

Verkefnaskýrsla  
04 - 05



# Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins

MAÍ 2005

**Aðdráttarafl beitu – banvænn biti**  
**Attractants in bait - Fatal attraction**

Rósa Jónsdóttir,  
Guðrún Ólafsdóttir,  
Soffía Vala Tryggvadóttir,  
Bergrós Ingadóttir,  
Magnús Már Kristjánsson,  
Þrándur Helgason,  
Sveinbjörn Jónsson

Lokuð til 05/2006





Titill / Title	Aðdráttarafl beitu – banvænn biti / Attractants in bait - Fatal attraction		
Höfundar / Authors	Rósa Jónsdóttir, Soffía Vala Tryggvadóttir, Guðrún Ólafsdóttir, Bergrós Ingadóttir, Magnús Már Kristjánsson, Þrándur Helgason, Sveinbjörn Jónsson		
Skýrsla Rf / IFL report	04-05	Útgáfudagur / Date:	Maí 2005
Verknr. / project no.	1559		
Samstarfsaðilar participants:	Raunvísindastofnun Háskóla Íslands og Veidarfærasalan Dímon ehf.		
Styrktaraðilar / funding:	RANNÍS		
Ágrip á íslensku:	<p>Markmið verkefnisins var að auka útstreymi niðurbrotsefna frá beitu til línuveiða í þeim tilgangi að laða fisk að beitunni. Bakgrunnur þess er Evrópuverkefni um þróun á beitu, sem fjallaði m.a um að nýta bræðslufisk og aukaafurðir, s.s. afskurði frá fiskvinnslum, til að framleiða beitu. Í því verkefni var þróuð ný aðferð og tækjabúnaður smíðaður til að framleiða beitu (pokabeitu) úr frystu hráefni.</p> <p>Beita þarf að innihalda þau grunnefni sem laða fiskinn að henni, en fyrri rannsóknir hafa aðallega skoðað áhrif aminosýra í útstreyminu. Í þessu verkefni var skoðuð samsetning lyktarefna sem mynduð eru úr fjölmöttum fitusýrum og gefa ferska fiskilykt. Niðurstöður sýna að samsetning á rokgjörnum efnum í mismunandi hráefni útskýrir breytileika í beituhráefni. Á svipaðan hátt er breytileikinn útskýrður vegna mismunandi fitusýrusamsetningar, aminosýrusamsetningar og efnainnihalds (fita, prótein og vatn). Einnig var ensímvirkni (lipoxygenasa og próteasa) í beituhráefni rannsökuð og áhrif þessara ensíma á myndun niðurbrotsefna sem laða fisk að beitunni. Þorskinnyfli gáfu áberandi hæstu próteasavirkni eins og við mátti búast. Smokkfiskur gaf lága virkni en þó aðeins hærrí en kolmunni, sandsíli og haustloðna, sem gáfu nánast enga virkni. Lipoxygenasavirkni (LOX) og þráhindravirkni þörungna (maríusvuntu, <i>Ulva lactuca</i>) í loðnulýsi var skoðuð og hafði maríusvunta greinilega þráhindravirkni. Hugsanlega má auka geymsluþol pokabeitu með íblöndun þörungna. Niðurstöður bentu til þess að LOX virkni væri til staðar við tínslu á þörungunum. Vitað er að LOX er mjög óstöðugt og niðurstöður sýndu að um mjög takmarkaða LOX virkni var að ræða í blöndu af maríusvuntu og loðnulýsi. Í skýrslunni eru settar fram tillögur um samsettar pokabeitur sem inniheldur hráefni með ensímvirkni, sem eiga að gefa sambærilegt eða meira útstreymi en hefðbundin beita. Þörf er á frekari rannsóknum á virkni samsettrar pokabeitu við veiðar og rannsóknir er einnig þörf á geymsluþoli pokabeitunnar.</p>		
Lykilorð á íslensku:	lyktarefni í fiski, beita, lipoxygenasi, próteasar, aukaafurðir		



### Summary in English:

The aim of the project was to increase the release of attractants from artificial bait for longline fishing for cod and haddock to enhance the efficiency of bait. The background of this project is a EU project (Q5CR-2000-70427) called "Artificial bait alternatives, mainly based on fish waste", that focused on finding ways to use raw material which is currently being used for meal production, as well as by-products from fish processing in artificial bait. In the EU project a method and equipment were developed to produce artificial bait from frozen material.

Bait should include the main ingredients that attract fish and earlier studies have mainly focused on the release of amino acids from bait. Further studies are needed on the contribution of other degradation components released from the bait. This project focused on the release of flavor compounds derived from polyunsaturated fatty acids that contribute to fresh fish odor. Moreover, enzyme activity (lipoxygenase and protease) in raw material for bait was studied and the role of the enzymes in producing degradation compounds (flavor compounds and amino acids) that attract the fish. As expected, protease activity was highest in cod viscera. The activity was much lower in squid although higher than in blue whiting, sandeel and capelin (autumn) which had almost no protease activity at all. Lipoxygenase activity (LOX) and antioxidant activity of seaweed (*Ulva lactuca*) mixed in capelin oil was studied and the antioxidant activity observed. The storage stability of the artificial bait can be increased by using seaweed. The results showed LOX activity in freshly cut seaweed but the activity was not detected after four weeks of storage in capelin oil, because of low stability of LOX.

In this report, the different combinations of raw material to produce artificial bait of ideal attractant properties are suggested. The combinations are based on the chemical and enzymic characterisation of the bait raw material. However, further studies are needed to gain information on the activity of the bait and also studies on the storage stability.

**English keywords:** *fish flavors, bait, lipoxygenase, protease, by products*

## Efnisyfirlit

1. kafli Aðdráttarafi beitu - banvænn biti .....	5
1.1 Inngangur og staða þekkingar .....	6
1.2 Fyrri rannsóknir á beitu .....	6
1.3 Rannsóknir á bragð og lyktarefnum sem nýtast við beiturannsóknir .....	7
1.4 Rannsóknir á lipoxýgenasa (LOX) í sjávarfangi .....	8
1.5 Heimildir .....	8
2. kafli Kortlagning á rokgjörnum niðurbrotsefnum í hráefni sem notað er í beitu .....	11
2.1 Inngangur / <i>Introduction</i> .....	12
2.2 <i>Materials and methods</i> .....	12
2.3 <i>Results and discussion</i> .....	14
2.4 <i>References</i> .....	24
A2.1 <i>Appendix</i> .....	25
3. kafli Þróun á samsettum beitum .....	27
3.1 <i>Comparison of chemical composition of different bait and bait alternatives</i> .....	28
3.2 <i>Artificial bait</i> .....	29
3.3 <i>References</i> .....	30
4. kafli Ensímvirkni lípoxýgenasa .....	33
4.1 Inngangur .....	34
4.2 Efni og aðferðir .....	36
4.3 Niðurstöður .....	37
4.4 Umræða og ályktanir .....	40
4.5 Heimildir .....	40
Viðauki A4.1 .....	43
Viðauki A4.2 .....	44
5. kafli Ensímvirkni próteasa í sjávarfangi .....	45
5.1 Inngangur .....	46
5.2 Aðferðaþróun .....	46
5.3 Mælingar á próteasavirkni .....	47
5.4 Sértek hvarfefni ( <i>Synthetic substrate</i> ) .....	47
5.5 Niðurstöður .....	48
5.6 Heimildir .....	50
Viðaukar	
A5.1 Útdráttur á þorskinnyflum .....	51
A5.2 Heimtur .....	52
A5.3 Niðurstöður útreikinga á próteasavirkni .....	53
A5.4 Um sýnin .....	54
A5.5 Almenn próteasavirkni .....	55
6. kafli Prófun á útstreymi og virkni beitu .....	57
6.1 Inngangur .....	58
6.2 Efni og aðferðir .....	58
6.3 Niðurstöður og umræða .....	59
6.4 Heimildir .....	62
Viðaukar .....	63
1 TAFT Proceedings and poster .....	65
2 Greinar, viðtöl og veggspjald .....	69



**1. kafli**  
**Aðdráttarafl beitu - banvænn biti**

---

## 1.1 Inngangur og staða þekkingar

Heildarmarkaður fyrir beitu á Íslandi er 700-900 milljónir kr. á ári, þar af er um 60-80% innflutt beita. Stór hluti þeirrar beitu sem flutt er inn til landsins er smokkfiskur og sandsili (Sveinbjörn Jónsson 2005). Mikill afskurður verður til við beitningu sem nýtist ekki í beitu. Í stað þess að flytja inn dýrt beituhráefni er augljós ávinningur að nýta beituúrgang sem til fellur í fisk- og skelfiskvinnslu hér á landi og ódýra uppsjávarfiska til beitu. Þess má einnig geta að veiðar á smokkfiskinum *Illus argentinus*, sem aðallega hefur verið veiddur við Falklandseyjar, hafa gengið mjög illa að undanfögnu og á síðasta ári varð nánast aflabrestur. Þessi tegund af smokkfiski er vinsælasta beitan hjá línuveiðiflotanum á Íslandi og er því ljóst að þörf er á nýjum möguleikum fyrir beitu. Þá hefur smokkfiskur og makrill verið nýttur í auknum mæli til manneldis á undanfögnu árum. Þessi samkeppni hefur leitt til hækkunar á verði beitu auk þess sem ljóst er að ekki er æskilegt að nota fisk í beitu sem nýtist til manneldis. Það er því nauðsynlegt að rannsaka möguleika þess að finna önnur hráefni sem hægt væri að nýta í áhrifaríka beitu.

Bakgrunnur þessa verkefnis, sem er RANNÍS-verkefni, er CRAFT-verkefni, sem styrkt var af Evrópubandalaginu, um þróun á beitu fyrir línuveiðar (Artificial bait alternatives, mainly based on fish waste). CRAFT verkefnið fjallaði m.a um nýtingu á bræðslufiski og aukaafurðum svo sem afskurði frá fiskvinnslunni til beitu-gerðar. Það verkefni var til tveggja ára og hófst í mars 2001 með þátttöku Íslendinga, Spánverja og Portúgala. Íslensku aðilarnir í þessu verkefni voru Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins og Dimon veiðarfærasala ehf. Í tengslum við verkefnið voru gerðar ítarlegar efnagreiningar á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins (Rf) á hefðbundinni beitu sem er vinsæl hér við land, svo sem smokkfiski, sandsili, makrill og síld. Einnig voru gerðar mælingar á ýmsu hráefni sem getur nýst í beitu eitt og sér eða í blöndu, svo sem loðnu, kolmunna, bolfiskafskurði, hörpudiskhrati, úrgangi eftir síldarflökun o.fl. Mæld voru hlutföll hinna ýmsu næringarefna svo sem fitu, próteins, vatns, salts og ösku, auk þess sem fríar aminosýrur og fitusýrur voru mældar. Mælingar svo sem TVN, peroxíð gildi og pH fóru fram til að fylgjast með hráefnigæðum. Allar mæliniðurstöður og afrakstur úr CRAFT verk-

efninu nýttust sem þekkingargrunnur fyrir RANNÍS verkefnið.

Í verkefninu var þróuð ný aðferð og sérstakur tækjabúnaður smíðaður til að framleiða beitu úr frystu hráefni. Í framhaldi af þeirri þróunavinnu var stofnað fyrirtækið Aðlöðun ehf. og beituverksmiðja sett upp í gamla Norðurtangahúsinu á Ísafirði. Framleiðslutæknin byggist á því að raspa niður frosnar fiskblökkir af beituhráefni til að útbúa frosið fisksag. Fisksagið er síðan mótað með þrýstingi í þétta bita (10-15 g) og pakkað í trefjaefnispoka (pokabeita). Vinnan fer fram í frosti þannig að hráefnið og framleiðslan þiðnar ekki fyrr en beitan er lögð í sjó. Mótið sem beitan er steipt í myndar gat í miðjan beitungubinn svo auðvelt er að krækja í hana. Aðlöðun ehf. hefur þegar fengið einkaleyfi á þessari tækni (Einkaleyfi nr. 1925, „Aðferð og búnaður til að breyta blokkfrystum afurðum í einskonar snjó, sem og afurðin sem fæst með notkun aðferðarinnar og búnaðarins“ Veitt 15. apríl 2004).

## 1.2 Fyrri rannsóknir á beitu

Margar rannsóknir hafa verið gerðar til að skilgreina efni sem hvetja fisk og skelfisk til að taka beitu (Mackie 1973; Carr 1978; Mackie og Adron 1978; Adron og Mackie 1978; Ellingsen and Döving, 1986; Johnstone and Mackie 1990; Sutterlin og Couturier 1993). Takmarkaður árangur hefur náðst við að nýta þá þekkingu til að framleiða árangursríka gervibeitu. Talsverðir erfiðleikar hafa verið í því fjölgirnir að finna hentugt efni til að pakka beitungu í en efnið þarf að uppfylla eftirtalin skilyrði:

- styrkleika til að halda beitungu á króknum í a.m.k. tvo tíma
- gisið svo að ekki lokist fyrir útstreymi frá beitungu
- hæfilega sterkt þannig að beitan detti af þegar línan er dregin inn (tímfrekt fyrir beitningamenn að þurfa að taka af krókunum áður en þeir beita aftur)
- má ekki gefa óeðlilega áferð sem fiskurinn hafnar.

Reynt hefur verið að nota bindiefni til að halda fiskhakki (beitu) saman (Lökkeborg, 1990) svo ekki þurfi umbúðir, en þá vill bindiefnið hægja á eða hindra útstreymi efna sem laða fiskinn að. Í fyrrgreindu CRAFT-verkefni er búið að leysa umbúðarmálið nokkuð vel.



Franskt fyrirtæki (Polymer Group Inc.), sem sérhæfir sig í umhverfisvænum trefjaefnum, hefur í samvinnu við Dímon veiðarfærasölu ehf. framleitt efni sem virðist hafa til að bera alla þá kosti sem umbúðir utan um beitumauk þurfa að hafa. Nýju pokabeitunni er pakkað í þetta trefjaefni sem hentar vel til að stjórna útstreymi beituhraefnisins í nægilegu magni í æskilegan tíma. Trefjaefnið hefur þegar verið reynt á hefðbundnum línuveiðum og lofar það góðu. Þess má geta að trefjaefnið sem notað er í pokana er samkvæmt upplýsingum frá framleiðenda, umhverfisvænt og eyðist í náttúrunni á nokkrum árum.

Af flestar rannsóknum sem fjalla um beitu og efnaboð því samfara má draga þá ályktun að aðalaðdráttarafi beittunnar komi frá aminosýrum (Sutterlin 1975; Lökkeborg, 1990; Sutterlin og Couturier 1993), en ljóst er að um er að ræða flókið samspil margra efnabátta. Franco o.fl. (1991) komust að því að með því að fjarlægja basískar og súrar L-aminosýrur úr sérlagaðri smokkfiskbeitu dró verulega úr virkni hennar. Einnig tóku þeir úr beittublöndunni ýmis efni sem tengjast efnum sem eru til staðar í vöðva svo sem TMAO, hypoxanthine, TMA, inosine og L(+) lactic acid og bætti það virkni beittunnar. Þessi efni (nema TMAO) myndast við skemmd á fiski og bendir það því til að fiskurinn vilji frekar ferska beitu.

### 1.3 Rannsóknir á bragð og lyktarefnum sem nýttast við beiturannsóknir

Líklegt er að útstreymi sem laðar fisk að beittunni sé samspil niðurbrotsefna með lítinn mólíkúlpunga svipað og niðurbrotsefni sem gefa bragð og lykt í matvælum. Ýmsar vísbandingar í CRAFT-verkefninu sýndu að ferskleiki beittunnar skipti miklu máli til að laða fiskinn að beittunni. Í fortíraun sem gerð var á Rf var útbúin beita, annars vegar úr hráefni, sem var látið þiðna, og hins vegar úr frosnu hráefni sem notað var beint í beittuna. Niðurstöður sýndu að tvífrýsting og meðhöndlun á hráefninu virtist hafa slæm áhrif á virkni beittunnar. Þetta kemur ekki á óvart þar sem fiskurinn lifir á lifandi æti og laðast því ákafast að útstreymi sem boðar ferskleika.

Tilgátan í Rannís verkefninu var sú að hægt væri að auka virkni samsettrar beitu með því að nota hráefni sem inniheldur lipoxygenasa virkni, þannig að hún framleiði niðurbrotsefni sem gefa ferska fiskilykt. Jafnframt var tilgátan sú að

hægt væri að auka virkni beittunnar með því að nýta próteasavirkni til að auka útstreymi aminosýra. Á Rf hafa verið stundaðar rannsóknir á rokgyörnum efnum sem áhrif hafa á lyktareinkenni í ferskum fiski (Guðrún Ólafsdóttir o.fl. 1997; Jensen o.fl. 1998), verkuðum hrognum (Rósa Jónsdóttir o.fl. 2000; 2001a) og bragðefnum úr sjávarfangi (Rósa Jónsdóttir o.fl. 2001b). Fjöldi rannsókna hafa verið gerðar á áhrifum ensíma t.d. próteasa á eiginleika matvæla m.a. til að mýkja áferð þeirra eða flýta fyrir verkun t.d. hroga. Einnig hafa sértæk not af ensímum unnum úr sjávarfangi mikið verið rannsökuð vegna virkni þeirra við lágt hitastig (López og Carreño 2000; Gildeberg o.fl. 2000). Sýnt hefur verið fram á að einkum eru það friar aminosýrur og peptíð sem gefa matvælum einkennandi bragð (Kawai 1996). Friar aminosýrur og peptíð eru t.d. talin meginuppistaða í hinu sérkennilega bragði sem myndast í saltaðri síld við langvarandi geymslu (Guðmundur Stefáns-son og Guðný Guðmundsdóttir 1995). Friar aminosýrur hafa hver um sig ákveðna bragðeiginleika t.d. hafa glycine og alanine sætt bragð, vatnsfælnar aminosýrur framkalla beiskt bragð og sölt af glutamic og aspartic sýru framkalla bragðfyllingu (umami). Dípeptíð geta einnig haft afgerandi áhrif á bragðeiginleika matvæla og þá skiptir máli samspil þátta eins og sýrustigs og saltstyrks, svo og magn af viðkomandi bragðhvetjandi efnum þ.e. dípeptíð og aminosýrur. Tiltölulega lítið er vitað um próteasavirkni í hráefninu sjálfu, sem hefur lykilhlutverk í myndun þessara bragðefna. Því er mikilvægt að kanna/greina virknina í hráefninu sem um ræðir. Rannsóknir á ferskleikalykt í fiski sýna að það er fyrst og fremst niðurbrot á fjölómettuðum fitusýrum vegna lipoxygenasa virkni, sem gefur ferska fiskilykt (Josephson o.fl. 1984a, b).

Ekki hefur verið rannsakað áður hlutverk niðurbrotsefna frá fjölómettuðum fitusýrum (lipoxygenasa virkni) í því að laða fisk að agninu, né heldur er vitað til þess að próteasavirkni hafi verið sérstaklega skoðuð í beitu. Langtíma-markmiðið er að þróa beitu sem hægt yrði að stjórna útstreyminu frá. Hugsanlegt væri að nota húðuð (encapsulated) ensím sem myndu virkjast þegar beitan kæmi í sjó og myndi tryggja niðurbrot þeirra efna sem eru í beittunni þannig að þegar línan væri lögð leystust upp aðdráttarefni frá beittunni í ákveðinn tíma og í ákveðnu magni. Efnin sem kæmu frá beittunni væru

breytileg þannig að hægt væri að stjórna hvaða fisktegund væri veidd. Seinni tíma markmið er þróun beitu sem þyrfti ekki kælingu né frystingu, svo kölluð „þurr beita“. Þá yrðu til staðar forverar lyktarefna, bundin hlutlausum massa, ásamt ensímum þar sem virkni mundi liggja í dvala þar til beitan blotnar. Hefðbundin beita í dag, svo sem síld og smokkfiskur, er mjög viðkvæm fyrir skemmdum. Kæli- og frystikostnaður hræfnis í beitu og beitunnar sjálfrar er einnig talsverður.

#### 1.4 Rannsóknir á lipoxygenasa (LOX) í sjávarfangi

Lipoxygenasar (LOX) eru til staðar í plöntum og dýrum, þar á meðal sjávardýrum og einnig í sveppum. Hlutverk LOX í lífverum og plöntum hefur verið tengt stjórnun á ýmsum þáttum varðandi lífvirkni svo sem viðbrögðum við stressi og sýnt hefur verið fram á að LOX virkni tengist einnig kynþroska og hrygningu í fiski (Josephson o.fl.1984b). Það er áhugavert að geta þess að nýlegt erlent einkaleyfi (Fish attractants, US 2004/0029276 A1) byggist á því að hormón sem áður voru talin að einungis tengdust kynæxlun hafi einnig áhrif á fæðuinntöku í fiski. Einkaleyfið felur í sér ákveðna samsetningu hormóna og sérstaklega er getið hormónsins 17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-one.

Það er ljóst að aðlöðun fisks að æti er háð ýmsum þáttum og rannsóknir sem hafa verið gerðar á hlutverkum LOX í sambandi við myndun rokgjarna efna, sem valda æskilegum lyktareinkennum í mörgum matvælum eru því góður bakgrunnur til að skoða betur hvernig þessi efni hafa áhrif á aðlöðunarhæfni beitu.

Á undanförunum árum hafa komið fram tillögur um að nota mætti þessa sérhæfðu virkni LOX til að framleiða sérstaklega efni sem gefa ferska fiskilykt. Josephson og Lindsay (1986) gerðu tilraun til þess að framkalla ferska fiskilykt í surimi sem unnið var úr ufsa. Surimi grunnurinn hafði mjög milda lykt sem aðallega var rakin til C8 efna og einnig voru 2,4 heptadienal og 2,4-decadienal til staðar í mjög litlu magni. Tilgátan var sú hvort nota mætti LOX úr plöntum, sem ekki væri eins óstöðugt og LOX úr sjávarfangi til að framleiða ferska fiskilykt. Þeir gerðu athuganir með því að bæta geranium laufblöðum, sveppum og agúrkum sem vitað er að hafa LOX virkni í surimi grunninn til að auka styrk einkennandi efna sem eru til staðar bæði í fiski og í þessum hræfnum. Niðurstöð-

urnar voru þær að heildarlyktin var í ójafnvægi og töldu þeir að frekari rannsóknir ættu að beinast að því að útbúa ensím „extract“ og bæta í grunninn til að framkalla sérhæfð lyktarefni og mildari fiskilykt. Fleiri rannsóknir hafa síðan beinst að því að nota LOX úr þörungum til að framkalla fiskilykt. Pan o.fl. (1997) sýndu fram á að hægt er að nota LOX þykkni unnið úr fiskúr-gangi t.d. tálknum úr gráröndungi (grey mullet) til að framkalla einkennandi fiskilykt með því að blanda saman við ákveðnar fjölmottaðar fitusýrur (18:2, 18:3, 20:5, 20:6) og lýsi. Hu og Pan (2000) sýndu síðan fram á að hægt er að breyta lyktareinkennum menhaden lýsis m.þ.a. meðhöndla það með LOX extracti úr þörungum (macroalgae). Þessar rannsóknir sýna að hugsanlegt er að stýra myndun niðurbrotsefna sem gefa ferska fiskilykt.

