acetylglukosiaminidase og funnet at pH-optimum for sure proteaser er rundt 3 og N-acetylglukosiaminidase på ca 4. Andre polysakkaridaser som finnes i fordøyelsesorganer hos fisk har pH - optimum i området 4 - 5,5. Dette kan støtte den antakelsen at vevsdegraderingen er et samspill mellom disse enzymgrupper.

I fordøyelsessystemet hos fisk er pepsin antatt for å vere den dominerende sure proteasen.

#### 4.1.2 Ensilage

Fiskeensilage -syrekonservering-, kan man kort beskrive som et væskeprodukt laget ved å blande sammen syre og fisk eller fiskeavfall (slog). Dannelse av væskefasen forårsakes av blant annet proteolytiske enzymer i fisken som løser den opp (autolyse), aktivert av syre som også medfører nedbryting og hindrer bakterievekst.

Det er blant annet utviklet en metode for konservering av fiskeslog med uorganiske og/eller organiske syrer. Den antimikrobielle virkningen skyldes at når pH faller, foreligger mer og mer av den organiske syren i udissoisert form. I denne formen er den i stand til å passere bakterienes celledemembraner og trenger inn i bakterien. Her er pH nøytral, noe som medfører at syren dissosierer og pH faller. Dette har toksisk effekt på cellene og bakteriene dør (Gildberg og Raa 1976).

Hvis malt torskeslog tilsettes propionsyre (0,75%) og maursyre (0,75%) dannes det en biokjemisk stabil suppe som kan lagres ved værelsestemperatur uten mikrobiell ødeleggelse. Det er enzymer som naturlig finnes i sloet som hurtig fører til at mesteparten av vevet løser seg opp (autolyserer). Autolysen skjer hurtigst ved svakt sur pH. Surhetsgraden i ensilagen blir da rundt pH 4,2.

Autolysatet kan separeres i tre faser: fettfase, vannfase og slamfase (sediment). Mesteparten av proteinet er løst i vannfasen. Ca. 80% av tørrstoffet i vannfasen er protein og fettinnholdet er mindre enn 0,5% (Gildberg og Raa, 1976).

Utifra pH-optimum for autolyse av fiskeslog, mengde proteaser med pH-optimum ca. 3 og at polysakkaridaser som finnes i fordøyelsesorganer hos fisk har pH-optimum i området 4 - 5,5 (Gildberg og Raa, 1976), vil det være hensiktsmessig å bruke enzympreparat fra ensilage. Videre vil dette enzympreparatet være aktivt ved pH rundt 4. Forskjellen i løselighet mellom loddesskinn- og muskel (som antas å være svært likens i sild) er størst ved pH 4, hvor loddemuskel er minimalt løselig. Degradering av skinn kan derfor trolig utføres ved pH rundt 4 uten vesentlig tap av muskelprotein.



## 4.2 Enzymrensing

Enzymer er biologiske katalysatorer, det vil si de påskynder en kjemisk prosess uten selv å forandres. Den aktive delen av enzympreparatet er et fordøyelig protein, det vil si at det ikke er "kjemisk" i klassisk forstand. I industriell henseende kan man skille mellom høytrensete enzymer - hovedsaklig laget for legemiddelindustrien, for eksempel for analytisk bruk - og bulk enzymer.

Etterspørselen etter bulkenzymer innen industrien øker. Slike enzymer inneholder relativt små mengder rent enzymprotein, vanligvis mellom 1 og 3%. 99% av markedet utgjøres av 16 enzymer, de fleste karbohydrat- eller proteinnedbrytende (Åslund, 1982).

Rensing er en konsentrasjonsprosess hvor det ønskelige protein er konsentrert og andre cellulære stoffer separert bort. For enzymrensing bør man søke etter cellevev som inneholder forholdsvis store mengder av det ønskelige enzym og som er tilgjengelige i store mengder. I dette henseende har det hovedsaklig vært brukt organer fra storfe som kyr, svin og geiter og planter. Alternativ kilde er mikroorganismer. En kilde som oppmerksomheten har vært lite rettet mot er fiskeslog, som dumpes i store mengder.

Molekyler i blandning kan man separere ved hjelp av tre ulike prinsipper. Et er å forandre miljø. Det kan skje, for eksempel gjennom tilsetning av alkohol, som gjør at bestemte stoffer ikke lenger kan finnes i oppløst form uten å danne krystaller eller felles ut.

Det andre prinsippet er å utnytte forskjellen i løselighet hos ulike molekyler i to oppløsningsmidler som ikke er blandbare. Og ved utnyttelse av det tredje og siste prinsippet har man et ytre kraftfelt, det vil si at stoffene beveger seg med forskjellig hastighet til et bestemt punkt.

De fleste moderne biokjemiske separasjonsmetoder bygger på det sistnevnte prinsipp. Ulempen med noen av metodene som bygger på dette tredje prinsippet er at de ikke kan anvendes ved

store mengder startmateriale.

Det finnes flere metoder til å få proteinmolekyler til å bevege seg i en bestemt retning. Disse er for eksempel elektroforese og kromatografi. En annen metode, er sentrifugering, hvor man utnytter gravidasjonen. En metode som bygger på molekylenes egenstørrelse er dialyse. Her kan små molekyler skilles fra store molekyler ved at de små molekylene diffunderer gjennom en membran.

Rensing av et protein, for eksempel enzym, kan man ofte dele inn i tre stadier:

Før rensingen må hvert protein foreligge i en løsning, dette fordi alle vanlige isoleringsteknikker foregår i vandig løsning.

