



<b>Titill:</b>	<b>Tegundagreining fiska og könnun á losi með rafdrætti</b>
<b>Höfundar:</b> <b>Authors:</b>	Margrét Bragadóttir og Jónas Bjarnason
<b>Rit Rf númer:</b> <b>IFL Publications no.:</b>	47
<b>Útgáfudagur:</b> <b>Published:</b>	16. apríl 1996
<b>Verknúmer:</b> <b>Project no.:</b>	213
<b>Blaðsíðufjöldi:</b> <b>No. of pages:</b>	16
<b>Styrktaraðili:</b>	Vísindasjóður Rannsóknarráðs Íslands
<b>Ágrip:</b>	<p>Markmið þessa verkefnis var að finna lífefnafræðilegar leiðir til þess að greina á milli próteina þorskvöðva sem er laus í sér og próteina í eðlilegum stinnum þorskvöðva. Undirmarkmið verkefnisins var síðan að nota sömu aðferðafræði við að byggja upp þekkingu og færni til þess að tegundagreina fisk og fiskafurðir. Sýni af gallalausum þorskflökum og flökum með miklu losi voru rafdreigin með jafnhleðslustillingu við þrjú mismunandi sýrustigsbil. Losflökin gáfu sambærilegt próteinmynstur og þéttu flökin, en styrkur bandanna var mismikill og sum böndin voru nánast ómerkjanleg hjá losflökunum. Niðurstöður þessarar forathugunar gefa tilefni til að skoða rafdrátt betur við rannsóknir á losi í fiskflökum. Áhrif sýnameðhöndlunar á niðurstöður rafdráttarins þyrfti að kanna, og þá sérstaklega áhrif breytilegs pH í þorskvöðvanum. Tegundagreining á ferskum fiskflökum og unnum fiskafurðum skilaði mjög góðum árangri. Auðvelt var að greina mun á próteinmynstrum af þekktum fisksýnum. Vinnsla fisks eins og reyking og harðfiskverkun hafði þau áhrif á niðurstöður rafdráttar að nokkur próteinbönd ýmist dofnuðu eða féllu út, en vel mátti þekkja einkennandi próteinbönd hjá öllum fisktegundum sem prófaðar voru. Ljóst er að tegundagreining fiska er brýnt verkefni fyrir Íslendinga sem fiskútflytjendur því ætla má að þróun í fiskiðnaði á næstu árum verði í átt til fullvinnslu fiskafurða, sem ekki er unnt að tegundagreina með hefðbundnum hætti.</p>
<b>Lykilorð:</b>	Fiskur, fiskafurðir, tegundagreining, rafdráttur, los.
<b>Title:</b>	<b>Fish species identification and studies on gaping by electrophoresis.</b>
<b>Summary:</b>	<p>The aim of this project was to distinguish by biochemical methods between flesh proteins of cod (<i>Gadus morhua</i>) from fillets with firm texture and fillets with loose or gaping texture. The aim was also to build up knowledge and skills for identifying species of fish and fishery products. Samples of sarcoplasmic proteins from cod with firm fillets and cod with loose or gaping fillets were analyzed by electrophoresis, using isoelectric focusing with three different pH-gradients. Fillets with loose texture gave similar protein patterns as fillets with firm texture, but some protein bands were almost unapparent. The results of this preliminary study indicate that further research is required on the use of electrophoresis in studying looseness of fish fillets. The influence of sample treatment on the results of electrophoresis needs more research, especially the influence of variable muscle pH. Species identification of fresh fillets and fishery products gave good results. Species identification of known fish samples was performed with no difficulties. Processing methods such as smoking and drying influenced the protein pattern from electrophoresis, in such a way that some protein bands were very weak or totally lost. However for all fish species investigated, there were enough specific protein bands left for identification. Clearly, fish species identification is an urgent task for Iceland as a fish exporting country. Particularly, as it is likely that the fishing industry will in coming years place more emphasis on value added products, which can usually not be species identified by traditional methods.</p>
<b>Keywords:</b>	Fish, fishery products, species identification, electrophoresis, gaping texture.

## EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR.....	5
2. FRAMKVÆMD.....	7
2.1. Hráefni og sýnameðferð.....	7
2.2. Aðferðir.....	8
3. NIÐURSTÖÐUR .....	9
3.1. Los í þorskflökum.....	9
3.2. Tegundagreining .....	11
3.3. Tegundagreining á unnum fiskafurðum.....	11
4. UMRÆÐUR OG ÁLYKTANIR.....	12
5. ÞAKKARORÐ.....	14
6. HEIMILDIR .....	15
7. VIÐAUKI.....	16

## 1. INNGANGUR

Los í fiski er vandamál sem bæði íslenskur og erlendur fiskiðnaður þarf að glíma við, og hefur áhrif á nýtingu fisks í verðmætustu pakkningarnar. Rannsóknir á losi í fiski hafa verið stundaðar um árabil á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins (Botta og Bjarnason, 1987). Reynt hefur verið að finna skýringar á því hvers vegna þorskvöðvi er stundum mjög laus í sér. Í ljós hefur komið að los í þorskflökum sem mælt er með rifþoli, hefur sterka fylgni ( $r = 0,91$ ) við RNA í þorskvöðva og hydroxyprólin, sem er mælikvarði á magn kollagens eða bandvefs (Bjarnason, 1994). Einnig hefur pH í vöðva þýðingu sem og aðrir þættir eins og stærð fisks, hrygningarástand, geymslutími fyrir vinnslu o.fl. (Botta og Bjarnason, 1987). Marga þessa þætti má tengja næringarástandi fisksins og margt bendir til þess að losið sé mest þegar fiskurinn er í örum vexti, að því gefnu að hátt RNA sé vísbending um nýlegan vöxt, sem endurspeglar væntanlega mikið æti (Bjarnason, 1994).