Markmið verkefnisins, Aðráttarafl beitu – banvænn bita, var að auka útstreymi niðurbrotsefna frá beitu sem notuð er til línuveiða, í þeim tilgangi að laða fisk að beitunni. Niðurbrotsefni voru skoðuð og frekari rannsóknir gerðar á ensím-virkni samfara myndun niðurbrotsefna í beituhræfni.

#### 1.5 Heimildir

- Adron, J.W., Mackie, A.M. 1978. Studies on the chemical nature of feeding stimulants for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Biol.* 12: 303-310.
- Carr, W.E.S. 1982. Chemical stimulation of feeding behaviour. Í: T.J. Hara, ritstj.: *Chemoreception in Fishes*. Elsevier, Amsterdam, 259-273.
- Ellingsen, O.F., Döving, K.B. 1986. Chemical fractionation of shrimp extracts including bottom food search behaviour in cod (*Gadus morhua*). *J. Chem. Ecol.* 12: 155-168.
- Franco, J., Johnstone, A.D.F., Mackie, A.M. 1991. Studies of bait preference in the cod, *Gadus morhua* L.: characterisation of feeding stimulants using an operant conditioning technique. *Fisheries Research* 10: 229-242.
- Gildberg, A., Simpson, B.J., Haard, N.F. 2000. Uses of Enzymes from Marine Organisms. Í: N.F. Haard, B.K. Simpson (ritstj.) *Seafood Enzymes*. Marcel Dekker, 619-639.
- Guðmundur Stefánsson, Guðný Guðmundsdóttir. 1995. Free amino acids and their relationship to taste in (salt) ripened pelagic fish species. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins. *Rf-skýrsla* 91-9.
- Hsieh, R.J., German J.B., Kinsella, J.E. 1988. Lipoxygenase in fish tissue: some properties of the 12-lipoxygenase from trout gill. *J. Agric. Food Chem.* 36: 680-685.
- Hu, S-P., Pan B.S. 2000. Modification of fish oil aroma using macroalgal lipxygenase. *JAOCs* 77: 343-348.
- Jensen, B., Refsgaard, H.H.F. Guðrún Ólafsdóttir. 1998.

- Headspace and extraction methods for analysis of volatile and semivolatile compounds in fish - Chemical and sensory assessment of lipid-derived volatiles. Í: *Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry, Proceedings of the Final meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness" AIR3 CT94 2283*. Nantes Nov 12-14, 1997. International Institute of Refrigeration. 70-91.
- Johnstone, A.D.F., Mackie, A.M. 1990. Laboratory investigations of bait acceptance by the cod, *Gadus morhua* L. identification of feeding stimulants. *Fisheries Research* 9: 219-230.
- Josephson, D.B., Lindsay, R.C., Stuibler, D.C. 1984a. Variations in the occurrences of enzymically derived volatile aroma compounds in salt- and freshwater fish. *J. Agric. Food Chem.* 32: 1344-1347.
- Josephson, D.B., Lindsay, R.C., Stuibler, D.C. 1984b. Biogenesis of lipid derived volatile aroma compounds in the Emerald Shiner (*Notropis atherinoides*). *J. Agric. Food Chem.* 32: 1347-1352.
- Josephson, D.B., Lindsay, R.C. 1986. Volatile Aroma Compounds from Fresh Fish. Í: T.H. Parliamend, R. Croteau (ritstj.) *Biogeneration of Aromas*. ACS Symposium series. ACS, Washington, 202-219.
- Kawai T. 1996. Fish Flavor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36: 257-298.
- López, M.D., Carreño, F.L.G. 2001. Applications of fish and shellfish enzymes in food and feed products. Í: N.F. Haard, B.K. Simpson (ritstj.) *Seafood Enzymes*. Marcel Dekker. 571-618.
- Lökkeborg, S. 1990. Rate of release of potential feeding attractants from natural and artificial bait. *Fisheries Research* 8: 253-2261.
- Mackie, A.M. 1973. The chemical basis of food detection in the lobster *Homarus gammarus*. *Marine Biology* 21:103-108.
- Mackie, A.M., Adron, J.W. 1978. Identification of inosine and inosine 5'-monophosphate as the gustatory feeding stimulants for the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 60A: 79-83.
- Guðrún Ólafsdóttir, Emília Martinsdóttir, Jónsson, E.H. 1997. Gas sensor and GC measurements of volatile compounds in capelin (*Mallotus villosus*). Í: J.B. Luten, T. Börresen, J. Oehlenschläger (ritstj.) *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality*. Amsterdam, Elsevier. 507-520.
- Pan, S. B., Kuo J.M., 1997. Lipoxigenases. Í: N.F. Haard, B.K. Simpson (ritstj.) *Seafood Enzymes*. Marcel Dekker, 619-639.
- Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir, Áslaug Högnadóttir, Emília Martinsdóttir og Guðmundur Stefánsson, 2000. Characterisation of roe ripening. *Verkefnaskýrsla til Nordisk Industrifond 01-00*. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins.
- Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir, Emília Martinsdóttir og Guðmundur Stefánsson, 2001a. Characterisation of roe ripening-II. *Verkefnaskýrsla til Nordisk Industrifond 04-01*. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins.
- Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir og Jón Magnús Einarsson, 2001b. Gagnagrunnur bragðefna úr sjávarfangi: Aðferðir við greiningu lyktarefna. *Verkefnaskýrsla til Rannsóknarráðs Íslands 16-01*. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins.
- Sutterlin, A.M. 1975. Chemical attraction of some marine fish in their natural habitat. *J. Fish. Res. Board Can.* 32: 729-738.
- Sutterlin, A., Couturier, C. 1993. *An Evaluation of Crude Hydrolysates from Fish and Fish Wastes as Alternate Sources of Bait for the Cod Longlining Fishery*. The Marine Sciences Research Laboratory, Memorial University og Newfoundland, St. John's, Nfld. Report: March 1993.
- Sveinbjörn Jónsson 2005. *Munnleg heimild*. Aðlöðun ehf.



**2. kafli**  
**Kortlagning á rokgjörnum niðurbrotsefnum í**  
**hráefni sem notað er í beitu**

*Volatile compounds in bait raw material*

Rósa Jónsdóttir  
Guðrún Ólafsdóttir  
Soffía Vala Tryggvadóttir

---

## 2.1 Inngangur / Introduction

Rokgjörn niðurbrotsefni (lyktarefni) voru mæld með gasgreini í hefðbundinni beitu og í hráefni sem fellur til við fiskvinnslu (sumarloðna, loðna, kolmunni, sandsíli, smokkfiskur, kúfiskur, kúfiskhrat (úr kúfiskvinnslu) og innyfli úr þorski. Auk þess voru gerðar mælingar á orkuefnum, aminosýrum og fitusýrum.

Niðurstöður sýna að samsetning á rok-gjörnum efnunum í mismunandi hráefni skýrir breytileika á beituhráefni á svipaðan hátt og breytileikinn er útskýrður vegna mismunandi fitusýrusamsetningar, aminosýrusamsetningar og efnainnihalds (fita, prótein og vatn).

Development of successful bait for marine commercial species is the aim for many researchers dealing with chemoreception. Regarding Gadiformes (cod, hake etc.) it is believed that its feeding behavior is primarily mediated by chemosensory mechanisms (Pawson 1977). Although different types of substances are known to provoke responses in fish, chemosensory research involving behavioral and electrophysiological work have given strong support that free amino acids (specially L- stereoisomers) and other low molecular weight components of tissues are dominant in the aquatic environment in this respect (Ellingsen and Doving 1986).

Gadiform fishes predate on live prey and are therefore very sensitive towards freshness. Preliminary studies in the project indicated that the preparation of bait material, like thawing, grinding and mixing appears to effect the chemoreception that attracts the fish to the bait. It is known that enzyme activity (lipoxigenase and protease) in fish is involved in producing degradation compounds (flavor compounds and amino acids) (Josephson and others 1987; Bailey 1998) that may attract the fish when used in bait.

The objective of this study was to analyze volatile compounds in bait and bait alternatives using gas chromatographic techniques. Gas chromatography olfactometry (GC-O) was used to identify the characteristic odors and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) to identify compounds based on mass spectra. Fatty acid, free amino acid and proximate analysis were also done to study their relationship to the volatiles. The role of odor compounds as attractants in bait has not been studied before.

## 2.2 Material and methods

### Samples

Different types of traditional and artificial bait were analyzed using gas chromatography olfactometry (GC-O) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) to study the composition of volatile compounds. Following species were studied: blue whiting (*Micromesistius poutassou*), capelin (*Mallotus villosus*), viscera of cod (*Gadus morhua*), ocean quahog (*Arctica islandica*) and waste, sandeel (*Ammodytes tobianus*) and squid (*Illus argentinus*). Fatty acid, free amino acid and proximate analysis were done on the samples and additional samples using traditional methods. The biochemical and proximate analysis were all performed at the Icelandic Fisheries Laboratories. Following is a description of the analytical methods used.

### Proximate analysis

*Protein. Ghb-e-AM-903.* The sample was digested in sulphuric acid in presence of copper as catalyst. There after the sample was placed in distillation unit, 2400 Kjeltec Auto Sampler System. The acid solution was made alkaline by a sodium hydroxide solution. The ammonia was distilled into boric acid and the acid was simultaneously titrated with diluted H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The nitrogen content was multiplied by the factor 6.25 to get %crude protein.

*Ref. ISO 5983-1979.*

*Water. Ghb-e-AM-904.* The sample was heated in a heating oven at 103°C +/-2°C for four hours. Water corresponds to the weight loss.

*Ref. ISO 6496 (1983).*

*Ash. Ghb-e-AM-905.* The sample was ashed at 550°C, and the residue was weighed.

*Ref. ISO 5984-1978 (E).*

*Fat. Ghb-e-AM-901a.* The sample was extracted with petroleum ether, boiling range 40-60°C. The extraction apparatus was 2050 Soxtec Avanti Automatic System.

*Ref. AOCS Official Method Ba-3-38 with modifications according to Application note Tecator no AN 301.*

*Salt (NaCl). Ghb-e-AM-902c.* Soluble chloride was extracted from the sample with water containing nitric acid. The chloride content of the solution was titrated with silver nitrate and

the end point was determined potentiometrically.

*Ref. AOAC 16th ed. 1995 no 976.18.*

### Amino acids analysis

*Apparatus.* The chromatography system consists of Hewlett Packard (HP) 1050 series (gradient) pumping system, HP autosampler, Varian 9070 fluorescence detector, Croco-cil column heater and HP Chemstation datahandling system. The column (150x4.6 mm) from Hi-chrom, Reading UK, was packed with 3mm Spherisorb ODS-2 material and suitable guard column of same packing material was used.

*Sample preparation.* The samples (2-5g) were accurately weighed into centrifuge tubes and 20 ml of hydrochloric acid (0.1 N) and 1 ml of an internal standard (norvaline) added. After homogenization for 1 minute, using an Ultra-Turrax homogenizer, the samples were centrifuged at 15000 rev/min for 20 minutes. An aliquot (1 ml) of the supernatant was then diluted to 25 ml with distilled water before analysis.

*Derivatization and separation.* The derivative, with OPA (o-phthalaldehyde) as derivatization reagent, was made in the autosampler. Each sample was run 3 times and standards before a sample triplicate. At least one blank was run.

The amino acid derivatives were separated by reversed phase chromatography using binary gradient elution at 25°C. Solvent A: acetate/methanol/THF (tetrahydrofuran) pH 7.0 and B: methanol. Flow rate 1ml/min. Excitation wavelength 338nm and emission 456nm. For more detail on amino acids analysis (Margrét Bragadóttir 2001).

### Fatty acids analysis

*Extraction of lipids.* Lipids were extracted by chloroform/methanol extraction system based on the method of Bligh and Dyer (1959) as modified by Hanson and Olley (1963), but with some alterations. To hinder oxidation of the lipids, all samples were treated in ice bath, BHT (butylated hydroxytoluene) (50-100 mg/l) was added to all solvents and care was taken to eliminate as much light as possible. The extract was centrifuged at 1000 x g for 20 min at 0-5 °C in a refrigerated centrifuge (Sorvall Superspeed RC5-B, DuPont Instruments, Stockholm). The lower layer containing the chloroform with the lipids was filtered by vacuum through a glass

filter (Watman GH/D). For determination of the lipid concentration in the extract, portion of the chloroform layer was pipetted into a preweighed beaker and the chloroform was evaporated on a rotary evaporator to dryness at 60°C for 30 min. Afterwards the beaker was cooled inside a desiccator and weighed. The remaining weight was taken as the lipid content in mg/ml.

*Methylation.* Saponification and methylation was done according to AOCS, Ce 1b-89 (1998) with minor adjustments.

*Gas chromatography.* Fatty acid methyl esters (FAME) were separated on a Perkin Elmer Autosystem XL GC gas chromatograph equipped with a fused silica capillary column (OmegaWax 320, 30 m x 0.32 mm i.d., 0.25 µm film obtained from Supelco, Bellefonte, PA), split injector and flame ionization detector fitted with Turbocrom Professional Version 4.1 software. The oven was programmed as follows: 160°C for 2 min, then raised to 210°C at 3°/min and held at this temperature for 35 min. Injector and detector temperature were 300°C and 310°C respectively. Helium was used as a carrier gas at a pressure of 8 psig. The peaks were identified by comparison with known fatty acid methyl ester standards (Sigma Chemical Co, Ltd). The fatty acid profiles of samples were quantified following addition of an internal standard C23:0 to each sample.

### Analysis of volatile compounds

*Purge and trap sampling.* Prior to GC-MS and GC-O analysis, samples were collected by a purge-and-trap sampling (Ólafsdóttir and others 1985). Samples were prepared by weighing 100±2 g and 100±5 g of saturated aqueous solution of NaCl into a 250 ml round bottom flask. Saturated NaCl solution (200±5 g) was prepared as a reference sample. Heptanoic acid ethyl ester was added as an internal standard to all samples by adding 1 ml of 10-ppm aqueous solution of the standard to the 200 g roe/NaCl<sub>sat</sub> solution. The sample was purged at room temperature with nitrogen at about 100 ml/min for 2.5 hours. Volatiles were collected on 250 mg Tenax 60/80 (Alltech, IL) in stainless steel tubes (Perkin-Elmer, Buckinghamshire, UK) for the combined ATD 400 and GC-MS measurements or 150 mg Tenax in a Pasteur pipette for the GC-O measurements. Each sample was prepared in duplicate.

*GC-MS measurements.* Volatile compounds were thermally desorbed (ATD 400, Perkin Elmer) from the Tenax tubes and separated on a DB-5ms column (30 m'0.25 mm i.d.'0.25  $\mu$ m, J&W Scientific, Folsom, CA) using helium as a carrier gas by GC-MS (HP G1800C GCD, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). The following temperature program was used: 50°C for 7 min, 50°C to 120°C at 5°C/min and from 120°C to 220°C at 10°C/min. The injection temperature was 250°C and the detector temperature was 280°C. The mass detector ion range was 35-300 m/z. The results are expressed as peak area ratio (PAR) of total ion count (TIC), i.e.  $TIC_{\text{compound}}/TIC_{\text{internal standard}}$ .

*GC-O measurements.* Volatiles were extracted from the Tenax traps with 1 mL diethyl ether. The sample was then concentrated by passing nitrogen over the solution leaving a small amount of sample, 20-30  $\mu$ L. Headspace sample (1  $\mu$ L) samples were then injected splitless. Measurements were performed on a GC (HP 5890, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) with the same type of column and the same conditions as for the GC-MS measurements. The end of the column was split 1:1 between flame ionization detector (FID) and an ODO-1 olfactory detector outlet (SGE, UK). Nitrogen, bubbled through water to add moisture, was used to drive the sample up to the sniffer. Two persons describing the odor sniffed the effluent. Intensity (quality and duration/retention times) of

each odor was determined using an intensity from 0-5, 0: not present; 5: very strong.

*Identification of the volatiles* was done by matching retention indices (RI) of ethyl esters and mass spectra of samples with authentic standards (Sigma-Aldrich and Merck). Tentative identifications were based on standard MS library data (Hewlett-Packard Co, 1997) with the quality of recognition above 60% accepted and also manually checked against literature sources and the database Flavornet (Acree 1997).

*Data handling.* Multivariate analysis was performed by the Unscrambler 7.5 software package (CAMO AS, Trondheim, Norway). The main variance in the data set was studied using principal component analysis (PCA). The PCA was performed on average results of sample replicates for each sample. The results were standardized to equal variance prior to PCA. Cross validation was used in the validation method.

## 2.3 Results and discussion

### Chemical analysis

Proximate analysis of protein, water, fat, salt and ash was done on traditional bait and bait alternatives collected in Iceland (Table 2.1). The main difference between the samples was in the fat content (Figure 2.1). A correlation between fat content and water content was seen in increasing fat content with decreased water content. The pelagic species, capelin and sandeel

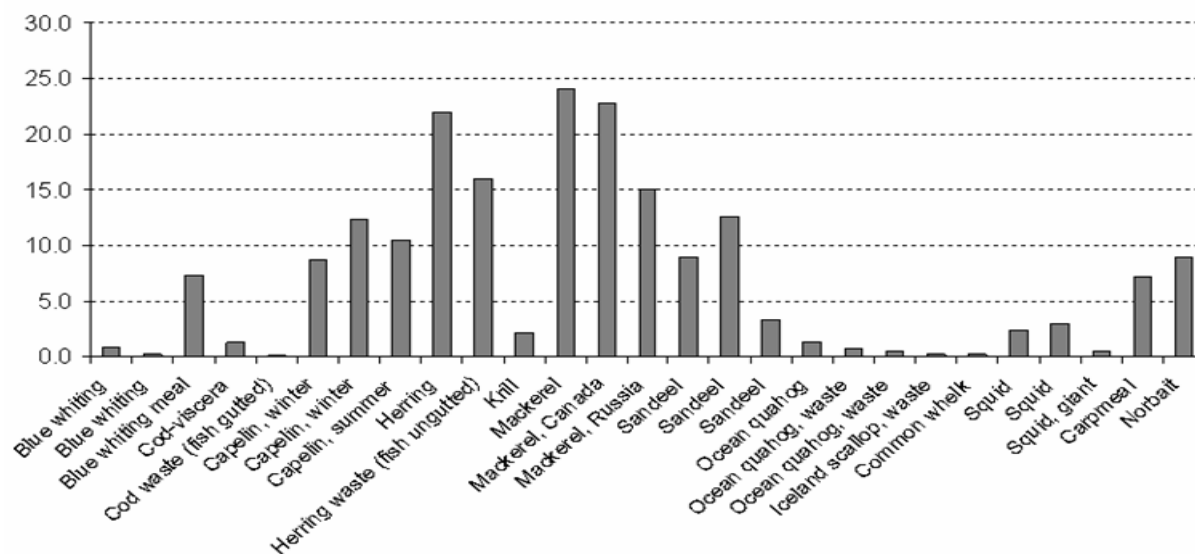


Figure 2.1. The content of fat (%) in various baits and bait alternatives.



Table 2.1. Results from proximate analysis of traditional fish baits and bait alternatives.

Sample		Traditional bait (yes/no)	Protein (%)	Water (%)	Fat (%)	Salt (%)	Ash (%)
Blue whiting	<i>Micromesistius poutassou</i>	no	18.1	80.5	0.8	0.1	1.2
Blue whiting	<i>Micromesistius poutassou</i>	no	19.2	78.2	0.2	0.7	2.4
Blue whiting meal		no	72.5	7.8	7.3	2.0	12.7
Cod-viscera	<i>Cod-viscera</i>	no	13.4	80.2	1.2	1.2	3.7
Cod waste (fish gutted)	<i>Gadus morhua</i>	no	16.4	82.8	0.1	0.3	1.2
Capelin, winter	<i>Mallotus villsus</i>	no	14.1	74.8	8.7	0.4	2.0
Capelin, winter	<i>Mallotus villsus</i>	no	13.3	71.6	12.4	0.5	2.2
Capelin, summer	<i>Mallotus villsus</i>	no	13.2	74.1	10.4	0.8	2.0
Herring	<i>Clupea harengus</i>	yes	15.6	59.6	21.9	0.2	2.2
Herring waste (fish ungutted)		no	14.4	66.6	16.0	0.7	3.2
Krill	<i>Euphausiidae</i>	no	12.6	80.9	2.2	1.5	-
Mackerel	<i>Scomber scombrus</i>	yes	15.4	57.0	24.1	0.4	2.4
Mackerel, Canada			17.7	64.6	15.0	0.4	-
Mackerel, Russia			16.1	58.8	22.7	0.3	-
Mackerel, Pacific			19.1	60.2	17.5	0.3	-
Sandeel	<i>Ammodytes tobianus</i>	yes	17.5	70.1	9.0	0.4	2.3
Sandeel	<i>Ammodytes tobianus</i>	yes	16.4	67.5	12.6	0.5	2.4
Sandeel		yes	18.5	75.2	3.3	0.2	-
Ocean quahog	<i>Artica islandica</i>	yes	16.2	75.6	1.4	1.5	2.5
Ocean quahog, waste		no	12.9	84.2	0.7	0.3	0.9
Ocean quahog, waste		no	11.1	85.3	0.5	0.5	1.7
Iceland scallop, waste	<i>Chlamys islandica</i>	no	12.5	85.7	0.2	0.3	0.7
Common whelk	<i>Buccinum undatum</i>	no	19.4	75.2	0.3	1.1	1.8
Squid	<i>Illus Argentinus</i>	yes	18.0	76.1	2.4	1.1	1.9
Squid		yes	18.1	75.7	2.9	1.0	1.9
Squid, giant	<i>Architeuthis dux</i>	yes	17.3	81.9	0.4	0.9	
Carpmeal		no	65.2	5.7	7.2	2.0	20.2
Norbait		yes	14.4	71.7	9.0	0.5	2.3

had much higher fat content (10-13%) compared to the others. Squid, which is the most popular bait in the longline fisheries in Iceland, and blue whiting, had very low fat content (2.4-2.9%) and high in protein (18-19%).