Ekstrasjon brukes til å frigjøre enzymene fra celler eller cellebestandsdeler. Hvis enzymene finnes inne i cellen, er intracellulære, må man vanligvis først sprengne celleveggen og cellemembranen. Når det gjelder dyre og planteceller er dette vanligvis ikke noe problem. Når det gjelder dyreceller anvendes helt enkelt en kjøttkvern og en turmixer som er en enkel beholder med roterende kniver i bunnen.

Det er klart at metoder som blir brukt til å ekstrahere noen få milligram av celler er lite anvendelig i prosess for store mengder materiale.

Etter ekstrasjonen følger ofte fraskilling av faste vevskomponenter ved sentrifugering.

Ofte kan det være vanskelig å få bort alle partikler fra ekstraktet - det gjelder spesielt bestemte ekstrakter fra kjertler og andre organer. Da kan man vanligvis ikke anvende ekstraktet til kromatografi. I stedet anvender man gamle utprøvde separasjonsmetoder ved proteinrensing, for eksempel utfelling med et salt, (ammonium sulfat), eller et løsningsmiddel som vanlig alkohol.

I det avsluttende stadiet av renseprosessen inngår det

vanligvis en eller flere høyoppløsende kromatografisteg. Der utnytter man i tur og orden ulike og varierende egenskaper hos proteinmolekylene. Ettersom ikke dette trinnet i renseprosessen blir brukt ved rensing av torskpepsinpreparatet, vil denne siste renseprosedyren ikke bli behandlet her nærmere.

Stabilisering. Den mest vanskelige, tidkrevende og frustrerende siden ved enzymrensing er stabilisering av proteinet (enzymet) i aktiv form. Denne vanskeligheten kommer av det faktum at hele stabiliseringsprosessen må gjentas i hvert enkelt skritt i rensingen. Her er det viktig å passe på følgende: pH, oksydasjon, tungmetaller og temperatur.

Det kan bety at bulkenzymer er mer stabile og har en større lagringsstabilitet og vil derfor ha en fordel fremfor høyrensete enzymer.

Regulering av pH i løsning involverer en rekke spissfindigheter. For eksempel, er det ofte antatt at pH verdier for maksimum pH aktivitet er den samme som for optimums pH stabilitet. Desverre er dette ofte ikke riktig. Det finnes flere tilfeller hvor pH optimum for assay og lagring (stabilitet) er forskjellig fra hverandre med en eller flere pH enheter (Cooper, 1977).

De fleste vanlige proteiner har en del sulfhydryl grupper. Disse kan være viktige for substratbinding og er meget reaktive. Ved oksydering av sulfhydryl grupper er det muligheter til dannelsen av intra- eller intermolekulære disulfidbindinger, som vanligvis fører til tap av enzymaktivitet (Cooper, 1977).

Det er vanlig antatt at protein er mest stabilt ved 0°C. Enkelte proteiner overlever best i konsentrerte løsninger ved 0°C, mens andre er mest stabile ved temperaturer ned til -20°C eller -70°C. Til tross for dette er det ikke riktig å anta at kaldeste betingelsene alltid resulterer i større stabilitet, fordi frysing og tining av enkelte proteinløsninger kan medføre denaturering. Slike tilfeller kan tilsetning av glycerol eller små mengder dimetyl sulfoxid til preparatet

før frysing virke stabiliserende (Copper, 1977).

#### 4.2.1 Fremstilling av torskpepsinpreparat

Fiskeslog (avfall) er malt i en vanlig kjøttkvern. Her vil man få frigjort enzymer fra celler og cellebestandsdeler ved å sprengne cellevegger og cellemembraner.

Etter at sloget er malt tilsettes det 0,75% maursyre og 0,75% propionsyre. Syren virker videre ved å degradere cellevegger og cellemembraner. Videre vil syren aktivere blant annet pepsinogen til pepsin. Disse enzymene vil siden hjelpe til ved degraderingen av celler. Fullstendig frigjøring av proteinene (enzymene) vil siden skje under autolyseprosessen. Det vil si sloget blir autolysert i 2 - 3 døgn ved ca. 30 °C, pH 4,2.

Fra autolysetank går ensilagen siden til sedimenttank.

I sedimenttanken vil fettfase, proteinfase og slamfase lagdele seg slik at det lar seg lett gjøre å tappe proteinfasen fra sedimenttanken. Da vil slamfasen (fiber og lignende) og fettfasen sitte igjen.

Nærmere rengjøring foregår ved sentrifugering i 30 min ved 3000g og slam og fett skilt ut.

Neste trinn i renseprosessen er ammoniumsulfat felling, 20/70% felling. Den mest brukte metoden til proteinfelling er tilsetning av ikke organiske salter som ammoniumsulfat eller kaliumfosfat. Til store mengder lite rensede preparater tilsettes saltet i tørret form. Hastigheten ved tilsetning av salt til proteinløsningen er meget viktig. For mange proteiner må tilsettingen skje meget trinnvis. Det vil si små mengder er tilsatt og løst fullstendig opp før neste tilsetning. Når ammoniumsulfatet ( $\text{Am}_2\text{SO}_4$ ) løses opp, blir store mengder vann bundet til hvert  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  molekyl. Når mengde  $\text{Am}_2\text{SO}_4$  molekyler øker i løsningen, vil det være mindre vann tilgjengelig for de proteiner som er til stede i løsningen. Ved samme tidspunkt vil det ikke være tilstrekkelig vann til stede til å opprettholde proteinløsningen og de vil falle ut. Dette er da

antageligvis en dehydreringsprosess. Andre forklaringer er også blitt foreslått. Hvis dehydrering går for raskt kan visse proteiner bli denaturert. På den andre siden, hvis dehydreringen går for sakte vil andre proteiner bli denaturert. For hver enkelt type protein må hastigheten ved salttilsetning undersøkes eksperimentelt (Cooper, 1977).