Ekki verður komist miklu lengra á þessu sviði með þeim rannsóknaraðferðum sem hingað til hefur verið beitt af ofanskráðum mönnum. Þörf er á nánari rannsókn um á próteinum fiskflaka sem eru laus í sér. Rafdráttur er aðferð sem mikið er notuð til þess að rannsaka gerð og eðli próteina. Þar er notaður sá eiginleika próteina að ferðast í rafsviði að andstætt hlöðnu rafskauti. Hlaðnar stórsameindir eins og prótein er hægt að aðskilja í rafdrætti ýmist út frá sameindapunga eða rafhleðslu. Jafnhleðslustilling aðskilur prótein út frá hleðslu þeirra. Í jafnhleðslustillingu eru próteinsýni sett á þar til gert gegndræpt hlaup sem hefur innbyggt vaxandi sýrustig. Þegar rafstraumur er settur á hlaupið ferðast próteinin í rafsviði að andstætt hlöðnu rafskauti en stöðvast í hlaupinu við það sýrustig þar sem hleðsla þeirra er núll út á við. Að loknum rafdrætti eru próteinin lituð og þá sjást einkennandi mynstur próteinbanda í hlaupinu. Fáanleg eru hlaup með mismunandi sýrustigssviði, bæði þröngu og víðu. Það gefur stundum betri raun að nota þröngt sýrustigsbil á jafnstóru hlaupi, til þess að skoða betur einstök próteinbönd. Þessi aðferð aðgreinir vatnsleysanleg vöðvaprótein fiska. Fiskvöðvi inniheldur vatnsleysanleg prótein (sarcoplasmic), vöðvaþráðaprótein og bandvefsprótein. Vatnsleysanleg prótein eru u.þ.b. 20-30% af heildarpróteinum fiskvöðvans. Í þessum hópi eru flest efnaskiptaensímín, með mólþunga á bilinu 40-60 kDa. Þetta eru hlaðin prótein, sem auðvelt er að aðgreina með jafnhleðslustillingu. Vatnsleysanleg prótein hvorrar fisktegundar eru svo einstök að próteinmynstur þeirra eftir jafnhleðslustillingu er hægt að nota til að tegundagreina þær með ótvíræðum hætti (Mackie, 1980, Rehbein, 1990). Það hefur einnig komið í ljós að hægt er að sjá

mismunandi næringarástand þorsks með því að rafdraga vatnsleysanleg vöðvaprótein þorsksins. Þannig sýndi Love (1988) fram á afgerandi mun á styrkleika próteinbanda hjá annars vegar sveltandi þorski og hins vegar þorski í miklu æti. Rehbein (1990) segir hins vegar, í yfirlitsgrein um tegundagreiningu fiskafurða, að ekki sé vitað að hve miklu leyti styrkur vatnsleysanlegra vöðvapróteina fiska sé breytilegur vegna líffræðilegra þátta (t.d. vegna hrygningar) eða tæknilegra (t.d. vegna skolunar eða þvottaaðferða).

Í þessu verkefni var vonast til þess að hægt væri að tengja niðurstöður jafnhleðslustillingar á vöðvapróteinum þorskflaka losi í fiskvöðvanum, út frá þeirri kenningu að los í ferskum vöðva endurspegli næringarástand fisksins.

Þörfin fyrir tegundagreiningu fiska er tvímælalaust fyrir hendi og mun jafnvel aukast á stuttum tíma við breyttar aðstæður í umhverfi okkar. Til dæmis hefur aðild Íslands að evrópska efnahagssvæðinu og hugsanleg innganga í Evrópusambandið haft örvasandi áhrif á þá þróun í fiskiðnaði að fullvinna afurðir. Fullvinnsla fiskafurða eykur á þörfina að greina slíkar afurðir til tegunda, því möguleikinn á að selja ódýrari fisktegundir sem aðrar dýrari eykst með fullvinnslu. Krafa um sönnunarbyrði hvað fisktegundir varðar eykst tvímælalaust við slíkar aðstæður. Tegundagreining fiska með rafdrætti er aðferð sem hefur verið notuð í mörg ár (Hume and Mackie, 1980) og jafnhleðslustilling á vatnsleysanlegum próteinum fiska hefur þar reynst betri en aðrar rafdráttaraðferðir (Rehbein, 1990). Tegundagreining fiska með jafnhleðslustillingu er orðin allþekkt aðferð og er víða notuð í löndunum í kringum okkur, (Rehbein, 1995). Jafnhleðslustilling hentar sérstaklega vel á hráan fisk, en vinnsla fiskafurða eins og kaldreyking, söltun og þurrkun getur torvelað jafnhleðslustillingu vegna þess að þessar vinnsluáðferðir valda oft eðlissviptingu próteina líkt og suða gerir. Eðlissvipting eða afmyndun próteina í unnum fiskafurðum, eins og reyktum og þurrkuðum fiski veldur því að oft þarf að nota flóknari útdráttaraðferðir en við hefðbundna jafnhleðslustillingu, eða jafnvel aðrar rafdráttaraðferðir við tegundagreiningu þeirra (Rehbein, 1990, Mackie, 1994).

Tilgangur þessa verkefnis var tvíþættur. Annars vegar að kanna hvort los í fiskflökum endurspeglar í rafdrætti vatnsleysanlegra próteina og hins vegar að nota þessa aðferðafræði til þess að byggja upp aðstöðu og þekkingu til þess að tegundagreina fiska með jafnhleðslustillingu og kanna notagildi þeirrar aðferðar á unnar fiskafurðir.