#### Fatty acid analysis

The fatty acid composition (%) of the traditional bait and bait alternatives is shown in Table 2.2. The content of saturated fatty acids (SFA) was similar in all samples (Figure 2.2) with C16:0 as the major saturated fatty acid. Increased fat content coincided with increasing concentration of monounsaturated fatty acids (MUFA) with C20:1 and C22:1 in highest proportion. This was especially seen in capelin and sandeel which had high fat content. Low con-

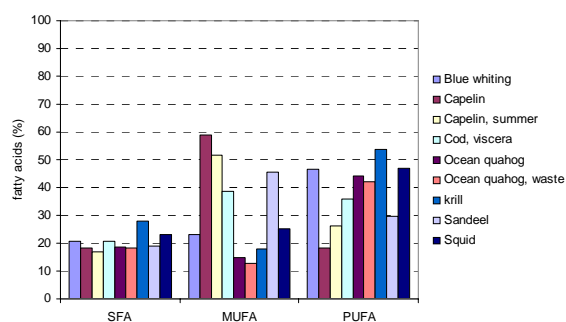


Figure 2.2. Composition (%) of saturated fatty acids (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) in traditional bait and bait alternatives.

Table 2.2. Fatty acid composition (%) of traditional fish bait and bait alternatives.

Sample	Blue whiting	Capelin	Capelin, summer	Cod, viscera	Ocean quahog	O. quahog, waste	Krill	Sandeel	Squid	Cod viscera
<b>Fatty acids</b>										
C14:0	1.2	5.1	5.2	2.6	1.0	0.8	8.6	5.6	2.4	2.3
C15:0	0.4	0.3	0.3	0.4	0.5	0.5	0.4	0.3	0.3	0.4
C16:0	15.8	11.6	10.5	14.6	12.1	10.9	18.1	11.6	17.4	13.6
C16:1n-7	2.0	9.5	5.7	4.1	4.5	3.4	4.2	3.7	2.0	7.4
C16:2	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.1	0.6	0.3	0.3	0.4
C17:0	0.1	0.0	0.1	0.1	0.7	0.9	0.0	0.2	0.4	0.2
C16:3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.7	0.8	0.2	0.1	0.1	0.3
C16:4	0.1	0.6	1.0	0.1	0.1	0.1	1.0	0.5	0.1	0.5
C18:0	3.3	1.1	0.9	2.7	4.3	5.0	0.7	1.1	2.6	3.2
C18:1n-9	10.2	10.5	7.1	12.0	2.0	2.1	13.6*	5.4	8.2	13.6
C18:1n-7	2.7	3.4	1.8	4.3	4.5	3.6		1.1	1.6	5.8
C18:1n-5	0.2	0.4	0.4	0.3	0.2	0.2		0.5	0.6	0.3
C18:2n-6	0.9	1.0	1.1	0.7	0.6	0.9	2.2	1.4	0.8	0.6
C18:3n-3	0.3	0.4	0.7	0.2	0.2	0.3	2.3	1.3	0.5	0.4
C18:4n-3	0.6	1.6	4.2	0.6	1.4	1.1	7.8	5.8	1.0	1.6
C20:0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.2	0.0	0.1	0.1	0.1
C20:1	3.5	15.8	16.0	9.2	3.7	3.7	0.3	15.3	8.7	4.4
C20:2n-6	0.1	0.2	0.2	0.3	0.9	1.0	0.0	0.2	0.4	0.3
C20:4n-6	1.3	0.3	0.3	1.8	1.4	2.0	0.3	0.3	1.2	2.6
C20:3n-3	0.1	0.1	0.1	0.1	-	-		0.1	0.3	0.1
C20:4n-3	0.3	0.3	0.6	0.3	0.3	0.3	0.6	0.6	1.0	0.5
C20:5n-3	11.6	7.5	9.3	12.1	19.0	14.4	18.1	8.1	13.4	14.2
C21:5	0.2	0.3	0.4	0.2	0.9	0.6	0.7	0.5	0.4	0.5
C22:1	2.9	18.9	20.0	7.9	-	-	0.0	18.7	3.4	1.1
C22:4n-3	-	-	-	-	0.3	0.3		-	0.3	0.2
C22:5n-3	1.1	0.5	0.6	1.2	1.3	1.4	0.6	0.7	0.6	1.5
C22:6n-3	29.7	5.2	7.8	17.9	16.8	18.5	13.8	9.8	26.5	12.7
C24:1	1.5	0.6	0.6	0.7	-	-	0.0	0.7	0.6	0.3
Unknown	9.6	4.7	5.1	5.2	22.2	26.8	5.5	5.9	4.8	10.7
Saturated fatty acids	20.8	18.2	17.0	20.6	18.7	18.3	28.0	18.9	23.2	19.8
Monounsaturated fatty acids	23.0	59.0	51.6	38.5	14.8	12.9	18.1	45.4	25.2	33.0
Polyunsaturated fatty acids	46.6	18.2	26.3	35.7	44.2	42.0	53.9	29.8	46.8	36.5

-: not detectable

\*:sum of 18:1 fatty acids

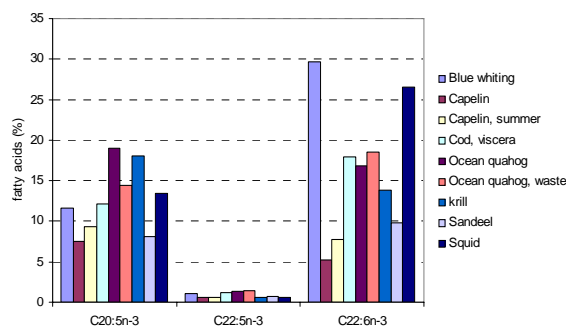


Figure 2.3. Composition (%) of long chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) in traditional bait and bait alternatives.

centration of fat is mainly represented by polar lipids dominated by the polyunsaturated fatty acids (PUFA) of the n-3 series (Figure 2.3). The concentration of eicosapentaenoic acid (C20:5n-3) and docosahexaenoic acid (C22:6n-3) exceeded 40% of the total fatty acids with very low fat content as in blue whiting. In cybrine and cybrine waste the proportion of unusual fatty acids (labeled as “unknown”) was very high or 22% and 27%, respectively. Nonmethylene interrupted diens (NMID) of chain length C20 and C22, were observed in ocean quahog (*Arctica islandica*) collected from two different locations in the Canadian maritimes (Ackman and others 1974). Many of the unknown fatty acids in our study had retention time that could fit the chain length of C20 and C22 and can possibly be NMIDs like detected by Ackman and others (1974).

#### Amino acid analysis

Following is a list of the free amino acids that were measured in the traditional and alternative bait. The abbreviations for each amino acid that are used in text and graphs are also listed:

Aspartic acid	<b>ASP</b>	Taurine	<b>TAU</b>
Glutamic acid	<b>GLU</b>	Tyrosine	<b>TYR</b>
Asparagine	<b>ASN</b>	Methionine	<b>MET</b>
Serine	<b>SER</b>	Valine	<b>VAL</b>
Glutamine	<b>GLN</b>	Phenylalanin	<b>PHE</b>
Histidine	<b>HIS</b>	Isoleucin	<b>ILE</b>
Glycine	<b>GLY</b>	Leucin	<b>LEU</b>
Threonine	<b>THR</b>	Lysin	<b>LYS</b>
Arginine	<b>ARG</b>		

The results of amino acid analysis performed are shown in Table 2.3 and Figure 2.4, 2.5 and 2.6. As previously reported (Soffia Tryggvadóttir and others 2002) squid contained similar amount of free amino acids as did cod viscera. The five amino acids glycine (GLY), serine

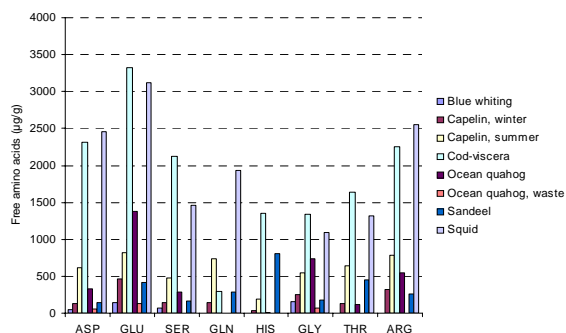


Figure 2.4. Free amino acid content ( $\mu\text{g/g}$ ) of eight amino acids (ASP, GLU, SER, GLN, HIS, GLY, THR, ARG) in traditional bait and bait alternatives.

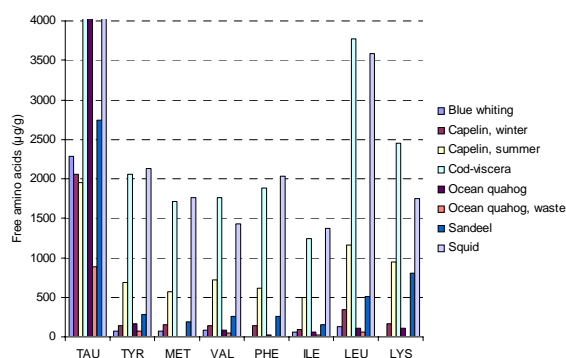


Figure 2.5. Free amino acid content ( $\mu\text{g/g}$ ) of eight amino acids (TAU, TYR, MET, VAL, PHE, ILE, LEU, LYS) in traditional bait and bait alternatives.

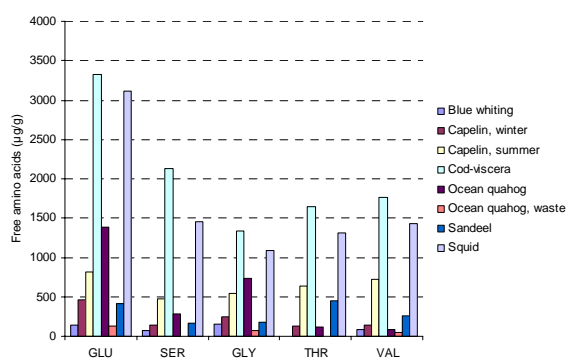


Figure 2.6. The content ( $\mu\text{g/g}$ ) of the five free amino acids (GLY, SER, GLU, THR, VAL) that are believed to evoke food search behavior in cod (Hara, 1992), measured in traditional bait and bait alternatives.

(SER), glutamic acid (GLU), threonine (THR) and valine (VAL) are thought to be the most effective amino acids as attractants for fish are shown (Hara, 1992). The content of all these amino acids exceeded 1000  $\mu\text{g/g}$  in squid and cod viscera. Summer capelin, containing high amount of stomach content, had also quite high values (500-1000  $\mu\text{g/g}$ ) of these amino acids (Figure 2.6).

Table 2.3. Free amino acid content ( $\mu\text{g/g}$ ) of traditional fish baits and bait alternatives.

Sample	Blue whiting	Capelin, winter	Capelin, summer	Cod-viscera	Cybrine	Cybrine, waste	Sandeel	Squid
ASP	48	129	613	2320	332	57	143	2451
GLU	144	461	814	3325	1379	134	412	3117
ASN	-	-	-	-	-	-	-	267
SER	70	144	473	2129	280	-	166	1459
GLN	-	142	731	294	-	-	284	1931
HIS	-	39	195	1353	17	-	804	-
GLY	150	248	543	1339	736	68	182	1092
THR	-	130	642	1642	121	-	452	1317
ARG	-	325	783	2257	548	-	257	2549
ALA	222	-	-	-	-	-	-	79
TAU	2286	2054	1958	6927	11372	886	2745	17115
TYR	75	145	680	2054	171	66	284	2132
MET	72	153	565	1716	-	-	185	1762
VAL	81	147	720	1759	86	45	257	1436
PHE	-	141	619	1877	19	-	265	2030
ILE	55	95	497	1240	59	26	158	1369
LEU	125	345	1158	3781	110	62	506	3585
LYS	-	165	945	2448	109	-	805	1751

-: not detectable

### Volatile components

Volatile compounds were analyzed using gas chromatography olfactometry (GC-O) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). Figure 2.7 shows a PCA biplot of the main volatile compounds identified in bait by GC-O. The figure shows that the combination of volatiles was similar in ocean quahog and ocean quahog waste, indicating that the ocean quahog waste could be used as bait instead of ocean quahog. Cod viscera and blue whiting are most dissimilar from ocean quahog. The squid sample had volatile composition unlike the other samples

and had rather mild odor.

Boiled potato-like odor (Table 2.5, 7—potato) was identified as the most important odor in all the samples, except for squid where this odor was not detected. Other important odors explaining the difference between samples were i.e. popcorn-like (8—popcorn), 1—octen—3—ol (10—mushroom) and viscera like (15—viscera) odor. This can also be seen when illustrated by sensory wheel (Figure 2.8 a and 2.8 b). Volatiles that are characteristic for all the samples, i.e. mushroom are in the middle of the

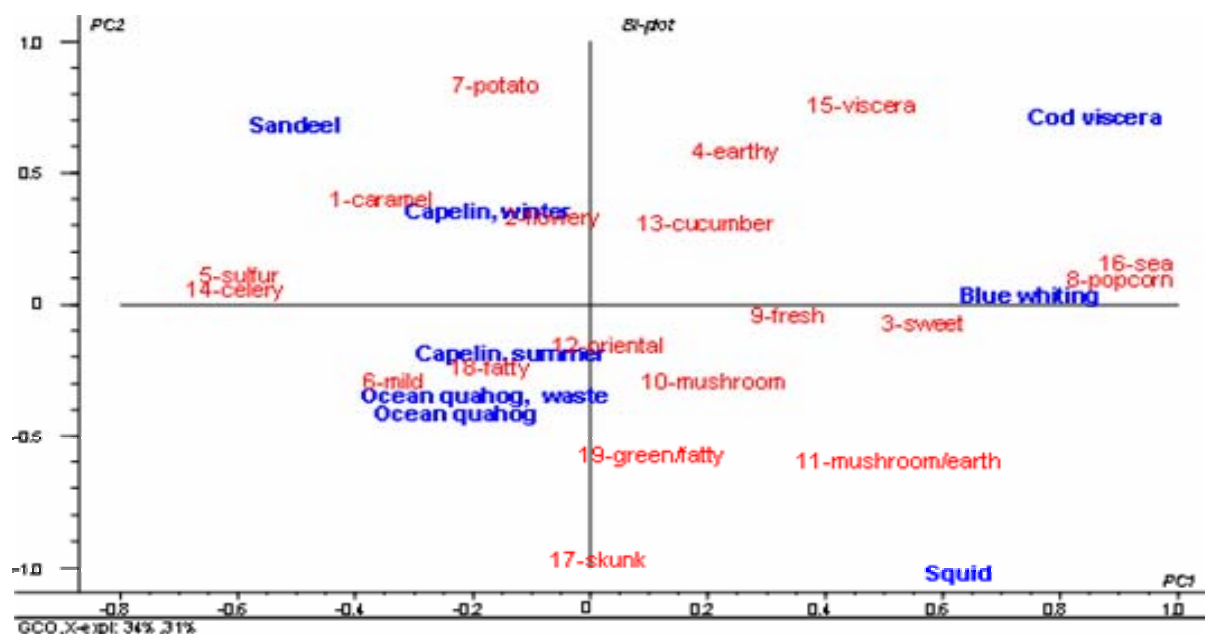


Figure 2.7. PCA biplot of volatile components in traditional and artificial bait identified by GC-O. The numbers in odor descriptors give the compound number in Table 2.5.

Table 2.4. Volatile compounds detected by GC-MS in in traditional bait and bait alternatives.

RI	Compound	GC-MS results, PAR					
		Blue whiting	Capelin, summer	Capelin, winter	Ocean quahog waste	Sandeel	Squid
172	Ethanol		4.8				
172	Dimethyl sulfide		79.2				
182	Pentane				48.4		
190	2-Butanone	1.5	170.8	68.1			
191	2-Butanone, 3-methyl-						4.1
195	Hexane				27.7		
209	Chloroform				721.1		
225	Acetic acid	3.9	123.3	12.8			
226	Butanal, 3-methyl-	5.9		25.8	11.5		
227	2-Pentanone						7.1
237	1-Penten-3-ol	50.8	729.3	599.3	118.7	84.6	41.8
254	3-Pentanone	22.8	768.1	439.0	217.8	2.0	
260	Pentanal				169.7		
264	2-Butanone, 3-hydroxy-	2.8					
300	1-Butanol, 3-methyl-	1.4	21.8				
305	Disulfide, dimethyl		309.5	11.1	4.4		
314	Pentane, 2,3,3-trimethyl-		30.7	20.1			
324	Toluene		262.1	110.5			14.8
327	1-Pentanol				131.0		
328	2-Penten-1-ol, (Z)-	20.9					
338	Hexane, 2,2,5-trimethyl		14.8				
343	Formamide, N,N-dimethyl						2.0
357	Octane		140.4			282.7	8.2
362	Hexanal	10.7		58.8	23.6		
367	2-Octene, (Z)-		68.4	24.0			
375	3,5-Octadiene, (Z,Z)-		801.2			308.1	
376	1,4-Heptadiene, 3-methyl-	8.1					6.3
377	Cyclohexene, 1-ethyl-				16.6		
378	3,5-Octadiene, (Z,Z)-		654.3	342.1	10.0	244.7	
385	1,4-Heptadiene, 3-methyl-			273.8			6.9
386	3,5-Octadiene, (Z,Z)-						
387	Cyclohexene, 1-methyl-				3.3		
398	Heptane, 2,6-dimethyl-		4.6				
403	Cyclopentane, butyl-		4.0				
414	1,3-Cyclopentadiene, 5-(1,1-dimethyl)-				0.8		
417	Benzene, chloro-		8.9	4.0	0.3		
422	2-Hexenal, (E)-			9.0			
431	Ethylbenzene	2.0	19.8				
431	Cyclopentane, 2-ethylidene-1,1				3.8		
431	1,2,4,4-Tetramethylcyclopentane				1.1		
434	Octane, 4-methyl-		4.1				
436	Hexane, 2,3,4-trimethyl	0.3		1.4			
436	1,3,6-Octatriene, (E,E)		23.3		3.8		
442	Benzene, 1,3-dimethyl-		52.4				5.6
443	p-Xylene	7.0		32.4	9.4	18.9	
444	Benzene, 1,3-dimethyl-	3.9			7.7		
457	1,3-cis,5-cis-Octatriene		556.8	130.0	0.6		
472	1,3,5,7-Cyclooctatetraene				7.6		
473	Styrene				8.6		
474	p-Xylene			8.8			
475	Heptane, 3,3,5-trimethyl		7.0				
481	Nonane	8.0	73.0	27.2	5.9	363.5	
486	Heptanal				6.7	88.4	
507	Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methyl-2-propenyl)-				0.3		
508	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1				1.7		
517	Formamide, N,N-dimethyl						163.5
518	Cyclohexane, propyl-	1.0		1.7	0.5		
519	1R- $\alpha$ -Pinene	1.8	8.4	8.1	9.6		
521	Octane, 2,6-dimethyl-	2.0					
524	Azetidone					1.7	
525	Ethanol, 2-(2-methoxyethoxy)-				0.6		
526	Heptane, 3-ethyl-2-methyl-		5.2				
536	Camphene				5.7		
539	Benzene, propyl-	1.3	5.2	1.9	1.0		
543	2-Heptanone, 6-methyl-				4.0		
545	1-Pentadecene, 2-methyl		2.8				
546	Benzene, 1-ethyl-2-methyl-	5.5	16.6	7.3	3.5		9.7
547	Benzene, 1-ethyl-3-methyl-				6.2		
552	Dimethyl trisulfide		10.9				
555	Nonane, 2-methyl-						7.9
555	Heptane, 2,4-dimethyl-			4.0			
555	Octane, 2,7-dimethyl-	2.5					
556	Benzene, 1,3,5-trimethyl	1.7	4.7	2.1	0.2		4.1
560	2-Heptenal, (E)-				2.9		
561	Nonane, 3-methyl-	2.5					14.7
561	Heptane, 5-ethyl-2,2,3-			3.6			

Table 2.4. continued

RI	Compound	GC-MS results, PAR					
		Blue whiting	Capelin, summer	Capelin, winter	Ocean quahog waste	Sandeel	Squid
569	1-Octen-3-ol	5.3	19.8	26.4	12.7		
576	Cyclotetrasiloxane, octamethyl				43.5		
578	Heptane, 2,2,4,6,6-pent			12.2			11.2
579	Benzene, 1,2,3-trimethyl	7.1	26.5	7.6			
581	Benzene, 1-ethyl-4-methyl-				6.5		
584	2,4-Heptadienal, (E,E)-		9.8	10.1		23.9	
589	Decane	13.3	38.9	29.0	13.9	220.8	47.2
592	Octanal		20.6		5.7	130.7	
597	3-Carene						
597	Cyclopropane, 1,1-dimet						3.2
600	2,4-Heptadienal, (E,E)-	1.0	18.9	13.4	1.0	32.3	
605	Benzene, 1,2,4-trimethyl	3.3	2.0		1.5		
611	Decane, 4-methyl-		7.6				
614	Octane, 1,1'-oxybis-			3.7			
614	Decane, 4-methyl-						24.5
614	Isooctyl mercaptoacetat	3.5					
622	D-Limonene	2.9	4.7	2.7	10.3		20.2
624	Cyclohexanone, 2,2,6-trimethyl				2.3		
630	Decane, 3-methyl-						7.5
632	Benzeneacetaldehyde	1.2	4.3		0.5		
640	Benzene, 1-methyl-3-propyl-	1.2			0.5		
643	Undecane, 5-methyl-						3.3
648	1-Decene, 9-methyl-		19.0				
650	Decane, 5-methyl-						9.8
652	Hexane, 3,3,4-trimethyl		1.1				
654	Decane, 4-methyl-						8.6
657	Benzene, 1-methyl-4-pro	0.9					
660	Decane, 2-methyl-	1.4					9.7
665	Decane, 3-methyl-						6.5
675	trans-1,4-Cyclohexanedicarboni				1.5		
676	Benzene, 1-methyl-2-(1-	1.2					
676	Cycloheptene			4.2			
678	Cyclohexane, 1,4-dimeth						6.8
678	Cyclopentene, 1-(2-propenyl)-				2.8		
684	1-Undecene		181.9				
685	2-Nonanone	1.2			14.5		
686	Cyclopropane, 1-methyl-			19.8			
687	3,5-Octadien-2-one	1.7					
692	Decane		9.7				
694	Undecane	7.6		7.8			35.1
699	Nonanal	7.9			15.2		
700	2-Nonen-1-ol, (E)-						15.5
705	1,3-Cyclooctadiene		22.0		15.2		
708	2-Cyclohexene-1-carboxaldehyde						
711	Pyrrrole					1.7	
720	Decane, 3,7-dimethyl-						10.5
728	Cyclohexane, pentyl-				2.19		7.76
730	Benzoic acid, 2-[(trimethylsil				10.7		
743	2,6-Nonadienal, (E,Z)-		7.0	3.1			
748	1-Undecene, 10-methyl-		47.08				
754	1-Undecene, 9-methyl-		22.6				
759	Nonane, 5-butyl-	0.2					4.1
764	Octane						
765	Undecane, 3-methyl-						3.8
765	Undecane, 3-methyl-						3.8
768	Cyclohexanol, 5-methyl-		3.9				
774	Naphthalene				1.6		
789	Hexadecane				4.3		
791	Dodecane						19.0
797	Decanal		9.4		4.7	34.8	4.5
805	Undecane, 2,6-dimethyl-						9.8
806	1,3-cis,5-cis-Octatrien		2.1				
809	1-Cyclohexene-1-carboxaldehyde				125.8		
832	Cyclohexane, (4-methylp						2.7
861	Undecane, 6,6-dimethyl-						6.5
865	3-Tetradecene, (E)-				1.6		3.6
866	1-Cyclohexene-1-acetaldehyde,						
880	Tridecane		19.3				12.0
887	2-Nonen-1-ol, (E)-		2.2				
890	Undecanal						6.9
923	1-Heptanol, 6-methyl-			1.0			
941	2(3H)-Furanone, dihydro		3.5				
964	1,4-Octadiene				0.8		
985	Eicosane						3.2
	<b>PAR, known compounds</b>	<b>229</b>	<b>5491</b>	<b>2368</b>	<b>1896</b>	<b>1839</b>	<b>604</b>
	<b>Total PAR</b>	<b>426</b>	<b>6929</b>	<b>3120</b>	<b>2027</b>	<b>3760</b>	<b>909</b>

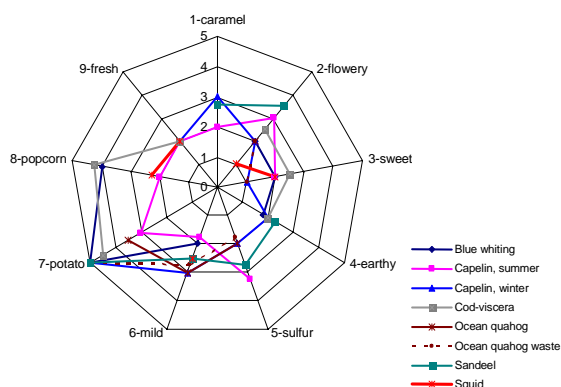


Figure 2.8 a. Odor intensity (identified by GC-O) of selected odor attributes in traditional bait and bait alternatives.