I praksis er det utfelte materiale samlet ved sentrifugering. I fleste tilfeller finnes det størst enzymaktivitet i 35 til 45% og 45 til 55% felling. Dette innebærer første felling 0 - 35% og andre mellom 35 og 55%. Dette må likevel undersøkes eksperimentelt i hvert enkelt tilfelle. Etter at bestemt mengde salt er tilsatt lar man løsningen stå på røring i kort tid (10 - 60 min) til å oppnå likevekt. Etter det er det utfelte materiale samlet ved sentrifugering.

En av de eldste metodene for å fjerne salt er dialyse. Denne delen av rengjøringen av torskpepsinpreparatet er å fjerne  $\text{Am SO}_4$ . Denne teknikken innebærer at en pakker proteinløsningen inn i en pose laget av cellulose. Denne posen er plassert i et stort volum av kald, bufret løsning med lav ionestyrke. Dialyseposen har små hull (semipermeabel) som slipper igjennom de små uorganiske saltmolekylene men ikke makromolekylære proteiner. Når små molekyler diffunderer ut igjennom posen og inn i dialysebuffer, vil ionestyrken i proteinløsningen reduseres. Denne prosessen fortsetter til saltkonsentrasjonen er like stor inne i posen og utenfor. Dette tar vanligvis 5 - 6 timer (Cooper, 1977).

En bør merke seg at denne prosedyren kan i tillegg til å fjerne salt også fjerner alle sorter av små metabolitter som ATP og coenzym.

Figur 12 viser renseprosessen for torskpepsinpreparat skjematisk.

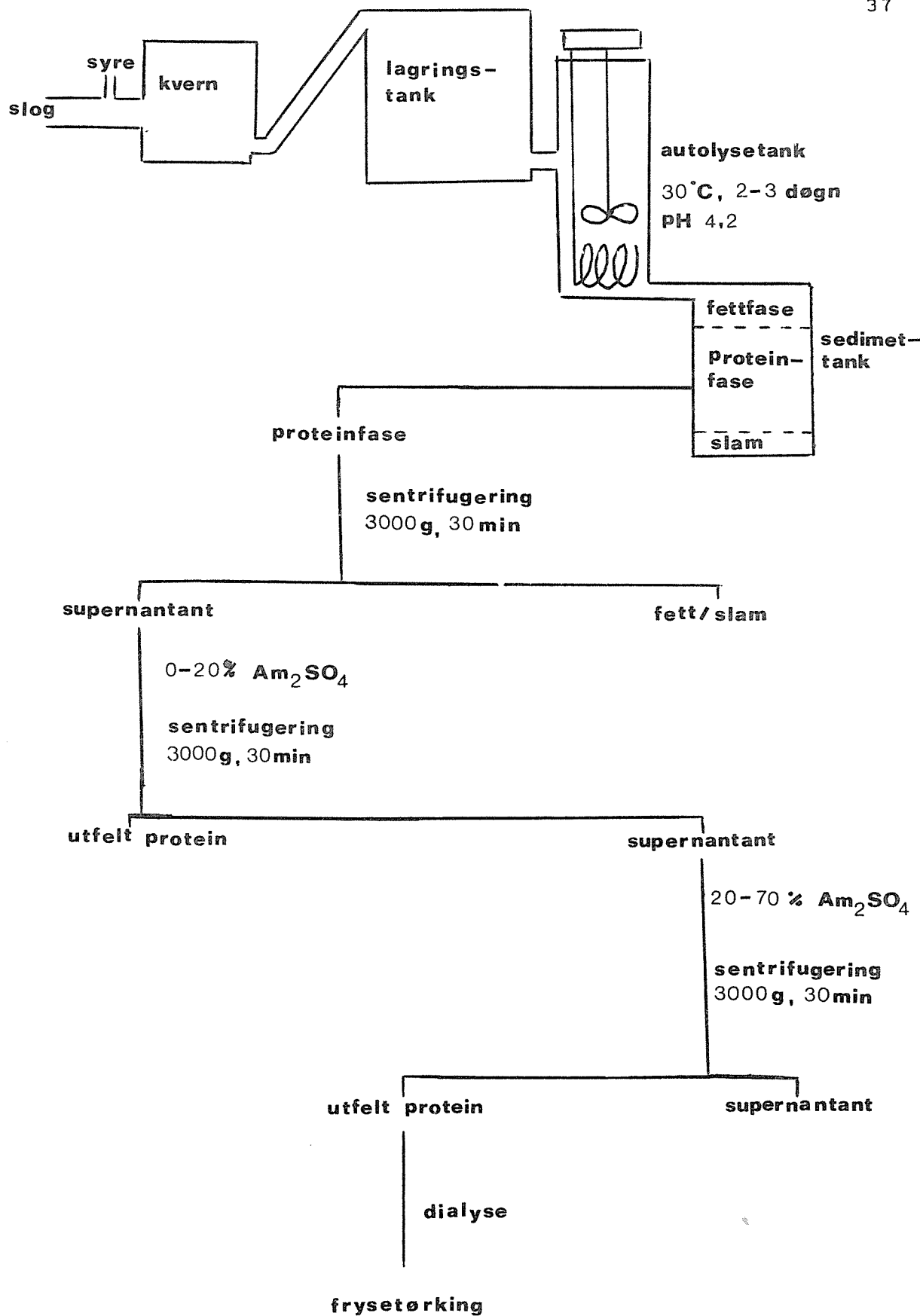


Fig. 12. Skjematisk illustrasjon av fremstilling av torskpepsinpreparat.