## 2. FRAMKVÆMD

### 2.1. Hráefni og sýnameðferð

Hráefnið í tegundagreiningu var í öllum tilfellum þriggja daga gamall fiskur, sem bar engin merki dauðastirðnunar. Fiskurinn, sem var misstór, hafði verið slægður og geymdur í ís og var fenginn frá fiskmarkaði í Reykjavík. Áhrif vinnslu á næmni tegundagreiningar með rafdrætti voru könnuð á reyktum fiski og harðfiski. Fiskurinn sem notaður var í reykingartilraunina var veiddur í byrjun desember, um var að ræða þorsk (*Gadus morhua*), ýsu (*Melanogrammus aeglefinus*), löngu (*Molva molva*) og blálöngu (*Molva dypterygia dypterygia*). Fiskurinn sem notaður var í harðfisktilraunina var veiddur í lok mars. Þá voru prófuð langa (*Molva molva*), þorskur (*Gadus morhua*), ýsa (*Melanogrammus aeglefinus*), keila (*Brosme brosme*) og ufsi (*Pollachius virens*). Fyrir flökun og sýnameðferð var fisktegundin staðfest af sérfræðingi frá Hafrannsóknastofnuninni. Fyrir reykingu var fiskurinn flakaður, en ekki roðrifinn. Annað flakið var tegundagreint strax en hitt flakið sett í 19,5% saltþækil í 45 mín. og síðan kaldreykt á hefðbundinn hátt í reykofni frá Ness & Co, Þýskalandi. Flökin voru þurrkuð í u.þ.b. 1 klst. við 25°C og 60-65% raka, og síðan reykt í u.þ.b. 2 klst. við 25°C. Harðfiskurinn var verkaður þannig að fiskurinn var flakaður og flökin lögð í 5% saltþækil í 20-30 mín., eftir stærð flakanna og síðan þurrkuð við meðalblástur (u.þ.b. 1,5-2 m/sek) og 25°C í 1,5-2,5 sólarhringa eftir stærð flakanna, þannig að vatnsinnihald yrði um 12-15%. Hitt flakið af fiskinum var tegundagreint strax.

Við athuganir á losi í þorskflökum og áhrifum þess á jafnhleðslustillingu vöðvapróteina, var notaður þorskur sem keyptur var á markaði í Sandgerði. Fiskurinn var veiddur í lok apríl á línu eða í net sem legið höfðu í sjó í eina nótt. Fiskurinn var slægður um borð, en ekki ísaður. Fiskurinn var vélflakaður degi eftir löndun. Valin voru flök af svipaðri stærð (35-45 cm), sem voru ýmist með miklu losi eða vel þétt. Flökin, sem voru án merkjanlegrar dauðastirðnunar, voru geymd í vatnspéttum umbúðum á ís, þar til þau voru útbúin fyrir mælingar, þá þriggja daga gömul.

## 2.2. Aðferðir

**2.2.1. Tegundagreining.** Fylgt var aðferð sem lýst er í Application Note 379 frá Pharmacia (Yman, 1992). Tekið var sýni, 3 g, af hvíta hluta fiskflaksins og fínhakkað með 3 g af kældu, eimuðu vatni í Ultra-Turrax homogenizer í ísbaði í 30 sek. Þetta var síðan skilið í skilvindu við 1500 g í 15 mín. við 4°C. Ef fita var í flötinu, var það síað í gegnum bómullarhnoðra og síðan rafdreigið með jafnhleðslustillingu (isoelectric focusing). Jafnhleðslustillingin var gerð með forstillingu (prefocusing) á sjálfvirkan hátt í rafdráttartæki (PhastSystem separation and control unit, Pharmacia, Þýskalandi), skv. ofangreindri aðferð á tilbúnu polyakrylamíð-hlaupi (43 mm × 50 mm × 0,35 mm), PhastGel IEF3-9 frá Pharmacia, við pH 3 til 9. Sýnin (1 µl) voru sett á hlaupið með sérstökum plastkömbum, katóðumegin (-), við pH 3, síðan ferðast próteinin í átt að anóðunni (+), sem endar í pH 9. Til þess að fylgjast með gangi jafnhleðslustillingar var notaður próteinstaðall, sem var blanda af próteinum með þekktum jafnhleðslupunktum á breiðu sviði (Broad pI calibration kit, pH 3-10), frá Pharmacia.

Að loknum rafdrætti voru hlaupin lituð með Coomassielit skv. ofangreindri aðferð. Próteinböndin voru fest (fixeruð) í hlaupinu með 20% tríklórediksýru, lituð með 0,02% PhastGel Blue R lausn og þvegin með þvottalausn sem samanstóð af 30% metanóli og 10% ediksýru í vatni.

Harðfisksýnin voru bleytt upp í þyngd sinni af vatni og síðan meðhöndluð á sama hátt, auk þess sem próteinstyrkur lausna fyrir rafdrátt var stilltur á 10 mg/ml. Próteinstyrkur lausna var ákvarðaður með Biuret aðferð. Próteinstyrkur reyktu fisksýnanna var einnig stilltur á 10 mg/ml.

**2.2.2. Greining á losi með rafdrætti.** Notuð var aðferð skv. 2.2.1., en hér var próteinstyrkur allra sýna stilltur á 10 mg/ml. Próteinstyrkur lausna var ákvarðaður með Biuret aðferð. Jafnhleðslustilling var gerð á polyakrylamíðhlaupum við pH 3-9, pH 5-8 og pH 4-6,5.

**2.2.3. Biuret-próteinákvörðun.** Prótein var ákvarðað með heimatilbúinni útgáfu af Biuret-aðferð. Útbúin var Biuret-lausn sem innihélt 1,50 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O og 6 g KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O, sem sett voru í 1 l flösku og bætt út í 500 ml af eimuðu vatni og 300 ml af 10% NaOH og loks var gert að 1.000 ml með eimuðu vatni. Próteinstaðall var þurrkað nautgripaalbumín (Albumin, bovine, fraction V), útbúin var staðlaröð sem inni-