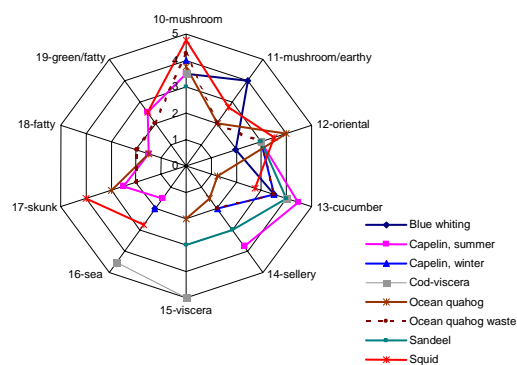


Figure 2.8 b. Odor intensity (identified by GC-O) of selected odor attributes in traditional bait and bait alternatives.

Table 2.5. Volatile compounds detected by GC-O and possible compounds contributing to the odor and identified by GC-MS in in traditional bait and bait alternatives.

GC-MS		GC-O			
RI DB-5ms <sup>a</sup>	Possible compound	Comp. no.	RI DB-5ms <sup>b</sup>	Odor	Id <sup>c</sup>
172	Ethanol				
172	Dimethyl sulfide				
182	Pentane				
190	2-Butanone				
191	3-Methyl-2-butanone,				
226	3-methyl butanal				
227	2-Pentanone				
237	1-Penten-3-ol	1	295	Caramel, vanilla, sweet, mild	MS, 2
254	3-Pentanone				
260	Pentanal				
264	3-Hydroxy-2-butanone				
300	3-Methyl-1-butanol				
305	Disulfide, dimethyl				MS
315	2-Pentenal, (E)-	2	320	Flowery, alcohol, solvent, sweet, mild	MS, 2
327	1-Pentanol				
328	2-Penten-1-ol, (Z)-				
		3	345	Sweet, caramel, soapy, solvent-like	2
362	Hexanal	4	365	Earthy, grass, mild	MS, 1, 2
		5	390	Sulfur, onion, rubbery	2
457	1,3-cis,5-cis-Octatrien	6	457	Mild, sweet, earthy, mushroom, flowery, geranium	2
486	Heptanal	7	496	Potato, mushroom, geranium, shellfish, flesh	MS, 1, 2
		8	521	Pop corn / sulfur in squid	2
560	2-Heptenal, (E)-				
569	1-Octen-3-ol	10	581	Mushroom, geranium, capelin	MS, 1, 2
584	2,4-Heptadienal, (E,E)-				MS
592	Octanal				MS
600	2,4-Heptadienal, (E,E)-				MS
684	2-Nonanone				MS
686	3,5-Octadien-2-one				MS
692	Decane				MS
694	Undecane				MS
699	Nonanal				MS
		11	662	Mushroom, earthy, cucumber, mild	2
		12	687	Oriental, spicy	2
700	2-Nonen-1-ol, (E)-				MS
743	2,6-Nonadienal, (E,Z)-	13	760	Cucumber	MS, 1, 2
797	Decanal	14	776	Sellery, mild sweet	2
		15	800	Viscera, cybrine, skunk, heavy, vomit, waxy	2
806	1,3-cis,5-cis-Octatrien	16	826	Sea-, shellfish-like, heavy	2
887	2-Nonen-1-ol, (E)-	17	828	Skunk / sweet, green in capelin	2
890	Undecanal	18	902	Fatty, solvent, mild	2
923	1-Heptanol, 6-methyl-	19	930	Green, fatty, fresh, mild, rancid, undertone	2

<sup>a</sup>Calculated ethyl ester retention index on DB-5ms capillary column by using GC-MS

<sup>b</sup>Calculated ethyl ester retention index on DB-5ms capillary column by using GC-O

<sup>c</sup>Identification means: MS, mass spectra; 1, authentic standards; 2, odor identification

PCA plot and do not contribute to the variation in the data.

Table 2.4 shows the volatile compounds identified in bait by GC–MS. The results are expressed as peak area ratio (PAR). About 150 compounds were identified, thereof 36 aldehydes, alcohols and ketones which may contribute to odor characteristics. Many compounds were identified as branched chain alkenes that may be derived from components with bioactive properties. In Table 2.5 the characteristic odors identified by GC–O are connected to possible volatile compounds identified by GC–MS. The boiled potato-like odor was identified as a combination of *cis*-4-heptenal and heptanal eluting close to each other from the GC column. *Cis*-4-heptenal was not detected by GC–MS but could be identified with GC–O and by comparison with standard. It is likely that this compound was below limit of detection (LOD) for GC–MS but above LOD for GC–O since it has a very low odor threshold (0.04 ppb) (McGill and others 1974). Lipid derived components giving mushroom and cucumber odors were identified as 1-octen-3-ol and 2,6-nonadienal, respectively. Compounds contributing to the fresh fish odor are typically unsaturated carbonyl compounds and alcohols with six, eight or nine carbon atoms that are present in low levels in the

headspace above fish (ppb). These compounds are derived from polyunsaturated fatty acids in fish and contribute to the characteristic fresh like odors such as planty-, cucumber-, melon- and mushroom- like odors (Josephson and others 1984; Guðrún Ólafsdóttir and others 1997). Other components not yet identified may explain difference between samples and need to be studied further.

Figure 2.9 shows a PCA biplot of the volatile compounds identified by GC–O and selected volatile compounds identified by GC–MS (compounds possibly corresponding to odor and detected in most samples). Correlation was seen between i.e. odors described as sweet, mushroom, green/fatty and cucumber and compounds that may contribute to these odors like 1-penten-3-ol, 3-methyl butanal, 2,4-heptadienal and 1-octen-3-ol. The squid, ocean quahog waste and blue whiting were described with e.g. fatty, mushroom and sea odors but correlation to compounds was not obvious, possibly because of low concentrations. However, these odors were detected with GC–O because of low odor thresholds.

Initial attempt was made to connect the compounds with odor thresholds to study their possible flavor impact in the samples (Table 2.6). It should be noted that compounds with odor im-

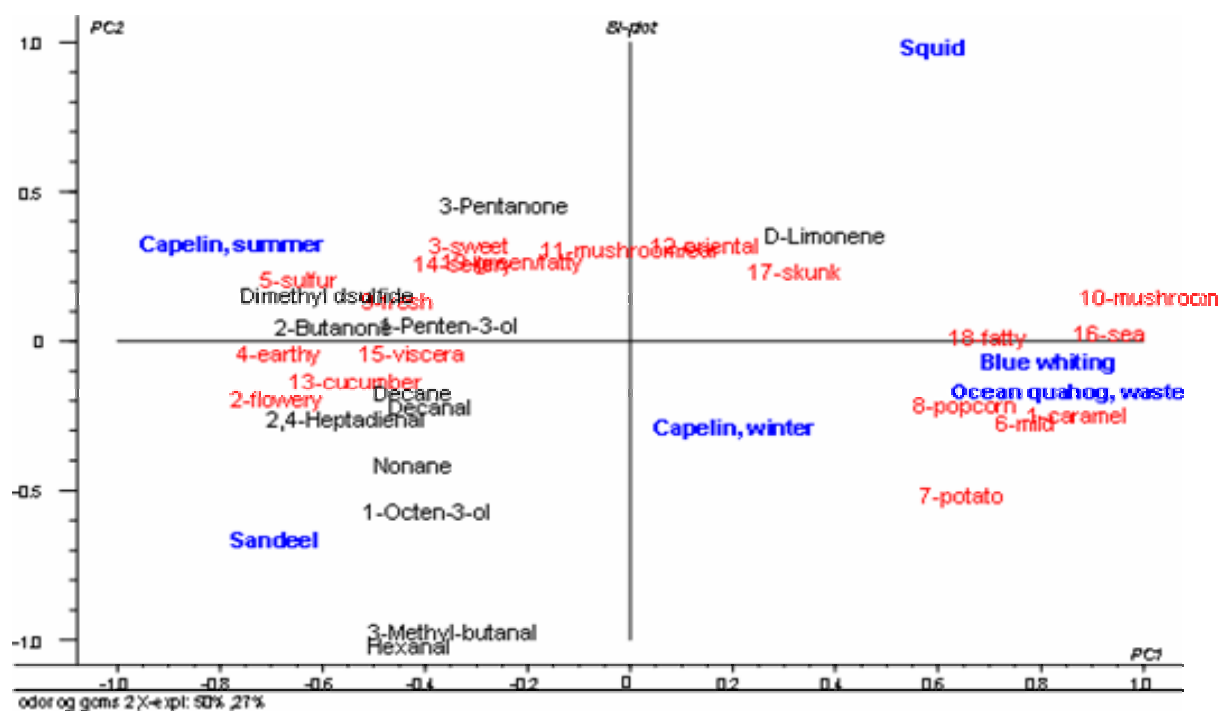


Figure 2.9. PCA biplot of volatile components in traditional and artificial bait identified by GC–O (red labels) and GC–MS (black labels). The numbers in odor descriptors give the compound number in Table 2.4.



Table 2.6. Possible flavor impact of volatile compounds (PAR/Odor threshold (pbb) in water) in traditional bait and bait alternatives.

RI <sup>a</sup>	Compound	Odor threshold <sup>b</sup>	PAR/Odor threshold					
			Blue whiting	Capelin, summer	Capelin, winter	Ocean quahog, waste	Sandeel	Squid
743	2,6-Nonadienal, (E,Z)-	0.001		7.0	3.1			
552	Dimethyl trisulfide	0.01		10.9				
797	Decanal	0.1		9.4			4.7	34.8
592	Octanal	0.7		20.6			5.7	130.7
699	Nonanal	1	7.9				15.2	
890	Undecanal	2						88.4
486	Heptanal	3.0				58.8	6.7	
362	Hexanal	4.5	10.7		26.4		23.6	
569	1-Octen-3-ol	10	5.3	19.8			12.7	
260	Pentanal	12					169.7	
305	Disulfide, dimethyl	12					4.4	
226	Butanal, 3-methyl-	60		309.5	11.1		11.5	
237	1-Penten-3-ol	400	5.9	729.3	599.3		118.7	84.6
264	2-Butanone, 3-hydroxy-	800	50.8					
315	2-Pentenal, (E)-	1500	2.8					
327	1-Pentanol	4000					131.0	
227	2-Pentanone	7000						
254	3-Pentanone	7000	22.8	768.1	439.0		217.8	2.0
190	2-Butanone	50000	1.5	170.8	68.1			

<sup>a</sup>Calculated ethyl ester retention index on DB-5ms capillary column by using GC-MS<sup>b</sup>Odor thresholds (pbb) in water: <http://www.leffingwell.com/>

pact are just examples of possible attractants in bait. Here, the ratio between PAR of the compounds and the odor threshold in water is expressed. The information about the odor and flavor thresholds in water are from the website [www.leffingwell.com](http://www.leffingwell.com), which again refer to various references. Most of the compounds are a degradation compounds from fatty acids. The low fat content (2.4-2.9%) in squid may explain the low number of flavor impact compounds in squid and its characteristic mild odor. In Table 2.4 the number of volatile compounds in squid is similar as in other samples. The different compounds have very different odor and flavor threshold, e.g. 2,6-nonadienal has the odor threshold of 0.001 ppb but 3-hydroxy-2-butanone has the odor threshold of 800 ppb. The capelin, especially the summer capelin, was characterized by 2,6-nonadienal with cucumber like odor. Dimethyl trisulfide with sulfuric, fishy- and cabbage-like odor may also have high flavor impact in summer capelin. It would be interesting to study further the correlation between the concentration and the flavor impact of each compound to study their ability as attractants.

## 2.4 References

- Ackman, R.G., Epstein, S., Kelleher, M. 1974. A comparison of lipids and fatty acids of the ocean quahuag, *Arctica islandica*, from Nova Scotia and New Brunswick. *J. Fish. Res. Board Can.* 31: 1803.
- Acree, T., Arn, H. 1997. <http://www.flavornet.com>. Flavornet, Cornell University.
- AOCS. 1998. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society, 5th ed. American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois.
- Bailey ME. 1998. Maillard reactions and meat flavour development. In: Shahidi F. (ed.) *Flavor of meat, meat products and seafoods*. London UK. Blackie Academic and Professional. p 267-89.
- Birdsall, T.C. 2003. Therapeutic Applications of Taurine. <http://www.thorne.com/altmedrev/fulltext/taurine3-2.html>
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Ellingsen, O.F., Döving, K.B. 1986. Chemical fractionation of shrimp extracts inducing bottom food search behavior in cod (*Gadus morhua* L.). *J. Chem. Ecol.* 12: 155-168.
- Hanson, S.W.F., Olley, J. 1963. Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochem. J.* 89: 101-102P.
- Hara, T.J. 1992. *Fish Chemoreception*. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1.
- Guðrún Ólafsdóttir, Steinke, J.A., Lindsay, R.C. 1985. Quantitative performance of a simple Tenax-GC adsorption method for use in the analysis of aroma volatiles. *J. Food Sci.* 50: 1431-1436.
- Guðrún Ólafsdóttir, Emillía Martinsdóttir, Einar Helgi Jónsson. 1997. Gas sensor and GC measurements of volatile compounds in capelin (*Mallotus villosus*). In Luten, J. B., Børresen, T. and Oehlenschläger, J. (eds) *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality*. Amsterdam, Elsevier, 507-520.
- Guðrún Ólafsdóttir, Fleurence, J. 1998. Evaluation of fish freshness using volatile compounds- Classification of volatile compounds in fish. In: Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry, Proceedings of the Final meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness" AIR3 CT94 2283. Nantes Nov 12-14, 1997. International Institute of Refrigeration. 55-69
- Josephson, D.B., Lindsay R.C., Stuibler, D.C. 1987. Enzymic hydroperoxide initiated effects in fresh fish. *J. Food Sci.* 52: 596-600.
- Margrét Bragadóttir, Heiða Pálmadóttir, Kristberg Kristbergsson 2002 Seasonal changes in chemical composition and quality parameters of capelin (*Mallotus villosus*). *J. Aquatic Food Product Technol.* 11: 87-103..
- McGill AS, Hardy R, Burt JR, Gunstone FD. 1974. Heptcis-4-enal and its contribution to the off-flavour in cold stored cod. *J. Sci. Food Agric.* 25: 1477-1489.
- Pawson, M.G. 1977. Analysis of a natural chemical attractant for whiting *Merlangius merlangus* L. and cod *Gadus morhua* L. using a behavioural bioassay. *Comp. Biochem. Physiol.*, 56A, 129-135.
- Soffía Vala Tryggvadóttir, Gunnar Páll Jónsson, Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir 2002. Artificial bait alternatives, mainly based on fish waste. CRAFT Q5CR-200-70427. Project report to EU. Icelandic Fisheries Labora-

## Appendix A2.1

### Rokgjörn lyktarefni í beitu

Einkunnir með lyktarskynmati (GC-O) eru eftirfarandi:

- 0 = engin lykt
- 1 = á mörkum
- 2 = vottur af lykt
- 3 = lítil lykt
- 4 = greinileg lykt
- 5 = mikil lykt

Tekin eru meðaltöl a.m.k. tveggja mælinga. Í þessu yfirliti er fjallað um einkunnir <sup>3</sup> 3.

### Porskinnyfli

Helstu lyktarefni koma seint af gasgreinisúlunni (RT>15 mín) í GC-O og var lýst sem innyflalykt, einnig skelfisk- og fjörulykt. Hér er hugsanlega lykt af ætinu, þörungum og skeljum. Önnur greinileg lyktarefni voru kartöflu-, stingandi, græn lykt (líklegast *cis*-4-heptenal og heptanal, skv. GC-MS og stöðlum), poppkornulykt (óþekkt, e.t.v. 2-acetyl-1-pyrroline) og gúrkulykt (2,6-nonadienal, skv. staðli). Einnig fannst lítil sveppalykt (1-octen-3-ol, skv. GC-MS og staðli), geraniumlykt (1,5-octadien-3-one?, skv. RI - hvað með 6-octen-2-one sem Chemstation stingur upp á?), sæt alkahól lykt, austræn-, krydd, perubrjóstsykurslykt (óþekkt efni) og krydd lykt (óþekkt efni, seint á GC).

### Sumarloðna 14. ágúst 2002

Helstu lyktarefni eru gúrkulykt (2,6-nonadienal, skv. staðli) Chemstation stingur líka upp á þessu efni 0,7 mín framur en passar við staðal og geranium (1,5-octadien-3-one?). Þau mældust í greinilegu til miklu mæli. Einnig fannst greinileg sveppa- og loðnulykt (1-octen-3-ol, skv. GC-MS og std.), sítrónulykt (getur það verið 2,4-heptadienal?) og sellery-, gras-, grænlykt (óþekkt efni). Önnur efni í litlu mæli voru blóma-, alkahól-, sæt lykt (óþekkt efni RT 4,6 mín), vond, brennisteins-, lauk-, gúmmilykt (óþekkt efni RT 6,9 mín), kartöflu-, þráa- sveppa- geranium lykt (hugsanlega *cis*-4-heptenal og heptanal, skv. stöðlum), gúrku-, nonenal lykt (óþekkt efni RT 13,3 mín) og skrýtin, krydd-, austræn lykt (óþekkt efni RT 18,1 mín),

### Loðna 3. júlí 2002

Helstu lyktarefni eru kartöflu-, sveppalykt (*cis*-4-heptenal, skv. staðli, greindist ekki með GC-MS) og geraniumlykt (1,5-octadien-3-one?) og voru þau í miklum mæli. Einnig greindist sveppalykt greinilega (1-octen-3-ol, skv. GC-MS og staðli.) og gúrkulykt (2,6-nonadienal, skv. staðli og GC-MS) í litlu til greinilegu magni. Önnur lyktarefni í litlu mæli voru karamellulykt sem kemur snemma (hugsanlega blanda af 3-methylbutanal, 1-penten-3-ol og 3-pentanone).

### Sandsíli 3. júlí 2002

Fitu-, þráa-, kartöflulykt (*cis*-4-heptenal og heptanal, skv. stöðlum, *cis*-4-heptenal greindist ekki með GC-MS) voru í miklu magni í sandsíli. Einnig var sítrónulykt mjög áberandi sem kemur á svipuðum stað og 2,4-heptadienal líkt og í sumarloðnunni. Auk þess var gúrkulykt (2,6-nonadienal, skv. staðli en ekki með GC-MS) vel greinanleg. Blóma-, leysalykt var í litlu til greinilegu magni (óþekkt efni, RT 4,6 mín). Sveppalykt (1-octen-3-ol, skv. std.), skrýtin, krydd- eða austræn lykt (óþekkt, 2 nonanone?), brennd, skúnkur, sellerilykt (óþekkt efni) og skunkur, vond lykt (óþekkt efni) voru litlu mæli. Snemma í GC-keyrslunni komu karamellu-, sæt lykt, einnig í litlu mæli.

### Kolmuni 3. júlí 2002

Kartöflulykt (líklegast *cis*-4-heptenal og heptanal, skv. stöðlum, greindust þó ekki með GC-MS) var í mesta mæli auk popp- og kjötgrillyktar (óþekkt, 2-acetyl-1-pyrroline?). Sveppalykt (1-octen-3-ol, skv. staðli og GC-MS) greindist einnig í miklu mæli. Þá var karamellu-, vanillu-, sæt lykt í óvenju miklu mæli miðað við önnur sýni. Samkvæmt GC-MS gæti hér verið um að ræða blöndu af mörgum stuttum rokgjörnum efnum: 3-methylbutanal, 1-penten-3-ol, 3-pentanone, 3-hydroxy-2-butanone og 3-methyl-1-butanol. Sítrónulykt (getur það verið 2,4-heptadienal?) var greinileg. Gúrkulykt (2,6-nonadienal, skv. staðli en ekki með GC-MS), sellerí (óþekkt efni), vaxlykt (óþekkt efni) og gras-, fitu-, leysalykt (óþekkt efni) voru í litlu mæli. Þessi síðastnefndu koma frekar seint í GC-keyrslunni. Blóma-, mild, jarðar-, sæt lykt sem einnig mældist í litlu mæli kom frekar snemma í GC.