## 5 PILOTANLEGG

Ved enzymatisk avskinning bør en legge hovedvekten på følgende momenter:

- a) Avskinningen bør skje raskt slik at dimensjonene på utstyret ikke er altfor omfattende (store) og dyrt.
- b) Avskinningen bør foregå uten å skade sølvhinne og/eller kjøtt. Produktet bør ikke avvike fra andre sildeprodukter produsert på tradisjonell måte når det gjelder kjemisk, mikrobiell eller sensorisk (smak, konsistens, lukt, utseende).
- c) Avskinningen bør foregå ved lavest mulig temperatur. Dette på grunn av hensyn til sildens generelle kvalitet. Silden bør holde lavest mulig temperatur under hele lagrings- og produksjonsperioden.

### 5.1 Avskinningsprosessen.

Avskinningsprosessen er tenkt i praksis å kunne foregå i tre trinn:

Trinn 1. Syrebehandlingen:

Ved en kort syrebehandling, 5 minutter i 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  vil skjell falle av fersk sild. Alternativt for fjerning av skjell kan det brukes ristrensemaskin før syrebad. Syrebehandlingen vil føre til svekkelse av skinn (denaturering av kollagen). For syrebehandlingen brukes det prinsipp for syrebestandig vippekar (Figur 13). Fordelen med vippekarprinsipp er at en på en lettvis måte kan tømme karet uten å tømme ut væsken når det går an å bruke samme syrebadet for flere porsjoner sild. På syrekaret kan det monteres en sil og utstyr for resirkulering, slik at silderisp kan samles opp til videre produksjon.

Trinn 2. Enzymbehandling:

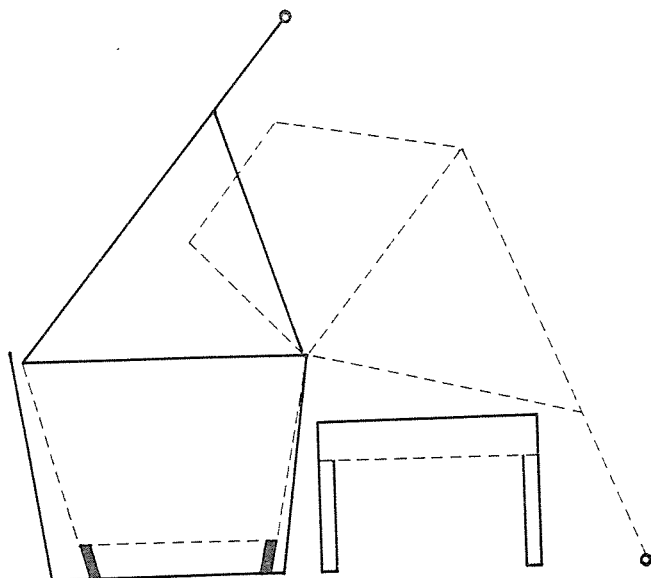


Fig. 13. Prinsipp for vippekar (Fra Pedersen, 1980).

Umiddelbart etter syrebehandlingen kan silden behandles i enzymløsning. For enzymbehandlingen brukes det også prinsipp for syrebestandig vippekar. Her oppnår man samme fordelene som under syrebehandlingen. Det er lett vint å tømme innholdet (silden) uten å tømme ut enzymløsningen som kan brukes til to porsjoner sild. Temperaturen i enzymløsningen bør være 15 - 20 °C og tid i enzymbadet 30 - 120 minutter, alt etter sildens størrelse. På denne tiden skal enzymene ha løst opp skinnet på silden uten å skade sølvhinne og eller kjøtt. Enzymrester og oppløst skinn (slitrer) som lett lar seg vaske av i vanlig vaskemaskin for fisk, blir liggende på sildens overflate.

Når temperatur viser seg å være viktig for effekten av avskinningen bør det tas hensyn til sildens temperatur og enzymbadets temperatur. Silden som blir tatt opp i enzymbad vil i praksis føre til nedkjøling av enzymbadet. Før silden tas opp i enzymbadet bør temperaturen ligge omkring 20 °C for at temperaturen i enzymbad under avskinningen ikke blir for lav.

Den varmemengde silden vil absorbere fra (kjøle ned) enzymbad kan beregnes med utgangspunkt i varmebalansen (Anonym, 1970):  
(varme avgitt fra enzymløsning = varme tilført sild)



$$VC_V (T_V - T_e) = C_f (T_e - T_f) \quad (1)$$

hvor:

$V$  = varmemengde pr. kg sild

$C$  = spesifikk varme for sild (0,813 kcal/kg, K)

$C_f$  = spesifikk varme for vann (1 kcal/kg, K)

$t_v$  = temperatur i enzymløsning før inkubering med sild

$t_v$  = temperatur i enzymløsning under inkubering med

$t_e$  sild (slutt temperatur)

$t_f$  = temperatur i sild

$f$

Den vannmengde som inneholder varmen overført fra enzymløsning til 1 kg sild vil da være:

$$V = \frac{0,813 (T_e - T_f)}{C_V (T_V - T_e)} \quad (2)$$

For å komme frem til den teoretiske ønskede inkuberingstemperatur kan man variere starttemperaturen i enzymløsningen eller mengde enzymløsning/sild ( $V$ ) ved en gitt starttemperatur. Øverste temperaturgrense for enzymløsning settes lik 25 °C, av hensyn til enzymenes temperaturstabilitet og sildens kvalitet. Toskepepsin blir raskt inaktivert ved temperaturer over 30 °C, pH 6,3 (Gildberg, 1983). Minste forhold enzymløsning/sild og det mest ønskelige er 1,5

Ved et fast forhold, enzymløsning/sild = 1,5 og en bestemt inkuberingstemperatur, må utgangstemperaturen i enzymløsningen varieres etter sildens temperatur.