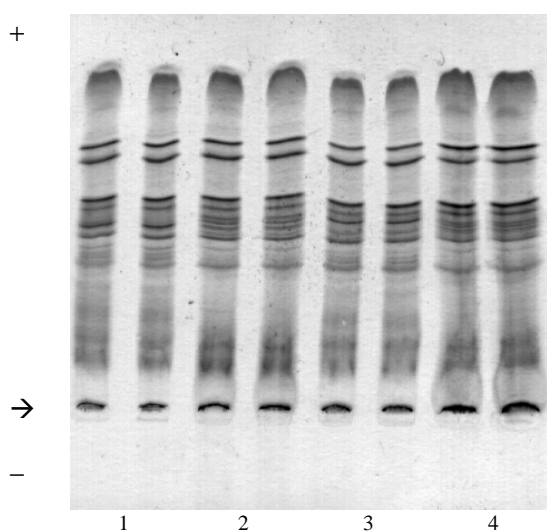
hélt 0, 5, 10 og 15 mg/ml. Próteinákvörðun á sýnum var gerð með því að blanda saman 0,1 ml af sýnalausn við 1,5 ml af Biuret lausn, en tómasýni var 0,1 ml eimað vatn með 1,5 ml Biuret-lausn. Sýni og tómalausnir voru síðan sett í 100°C heitt vatnsbað í 1 mín. og síðan kæld og mæld í ljósgleypnimæli við 540 nm bylgjulengd. Styrkur sýna-lausna var síðan lesinn af út frá staðalkúrfu staðallausna (ljósgleypni á móti styrk (mg/ml)).

**2.2.4. Sýrustigsmæling á lossýnum.** Fiskflökin voru hökkuð og síðan var vegið út í bikarglas, 10 g af hakkinu og bætt saman við 20 g af herbergisheitu, eimuðu vatni. Hrært var í bikarglasinu með segulhræru og sýrustig lausnarinnar mælt með sýrustigsmæli (GK 240, Radiometer, Köbenhavn).

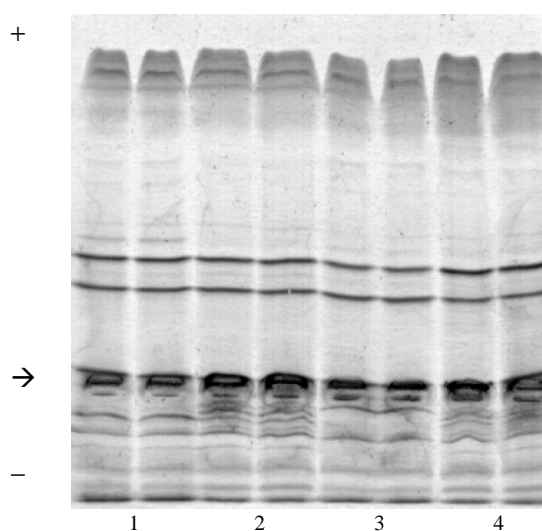
**2.2.5. Skönnun á jafnhleðsluhlaupum.** Eftir rafdrátt og Coomassie-litun á hlaupum lossýnanna voru þau skönnuð á litskanna og greind með hugbúnaði, Density One (1994) frá pdi, 405 Oakwood Road, Huntington Station, New York 11746.

### 3. NIÐURSTÖÐUR

#### 3.1. Los í þorskflökum

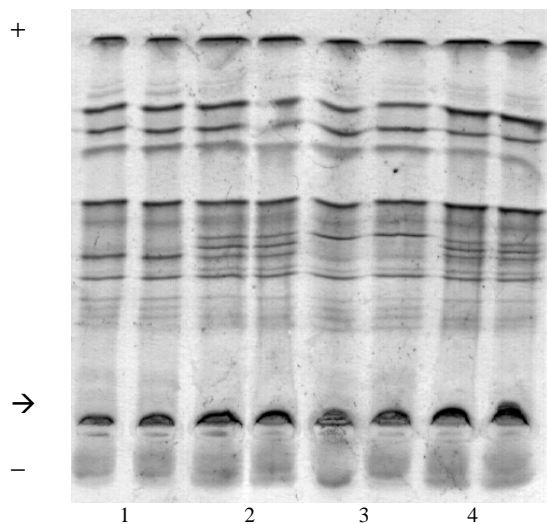


*Mynd 1.* Próteinmyndir þorskflaka eftir jafnhleðslustillingu á vatnsleysanlegum próteinum á IEF3-9 hlaupi. 1: lossýni a. 2: þétt sýni a. 3: lossýni b. 4: þétt sýni b. Hvert sýni var keyrt í tvísýni og öðrin sýnin hvar sýnin voru sett á hlaupið.



*Mynd 2.* Próteinmyndir þorskflaka eftir jafnhleðslustillingu á vatnsleysanlegum próteinum á IEF4-6,5 hlaupi. 1: lossýni a. 2: þétt sýni a. 3: lossýni b. 4: þétt sýni b. Hvert sýni var keyrt í tvísýni og öðrin sýnin hvar sýnin voru sett á hlaupið.

Niðurstöður jafnhleðslustillingar á vatnsleysanlegum próteinum þorskvöðva má sjá á myndum 1, 2 og 3. Allar myndirnar eru af sömu fjórum þorsksýnunum, í tvísýni. Tvö sýni voru af þorsflökum með áberandi losi í vöðvabyggingunni og mældust með pH 6,59 og 6,58, en hin tvö sýnin voru með eðlilega þéttum og stínum vöðva, sem mældust með pH 6,95 og 6,86. Annað sem var eftirtektarvert var að hakk lossýnanna við sýrustigsmælingu var hvítt, eða mjólkurlitt, og samhangandi að sjá, en hakk þétu sýnanna var glærara og sundurlaust. Mynd 1 sýnir jafnhleðslustillingu við pH 3-9. Þar má sjá að mestur munur er á sýnum hjá próteinböndum sem eru við miðbik hlaupsins, eða við það sýrustig sem er mitt á milli 3 og 9. Mynd 2 sýnir jafnhleðslustillingu við pH 4-6,5 og þar sést lítil sem enginn munur á próteinböndunum við þetta sýrustig.



*Mynd 3.* Próteinmynstur þorsflaka eftir jafnhleðslustillingu á vatnsleysanlegum próteinum á IEF 5-8 hlaupi. 1: lossýni a. 2: þétt sýni a. 3: lossýni b. 4: þétt sýni b. Hvert sýni var keyrt í tvísýni og örin sýnir hvar sýnin voru sett á hlaupið.