**Kúfiskur**

Kydd-, skrýtin, austræn lykt (óþekkt efni) var greinleg af kúfiskinum auk sveppalyktar (1—octen—3—ol, skv. staðli og GC-MS). Þráa-, kartöflulykt (líklegast *cis*-4-heptenal og heptanal, skv. stöðlum, greindust þó ekki með GC-MS) var í litlu til greinanlegu magni. Mild blóma-, sveppalykt (óþekkt efni), sítrónulykt (getur það verið 2,4-heptadienal?) og þung óþekkt lykt (óþekkt efni, RT 22,5 mín) voru í litlu mæli.

**Kúfiskhrat**

Kartöflulykt (líklegast *cis*-4-heptenal og heptanal, skv. stöðlum, greindust þó ekki með GC-MS) greindist í miklu mæli en einnig var sveppalykt (1—octen—3—ol, skv. staðli og GC-MS) í greinileg. Auk þess var gúrkulykt (2,6-nonadienal, skv. staðli en ekki með GC-MS) lítil til greinileg. Lítil blóma- geranium (RI 450-

464, óþekkt efni) geraniumlykt (1,5—octadien—3—one?) og skrýtin, krydd- eða austræn lykt (óþekkt efni), greindust einnig.

**Smokkfiskur**

Sveppalykt (1—octen—3—ol, skv. std.) var mikil í smokkfiski. Þvag-, skúnklykt (óþekkt efni) var í greinilegu mæli og skrýtin, krydd- eða austræn lykt (óþekkt efni) í litlu til greinilegu magni. Lítil lykt af sveppa-, jarðar- og gúrkulykt (RI 655-661), fersk (RI 756-763), fersk-, sjávar- skelfisklykt (RI 794-804) og græn-, leysa-, vond lykt (RI 887-894) greindust einnig en enn er óljóst um hvaða efni er að ræða.

### **3. kafli**

#### **Þróun á samsettum beitum**

#### *Development of artificial bait*

**Rósa Jónsdóttir**

**Soffía Vala Tryggvadóttir**

**Guðrún Ólafsdóttir**

---

### 3.1. Comparison of chemical composition of different bait and bait alternatives

In the project on artificial bait alternatives mainly based on fish waste (CRAFT Q5CR-2000-70427) successful bait wrapped in bags was developed by grating frozen raw material (Soffia Vala Tryggvadóttir and others 2002; 2003). Development of a database with results from the analysis of chemical composition, fatty acid composition, amino acid composition and identification of volatile compounds of various traditional bait raw materials and bait alternatives was done in this project (Chapter 2). Based on the information on the various composition of the raw material analyzed, suggestions are given herein on the ideal composition of an artificial bait, with mixtures of different raw material to mimic traditional bait like squid and sandeel.

Principal component analysis (PCA) was done to study the interrelationships between objects (samples analyzed) and variables (fat, protein, water, salt, amino acids, fatty acids and volatiles) measured. Figure 3.1 a shows the score plot (PC1 vs. PC2) of all the samples and 3.1b the loading plot of proximate analysis, fatty acid composition, amino acid composition and volatile composition (GC-O results). The first two factors explained about 54% of the

total variation of the original variables. Factors 1 and 2 represented about 30% and 24% of the explained variance, respectively. The samples are clearly grouped into pelagic species and bivalves (Figure 3.1 a) indicating their similarity. In between these groups are samples from lean species, cod waste (cut off) and blue whiting. In the upper right corner are the samples of squid and cod viscera, containing high amount of free amino acids as previously mentioned.

Factor 1 describes mainly the variation in the amino acid content, salt content, sea-like odor (16—sea) and popcorn odor (8—popcorn), as can be seen on the right side of the loading plot (Fig. 3.1 b). On the opposite side are volatile components like potato (7—potato), celery (14—celery) and sulfur (5—sulfur) like odors, contributing to factor 1. Factor 2 describes mainly the variation in fat and water content and in the content of fatty acids. It also describes mushroom-like odor (11—mushroom), which was correlated to water and long chain polyunsaturated fatty acids, and cucumber-like odor (13—cucumber) that correlated with higher fat content and monounsaturated fatty acids.

The pelagic species had a similar profile, explained by factor 1 and 2, with higher fat content and lower water content compared to other samples. The content of monounsaturated

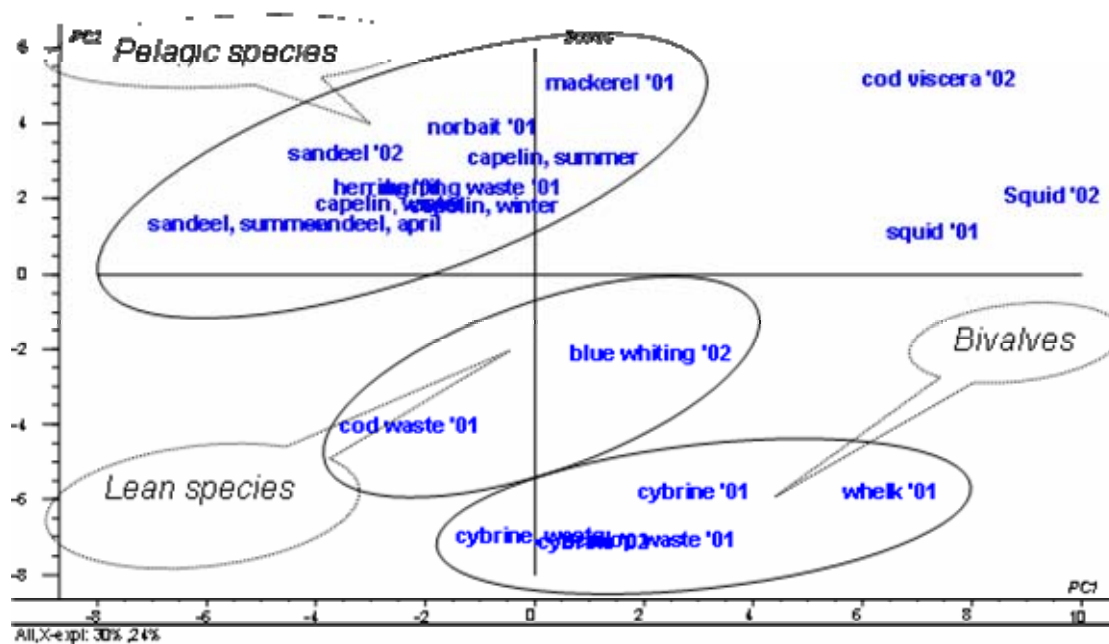


Figure 3.1 a. PCA score plot (PC1 vs. PC2) of various bait and bait alternatives. The loadings are shown in Fig 3.1 b.

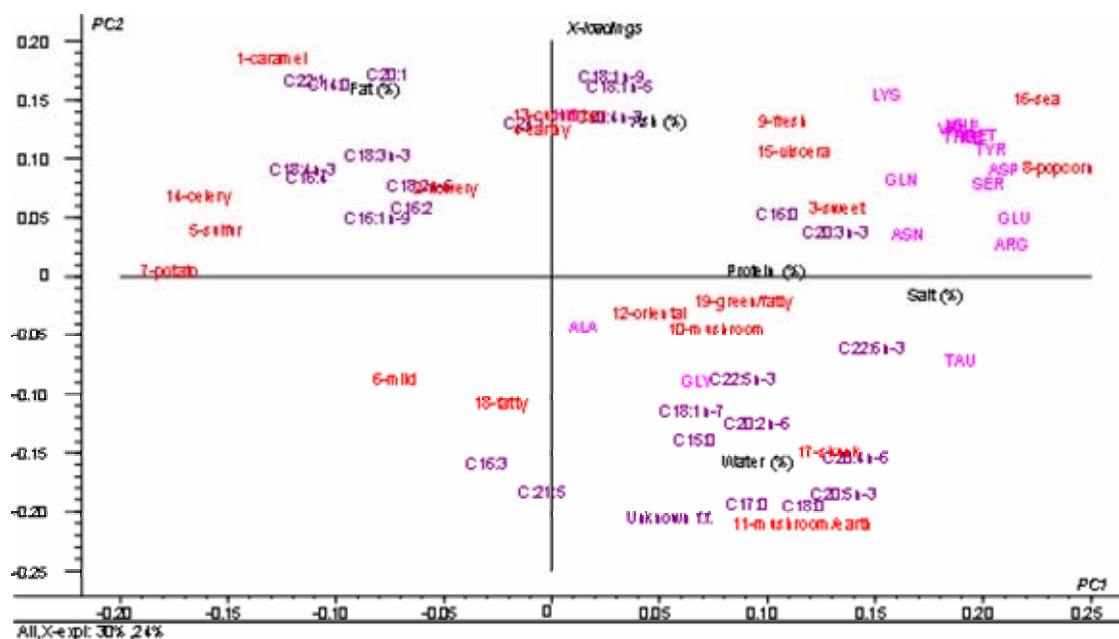


Figure 3.1 b. PCA loading plot (PC1 vs. PC2) of fat, protein, water, salt, as (proximate analysis labeled with black letters), fatty acid composition (cherry colored letters), amino acid composition (pink letters), volatile components (red letters). The scores are shown in Fig 3.1 a. The numbers in odor descriptors give the compound number in Table 2.4.

fatty acids was higher in these samples, especially in the content of C20:1 and C22:1, as can be seen in table A1. The content of C18:4n-3, C18:3n-3 and C16 fatty acids were also high in these samples. This is in accordance with previous study (Soffía Vala Tryggvadóttir and others 2002). These samples were characterized with caramel, vanilla, sweet like odor (Figure 3.1 b, 1-caramel) and flowery odor (2-flowery). Cucumber-like odor (13-cucumber), sulfur, onion-like odor (5-sulfur) and celery-like odor (14-celery) were also high in these samples. The bivalves are grouped together as mentioned correlating with high water content and relatively higher content of polyunsaturated fatty acids.

In the upper right corner are the squid samples and cod viscera containing high amount of the five amino acids (GLY, SER, GLU, THR, VAL) which are thought to be the most effective amino acids (Hara, 1992). The amino acids are shown underlined in Figure 3.1 b. Squid is the most popular bait in the longline fisheries in Iceland. Based on the PCA plots it may be speculated whether it is possible to produce artificial squid bait from i.e. mackerel or summer capelin together with whelk or ocean quahog. Another possibility and maybe better is a mixture of blue whiting and cod viscera.

### 3.2 Artificial bait

With the newly developed bait (Figure 3.2) from frozen material it is now possible to produce artificial bait with different combinations of bait raw material of ideal attractant properties. By using PCA (Figure 3.1a and b) it is possible to study the similarities and dissimilarities between the various traditional bait raw materials and bait alternatives based on the chemical, fatty acid and amino acid composition and volatile compounds. Suggestions of ideal mixtures of different raw material to be used in the new developed bait are given in



Figure 3.2. Artificial bait in bags.

Table 3.1. Ideas of artificial bait from combined raw material

Label*	Raw material	%
<b>70-30 BCw</b>	Blue whiting	70.0
	Ocean quahog, waste	30.0
<b>80-20 BCw</b>	Blue whiting	80.0
	Ocean quahog, waste	20.0
<b>90-10 BCw</b>	Blue whiting	90.0
	Ocean quahog, waste	10.0
<b>95-5 BCw</b>	Blue whiting	95.0
	Ocean quahog, waste	5.0
<b>90-5-5 BCwCv</b>	Blue whiting	90.0
	Ocean quahog, waste	5.0
	Cod viscera	5.0
<b>70-30 CapCw</b>	Capelin, summer	70.0
	Ocean quahog, waste	30.0
<b>80-20 CapCw</b>	Capelin, summer	80.0
	Ocean quahog, waste	20.0
<b>90-10 CapCw</b>	Capelin, summer	90.0
	Ocean quahog, waste	10.0
<b>95-5 CapCw</b>	Capelin, summer	95.0
	Ocean quahog, waste	5.0
<b>90-5-5 CapCwCv</b>	Capelin, summer	90.0
	Ocean quahog, waste	5.0
	Cod viscera	5.0
<b>50-40-10 CapBCv</b>	Capelin, summer	50.0
	Blue whiting	40.0
	Cod viscera	10.0
<b>60-20-20 CapBCv</b>	Capelin, summer	60.0
	Blue whiting	20.0
	Cod viscera	20.0
<b>80-15-5 CapBCv</b>	Capelin, summer	80.0
	Blue whiting	15.0
	Cod viscera	5.0
<b>50-20-30 CapBCv</b>	Capelin, summer	50.0
	Blue whiting	20.0
	Cod viscera	30.0

Table 3.1. based on the information gained from analysis of the different raw material. PCA was done on the test samples (blue whiting, cod viscera, ocean quahog waste and summer capelin) and the ideal mixtures of bait using the same variables in the PCA as before (Figure 3.3). From the figure it can be seen that e.g. by mixing cod viscera into the bait the composition of the mixture becomes more similar to the composition of squid which is popular bait.

By using the new grinding technology it is possible to put together different mixtures of bait raw material that was impossible to use for bait before. The characteristics of the mixtures can then be estimated by exploring the data by multivariate analysis (PCA). In this way it maybe possible to develop the ideal bait for longline fishing but fishing trials are needed to test the activity of these mixtures.

### 3.3 References

- Hara, T.J. 1992. Fish Chemoreception. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1.
- Soffía Vala Tryggvadóttir, Gunnar Páll Jónsson, Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir 2002. Artificial bait alternatives, mainly based on fish waste. CRAFT Q5CR-200-70427. Project report to EU. Icelandic Fisheries Laboratories, 09-02.
- Soffía Vala Tryggvadóttir, Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir 2003. Artificial bait alternatives, mainly based on fish waste. CRAFT Q5CR-200-70427. Second individual progress report to EU. Icelandic Fisheries Laboratories, 31-03.



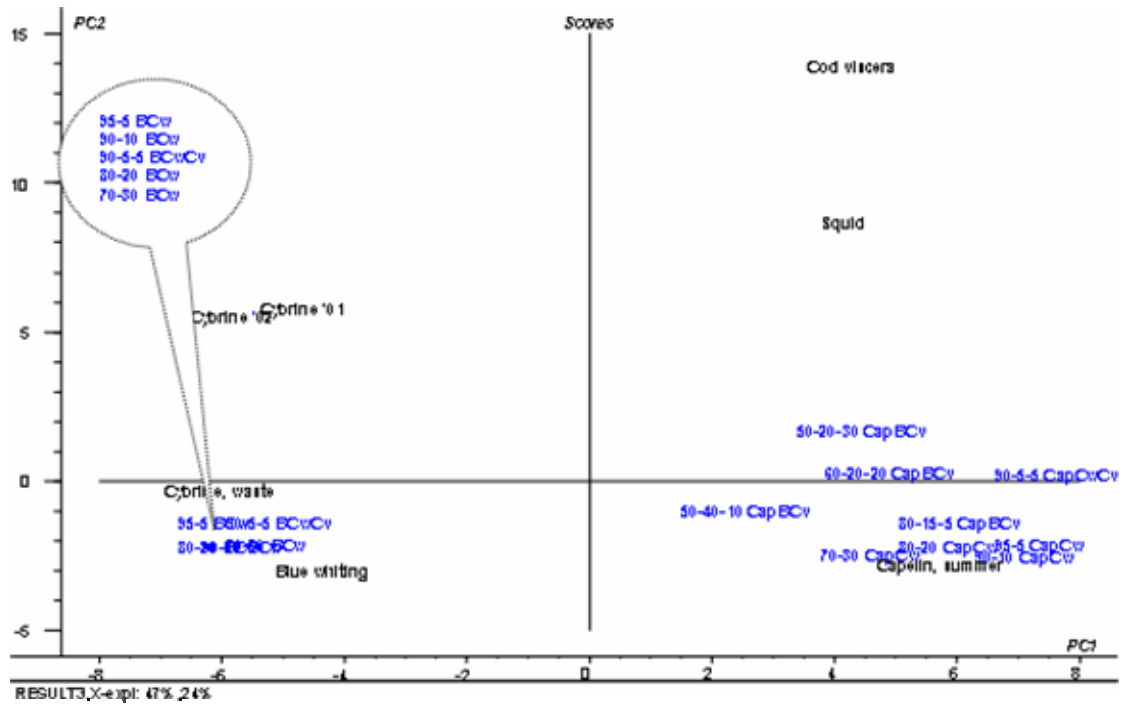


Figure 3.3. PCA score plot (PC1 vs. PC2) of bait and ideas of bait (Table 3.1).



## 4. kafli

# Ensímvirkni lípoxýgenasa

Guðrún Ólafsdóttir

Þrándur Helgason

Rósa Jónsdóttir

---

#### 4.1 Inngangur

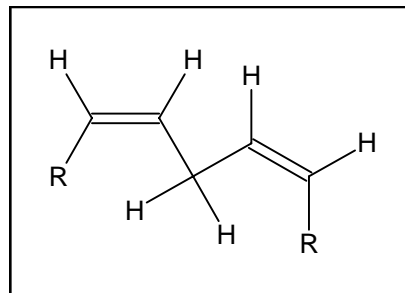
Lípoxýgenasar (LOX) eru til staðar í plöntum, dýrum, þar á meðal sjávardýrum og í sveppum. LOX hafa ýmsum hlutverkum að gegna í plöntum og lífverum sem tengjast lífvirkni m.a. baráttu við sjúkdóma, þroskun, seiti vaxtarhormóna og viðbrögðum við streytu. Skilningur á öllum þessum þáttum er ekki fyllilega ljós (Pan og Kuo 2000; Gardner 2001).

Óstöðugleiki LOX úr sjávarfangi hefur komið í veg fyrir að hægt hafi verið að einangra og fullhreinsa ensímið en rannsóknir á virkni LOX hafa verið gerðar með óhreinsað þykkni. Óstöðugleikinn stafar m.a. af háu hlutfalli fjölómattaðra fitusýra (FÓFS) sem hvarfast við ensímið og mynda peroxíð-afleiður sem flýta fyrir virknitapi ensímsins. Til að koma í veg fyrir þessa afmyndun ensímsins eru önnur ensím til staðar *in vivo* (hydroperoxide scavenging enzymes) sem breyta hydroperoxíð-myndefnunum yfir í efni sem ekki hafa áhrif á stöðugleika ensímsins. Aðallega er um tvö ensím að ræða, glútaþíon-peroxydasi og hydroperoxy-lyasi (German og Kinsella 1986; Cadwallader 2000; Sikorski og Kolakowski 2000).

##### Eiginleikar og myndefni LOX í sjávarfangi

Rannsóknir hafa verið gerðar á hlutverkum LOX í sambandi við myndun rokgjarnra efna sem valda æskilegum lyktareinkennum í mörgum matvælum. LOX virkni hefur verið mikið rannsökuð í plöntum um árabil, mest í sojabáunum en á síðustu 10-20 árum hafa verið gerðar rannsóknir á ensíminu í fiski (German og Kinsella 1985; German o.fl. 1986; Josephson o.fl. 1987). Sýnt hefur verið fram á tilvist og virkni LOX í tálknum og í roði fisks (Yamaguchi og Toyomizu 1984; Hsieh o.fl. 1988). Ensímið hvatar hvarf súrefnis við eitt af  $\alpha$ -kolefnunum í *cis,cis*-1,4-pentadiene hluta fjölómattaðra fitusýra (mynd 4.1) og stuðlar að myndun ákveðinna hydroperoxíð-afleiða sem geta síðan hvarfast og myndað ýmis niðurbrotsefni. Í fyrsta lagi geta myndast frjár stakeindir (free radicals) sem stuðla að sjálfsoxun en mjög erfitt er að stjórna slíkum ferlum. Myndefni þess ferils gefa hydroperoxíð sem geta eyðilagt virkni vítamína, litarefna og próteina og valdið óæskilega þrálykt í matvælum.

Hins vegar geta myndast niðurbrotsefni þar sem önnur ensím eins og glútaþíon-peroxydasi



Mynd 4.1. 1,4-*cis,cis*-pentadien bygging í fjölómattuðum fitusýrum.

og hydroperoxy-lyasia stýra ferlinu og hafa ýmsir sýnt fram á hvarfganginn og hlutverk þessara ensíma við myndun niðurbrotsefna (German og Kinsella 1986; Hsieh og Kinsella 1989; Cadwallader 2000; Fujimura og Kawai 2000). Tillögur um hvarfgang LOX við niðurbrot eicosapentenoic sýru (20:5n-3) og myndun efna sem áhrif hafa á ferskleikalykt sjávarfangs voru fyrst settar fram af Josephson og Lindsay (1984a). Þetta eru efnin 1,5-octadien-3-ol, 2,5-octadien-3-ol, 1,5-octadien-3-one, 2,6-nonadienal og 3,6-nonadien-1-ol sem hafa einkennandi sveppalykt, geranium-, plöntu- eða málmlykt og agúrku- og melónulykt (Josephson o. fl. 1983, 1984a,b; Josephson og Lindsay, 1986). Hydroperoxíð-afleiðurnar eru klipptar í sundur með aðstoð ensíma við hydroperoxíðhópana og tvö styttri og rokgjarnari myndefni myndast. LOX er mun sérvirkari á FÓFS en stakeindamyndun og þannig getur verið æskilegt að nota LOX til að stjórna myndun jákvæðra lyktarefna, t.d. myndun rokgjarna efna sem einkenna lykt af ferskum fiski (Josephson o.fl. 1984a). Myndefnin eru háð því hvaða hvarfefni eru til staðar. Þannig myndast 1-octen-3-ol og *trans*-2-nonenal frá arakíðonsýru (20:4n-6) og 2,6-nonadienal og 3,6-nonadien-1-ol frá 20:5n-3 (Hsieh og Kinsella 1989). Hirano o.fl. (1992) báru kennsl á þessi efni í ákveðinni fisktegund (ayu) og Zhang o. fl. (1992) fundu LOX virkni í óhreinsuðu ensími úr tálknum og í roði „ayu“, en ekki fannst ensímvirkni í vöðva. Josephson o. fl. (1985) bentu á hlutverk LOX í myndun rokgjarna efna í ostrum. Með því að hindra virkni ensímsins sýndu þeir fram á minni myndun rokgjarnra efna, sem einkenna ferska lykt af ostrum. Mohri o.fl. (1990) fundu LOX virkni í roði í ferskum sardínnum og Kuo o.fl. (1994) báru kennsl á 12-lípoxýgenasa í blóðvökva (hemolymph) í rækju (Tiger shrimp).