Ved videre å benytte ligning (1) kan utgangstemperaturen i enzymløsningen beregnes ved fast forhold enzymløsning/sild lik 1,5 og bestemt inkuberingstemperatur. Da kommer man frem til følgende ligning:

$$T_v = \frac{0.813 (T_e - T_f)}{\text{ENZYMLØSNING/SILD}} + T_e$$

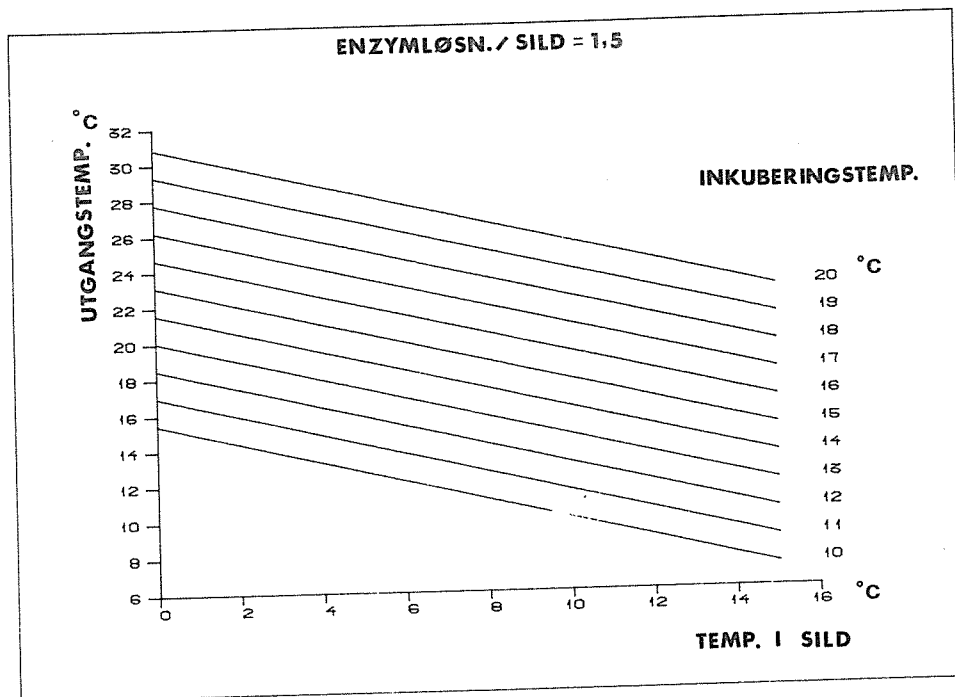


Fig. 14. Utgangstemperatur ved forskjellige temperaturer i sild.

Figur 14 viser verdiene for forskjellige inkuberingstemperaturer. Utifra Figur 14 kan man finne passende utgangstemperaturer i enzybad, slik at inkuberings-temperaturen ikke blir for lav/høy, forutsatt kjent temperatur i sild og fast forhold enzym/sild = 1,5.

For å undersøke tiden det tar før inkuberingstemperaturen har stabilisert seg er temperatur i enzybad og sild undersøkt eksperimentelt (Figur 15). Temperaturutviklingen i følgende forhold: 3 deler enzymløsning og 2 deler sild (2 kg) er undersøkt. Temperatur er målt i enzybad ( $t_1$ ), ved sildens overflate ( $t_2$ ), under sildens skinn ( $t_3$ ) og midt inn i silden ( $t_4$ ). Silden er av størrelse 250 - 350 g.

Som fremkommer av Figur 15 synker temperaturen i enzybad med 5°C de første 5 minuttene, men holdes deretter på et stabilt nivå. Temperatur midt i silden øker jevnt under inkuberingen.

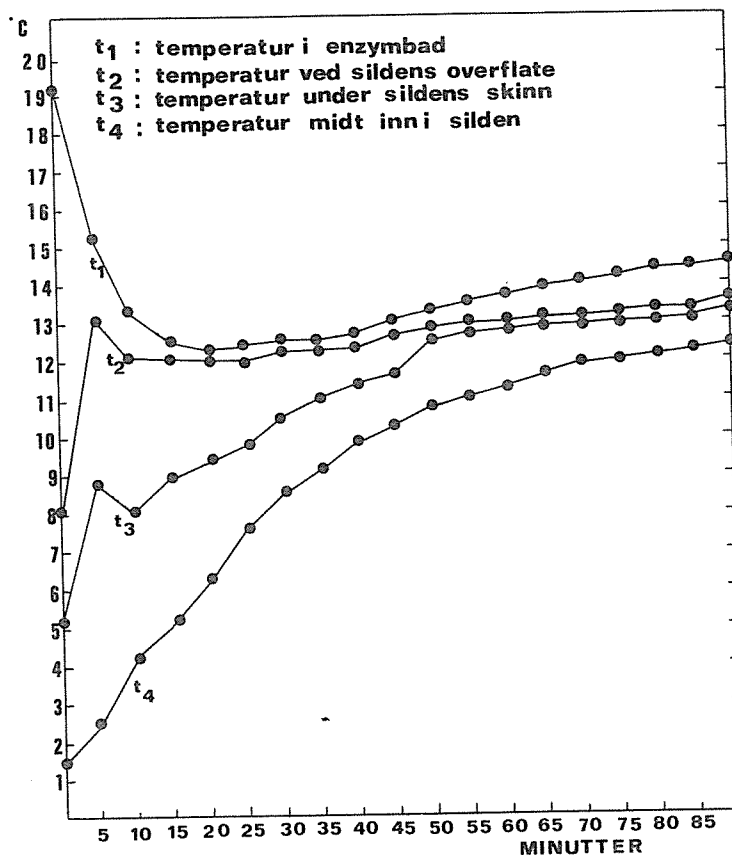


Fig. 15. Temperatur i enzymbad og sild ved tid under inkubering. Forhold enzymløsning/sild 1,5. Størrelse på sild er 3-4 stk. per kg. Omgivelsestemperatur er 23°C. Temperatur er målt med FLUKE, modell 2240B, Datalogger.