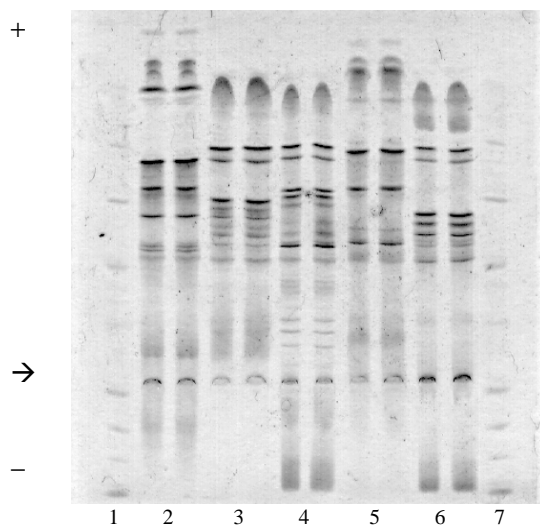
Á mynd 3, sem sýnir jafnhleðslustillingu við pH 5-8, er greinilegt að þar er mestur munur á próteinböndum þorsksýnanna. Próteinbönd þorsflaka með þéttum vöðva sýnast vera eins, en próteinbönd losflakanna eru greinilega frábrugðin hinum tveimur, auk þess sem nokkur munur er á próteinböndum þessara tveggja losflaka. Anóðumegin (-) eru fyrstu fjögur einkennandi böndin á hlaupinu. Hjá sýnum af þétu flökunum er þriðja bandið af þessum fjórum mjög dauft, en í báðum lossýnunum er þetta band álíka greinilegt og hin þrjú. Á miðbiki hlaupsins eru sjö einkennandi bönd hjá sýnum af þétu flökunum, en einungis 4-5 eru greinileg hjá losflökunum. Styrkleiki þessara banda er auk þess greinilega frábrugðinn milli þessara tveggja lossýna. Með því að skanna próteinbönd hlaupanna í myndskanna var bæði hægt að sjá útslag (optical density) hvers bands og hlutfall þess í prósentum, sjá viðauka. Slík skönnun staðfesti það sem sjáanlegt var með berum augum, skv. ofanrituðu, auk þess sem þar kemur fram að fjöldi próteinbanda hjá lossýnum og þéttum sýnum er sá sami, en styrkleiki þeirra er



mismikill. Þar sem einkennandi próteinbönd eru jafnmörg í öllum tilfellum og staðsetning þeirra sú sama, þá er greinilega um sömu fisktegund að ræða.

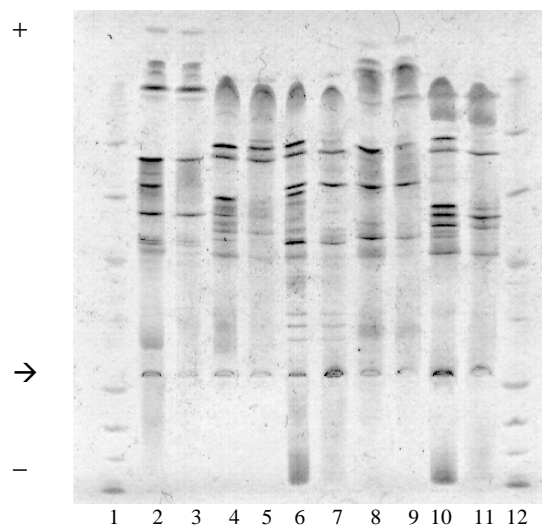
### 3.2. Tegundagreining

Niðurstöður tegundagreiningar á skyldum þorskfiskum má sjá á mynd 4. Greinilega má sjá mun á próteinböndum tegundanna, þó svo að mikið sé um sameiginleg bönd. Ýsa hefur t.d. einkennandi próteinbönd, anóðumegin (-), eins og langa, en greinilegur munur er á próteinböndum ýsu og löngu katóðumegin (+). Þorskur og ufsi hafa mjög lítið af próteinböndum anóðumegin (-), en munurinn er auðsjáanlegur á próteinböndunum katóðumegin (+).



Mynd 4. Próteinmynstur fisksýna eftir jafnhleðslustillingu á vatnsleysanlegum próteinum á IEF3-9 hlaupi.

1 og 7: Próteinstaðall. 2: Langa (*Molva molva*). 3: Þorskur (*Gadus morhua*). 4: Ýsa (*Melanogrammus aeglefinus*). 5: Keila (*Brosme brosme*). 6: Ufsi (*Pollachius virens*). Hvert sýni var keyrt í tvísýni og örin sýnir hvar sýnin voru sett á hlaupið.



Mynd 5. Áhrif harðfiskverkunar á próteinmynstur fisksýna eftir jafnhleðslustillingu á vatnsleysanlegum próteinum á IEF3-9 hlaupi.

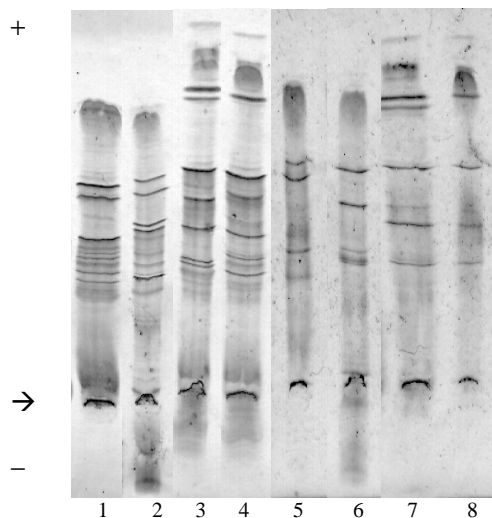
1 og 12: Próteinstaðall. 2: Langa (*Molva molva*), 3: Harðfisklanga. 4: Þorskur (*Gadus morhua*), 5: Harðfiskþorskur. 6: Ýsa (*Melanogrammus aeglefinus*), 7: Harðfiskýsa. 8: Keila (*Brosme brosme*), 9: Harðfiskkeila. 10: Ufsi (*Pollachius virens*), 11: Harðfiskufsi. Örin sýnir hvar sýnin voru sett á hlaupið.