### LOX virkni í þörungum og myndun niðurbrotsefna frá 20:5n-3

Rannsóknir á LOX í þörungategundum (*Ulva lactuca*) skyldum maríusvuntu hafa verið framkvæmdar og tekist hefur að grófhreinsa LOX og finna kjörsýrustig (pH 7,5) og kjörhitastig (33°C) þar sem notaðar voru mismunandi fitusýrur til að skoða einkennandi hvarfgang ensímsins (Kuo o.fl. 1997). Miklu máli skiptir hvaða FÓFS eru til staðar því mismunandi LOX hafa sértæka virkni gagnvart mismunandi FÓFS. Sýnt var fram á að LOX úr þessari þörungategund var hvarfgjarnastur á fitusýruna 18:2 og síðan 20:4, 20:5, 22:6, og 18:3. Meðhöndlun á 18:2 með LOX leiðir af sér myndun 9-HODE (hydroxyoctadecadienoic acid) og 13-HODE í hlutföllunum 86:14. LOX er flokkaður eftir myndefnum þar sem mismunandi myndefni koma fram eftir því hvar LOX setur hydroperoxíðhópinn og því er mikilvægt að þekkja sérvirkni ensímsins.

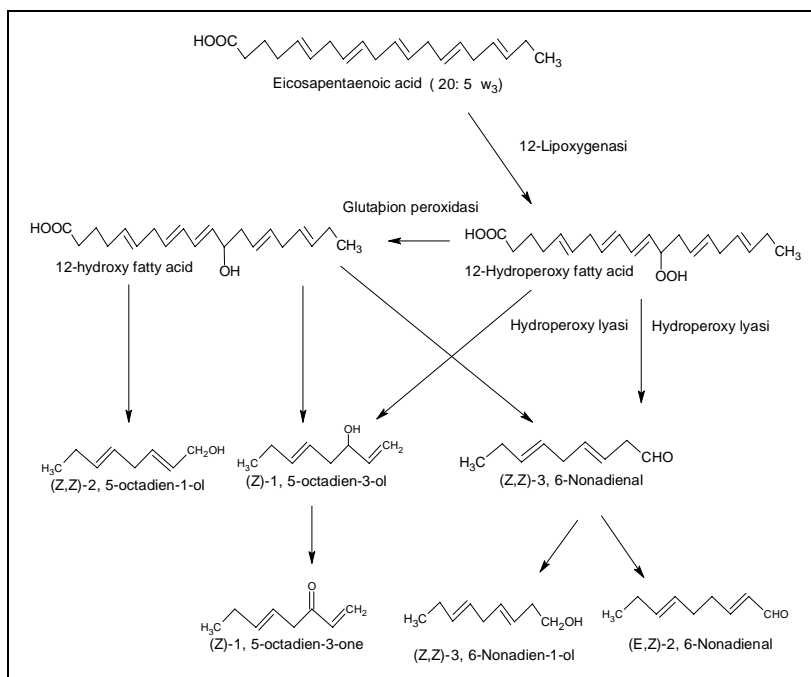
Í okkar tilraunum var notað loðnulýsi og því var áhugavert að skoða hugsanleg myndefni frá LOX virkni í loðnulýsi. Loðnulýsi inniheldur töluvert af FÓFS, sérstaklega C20:5n-3, en hvorki 18:2 né 20:4 í teljandi magni (sjá töflu A4.1 í viðauka). Fyrri rannsóknir hafa sýnt að aðallega myndast 12-HETE (hydroxyeicosatetraenoic acid) við meðhöndlun LOX úr þörungum á 20:5 fitusýru (Kuo o.fl. 1996; 1997)

Mynd 4.2 sýnir hugsanlegan hvarfgang fyrir 12-LOX á C20:5n-3 og myndun niðurbrotsefna. German og Kinsella (1986) sýndu fram á

hvarfið frá C20:5n-3 í 12-hydroperoxíð fitusýru með 12-LOX og síðan myndun 12-hydroxy fitusýru með glutatíon peroxidasa. Cadwallader (2000) lýsti myndun (*cis,cis*)-3,6-nonadienal frá 12-hydroperoxy fitusýru og umbreyting í annaðhvort (*cis,cis*)-3,6-nonadien-1-ol eða (*trans,cis*)-2,6-nonadienal og líka 12-hydroperoxy fitusýru yfir í (*cis*)-1,5-octadien-3-ol og frekari oxun í (*cis*)-1,5-octadien-3-one. Hsieh og Kinsella (1989) sýndu síðan fram á myndun (*cis*)-1,5-octadien-3-ol, (*cis,cis*)-2,5-octadien-1-ol, (*cis,cis*)-3,6-nonadienal frá 12-hydroxy fitusýru. Hlutverk hydroperoxy lyasa við hvarf 12-hydroperoxy fitusýra yfir í annaðhvort (*cis,cis*)-3,6-nonadienal eða (*cis*)-1,5-octadien-3-ol var sýnt fram á af Fujimura og Kawai (2000).

### Andoxunarefni

Andoxunarefni geta verið ýmiss konar efni t.d. vítamínin C, E og β-karótín, lífhvatar (súperoxíð og dismútaði), málmar (selen, sem hluti af glutathione-peroxidasa), fjölfenól og ýmis önnur efni (Gunnar Ólafsson og Margrét Bragadóttir 1997). Rannsóknir hafa sýnt að þörungar innihalda mikið af andoxunarefnum, sérstaklega botnþörungar sem lifa í köldum sjó fyrir norðan og austan Ísland, en þang reyndist ekki hafa þráavarnarvirkni. Þráavarnarvirkni í þörungum er einnig háð árstíma þ.e. virknin er einungis til staðar frá maí til ágúst (aðallega maí) (Gunnar Ólafsson og Margrét Bragadóttir 1997). Andoxunarefni eru talin hafa mjög góð áhrif á heilsuna og eru þess vegna mikið rannsökuð í heiminum nú á dögum.



Mynd 4.2 Áætlaður hvarfgangur 12-LOX á eicosapentaen-sýru. C20:5n-3 (ekki eru öll hugsanleg myndefni sýnd)

### Markmið tilraunar og verkþættir

Upphaflegt markmið þessa hluta verkefnisins var að sýna fram á lípoxýgenasavirkni í tálknum, roði og blóðvökva í hráefni sem valið var eftir kortlagning á rokgjörnum niðurbrotsefnum í hráefni sem notað er í beitu (2. kafli, 1. verkþáttur) og einnig í þörungum.

#### A) Ensímhindrun í hráefni

Velja átti hráefni (tálkn, roð, blóðvökva eða þörunga), sem sýnt hafði verið fram á í öðrum rannsóknum að hafa LOX-ensímvirkni. Þær breytingar urðu á þessum verkþætti að lögð var áhersla á notkun þörunga til að mynda ferskleikaefni í lýsi. Ástæðan er sú að við heimildaleit kom í ljós að meiri líkur voru á að ná árangri með lípoxýgenasa úr þörungum sem er stöðugri en þeir sem finnast í öðru sjávarfangi. Upphaflega stóð til að sýna fram á LOX-ensímvirkni beituhráefnis með því að nota þekktu LOX-ensímhindra ( $\text{SnCl}_2$ ) og/eða elucitin og mæla með gasgreini hvort minna myndaðist af þekktum niðurbrotsefnum vegna lípoxýgenasa-virkni. Ekki var ráðist í þær mælingar á þessu stigi, þar sem fyrst þurfti að kanna betur ensímvirknina og næmni gasgreini-aðferða til að mæla niðurbrotsefnin. Ákveðið var að nota lýsi sem módelkerfi í fyrstu og gera þessar rannsóknir samkvæmt verkþætti B um lípoxýgenasavirkni og þráahindravirkni þörunga.

#### B) Lípoxýgenasavirkni og þráahindravirkni þörunga í lýsi

Stuðst var við upplýsingar um hvernig standa ætti að sýnatöku og meðhöndlun þörunganna frá Kuo o.fl. (1997) sem hreinsuðu og skoðuðu virkni LOX úr maríusvuntu. Notað var óhreinsað þörungapýkkni í þennan hluta þar sem ekki voru til staðar aðferðir til að skoða betur virkni ensímsins. Bent hefur verið á að hægt sé að auka stöðugleika LOX með því að nota þráavarnarefni, fosfólípíð, iodoacetamide o.fl. til að koma í veg fyrir að of mikið af myndefnum safnist upp. Einnig er hugsanlegt að fjarlægja súrefni og/eða fjarlægja hemepróteinið úr LOX—lausninni, en hvarfstöð LOX er járn. Í slöku ástandi er járn-hópurinn í Fe(II) stöðu en í hvataðri stöðu er járn-hópurinn í Fe(III) (Pan og Kuo, 2000).

Ákveðið var að nota maríusvuntu sem auðvelt er að nálgast á hérlendis. Einu annmarkarnir eru að tínslan er árstíðarbundin. Rannsóknir hafa sýnt að lípoxýgenasi er til staðar í miklu magni, hefur mikla virkni og er stöðugt í

þörungategundunum *Ulva conglobata* og *Ulva lactuca* sem finnast við strendur Taiwan (Kuo o.fl. 1997). Sú fyrri finnst ekki við strandir Íslands en *Ulva lactuca* þ.e. maríusvunta er skyld tegund sem finnst við strendur Íslands (Sigurður Jónsson og Karl Gunnarsson 1978). Maríusvunta er stöngullaus þari af grænþörungætt en blöðin festast við fjörusteina með rótum. Blöðin eru ljósgræn, mjög þunn, viðkvæm og frekar lítil (u.þ.b. 5-15 cm í þvermál). Blöð maríusvuntu geta verið tvennskonar þ.e. með einu eða tveimur frumulögum. Það kom í ljós að sýnin sem aflað var innihéldu ekki eingöngu maríusvuntu heldur líka marglýu (*Ulvaria obskura*) sem er mjög lík maríusvuntunni og var því notuð blanda af þessum tveim tegundum í tilraunina.

Við undirbúning sýna er best að geyma LOX í frosti til að halda virkninni niðri en jafnvel við 0°C er enn um 60% virkni til staðar. Hydroperoxíð draga úr stöðugleika en í litlu magni geta þau einnig virkjað LOX og því er nauðsynlegt að halda þeim í algjöru lágmarki ef geyma á sýni með LOX. Auk þess er hægt að stjórna virkninni með glútaþíon-peroxidasa og hydroperoxi-lyasa sem halda hydroperoxíðunum í lágmarki.

Gerðar voru tilraunir til að ákvarða æskilegt magn af þörungum til að hægt sé að greina mun á magni niðurbrotsefna í sýnum og jafnframt að gera athugun á því hvort ensímvirknin haldist í þörungunum eftir tínslu. Þar sem gasgreinibúnaðurinn var bilaður í upphafi tilraunarinnar tókst ekki að skoða LOX virknina í ferskum þörungum. Hér var því um að ræða frumathugun á blöndun maríusvuntu í loðnulýsi, ákvörðun á magni og geymsluaðstæðum sem áhrif hafa á myndun niðurbrotsefna og könnun á næmni gasgreiniaðferðanna til að greina mun á milli sýna með mismiklu magni af maríusvuntu og við mislangan geymslutíma.

## 4.2 Efni og aðferðir

Þörungum (maríusvuntu, *Ulva lactuca*) var blandað saman við ferskt loðnulýsi í mismiklu magni (10, 20, 30 eða 50 g af þörungum í 300 g lýsi) og blandan geymd við herbergishita í fjórar vikur. Mæld voru rokgjörn niðurbrotsefni með gasgreini-massagreini (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) og gasgreini-sniffi (gas chromatography-olfactometry, GC-O) í hreinu lýsi og í lýsi með 10 og 50 g af þörungum eftir fjögurra vikna geymslu til að

kanna hvort niðurbrotsefni sem vitað er að lipoxygenasi myndar væru til staðar og einnig hvort þörungarnir hefðu þráhindravirkni. Einnig voru mæld rokgjörn niðurbrotsefni með GC-O í lýsi með 50 g af þörungum eftir 5 daga geymslu. Peroxíðgildi voru mæld í fersku lýsi og síðan í hreinu lýsi og þörungablöndum eftir fjórar vikur. Fylgst var með breytingum á lyktareinkennum með skynmati bæði í lýsi og lýsis-þörungablöndunni við geymslu.

#### 4.2.1 Söfnun þörunga

Sýnum af maríusvuntu (*Ulva lactuca*) var safnað í fjörunni rétt utan við Minni-Vatnsleysu á Vatnsleysuströnd á uppstigningardag þann 29. maí 2003 við háfjöru. Þörungarnir voru fluttir í svörtum plastpokum með sjó og geymdir við 4°C í 5 daga í myrkri þar til þeim var blandað saman við loðnulýsi.

#### 4.2.2 Undirbúningur sýna

*Lipoxygenasavirkni og þráhindravirkni maríusvuntu*

Maríusvuntan var hökkuð í blandara (Braun electronic type 4262, Þýskalandi) í um þrjár mínútur á mesta hraða þar til mauk með smáum þörungatægjum hafði myndast. Loðnulýsi (300 ml) var sett í 500 ml sýnaglös og 50 g af maríusvuntu bætt út í fjögur sýnaglös. Lýsið var ferskt, afsýrt, kaldhreinsað, bleikt og aflyktað loðnulýsi (Lota B3057; Lýsi hf., sjá viðauka A4.2). Blandan var síðan geymd í opnum glösum við 4°C við venjulegt ljós frá flúrperu. Eftir fjóra daga voru allar lausnirnar fluttar í herbergishita (20°C). Eftir það var blandan hrist rösklega einu sinni á hverjum virkum degi í um 10 sek. í fjórar vikur. Þar sem gasgreinibúnaðurinn var bilaður reyndist ekki unnt að mæla niðurbrotsefnin í blöndunni í upphafi. Ákveðið var þá að nýta sýnin til að skoða hugsanlega þráhindravirkni þörunganna við geymslu í lýsisblöndunni.

Fimm dögum eftir tínslu voru gerðar þynningar með 10, 20 og 30 g af maríusvuntu, tvær lausnir af hverri þynningu, í 300 ml af loðnulýsi (mynd 4.3). Þynningarnar voru gerðar úr sama skammti af maríusvuntu og var hún þess vegna orðin 5 dögum eldri þegar þynningarnar voru gerðar þannig að virknin var kannski ekki eins en aftur á móti virtist maríusvuntan vera lifandi þegar hún var hökkuð þannig að munurinn er sennilega óverulegur.

#### 4.2.3 Mælingar

*Lyktarskynmat*

Lyktarmat var framkvæmt af tveimur þjálfuðum skynmatsdómurum þar sem lýst var með orðum lyktareinkennum hvers sýnis. Lyktarmat var gert á ferskum þörungum og síðan á þörungablöndum og lýsi eftir fjögurra vika geymslu við stofuhita.

*Gasgreinimælingar*

Notaðar voru „headspace“ einangrunar-aðferðir þar sem rokgjörnum efnum er safnað á gildru með ásogsefni (TENAX) (Guðrún Ólafsdóttir o.fl. 1985). Lyktarefnin voru því næst aðgreind með því að nota tvo gasgreina (HP5890; HP GCD G1801C) með mismunandi nemum til að bera kennsl á lyktarefnin. Gasgreinir með massagreini (GC-MS) var notaður til að fá massaróf efnanna og ákvarða byggingarformúlur efna. Einnig var notuð lyktargreining með „sniffer“ (GC-O, gas chromatography olfactometry eða GC-sniff) sem byggist á því að lykta af efnum þegar þau koma af gasgreinisúlunni og bera þannig kennsl á efni eftir lyktareiginleikum þeirra (Grosch 1993). Styrkleiki hverrar lyktar er ákvarðaður og notaður eftirfarandi skali: 0=engin lykt; 1=á mörkum; 2=vottur af lykt; 3=lítill lykt; 4=greinileg lykt; 5=mikil lykt. Auk þessa voru borin kennsl á einstök efni með samanburði efnanna við staðla og rástíma, ásamt massarófum.

*Peroxíðmælingar*

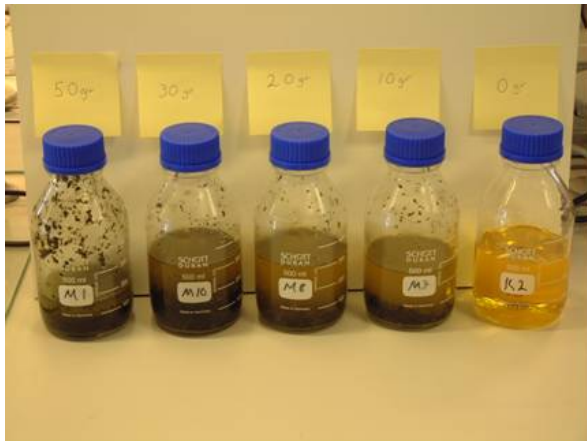
Peroxíðgildi loðnulýsis var mælt með jöðómetriskri títrun (AOAC, 1990). Niðurstöður voru gefnar upp sem milliequivalent peroxíðs í kg loðnulýsis (meq/kg). Fyrir mælingar á peroxíðgildi í lýsisblöndum sem innihéldu maríusvuntu, var blandan skilin í skilvindu, til þess að skilja frá vatn og óhreinindi, en peroxíðgildið ákvarðað í hreinu lýsi.

*Vatnsinnihald*

Mæling á vatnsihaldi maríusvuntu var gerð með þurrkun í ofni við 102-104 °C í 4 t (ISO 1983).

#### 4.3 Niðurstöður

Blandan af lýsi og maríusvuntu var grænleit eins og sést á mynd 4.3. Þörungarnir virtust mynda þykkni, en þar sem maríusvuntan var vatnsrík (81,4% vatn) og ef ofgnótt var af henni



Mynd 4.3. Loðnulýsi með 0, 10, 20, 30 og 50 g af maríusvuntu

voru lýsislausnir með maríusvuntu ekki tærar í útliti og botnfall myndaðist.

#### 4.3.1 Gasgreininiðurstöður

Ef um LOX virkni í maríusvuntu væri að ræða hefði mátt búast við að niðurbrotsefni C20:5n-3 vegna 12-LOX virkni væru til staðar þ.e. (*cis, cis*)-2,5-octadien-1-ol, (*trans, cis*)-2,6-nonadienal, (*cis*)-1,5-octadien-3-one, (*cis*)-1,5-octadien-3-ol, (*cis, cis*)-3,6-nonadien-1-ol (German og Kinsella 1986; Hsieh og Kinsella 1989; Josephson 1991; Cadwallader 2000). Niðurstöður gasgreinimælinga (Tafla 4.1) á lýsis-maríusvuntu-blöndunni sýndu hins vegar að ekkert af þessum efnum mældust með GC-MS en einkennandi gúrkulykt og sveppalykt greindust með GC-O sem bendir til að 2,6-nonadienal og 1-octen-3-ol. Lyktarþröskuldur 2,6-nonadienals er mjög lágur eða 0,001 ppb í vatni (Josephson 1991) og hugsanlegt að það sé til staðar í litlu magni þó það greinist ekki með GC-MS. 2,6-Nonadienal er einmitt það efni sem mest áhrif hefur á ferskleikalykt í loðnu (Guðrún Ólafsdóttir o.fl. 1997). Hugsanlegt er að hægt hefði verið að greina þessi efni ef blandan hefði verið mæld strax eftir tínslu á meðan LOX virkni var ennþá til staðar, en það var ekki gert vegna bilunar í tækja-búnaði.

Öll efni sem rekja má til niðurbrots fitusýra reyndust vera í mun meira magni í hreinu loðnulýsi heldur en í blöndu af lýsi og þörungum eftir fjögurra vikna geymslu. Því má ætla að þörungarnir hafi sýnt þráhindravirkni og komið í veg fyrir myndun hydroperoxíðafleiða úr FÓFS eða hindrað niðurbrot hydroperoxíða úr þeim. 1-Penten-3-ol var í mestu magni í loðnulýsinu en önnur efni

sem rekja má til niðurbrots fitusýra og voru til staðar í mestu magni í loðnulýsinu voru hexanal, (*trans*)-2-hexenal, (*trans*)-2-heptenal, (*trans,trans*)-2,4,heptadienal, nonanal, (*trans*)-2-nonenal, decanal, decenal, undecanal og undecenal. Efnin 1,3,5-octatriene og 3,5-octadiene mældust einnig í talsverðu magni í loðnulýsinu.

Rannsóknir á lýsi hafa sýnt að svipuð niðurbrotsefni eru til staðar og í fiski. Karahadian og Lindsay (1989) sýndu fram á breytingar á magni og tilvist ákveðinna rok gjarna lyktarefna í réttu hlutfalli við lyktarbreytingar sem urðu í lýsi úr meinhaddi (menhaden) við þrúnun. Þannig sýndu þau fram á að einkennandi græn-, plöntulykt minnkaði um leið og styrkur 2,6-nonadienals minnkaði og myndun þrályktar var í réttu hlutfalli við aukinn styrk af *cis*-4-heptenal og ísómera af 2,4,7-decatrienal.

Í lýsis-þörungablöndunni voru efni í mestu magni sem rekja má til örverugróðurs. Skemmdarlykt myndaðist í sýnunum og efni sem eru vel þekkt niðurbrotsefni vegna örverugróðurs myndaðist eins og propanol, butanol, 2-butanone, 2-metyl-1-propanol, 3-hydroxy-2-butanone, 3-metyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol og 1,3-butandiol (Guðrún Ólafsdóttir og Fleurence 1997). Einnig myndaðist dimetýlsúlfíð í miklu magni í þörungablöndunni en það efni er vel þekkt í ýmsum þörungum (Hattula og Granroth, 1974).

#### 4.3.2. Mat á lykt af þörungablöndum og loðnulýsi

Lyktarmat var framkvæmt af tveimur þjálfuðum skynmatsdómurum og lýst var með orðum lyktareinkennum hvers sýnis. Lykt af ferskum þörungum (maríusvuntu) við tínslu var lýst sem áberandi gúrkulykt sem er hugarlega af völdum 2,6-nonadienal. Aðrir þörungar sem tíndir voru á sama tíma höfðu ekki þessa einkennandi lykt. Niðurstöður lyktarskynmats voru eftirfarandi:

##### Lyktarmat á ferskum þörungum:

1. Áberandi gúrkulykt var af ferskri maríusvuntu (við tínslu), en ekki daginn eftir, sem bendir til LOX virkni haldist ekki í sýnunum við geymslu.
2. Önnur lykt, ekki ferskleikalykt, var af hrossapara og klóþangi sem einnig voru tínd á sama tíma og notuð í tilraunir um



Tafla 4.1. Áhrif íblöndunar þörunga (mariuvuntta, *Uva lactuca*) í loðnlýsi á myndun rokgnarra efna eftir fjögurra vikna geymslu við stofuhita mæld með GC-MS og GC-O. Mariuvunttu var blandað við loðnlýsi að 300 mL.