Problem med bakterievekst vil man antageligvis ikke få hverken under syrebehandlingen eller enzymbehandlingen på grunn av den organiske syren som er til stede i begge behandlingene. Her vil man få samme effekt av den organiske syren som i ensilage (se tidliger). Den mikrobielle virkningen til den organiske syre skyldes syrens evne til å bringe protoner (hydrogenioner) gjennom cellemembraner, dersom pH i omgivelsene er sure. I cellene, hvor det er nøytralt pH, vil pH falle og cellen dø (Gildberg og Raa 1976).

Ved å behandle silden rund i enzymbadet vil selve fiskekjøttet ikke bli eksponert for syre eller enzymangrep, som blant annet ville kunne redusere utbyttet og forårsaket dannelse av

bitterpeptider.

Den utilstrekkelige stabiliteten, tendensen til å brytes ned, hos mange enzymmolekyler begrenser deres anvendelighet i bioteknisk sammenheng. Proteaser som trypsin og papain bryter ned proteiner og kan derfor bryte ned seg selv. Ved immobilisering fikseres molekyler av disse enzymene så langt fra hverandre slik at "kanibalisme" blir umulig. Enzymer av det slaget kan i immobilisert form være anvendbare i en måned, mens frie enzymer under samme betingelser bryter hverandre ned på en time (Larsson, 1982). Sure proteaser fra ensilage er meget stabile (Figur 11) og ved pH - 4 vil en i tillegg få hemmet bakterievekst. Dette vil i praksis bety at immobilisering er unødvendig og de sure crude enzymene fra ensilage (torske pepsin) vil kunne brukes to ganger som fører til reduserte kostnader.

Trinn 3:

Vasking av sild etter enzymbehandling har den hensikt å vaske vekk eventuelle skinn- og enzymrester fra sildens overflate og dermed stoppe enzymdegraderingen. Denne vaskingen kan foregå ved hjelp av de fleste vaskemaskinene som finnes for fisk og har spylestasjon under vaskeprosessen. Disse kan inndeles i flere kategorier etter prinsipp og formål.

- kontinuerlig trommelvaskere
- stående vaskere med batch-vis vasking
- skyllekar med opptrekkbane

Etter disse tre trinnene er silden ferdig avskinnnet med bevart sølvhinne og uten innvirkning på selve kjøttet. Silden er klar til filetering eller annen anvendelse. Går silden umiddelbart til filetering kan trinn tre eventuelt gå ut. Dette på grunn av at i følge ferskfiskforskriftene skal ferdig skåret filet vaskes i rennende vann. Blodvann, silderisp og lignende må fjernes.

## 5.2 Oppskalering.

Oppskalering fra laboratoriet til en produksjonsprosess er ofte vanskelig. I laboratoriet er det adskildig lettere å beholde de fleste variable faktorene under kontroll. Derfor bør betingelsene for avskinningsprosessen tåle en del slingring. Det vil si at en del variasjon i temperatur og pH ikke virker slik at avskinningen stoppes opp eller blir betydelig redusert.

For å undersøke om enzymene eller de betingelsene avskinningen foregår ved, virker inn på produktet når det gjelder smak, lukt, konsistens, utseende, bakterievekst, saltopptak og histamin vil det være nødvendig å foreta prøveproduksjon. Denne produksjonen vil da også kunne brukes til å undersøke følgende faktorer:

- 1) Kan samme enzymløsning brukes flere ganger i oppskalert form?  
(kan redusert enzymaktivitet kompenseres med tilsetning av enzym?)
- 2) Hvordan innvirker sildens størrelse på avskinningseffekten i oppskalert form?
- 3) Har variasjoner i styrken av kollagen gjennom året en innflytelse på avskinningseffekten?
- 4) Hvorvidt er det forskjell i avskinningseffekten når det gjelder fersk, frossen og moden sild?
- 5) Er skinn på saltmoden sild nok saltdenaturert, slik at syrebad eventuelt kan kuttes ut?

Avskinningsprosessen er tenkt å kunne tilpasses en produksjonslinje for sildefileter slik:

1. Størrelsessortering:

Dersom sildens størrelse har innvirkning på avskinnings-effekten (tid i enzymbad) er det ønskelig med størrelsessortering. Det er flere momenter som gjør størrelsessortering fordelaktig. En ensartet størrelse til fileteringsmaskin kan bety mye i utbytteprosent. Det krever da riktig samkjøring mellom sorterings- og fileteringsmaskin. Betydningen av sorteringsmaskin har ikke vært tilstrekkelig høyt vurdert i næringen, men i de senere år har flere silde-anlegg anskaffet slike maskiner, da kravene til størrelsessortert sild i markedet er økt.

## 2. Syrebad:

Silden går i syrebad for fjerning av skjell og denaturering av skinn. Syrebadet kan foregå i kar laget etter prinsipp for vippekar med resirkulering slik at silderisp kan samles opp etter hvert som det faller av silden.