### 3.3. Tegundagreining á unnum fiskafurðum

Harðfiskverkun, eða þurrkun fiskflaka, hefur talsverðar breytingar í för með sér á fjölda og styrkleika próteinbanda eftir jafnhleðslustillingu, eins og sjá má á mynd 5. Erfiðara verður að greina á milli harðfisktegunda af skyldum fisktegundum. Samt sem áður

hefur hver fisktegund það mikið af einkennandi próteinböndum, sem hverfa ekki við þurrkun fisksins, að óhætt er að fullyrða að unnt sé að tegundagreina óþekkt harðfisksýni, ef þekkt sýni eru til samanburðar.

Kaldreyking á fiski hafði mjög svipuð áhrif á niðurstöður jafnhleðslustillingar þurrkunin. Fækkun varð á próteinböndum, en þó aldrei svo mikil að ekki var hægt að tegundagreina reykt fiskinn svo að ótvírætt væri, sjá mynd 6.



Mynd 6. Áhrif kaldreykingar á próteinbönd fisksýna eftir jafnhleðslustillingu vatnsleysanlegra próteina á IEF3-9 hlaupi.

Mynstur 1: Þorskur (*Gadus morhua*).  
Mynstur 2: Ýsa (*Melanogrammus aeglefinus*).  
Mynstur 3: Langa (*Molva molva*).  
Mynstur 4: Blálanga (*Molva dypterygia dypterygia*).  
Mynstur 5: Reyktur þorskur.  
Mynstur 6: Reykt ýsa.  
Mynstur 7: Reykt langa.  
Mynstur 8: Reykt blálanga.  
Örin sýnir hvar sýnin voru sett á hlaupið.

Helmingsblöndu af ýsu og þorski var hægt að greina til tegunda með jafnhleðslustillingu. Alla vega var hægt að sjá að ekki var um að ræða ýsu eingöngu, jafnvel þótt þorskur væri einungis 30% af hakkblöndunni. Helmings blanda af ýsu- og lönguhakki var greinilega ekki einungis ýsa og vel mátti þekkja hin einkennandi basísku próteinbönd löngunnar.

#### 4. UMRÆÐUR OG ÁLYKTANIR

Tegundagreining fiska með því að rafdraga vatnsleysanlegu vöðvapróteinin er í eðli sínu ekki flókin aðferð. Hún krefst samt mjög nákvæmra og staðlaðra vinnubragða til þess að niðurstöður verði alltaf samanburðarhæfar, þ.e. að niðurstöður séu alltaf eins frá einum rafdrætti til annars. Rafdráttur með jafnhleðslustillingu á vatnsleysanlegum próteinum fiska hefur reynst vera sú aðferð sem gefur besta upplausn og samsvörun við tegundagreiningu flestra fisktegunda (Mackie, 1990). Rehbein o.fl. (1995) stóðu nýlega fyrir samanburðarrannsókn milli sjö rannsóknarstofa í jafnmörgum löndum Evrópu, á tegundagreiningu tíu óþekkra fisksýna, sem borin voru saman við viðmiðunarsýni. Í 93% tilvika reyndist tegundagreining fisksýnanna rétt. Þær tvær rannsóknarstofur sem notuðu sjálfvirkan rafdráttarbúnað (PhastSystem) tegundagreindu öll sýnin rétt. Þótt

sjálfvirkur rafdráttarbúnaður sé ekki skilyrði fyrir réttum niðurstöðum við tegundagreiningu fiska, er hann mjög hjálplegur við að tryggja sambærilegar niðurstöður og útilokar ýmsar skekkjur við sýna- og efnismeðhöndlun. Sjálfvirkur rafdráttarbúnaður, sem einnig var notaður í þetta verkefni, gerir rafdrátt og litun próteina mun þægilegri og fljótlegri en áður var, auk þess sem mun auðveldara er að tryggja sambærilegar niðurstöður tegundagreininga. Þó svo að rafdráttarhlaupin fyrir sjálfvirkan rafdrátt séu frekar lítil, eða á stærð við litskyggnu ( $40 \times 40$  mm), þá hefur komið í ljós að þjálfað auga greinir vel í sundur mismunandi próteinbönd í slíku hlaupi, og stendur myndskanna ekki að baki við að greina mismun á sýnum. Til þess að niðurstöður tegundagreiningar séu samanburðarhæfar þarf að hafa í huga að þættir eins og eiginleikar vöðvavefsins, vinnsla og geymsla fisksins getur haft mikil áhrif. Litur fiskholdsins og hlutfall af ljósum og dökkum vöðvavef hefur áhrif á niðurstöður. Hvítur vöðvavefur inniheldur mikið af efnaskiptaensímum og parvalbúminum, en lítið af krómopróteinum. Þetta hefur áhrif á fjölda, stöðu og styrk próteinbanda í jafnhleðslustillingu, þannig að súru próteinböndin (anóðumegin) verða áberandi í hvítum vöðvavef (Rehbein, 1990). Þess vegna er mælt með að taka eingöngu sýni af hvítum, blóðlausum vöðvavef við tegundagreiningu (Yman, 1992). Hakk og hakkblöndur af heilum flökum hafa samt ekki valdið erfiðleikum við tegundagreiningu, og niðurstöður þessa verkefnis sýndu að vel mátti greina þorsk og löngu í hlutföllum frá 50-70% í ýsuhakki. Samkvæmt Rehbein (1990) er hægt að tegundagreina flestar unnar fiskafurðir, nema síst hitaðan eða soðinn fisk. Við hitun afmyndast próteinin, eða eðlissviptast, þannig að jafnhleðslustilling slíkra próteina gefur allt annað mynstur próteinbanda en fyrir hitun þeirra. Einungis örfá hitapólin próteinbönd verða eftir í mynstri hvernar fisktegundar og lítill eða enginn munur verður milli fisktegunda. Hitaðar fiskafurðir er hægt að greina til tegundar með SDS-rafdrætti (sodium dodecyl sulphate) (Craig o.fl., 1995). Byggt er á aðskilnaði próteina út frá mólmassa, eftir útdrátt með SDS, þótt slíkur rafdráttur sýni lítinn mun milli fisktegunda, þar sem helstu próteinin sem koma fram eru vegna vöðvaþráða (myofibrils) og bindivefs (connective tissue), en þau hafa sama mólmassa hjá öllum dýrum. Vinnsla fiskafurða eins og kaldreyking, söltun og þurrkun afmyndar einnig fiskprótein, en þó mikið minna en suða eða hitun. Niðurstöður þessa verkefnis sýndu fram á að einungis fá próteinbönd dofnuðu og féllu út eftir kaldreykingu eða harðfiskverkun, þannig að ennþá var hægt að greina að jafnvel skyldar tegundir. Samkvæmt Rehbein (1990) er það engum erfiðleikum bundið að tegundagreina fisk sem hefur verið geymdur í ís í allt að 23 daga. Frysting hefur heldur ekki áhrif á tegundagreiningu fisks. Langtímageymsla í frysti