Efnir	GC-MS			GC-O			Staðfesting <sup>3</sup>
	R <sup>1</sup>	% flatarmál	10 50	R <sup>1</sup>	lyktarmat <sup>2</sup>	10 50	
acetaldehyde							
ethanol	173	0.81	0.85				MS
2-propenal eða pentane	178	11.2	7.4				MS
dimethyl sulfide	184		10.6				MS
1-propanol	191		5.0				MS
2-butanone	205		26.2				MS
butanal	205	5.1					MS
2-methyl-1-propanol	219		0.85				MS
(E)-2-butenal	235	2.1					MS
benzene	245	6.8	4.4				MS
1-penten-3-ol	257	25.3	5.8	258		1.5	MS
3-methylbutanal eða pentanal	273	29.5	7.6	284		1.5	MS, 1
3-hydroxy-2-butanone	293		21.8				GC-O
3-methyl-1-butanol	308	1.4	7.5				MS
2-methyl-1-butanol	310	0.42	2.3	303	2.0		MS
(E)-2-pentenal	315	2.0					MS
(E)-2-pentenal	324	2.2	0.21				MS
1-pentanol	333		4.3				MS
1,3-butanediol og 2,3-butanediol	346-367		1.40	345	1.5	1.5	MS
2-methyl-4-pentenal	368	1.2					MS
hexanal	371	2.1		372	3.0	2.0	MS, GC-O, 1
2,3-butanediol	381		14.3				MS
(Z,Z)-3,5-octadiene	386	0.56	0.17	392	2.0	2.0	MS
(Z,Z)-3,5-octadiene	395	0.29	0.08	403		2.0	GC-O
(E)-2-hexenal	431	0.30		415	1.5	2.0	GC-O
1-hexanol	447		0.09	432	2.0		MS
1,3-cis,5-cis-octatriene	461	0.66	0.11				MS
heptanal	489	0.45	0.13				GC-O
(E)-2-heptenal	550	0.06					GC-O
benzaldehyde	552	0.58		457	1.8	1.8	GC-O
1-octen-3-ol	588	0.66	0.10	468	3.0	3.0	GC-O
(E)-2,4-heptadienal	598	0.35	0.03	482		2.0	GC-O
octanal	603	0.40	0.02	501	3.3		MS, GC-O, 1
heptanoic acid	676	0.36	0.03	508		2.0	GC-O
nonanal	703	0.64	0.26	545			MS
E-2-nonanal	754	0.14		566	2.0	2.3	GC-O
2,6-nonadienal	760	0.13		580	4.5	2.3	GC-O, 1
octanoic acid	786	0.87	0.81				MS
decanal	800	0.27					MS
(E)-2-decenal	855	0.15		603	2.0	3.0	MS, 1
nonanoic acid	863	1.5		638	1.8	2.3	GC-O
undecanal	890	0.37		668	2.0	1.8	GC-O
2-undecenal	953	0.40	0.22	684	1.5	2.5	
dodecanal	982	0.13		739	3.5	3.3	MS
				763	5.0	4.0	MS, GC-O
							GC-O, 1
				791	3.0		MS
				828	1.5	1.5	GC-O
							MS
				892	2.5		MS
				930		1.5	MS, GC-O

<sup>1</sup>Retiknaður ethyl ester retention index á DB-5ms háþrúpsúlu

<sup>2</sup>Lyktareinkunn, meðaltal tveggja sýna

<sup>3</sup>Staðfest með MS, massaröf, 1. staðlar, 2. lyktareinkenni, 3. lyktareinkenni og RI heimildir

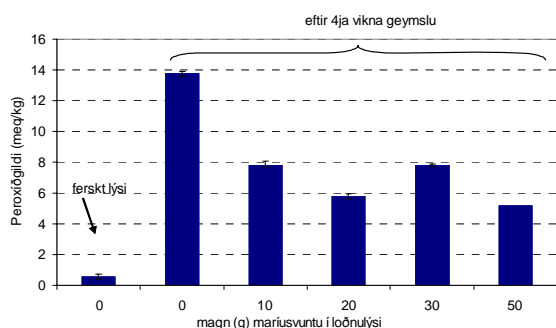
þráahindravirkni íslenskra þörunga Margrét Bragadóttir 2003).

### Lyktarmat á þörungablöndum og lýsi eftir fjögurra vikna geymslu við stofuhita:

1. Loðnulýsi  
þrátt lýsi, málning, (grænt), sætur undirtónn.
2. 10 g maríusvunta í 300 ml loðnulýsi  
Skemmt, ælulykt, væmin, lykt sem minnir á brennisteinsefni (sennilega dímetýl súlfíð), esterar, thioesterar, bútanól, leysalykt, sæt.
3. 20 g maríusvunta í 300 ml loðnulýsi:  
Lýsislykt með yfirgnæfandi þörungalykt, fjörulykt, sætur væminn undirtónn, brennisteins-, hita-, hveralykt. Leysalykt, málningalykt, þráa-, lýsislykt.
4. 30 g maríusvunta í 300 ml loðnulýsi:  
Væmin, fjörulykt, stingandi, ælulykt, miklu minni lýsislykt.
5. 50 g maríusvunta í 300 ml loðnulýsi:  
Hita-, svækjulykt, fiskimjölsverk-smiðjulykt, væmin, velgjuleg lykt (sickenly sweet).

#### 4.3.3 Peroxíðgildi

Ferskt lýsi hefur venjulega peroxíðgildi innan við 10 meq/kg en í þessu tilviki var það 0,55 meq/kg. Þráabragð finnst þegar peroxíðgildið er milli 20-40 meq/kg. Peroxíðgildi er góður mælikvarði til að fylgjast með upphafs-skrefum í oxunarferlum. Niðurstöðurnar sýndu að peroxíðgildi hækkaði minna við geymslu eftir því sem sýnin innihéldu meira magn af maríusvuntu (mynd 4.2.) sem bendir til þess að maríusvuntan hafi andoxunavirkni í lýsinu.



Mynd 4.2. Peroxíðgildi í loðnulýsi og þörungablöndum eftir fjögurra vikna geymslu (meðaltal tveggja mælingar).

## 4.4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR

Niðurstöður gasgreinimælinga sýndu að eftir fjögurra vikna geymslu var um mjög takmarkaða LOX virkni að ræða í blöndu af maríusvuntu og loðnulýsi. Þar sem ekki tókst að mæla upphaflegu sýnin í tilrauninni tókst ekki að sýna fram á LOX virkni í lýsisblöndunni en vitað er að LOX er óstöðugt við geymslu. Greinilegt var að LOX virkni var til staðar við tínslu vegna einkennandi gúrkulyktar sem stafar af 2,6-nonadialal.

Maríusvunta virðist hins vegar hafa andoxunavirkni og magn myndefna þránunar var í mun hærra magni í hreinu loðnulýsi samanborið við þörungablendað loðnulýsi (10 g, 20 g, 30 g, og 50 g í 300 ml lýsi). Hugsanlegt er að minna magn þörunga í lýsi en notað var, sé nægilegt til að koma í veg fyrir oxun, en frekari rannsóknar er þörf til að kanna það. Niðurstöður mælinga á peroxíðgildi ber vel saman við gasgreinimælingar þar sem peroxíðgildi var hæst í hreinu loðnulýsi eftir geymslu. Niðurbrotsefni úr maríusvuntu eru í háum styrk í þörungablönduðu lýsi og benda til þess að um örveruniðurbrot hafi verið að ræða.

Aukinn skilningur á hvarfgangi niðurbrots fitusýra og myndun æskilegra ferskleikaefna og óæskilegra niðurbrotsefna, sem valda þráalykt, gefur möguleika á að notfæra sér þá þekkingu. Annars vegar til að hvetja myndun efna sem hugsanlega hafa aðdráttarafl sem beita fyrir fiska og hins vegar að reyna að koma í veg fyrir óæskilegar breytingar. Bent hefur verið á að hugsanlegt sé að hafa áhrif á lípoxýgenasa með þráavarnarefnum eða hitun til að koma í veg fyrir að fiskur skemmist eins hratt og raun er (Josephson o.fl. 1987). Gildi þekkingar á náttúrulegum þráahindrum felst einkum í auknum möguleikum til þess að hindra þránun og lengja geymsluþol, en ef þráahindravirkni finnst í íslenskum þörungum ýtir það einnig undir uppbyggingu þeirra sem heilsuvara.

## 4.5 HEIMILDIR

AOAC. Official methods of analysis, 15th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, Virginia, 1990.

Cadwallader K.R. 2000. Enzymes and flavor biogenesis in fish. Í: N.F. Haard, N.F., Simpson B.K. (ritstj.). Seafood Enzymes. Marcell Dekker Inc, New York, 366-383.

- Fujimura, T., Kawai, T. 2000. Enzymes and Seaweed Flavor. Í: Haard N.F., B.K. Simpson (ritstj.) Seafood Enzymes. Marcell Dekker Inc, New York, 385-409.
- Gardner, H.W., 2001. Analysis of Lipoyxygenase Activity and Products. Í: Wrolstad o.fl. (ritstj.) Current Protocols in Food Analytical Chemistry C4.2.1-C4.2.16. John Wiley & Sons, Inc.
- German, J.B., Kinsella, J.E. 1985. Lipid oxidation in fish tissue. Enzymatic initiation via lipoyxygenase. J. Agric. Food Chem. 33: 680-683.
- German J.B. Kinsella, J.E. 1986. Hydroperoxide metabolism in trout gill tissue: Effect og glutathione on lipoyxygenase product generated from arachidonic and docosaeonic acid. Biochim. Biophys. Acta 879: 378-387
- German, J.B., Buckner G.B., Kinsella, J.E. 1986. Lipoyxygenase in trout gill tissue acting on arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acidshttp://www.gallerinordlys.dk
- Grosch W. 1993. Detection of Potent Odorants in Foods by Aroma Extract Dilution Analysis. Trends Food Sci. Technol. 4: 68-73.
- Guðrún Ólafsdóttir, Steinke, J.A., Lindsay, R.C. 1985. Quantitative Performance of a Simple Tenax-GC Adsorption Method for Use in the Analysis of Aroma Volatiles. J. Food Sci. 50: 1431-1436.
- Guðrún Ólafsdóttir, Emilia Martinsdóttir, Einar Helgi Jónsson, 1997. Gas sensor and GC measurements of volatile compounds in capelin (*Mallotus villosus*). Í: J.B. Luten, T. Børresen, J. Oehlenschläger (ritstj.) Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality. Amsterdam, Elsevier, 507-520.
- Guðrún Ólafsdóttir, Fleurence, J. 1997. Evaluation of fish freshness using volatile compounds- Classification of volatile compounds in fish. Í: Guðrún Ólafsdóttir o.fl. (ritstj.) Methods to Determine the Freshness of Fish in Research and Industry. International Institute of Refrigeration: Proceedings of the Final meeting of the Concerted Action "Evaluation of Fish Freshness" AIR3 CT94 2283. Nantes Nov 1997, 55-69.
- Gunnar Ólafsson, Margrét Bragadóttir 1995. Screening for antioxidant activity in Icelandic seaweed - preliminary results. Í: G.G. Haraldsson, Sigmundur Guðbjarnarson & G. Lambertsen (ritstj.) 18th Nordic Lipid Symposium; Lipidforum; Bergen 1995, p 107.
- Hattula, T., Granroth, B, 1974. Formation of dimethyl sulphide from S-methylmethionine in onion seedlings (*Allium cepa*). J. Sci. Food Agric. 25: 1517-1521.
- Hirano, T., Zhang, H., Morishita, A., Suzuki T., Shirai, T. 1992. Identification of volatile compounds in ayu fish and its feeds. Nippon Suisan Gakkaishi 58: 547-557.
- Hsieh, R.J, German J.B., Kinsella, J.E. 1988. Lipoyxygenase in fish tissue: some properties of the 12-lipoyxygenase from trout gill. J.Agric. Food Chem. 36: 680-685.
- Hsieh, R.J., Kinsella, J.E. 1989. Lipoyxygenase generation of specific volatile flavor carbonyl compounds in fish tissue. J. Agric. Food Chem. 37: 279-286.
- ISO. 6496 - Animal feeding stuffs - Determination of moisture content, 1st ed.; International Organization for Standardization: Genf, Switzerland, 1983.
- Josephson, D.B., Lindsay R.C., Stuiber, D.C. 1983. Identification of compounds characterizing the aroma of fresh Whitefish (*Coregonus Clupeaformis*). J. Agric. Food Chem. 31: 326-330.
- Josephson, D.B., Lindsay R.C., Stuiber, D.C. 1984a. Variations in the occurrences of enzymically derived volatile aroma compounds in salt- and freshwater fish. J. Agric. Food Chem. 32: 1344-1347.
- Josephson, D.B., Lindsay R.C., Stuiber, D.C. 1984b. Biogenesis of lipid derived volatile aroma compounds in the Emerald Shiner (*Notropis atherinoides*). J. Agric. Food Chem. 32: 1347-1352.
- Josephson, D.B., R.C. Lindsay og Stuiber, D.C. 1985. Volatile compounds characterizing the aroma of fresh Atlantic and Pacific Oysters. J. Food Sci. 50: 5-9.
- Josephson, D. B., Lindsay R.C. 1986. Enzymic Generation of Volatile Aroma Compounds from Fresh Fish. Í: Thomas H. Parliment og Rodney Croteau (ritstj.) Biogeneration of aromas. ACS Symposium Series, 317; American Chemical Society, bls 201-219.
- Josephson, D.B., Lindsay R.C., Stuiber, D.C. 1987. Enzymic hydroperoxide initiated effects in fresh fish. J. Food Sci. 52: 596-600.
- Josephson, D.B., 1991. Seafood. Í: Maarse, H. (ritstj.) Volatile compounds in foods and beverages. Marcel Dekker Inc, New York, 179-202.
- Karahadian, C., Lindsay, R.C. 1989. Evaluation of compounds contributing fishy flavors in fish oils. JAOCS 66: 953.
- Kuo, J.M., Pan,B.S., Zhang, H. German, J.B. 1994. Identification of 12 Lipoyxygenase in the Hemolymph of Tiger Shrimp (*Penaeus Japonicus* Bate). J. Agric. Food Chem. 42: 1620-1623.
- Kuo, J.M., Hwang, A. HsiuHuaHsu og Pan, B.S. 1996. Preliminary Identification of Lipoyxygenase in Algae (*Enteromorpha intesinalis*) for Aroma formation. Food Chem. 44: 2073-2077.
- Kuo, J.M., Hwang, A og Yeh, D.B. 1997. Purification , Substrate Specificity and Products of Ca<sup>+2</sup> Stimulating Lipoyxygenase from Sea Algae. J. Agric. Food Chem. 45: 2055-2060.
- Margrét Bragadóttir. 2003. Áhrif þörunga og lækningajurta á geymsluþol loðnulýsis. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins. Verkefnaskýrsla 29-03.
- Mohri, S, Cho,S.Y., Endo, Y., Fuijimoto, K. 1990. Lipoyxygenase activity in sardine skin. Agric. Biol. Chem. 54: 1889-1891.
- Pan, BS, Kuo JM. 2000. Lipoyxygenases. Í: Haard, N.F., Simpson, B.K. (ritstj.) Seafood Enzymes Utilization on Postharvest Seafood Quality. Marcel Dekker, Inc, New York, 317-336.
- Sigurður Jónsson, Karl Gunnarsson – 1978. Botnþörungar í sjó við Ísland. Greiningarlykill. Hafrannsóknir 15: 1-95.
- Sikorski Z.E. , Kolakowski, E. 2000. Endogenous Enzyme Activity and Seafood Quality: Influence of Chilling, Freezing and Other Environmental Factors. Í: Haard, N.F., Simpson, B.K. (ritstj.) Seafood Enzymes Utilization on Postharvest Seafood Quality. Marcel Dekker, Inc, New York, 451-487.

- Yamaguchi, M., Toyomizu, M. 1984. Acceleration of lipid oxidation in the extract from the skin of fish. *Nippon Suisan Gakkaishi* 50: 2049-2954.
- Zhang, H., Hirano, T. Suzuki T., Shirai, T.1992. Enzymatically generated specific volatile compounds in ayu tissues. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 559-565.
-

## VIÐAUKI A4.1

Tafla A4.1. Fitusýrusamsetning loðnulýsis (n=8)<sup>1</sup>.

	Meðaltal	staðalfrávik
C14:0	6.6	0.55
C16:0	10.7	0.82
C16:1n-7	8.2	0.86
C18:0	1.0	0.10
C18:1 *	13.9	1.24
C18:2n-6	1.0	0.08
C18:3n-3	0.6	0.12
C18:4n-3	2.0	1.46
C20:0	0.2	0.07
C20:1	17.1	1.96
C20:2n-6	0.1	0.04
C20:4n-6	0.2	0.03
C20:3n-3	0.0	0.02
C20:4n-3	0.3	0.09
C20:5n-3	7.4	1.55
C22:1	20.1	1.86
C21:5n-3	0.3	0.07
C22:5n-3	0.5	0.07
C22:6n-3	3.5	1.09
Óþekktar	3.8	0.74
* : samanlagt hlutfall 18:1n-9 og 18:1-7		
SFA	18.7	0.40
MUFA	59.7	5.21
PUFA	17.8	4.75

<sup>1</sup> Mælingar á loðnulýsi framkvæmdar á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins fyrir Félag íslenskra fiskmjölsframleiðenda.

**VIÐAUKI A4.2**

Description of goods:	Deodorized fish oil (H422)		
Quantity:	Drums; 20 x 190 kg ; 3.800 kg		
Production batch no.:	B3057	Producer:	Lýsi h.f.
Packing batch no.:	B3E057	Sampled by:	Producer
Date of production:	05 2003	Seller:	Lýsi h.f., Reykjavík
Expiry date:	05 2006	Destination:	Aarhus
Date of approval:	04-06-2003	Date of shipment:	05-06-2003

Marks..... **AKTERN A/S**  
**ALLERÖD DENMARK**  
**CAPELIN FISH OIL**  
**BATCH NO: B3E057**  
**NET 190 KG, GROSS 207 KG**  
**1 - 20**

	RESULTS:	SPECIFICATIONS:	METHODS:
Free Fatty Acids, %.....	0,17	max 0,25	401
Iodine value .....	122	110 - 140	403
Saponification value.....	182	180 - 190	414
<b>Unsaponifiable matter, %</b>	0,9	max 2,0	416
*****			
Water and mucilage, %.....	<0,15	max 0,15	419
Refractive index at 20°C.....	1,475	1,470 - 1,482	413
Weight, g/ml at 20°C.....	n/a	0,910 - 0,925	415
Cloud point, °C.....	-9,5	max -7	406
Colour, Lovibond (Y=35).....	5,2	max R=4,0	429
Microorganisms.....	conforms	Negative	-

Reykjavík, 10-06-2003

\_\_\_\_\_  
Lýsi h.f. QC laboratory  
Sigrún Víglundsdóttir.

Raunvísindastofnun  
Vor 2002

## **5. kafli**

# **Ensímvirkni próteasa í sjávarfangi**

Bergrós Ingadóttir  
Magnús Már Kristjánsson

---

## 5.1 Inngangur

Markmið verkþáttarins „ensímvírkni próteasa í sjávarfangi“ var að ákvarða almenna próteasavirkni í völdu beituhraefni gagnvart próteinasahvarfefnunum azokaseini og azoalbumini, með vel þekktum aðferðum (Sarath o.fl. 2001). Einnig að greina próteasavirkni í hraefninu gagnvart minni hvarfefnum sem eru sértæk fyrir einstök ensím (t.d. trypsin, chymotrypsin, karboxypeptíðasa og aminópeptíðasa) en erfiðleikar í tengslum við tærleika lausna og kalsíumútfellingar hjá sýnum dregin út við pH 6,0 var ákveðið að falla frá þeirri hugmynd.

## 5.2 Aðferðaþróun

### Útdráttur

Til að kynna vinnubrögðum og aðferðum sem notuð/áðar eru við útdrátt sýna var stuðst við verklegt hefti fyrir Lífefnafræði 3 (Bjarni Ásgeirsson 2001). Til að byrja með var framkvæmdur útdráttur á skúflöngum samkvæmt verklýsingu fyrir æfingu 1. Notast var við Waring Commercial Blender til að tæta sýnin sem voru svo spunnin í Sorvall RC5C skilvindu með SS-34 snúð á 10000 rpm í 15 mín. Við útdrátt sýna var notast við 25 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0 buffer. Eftir fyrsta spuna var gerð felling með 10% ammóníum sulfati og eftir annan spuna 80% felling. Til að hjálpa til við fellinguna fitu var 50mM CaCl<sub>2</sub> bætt í ásamt 10% ammóníum sulfat saltfellingu. Flot var svo fryst í 1,5 mL eppendorfglösum í fljótandi köfnunar-efni og geymt í frysti við -18 °C.

Smokkfisksýni 1 var meðhöndlað á svipaðan hátt. Notaðir voru tveir bufferar, 25 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0 og 0,2 M natríum fosfat, pH 6,0. Hér hentaði Waring blandarinn ekki vel því hnífarnir náðu ekki nægilega vel til sýnisins og því þurfti að bæta buffer út í til að hægt væri að tæta sýnið. Það þykir óæskilegt þar sem það leiðir til froðumyndunar og þ.a.l. afmyndunar próteina. Þar sem sýnið var stærra en áður var ákveðið að nota GSA snúðinn (sýnaglösin eru 250 ml). Sýnin voru spunnin í Sorvall skilvindu á 11000 rpm í a.m.k. 20 mín. Fyrri saltfellingin var nú 15% en seinni sú sama og áður eða 80%. Eftir spuna eftir 80% saltfellingu var botnfallið svo laust í sér að ákveðið var að láta sýnin standa yfir nótt inn í kæliherbergi (3-5 °C) á ís til að leyfa þeim að klumpast (aggregera) betur.

Spuni á 12000 rpm í 30 mín gaf mun betra botnfall í þetta skiptið. Flotið var þó ekki nógu tært og nokkrar flyksur sjáanlegar í flötinu.