Det er nødvendig med fjerning av skjell hvis avskinningen skal være vellykket. Hvis silden har skjellene intakt i enzymbadet vil enzymene ikke slippe til og angripe det denaturerte skinn. Ønskelig temperatur i syrebad er lavest mulig. Dette på grunn av kvalitetshensyn til silden som råstoff.

## 3. Enzymbad:

Silden går direkte fra syrebad i enzymbad. Før silden taes opp i enzymbadet, bør det ha en bestemt temperatur, slik at når silden kjøler ned enzymbadet skal det ende opp med en optimal inkuberingstemperatur.

## 4. Vasking:

Når silden er ferdig avskinnet, vaskes det vekk skinnrester og enzymer på sildens overflate, slik at enzymene ikke fortsetter videre å degradere sølvhinne og kjøtt, samtidig som silden kjøles ned.

## 5. Alternativ anvendelse:

Etter vaskingen går silden til filetering, trimming og går siden til videre foredling: fersk, salting/modning, marinering eller frysing, etc.



Fig. 16. Avskinningsprosessens plass i en sildefileteringslinje.

### 5.3 Modning av sildefileter.

Etter at transportkostnader og emballasjekostnader har steget meget i de senere år er det blitt mer aktuelt å filetere silden fersk og salte (modne) filetene.

Forsøk med hurtigmodning av sildefileter har vist at for å beholde sølvhinnen intakt under modningsprosessen er det nødvendig med noen slags beskyttelse. Dette kan løses ved å degradere skinnet så pass mye at et tynt gelaktig lag av stratum compactum er igjen. Dette tynne laget vil siden brytes sakte ned under modningen, slik at ved slutten av er dette laget tilnærmet oppløst og sølvhinnen bevart (Figur17).

En kan på denne måten styre graden av avskinning slik at tykkelsen på stratum compactum kan reguleres og tilpasses videre alternative produksjonsformer (fermenteringsformer), slik at når silden er ferdig moden er stratum compactum oppløst, med sølvhinne bevart.

Til modningsforsøkene er det brukt tradisjonell saltemetode for rund sild. Til 10 kg fileter er det brukt 1,3 kg fint salt, 0,6 kg sukker og 0,1 kg krydderblanding. I tillegg er det tilsatt følgende enzympreparater:

- a) supernatant fra senterfugert homogenat fra sildens blindtarmer (fortynning 1/100).
- b) torské pepsin preparat, renset etter metode beskrevet i kappittel 4. Det er brukt 100 mg enzym/l lake.

Forsøkene viser at etter 7 dager er sildefiletene modnet med blindtarmspreparat og sølvhinne bevart. Modningstemperaturen var 4 °C. Med torské pepsin preparat fra ensilert torskeslog er filetene modne etter 10 dager ved 4 °C og bevart sølvhinne (Figur 17). Ved sammenlikning av sild produsert med den nye metoden kontra tradisjonelt produksjonsform, observeres ingen merkbar forskjell når det gjelder smak, lukt, konsistens og utseende.

Følgende forsøksproduksjon er foreslått:

Fersk sild enzymbehandles slik at:

- a) Skinn er fullstendig oppløst og vaskes vekk.
- b) Skinn er fullstendig oppløst og vaskes ikke.
- c) Skinn oppløst slik at en seig innerste hinne (stratum compactum) blir igjen og vaskes godt.

SILD FILETERES OG GÅR TIL

- a) innfrysning
- b) skarpsalting

SILD BLIR BEHANDLET RUND ETTER ENZYMBAD OG GÅR TIL

- a) skarpsalting
- b) sukkersalting





Fig. 17. Bilder av enzymatisk avskinnat sild før og etter modning.

c) sukkersalting  
 d) sure lapper  
 e) fersk filet til  
 marinering

c) kryddersalting

## 6 SAMMENDRAG.

I denne oppgaven er undersøkt muligheten for bruk av enzymer til avskinning av sild. Målet er å øke utbyttet og bevare filetens sølvhinne på skinnsiden.

Det er hovedsaklig bindevevsproteinet kollagen som gir fiskeskinns mekanisk styrke. Kollagen kan i nativ tilstand brytes ned enzymatisk av bare en bestemt type enzymer, kollagenaser. Dersom man derimot denaturerer kollagenet, vil skinnet miste mye av sin mekaniske styrke og flere proteaser vil klare å degradere skinnet. Strategien for oppgaven er: syrebehandling kombinert med enzymatisk oppløsning av denaturert kollagen.

En lang rekke faktorer har betydning for enzymatisk degradering av skinn. Disse er blant annet type og renhet av enzymer, substrat, pH, enzymkonsentrasjon etc.

De betingelser en er kommet frem til for optimal avskinning er:

A) Rund fersk sild syrebehandles i 5%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  i 5 minutter. Da vil skjell falle av og skinn (kollagen) blir denaturert.

B) Umiddelbart etter syrebehandling behandles sild i enzym-løsning. Her er det mest effektivt å bruke 50 mg/l torskpepsin (crude preparat) fra torskeslog og 0,2 - 0,5 %  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Temperaturen under inkuberingen bør være 15 - 20 °C og inkuberingstid 30 - 120 minutter, alt etter sildens størrelse.

C) Fra sildens overflate vaskes skinnrester og enzymrester vækk slik at enzymatisk degradering blir stoppet.

Silden kan da gå til alternativ anvendelse.

Fordelene med enzymatisk avskinning er økning i utbytteprosent. Metoden byr på større fleksibilitet i produksjonen, da investeringer i ensidig avansert utstyr

unngås. Denne metoden kan brukes både på fersk, fryselagret og saltmoden sild.