veldur engum breytingum á próteinmynstrum tegundanna en sýnt hefur verið fram á að sum próteinböndin dofna með tímanum. Það hefur hins vegar ekki valdið neinum vandkvæðum við tegundagreiningu fisks.

Þessi forkönnun á notkun rafdráttar með jafnhleðslustillingu, til þess að sjá mun á losi þorskflaka, hefur gefið ákveðnar vísbendingar. Losflökin gáfu sambærilegt próteinmynstur og þétta flökin, en styrkur bandanna var mismikill og sum voru nánast ómerkjanleg hjá losflökunum. Los í þorskflökum hafði að þessu leyti svipuð áhrif og verkun (þurrkun og reyking) á próteinmynstur fisksýnanna. Spurning er hvort los í þorskflökum geti verið af sama toga og sú eðlissvipting próteina sem verður við verkun fiskflaka eins og þurrkun og kaldreykingu. Þessar niðurstöður gefa tilefni til að skoða rafdrátt betur við rannsóknir á losi í fiskflökum. Skoða mætti próteinin með SDS-rafdrætti, sem greinir að prótein eftir mólþunga, til þess að sjá betur hvaða prótein er um að ræða sem eru öðruvísi í losflökum en þéttum flökum. Eins mætti athuga tveggja vídda rafdrátt við mælingar á losflökum til þess að auka upplausn próteinbandanna (Görg o.fl., 1995). Áhrif sýnameðhöndlunar á niðurstöður rafdráttarins þyrfti að kanna, og þá sérstaklega áhrif breytilegs pH í þorskvöðvanum. Hefðbundin tegundagreining fiska með jafnhleðslustillingu notar hvorki buffer, eða gerir ráð fyrir að þurfi að stilla sýrustig sýnanna (Rehbein o.fl., 1995; Yman, 1992), en ljóst er að jónastyrkur og sýrustig geta haft mikil áhrif við útdrátt próteina. Þannig sýndu Toom o.fl. (1982) fram á að útdráttarbuffer með pH 7 gaf hæstan próteinstyrk og flest próteinbönd í jafnhleðslustillingu á fisktegundinni atlantsbaulara (*Micropogon undulatus*). Niðurstöður þessa verkefnis hafa gefið tilefni til þess að reyna að tengja þennan mælipátt fyrri vísbendingum á losi í flökum, eins og mælingum á pH, RNA og hydroxyprólíni auk skynmats og rifþolsmælinga.

## 5. ÞAKKARORÐ

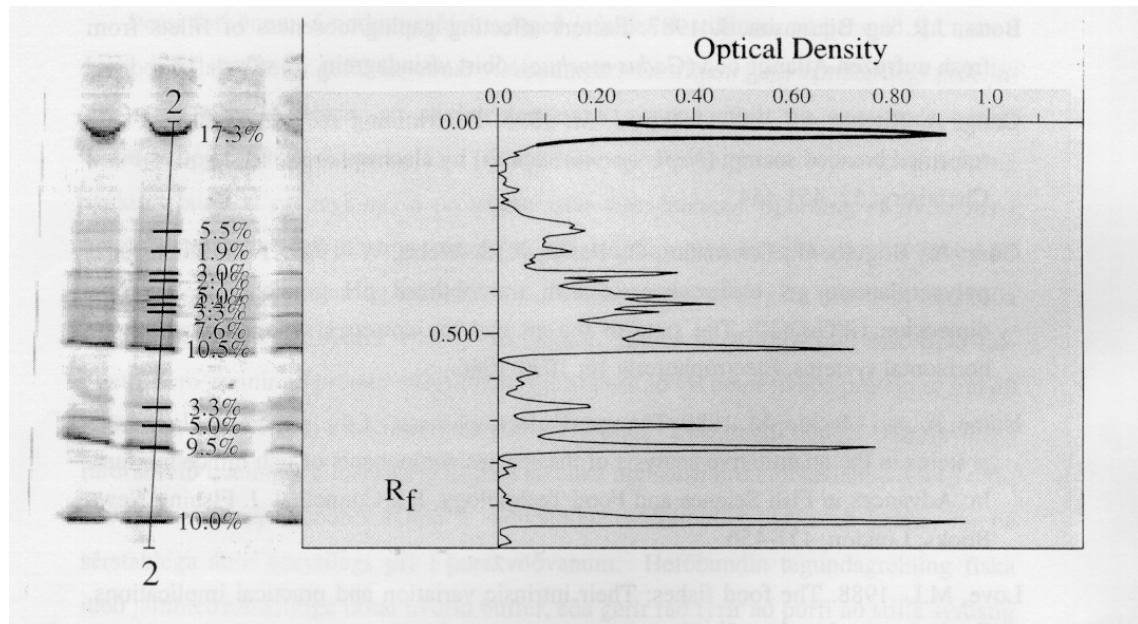
Við viljum þakka Monique Etienne hjá IFREMER stofnuninni í Nantes, Frakklandi fyrir verklega þjálfun í tegundagreiningu fiska, og sömuleiðis Bjarna Ásgeirssyni hjá Raunvísindastofnun Háskóla Íslands fyrir verklega kennslu við jafnhleðslustillingu. Ennfremur viljum við þakka starfsmönnum Faxamarkaðarins hf. fyrir öflun fisksýna og Gunnari Jónssyni fiskifræðingi á Hafrannsóknastofnuninni fyrir vinnu sína við líffræðilega tegundagreiningu þessara fiska. Loks viljum við þakka Vísindasjóði veittan styrk til að kaupa PhastSystem tækjabúnað sem var nauðsynlegur í þetta verkefni.

## 6. HEIMILDIR

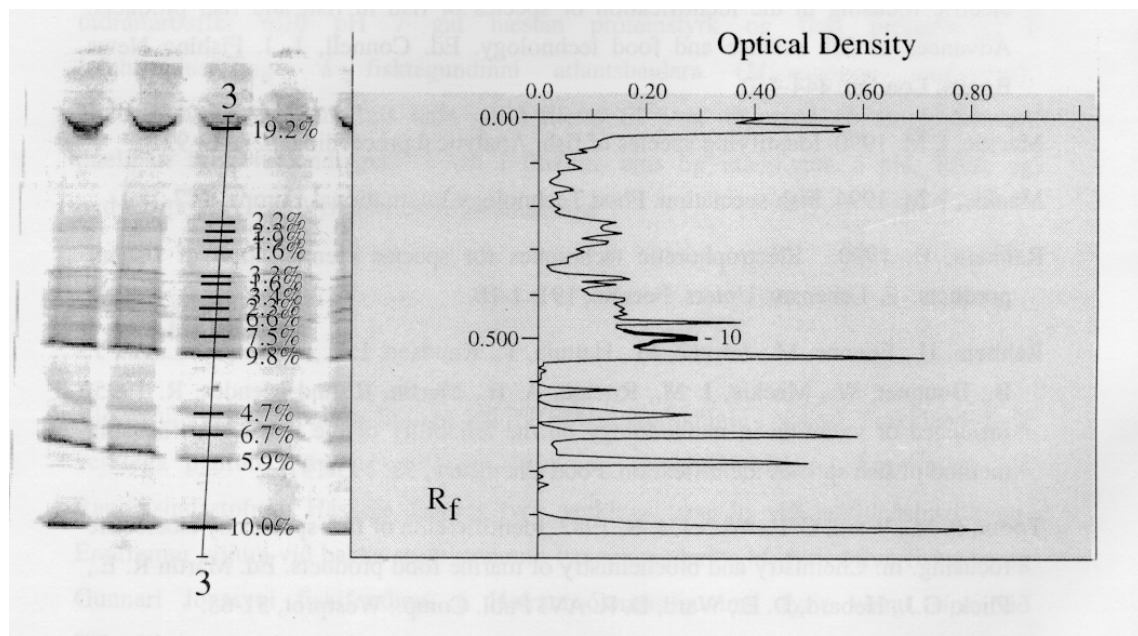
- Bjarnason, J. 1994. Seasonal variation in quality of cod. Workshop on quality and marketing of cod. Hvidøvre, Danmark, 14-15.11.1994.
- Botta, J.R. og Bjarnason, J. 1987. Factors affecting gaping/looseness of fillets from fresh unfrozen Atlantic cod (*Gadus morhua*), óbirt vísindagrein, 32 síður.
- Craig, A, Ritchie A.J. and Mackie, I. M. 1995. Determining the authenticity of raw reformed breaded scampi (*Nephrops norvegicus*) by electrophoretic techniques. Food Chemistry: 52: 451-454.
- Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A. & Weiss, W. 1995. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): The state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. Electrophoresis 16: 1079-1086.
- Hume, A. and Mackie, M. 1980. The use of electrophoresis of the water-soluble muscle proteins in the quantitative analysis of the species components of fish mince mixture. In: Advances in Fish Science and Food Technology. Ed. Connell, J. J. Fishing News Books, London, 451-456.
- Love, M.L. 1988. The food fishes: Their intrinsic variation and practical implications. Farrand press, London, 59-68.
- Mackie, I. M. 1980. A review of some recent applications of electrophoresis and isoelectric focusing in the identification of species of fish in fish and fish products. Advances in fish science and food technology. Ed. Connell, J. J. Fishing News Books, London, 444-450.
- Mackie, I. M. 1990. Identifying species of fish. Analytical proceedings, 27: 89-92.
- Mackie, I. M. 1994. Fish speciation. Food Technology International Europe, 177-180.
- Rehbein, H. 1990. Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 191: 1-10.
- Rehbein, H., Etienne, M., Jerome, M., Hattula, T., Knudsen, L.B., Jessen, F., Luten, J. B., Bouquet, W., Mackie, I. M., Ritchie, A. H., Martin, R. and Mendes, R. 1995. Influence of variation in methodology on the reliability of the isoelectric focusing method of fish species identification. Food Chemistry, 52: 193-197.
- Toom, P. M., Ward, C. F., Weber, J. R. 1982. Identification of fish species by isoelectric focusing. In: Chemistry and biochemistry of marine food products. Ed. Martin R. E., Flick, G.J., Hebard, D. E., Ward, D. R. AVI Publ. Comp., Westport, 51-65.
- Yman, I. M. 1992. Identifying fish species by IEF with PhastSystem. Pharmacia lkb. Biotechnology. Application Note 379.

## 7. VIÐAUKI

Dæmi um niðurstöður myndskönnunar á próteinmynstrum þorsklaka af mynd 3



Myndskönnun af próteinmynstri 4 af mynd 3. Þétt sýni b.



Myndskönnun af próteinmynstri 3 af mynd 3. Lossýni b.