Enzymatisk avskinnert sild kan gi et mer verdifullt produkt dersom sølvhinnen på filetenes skinnside blir bevart.

## 7 LITTERATURLISTE.

- Anonym. 1970, Dobbelfrysing av fisk. Fiskeridirektoratets småskrift. Serie nr. 7.
- Anonym. 1981, Godkjente tilsetningsstoffer. Helsedirektoratet.
- Boas - Thomsen. 1961. Zoologi, 4. opplag, Gyldendal. 487 pp.
- Bond, C.E. 1969. Biology of Fishes, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto. 514 pp.
- Burleigh, M.C. 1977. Degradation of collagen by non-specific proteinases. I "Proteinases in Mammalian Cells and Tissues", 2:285 - 309. Barret, A.J. (ed.). Elsevier/North-Holland, New York.
- Cooper, T.G. 1977. The Tools of Biochemistry, John Willey and sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto. 423 pp.
- Eide, O., Børresen, T. og Strøm, T. 1980. Fettseparering av lodde. FTFI-rapport nr. 666.1-8-1.
- Galloway, J.H. 1975. Collagen - the universal body builder. New Scientist 67:582 - 584
- Gildberg, A. og Raa, J. 1976. Utnyttelse av fiskeslo. Kjemisk og biokjemisk karakterisering av fiskeslo. FTFI-rapport 663.2-4-2.
- Gildberg, A og Raa, J. 1979. Solubility and enzymatic solubilization of muscle and skinn of capelin (Mallotus villosus) at different pH and temperature. Comp. Biochem. Physiol. 63B: 309 - 314.
- Gildberg, A. og Raa, J. 1983. Purification and characterization of pepsin from the arctic fish capelin (Mallotus villosus). Comp. Biochem. Physiol. 75A: 337 - 342.

- Gottschalk, A. 1970. Definition og glycoproteins and their delineation from other carbohydrate-protein complexes. I "Glycoproteins" (Gottschalk, A. ed.). Elsevier publishing company, Amsterdam - London - New York. 731 pp.
- Grampp, E.G. 1982. Modification of certain foodstuffs by enzymes. Process Biochem. 17: 2 - 6
- Harper, E. 1980. Collagenases. Ann. Rev. Biochem. 49: 1063 - 1078.
- Hayashi, T. og Nagai, Y. 1973. Effect of pH on the stability of collagen molecule in solution. J. Biochem. 73: 999 - 1006.
- Hildebrand, M. 1974. Analysis of vertebrate structure, John Wiley and sons, New York, London, Sidney, Toronto. 710 pp.
- Hughes, R.B. 1963. Chemical studies on the herrings (Clupea harengus). VII-Collagen and cohensiveness in heat-processed herring, and observations on a seasonal variation in collagen content. J. Sci. Fd Agric. 14: 432 - 441.
- Kulikov, P.I. 1978. Production of meal, oil and protein-vitamin preparations in the fishing industry, 3. utgave, Amerind publishing co.pvt. Ltd. 253 pp.
- Langmyhr, E. 1981. Enzymatisk hydrolyse av fiskeprotein. Hovedfagsoppgave. Institutt for teknisk biokjemi, Norges tekniske høyskole, Universitetet i Trondheim.
- Lapanje, S. 1978. Physicochemical Aspects of Protein Denaturation, John Wiley and sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto. 331 pp.
- Larsson, P. 1982. Vid lopande bander - immobiliserade enzymer och celler. I "Bioteknik", (Ryden, L. red.), Studieförlaget, Uppsala, Sverige. 200 pp.

- Little, C. og Wallin, R. 1981. The kinetics mechanism and structure of enzymes. Forelesninger. Universitetet i Tromsø.
- McLaren, A.D. 1963. Enzymes reactions in structurally restricted systems IV. The digestion of insoluble substrats by hydrolytic enzymes. Enzymologia. 26: 237 - 246
- Mihalyi, E. 1972. Application of proteolytic enzymes to protein structure studies. The chemical Rubber Co. 18901 Cranwood Parkway. Cleveland, Ohio 44128. 364 pp.
- Mohr, V. 1971a. Muskelvevet i kjøtt og fisk. Endogene forandringer post mortem. Forelesninger i teknisk biokjemi, Institutt for teknisk biokjemi, Norges tekniske høgskole.
- Mohr, V. 1971b. On the constitution and physical-chemical properties of the connective tissue of mammalian and fish skeletal muscle. Thesis (231 pages), University of Aberdeen, Scotland.
- Nicolaysen, F. 1976. Enzymer i fisk. En undersøkelse av noen hydrolaser. Hovedoppgave, Institutt for biologi og geologi, Universitetet i Tromsø
- Pedersen, T. 1980. Prosesser og produkter i norsk fiskeindustri. Del 1, Universitetsforlaget, Oslo. 117 pp.
- Rawn, J.D. 1983. Biochemistry, Harper & Row, Publishers, New York. 1139 pp.
- Rucker, R.B. og Murray, J. 1978. Cross-linking amino acids in collagen and elastin. Ann. J. Clin. Nutr. 31: 1221 - 1236.
- Stryer, L. 1975. Biochemistry, W.H. Freeman and company. San Francisco, 877 pp.
- Tangstad, W. 1983. Maskiner og utstyr for sildeproduksjon. I "Kurs for sildeprodusenter i Trøndelag 17. - 19. januar

1983. Norges Fiskerihøgskole.

Åslund, A. 1982. Bioteknik på frammarsch - en global oversikt. I  
"Bioteknik", (Ryden, L. red.), Studieförlaget,  
Uppsala, Sverige. 200 pp.