Útdráttur á þorskinnyflum var í meginatriðum sá sami og fyrir smokkfisksýni 1. Notaðir voru tveir bufferar við útdrátt, 100 mM Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0 og 0,1 M natríum fosfat, pH 6,0. Töfrasprotinn Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik, Ultra Turrax T25 var notaður til að tæta sýnin og reyndist hann vel. Eftir 15% saltfellingu voru sýnin látin standa yfir nótt í kæliherbergi (3-5 °C) á ís. Sýnin voru spunnin á 15000 rpm í a.m.k. 20 mín. Að láta 15% fellinguna standa yfir nótt og að auka spunahraðann skilaði ekki þeim árangri sem vonast var eftir því botnfallið var enn laust í sér og þá sérstaklega hjá sýninu sem var dregið út við pH 8,0 en það var leðjukennt í botninum og hluti „botnfallsins“ flaut ofaná. Hér gæti lægri CaCl<sub>2</sub> styrkur í sýni (vegna lægri styrks í buffer og að CaCl<sub>2</sub> var ekki bætt í aukalega) haft þau áhrif að fitan falli ekki í botninn heldur fljóti ofaná. (sjá viðauka A5.1).

Á smokkfisksýni 2 var notuð sama aðferð og fyrir þorskinnyflin. Hér kom fram sama vandamál og áður, þ.e. að botnfallið eftir saltfellingu og spuna var ekki nógu þétt og þá sérstaklega hjá sýninu sem dregið var út við pH 8,0. Tekið var eitt aukasýni sem var dregið út við pH 8,0, spunnið einu sinni við 15000 rpm í 20 mín og flotið síað gegnum filterpappír með sogtrekt. Síunin gaf ekki tærara lokaflot en áður og því var ákveðið að sleppa frekari tilraunum með síun.

Eftir þessar þrjár tilraunir með útdrátt á sýnum var ljóst að hann tæki of langan tíma miðað við árangur þ.e. tærleiki flotsins í lokin var ekki nógu góður. En tærleiki flotsins er nauðsynlegur til að hægt sé að mæla virkni í því með sértækum hvarfefnum. Mælingar með próteinasahvarfefnunum azokaseini og azoalbumini krefjast þess hins vegar ekki að flotið sé alveg tært. Því var ákveðið að fækka skrefum í útdrætti og sleppa saltútfellingum og nota eftirfarandi aðferð við útdrátt sýna.

Náð var í lofttæmt pakkað sýni sem geymt hafði verið við -24 °C á Rannsóknarstofnun fiskiðnaðarins og það geymt á ís þar til það var meðhöndlað (nema smokkfisksýni 3, sem var geymt í frysti við -18 °C í 12 daga, en náð var í það á sama tíma og smokkfisksýni 2). Fjögur sýni voru vigtuð beint í 100 ml bikarglös og tætt með Janke & Kunkel töfrasprotanum í 1 mín. og



30 sek. (bikarglas haft á ís á meðan). Eftir tætingu var hluti sýnis viðloðandi töfrasprotann og var pípettuoddur úr plasti notaður til að losa sem mest af sprotanum og bufferinn notaður til að skola restina af með pasteur pípettu. Tveir bufferar voru notaðir við útdrátt, annars vegar 100 mM Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0 og hins vegar 0,1 M natrium fosfat, pH 6,0. Þeim var bætt út í sýnin eftir tætingu, í hlutföllunum 4:1 (buffer:sýni), þ.e. tvö sýni voru dregin út við pH 6,0 og tvö við pH 8,0. Álpappír var settur yfir bikarglösinn og sýnin hrærð á segulhræru inni í kæliherbergi (3-5 °C) í 3 klst á ½ hámarkshraða. Eftir þrjár klst. voru sýnin spunnin í Sorvall RC5C skilvindu með SS-34 snúð, á 18000 rpm í 20 mín við 2 °C. Eftir spuna var flotinu hellt af og rúmmál þess mælt en botnfallinu hent. Fyrir hvert sýni voru 1,2 ml af floti settir í ca 10 stk. 1,5 ml eppendorfglös og þau fryst í fljótandi köfnunarefni. Sýnin voru geymd í frysti við -18 °C þar til mælingar fóru fram.

### 5.3 Mælingar á próteasavirkni

#### Aðferð

Til að ákvarða almenna próteasavirkni gagnvart próteinasahvarfefnunum azoalbumini og azokaseini var notast við eftirfarandi aðferð samkvæmt Sarath o.fl. (2001). Sýnaglös voru tekin úr frysti og þeim komið fyrir í 25°C heitu BIOBLOCK-SCIENTIFIC, polystat 8633 hitabaði og leyft að jafna sig í 10 mín. Á meðan voru 250 µL af próteinasahvarfefni (2% w/v azokasein eða azoalbumin) pípettaðir með 1000 µL Finn pípettu í 1,5 mL eppendorftilraunaglös og þeim komið fyrir í 25°C heitu hitabaði ásamt sýnunum. Hvarfinu var komið af stað með því að pípetta 150 µL af sýni út í hvarfefnið og blanda því varlega saman með því að hvolfa glasinu nokkrum sinnum (skeiðklukka sett í gang um leið og sýni var sett í). Hvarfið var látið ganga í fyrirfram ákveðinn tíma (0, 5, 10, 15, 20, 25 og 30 mín og í sumum tilfellum 35 til 50 mín) í hitabaðinu við 25°C þar til hvarfið var stöðvað með 1,2 ml af 10% TCA (Trichloroacetic acid). Blanksýni var útbúið með því að setja 150 µL af viðeigandi buffer (sami buffer og notaður var við útdrátt) í stað sýnis. Fyrir núllpunktsýni voru 1,2 ml af 10% TCA settir út í áður en 150 µL af sýni var bætt í (hvarf gat ekki átt sér stað). Eftir að hvarf hafði verið stöðvað voru sýnaglösunum leyft að standa í u.þ.b. 15 mín. Sýnin voru síðan spunnin í

borðskilvindu v/8000g í a.m.k. 5 mín (smokkfisksýni 3, kolmurni, sandsíli og loðna spunnin í 10 mín). Eftir spuna voru 1,2 ml teknir úr eppendorfglösunum og færðir yfir í lítill tilraunaglös sem innihéldu 1,4 ml af 1,0 M NaOH (til að framkalla lit). Lausninni var hellt í plastkúvettu og gleypnin mæld við 440 nm með Cary 50 Bio Spectrophotometer.

#### Lausnir próteinhvarfefna

Azoalbumin var leyst upp í þremur mismunandi bufferum; 100 mM Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0; 0,1 M natrium-fosfat buffer, pH 6,0 og natrium-acetat buffer, pH 4,0. Erfiðlega gekk að leysa azoalbuminið upp í natrium-acetat buffernum við pH 4,0 og var ástæðan líklega sú að þar erum við mjög nálægt jafnhleðslupunkti próteinsins og þar er leysnin minnst. Því var fallið frá hugmyndum um að mæla sýni dregin út við pH 6,0 með azoalbumini leyst upp í buffer pH 4,0. Sýni dregin út við pH 6,0 voru mæld með pH 6,0 lausninni og sýni dregin út við pH 8,0 voru mæld með pH 8,0 lausninni. Azokasein var aðeins leyst upp buffer 100 mM Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0 og því voru sýni dregin út við pH 6,0 og 8,0 mæld með sömu lausninni. Azokasein er óleysanlegt við pH 6,0.

### 5.4. Sértek hvarfefni (Synthetic substrates)

Til að skoða próteasavirkni í hráefninu gagnvart sértækum hvarfefnum var byrjað á því að útbúa 25 mM stofnlausnir af sértæku hvarfefnunum N-benzoyl-Arg-p nitroanilide (BAPna) fyrir trypsin, N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (SAAPF-pna) fyrir chymotrypsin og N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (SAAAPna) fyrir elastasa. Hvarfefnislausnir 0,5 og 1,0 mM voru útbúnar með því að þynna 25 mM stofnlausnir með 100 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,6. Aukning í gleypni var mæld við 410 nm sem fall af tíma og virkni ákvörðuð í ein/ml (Magnús M. Kristjánsson 2001).

Við mælingar með sértækum hvarfefnum kom m.a. í ljós að þegar sýnin sem voru dregin út við pH 6,0 var blandað saman við sértækt hvarfefni varð lausnin svo mött að ekki var hægt að mæla hana (óeðlilega háar upphafsgleypnitölur). Ástæðan var sú að sýnið var dregið út með buffer sem innihélt fosfat og hvarfefnið var þynnt með buffer sem innihélt kalsíum og því féll út kalsíumfosfat þegar þeim var blandað

saman. Einnig kom í ljós við þróun aðferðar á útdrætti að laust botnfal var vandamál, sem varð til þess að erfitt reyndist á fá tærar lausnir. Erfiðleikar í tengslum við tærleika lausna, kalsíumútfellingar hjá sýnum dregin út við pH 6,0 og tímaskortur urðu til þess að ákveðið var að falla frá þeim hugmyndum að framkvæma mælingar með sértækum hvarfefnum á þessu stigi.

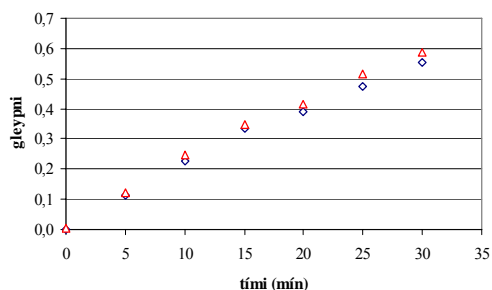
## 5.5. Niðurstöður

### Tímamælingar fyrir almenna próteasavirkni

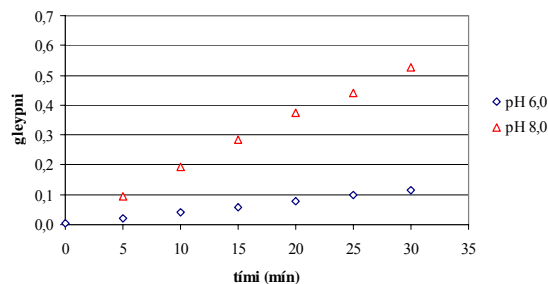
Fyrir hvert sýni (skúflangar, smokkfisksýni 1, þorskinnyfli) voru tekin prufusýni þar sem hvarfi ensíms og hvarfefnis var leyft að ganga í fyrirfram ákveðinn tíma, yfirleitt 15 og 30 mín. Gleypni sýnanna var svo mæld v/440 nm samkvæmt aðferð Sarath et.al. 2001 og ef hún var langt yfir 1 var sýnið þynnt hæfilega mikið (5x eða 10x) og tímamælingar framkvæmdar. Þegar hæfilegri gleypni var náð (undir 1) voru gerðar tímamælingar fyrir bæði próteinasahvarfefnin (azokasein og azoalbumin) þar sem hvarf var stöðvað eftir 0, 5, 10, 15, 20, 25 og 30 mín og gleypni mæld við 440 nm samkvæmt sömu aðferð. Tilgangurinn með tímamælingunum var að kanna hvort mælingar við 15 og 30 mín. féllu á línulegan hluta ferils sem sýnir gleypni sem fall af tíma.

Á myndum 5.1 og 5.2 má sjá dæmi um tímamælingar fyrir þorskinnyfli, annars vegar með azokaseini (mynd 5.1) og hins vegar með azoalbumini (mynd 5.2).

Á myndum 5.1 og 5.2 má sjá að eftir 30 mín er ferillinn enn línulegur og því er hægt að gera frekari mælingar við þennan tíma til að ákvarða fjölda eininga próteasa á hvert gramm sýnis.



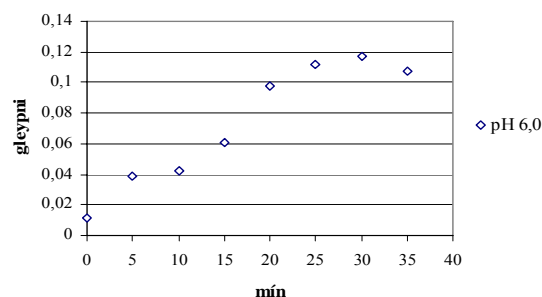
Mynd 5.1. Próteasavirkni í þorskinnyflum mæld gagnvart 2% azokaseini. Sýni voru dregin út við pH 6,0 og 8,0. Sýni voru þynnt 5x fyrir mælingar á almennri próteasavirkni.



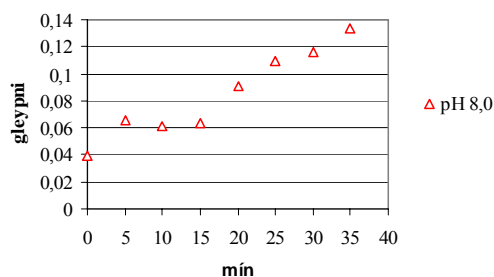
Mynd 5.2. Próteasavirkni í þorskinnyflum mæld gagnvart 2% azoalbumini. Sýni voru dregin út við pH 6,0 og 8,0. Sýni voru þynnt 5x fyrir mælingar á almennri próteasavirkni samkvæmt kafla 5.2.1.

Eftir mælingar með próteinasahvarfefnunum azokaseini og azoalbumini á skúflöngum, smokkfisksýni 1 og þorskinnyflum var ljóst og að mun auðveldara var að vinna með azoalbumin en azokasein. Azokaseinið myndaði þráðlaga útfellingar sem áttu til að loða við hliðar eppendorfglasanna eða fljóta lausar um í lausninni í stað þess að setjast í botninn. Lausar þráðlaga útfellingar auka líkur á skekkju í mælingum og sérstaklega hjá sýnum með lága virkni því ef þráðlaga útfellingarnar slæðast með eykst gleypni lausnarinnar. Því var tekin sú ákvörðun að vinna aðallega með 2% azoalbumin við ákvörðun á almennri próteasavirkni fyrir smokkfisksýni 2, smokkfisksýni 3, kolumunna, sandsíli og haustloðnu.

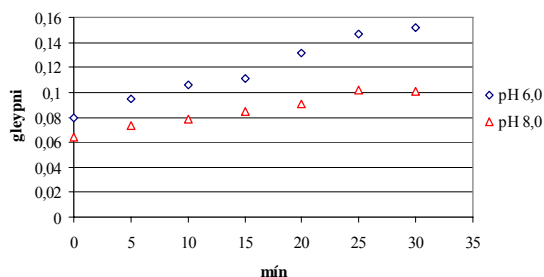
Á myndum 5.3 og 5.4 má sjá dæmi um tímamælingar fyrir smokkfisksýni 2 þar sem almennar próteasamælingar voru gerðar gagnvart 2% azoalbumini. Þar sést að gleypnin mælist mun lægri en fyrir þorskinnyflin og erfiðara er að meta hvort ferillinn sé línulegur eftir 30 mín. En miðað við þann styrk af



Mynd 5.3. Almenn próteasavirkni fyrir smokkfisksýni 2 mæld gagnvart 2% azoalbumini. Sýni var dregið út við pH 6,0. Sýni voru óþynnt við mælingar á almennri próteasavirkni.



Mynd 5.4. Almenn próteasavirkni fyrir smokkfisksýni 2 mæld gagnvart 2% azoalbumini. Sýni var dregið út við pH 8,0.

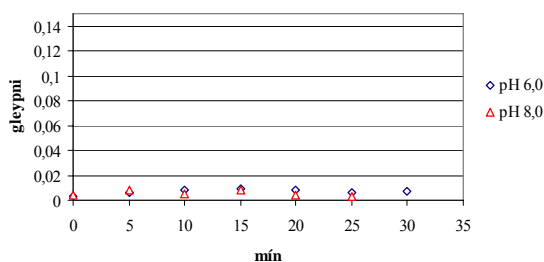


Mynd 5.5. Almenn próteasavirkni í smokkfisksýni 3 gagnvart 2% azoalbumini. Sýni voru dregin út við pH 6,0 og pH 8,0.

hvarfefni sem unnið var með í hlutfalli við ensímstyrk ætti að vera í lagi að gera frekari mælingar við 30 mín með 2% azoalbumini.

### Próteasavirkni í beituhraefni

Fjöldi eininga próteasa í hverju grammi sýnis voru reiknaðar út fyrir þorskinnyfli, smokkfisksýni 2, smokkfisksýni 3, kolmunna, sandsili og haustloðnu. Við útreikninga á próteasavirkni var notast við niðurstöður gleypnimælinga fyrir



Mynd 5.6. Almenn próteasavirkni í kolmunna gagnvart 2% azoalbumini. Sýni voru dregin út við pH 6,0 og pH 8,0.

almenna próteasavirkni gagnvart 2% azoalbumini eftir hvarf í 30 mín. (meðaltal af fjórsýni).

Í útreikningum fyrir þorskinnyfli og smokkfisksýni 2 var tekið tillit til heimta í útdrætti. Fyrir þessi sýni var útdráttur framkvæmdur í nokkrum skrefum með saltútfellingum og þá er viðbúið að próteasar tapist á leiðinni. Til að finna út heimtur útdrattarins var upphafssýni sem var tekið eftir fyrsta spuna (viðauki A5.1) mælt í 30 mín. gagnvart 2% azoalbumini (þrísýni). Fyrir þetta sýni gáfum við okkur að heimtur væru 100%. Mælingar á lokasýni voru gerðar á sama hátt og þær notaðar til að ákvarða heimtur útdrattarins þ.e. hversu hátt hlutfall próteasa skilaði sér úr upphafssýni í lokasýnið. (viðauki A5.2)

Í töflu 5.1 má sjá % heimtur fyrir útdrátt á þorskinnyflum og smokkfisksýni 2. Útdráttur við pH 6,0 gefur í báðum tilfellum lægri heimtur en útdráttur við pH 8,0.

Í töflu 5.2 má svo sjá fjölda eininga próteasa í hverju grammi af sýni þar sem niðurstöður hafa verið leiðréttar með tilliti til heimta í útdrætti. Þar má sjá að bæði sýnin gefa lægri gleypnigildi fyrir útdrátt við pH 6,0 en við pH 8,0. Greinilegt er að virkni í þorskinnyflum er töluvert meiri en í smokkfisksýni 2.

Útdrátturinn sem var notaður fyrir þorskinnyflin og smokkfisksýni 2 þótti taka of langan tíma miðað að lokasýnin voru ekki nógu tær til

Tafla 5.1. Heimtur fyrir útdrátt á smokkfisksýni 2 og þorskinnyflum.

Sýni	Heimtur	
	pH 6,0	pH 8,0
Smokkfisksýni 2	54%	76%
Þorskinnyfli	62%	87%

Heimtur voru reiknaðar út frá mælingum á almennri próteasavirkni gagnvart 2% azoalbumini í 30 mín.

Tafla 5.2. Fjöldi eininga próteasa í hverju grammi af sýni m.t.t. heimta útdrattarins.

Sýni	Fjöldi eininga / g sýni	
	pH 6,0	pH 8,0
Smokkfisksýni 2	2,9	3,6
Þorskinnyfli	7,9	39,5

Mælingar á almennri próteasavirkni voru gerðar gagnvart 2% azoalbumini í 30 mín. Dæmi um útreikninga má finna í viðauka. Ein ensímeining er skilgreind sem það magn ensíms sem breytir gleyfni hvarfefsins í lausninni um 1 gleyfnieiningu (1 AU) á 30 mín.

Tafla 5.3. Próteasavirkni í hverju grammi sýnis. Sýni voru dregin út við pH 6,0 og 8,0.

Sýni	Fjöldi eininga / g sýni	
	pH 6,0	pH 8,0
Smokkfisksýni 3	4,08	3,89
Kolmunni	0,07	0,27
Sandsíli	0,16	0,73
Haustloðna	0,16	0,75

Mælingar á almennri próteasavirkni voru gerðar gagnvart 2% azoalbumini í 30 mín og fjöldi eininga í grammi sýnis reiknað út frá þeim mælingum. (viðauki A5.3).

að hægt væri að framkvæma mælingar með sértækum hvarfefnum. Því var ákveðið að fækka skrefum í útdrætti fyrir smokkfisksýni 3, kolmunna, sandsíli og haustloðnu þ.a. sýnin voru aðeins spunnin einu sinni og saltfellingum sleppt. Útreikningar á próteasavirkni fyrir þessi sýni voru mun einfaldari því ekki þurfti að taka tillit til heimta aðferðarinnar. Því var fjöldi eininga próteasa í grammi einungis reiknaðar út frá mælingum gerðum á lokafloði og þar voru mælingar gerðar eins og áður gagnvart 2% azoalbumini í 30 mín. (viðauki A5.3).

Þegar tafla 5.3 er skoðuð kemur í ljós að af þeim sýnum sem voru dregin út með styttri útdrættinum gaf smokkfisksýni 3 hæstu virknina (virknin lág miðað við þorskinnyflin). Kolmunni, sandsíli og haustloðna hins vegar nánast enga virkni.

Sýni sem dregin voru út við pH 8,0 gáfu í öllum tilfellum nema fyrir smokkfisksýni 3 hærri niðurstöður en sýni sem voru dregin út við pH 6,0. Þessi munur gæti stafað af því að við pH 6,0 sé hluti ensímanna á óvirku formi (zymogen) og þ.a.l. ekki mælanleg með 2% azoalbumini við pH 6,0. Nielsen (1990) sýndi fram á að virkni chymotrypsins væri hverfandi eftir útdrátt úr silungainnyflum við pH 6,0 en með því að inkúbera sýnið í buffer við pH 7,8 jókst virknin jafnt og þétt. Hann ályktaði því sem svo að chymotrypsinið væri á óvirku formi við pH 6,0 en virkjaðist við inkuberingu í buffernum við pH 7,8.

Þegar niðurstöður mælinga fyrir almenna próteasavirkni eru skoðaðar er nokkuð ljóst að þorskinnyflin gefa áberandi hæstu virknina. Virkni þorskinnyfla er ágætlega þekkt og því kemur þessi mikla virkni ekki á óvart. Smokkfisksýnin gáfu lága virkni en þó aðeins hærri en virknimælingar fyrir kolmunna,

sandsíli og haustloðnu sem gáfu nánast enga virkni. Þessi lága virkni kolmunna, sandsílis og haustloðnu kom nokkuð á óvart þar sem heill fiskur (með meltingarfærum o.s.frv.) var notaður við undirbúning á sýnum. Enn er af nógu að taka við frekari mælingar og væri m.a. áhugavert að gera mælingar á sumarloðnu til samanburðar við haustloðnuna.

## 5.6. Heimildaskrá

- Bjarni Ásgeirsson, 2001 Verklegrar æfingar í lífefnafræði fyrir námskeiðið Lífefnafræði 3. Háskóli Íslands. Ísland. Bls 6-16.
- Magnús Már Kristjánsson 2001. Proteolytic Enzymes. Activity Measurements of Proteinases Using Synthetic Substrates. Í: Wrolstad, R.E. (ritstj.) *Current Protocols In Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. New York. Bls. C2.1.1–C2.1.7.
- Nielsen, H.H. 1990. *Isolering af proteolytiske enzymer fra regnbueorredindvolde*. Hovedopgave við Den Kongelige Veterinær og Landbohøjskole. Denmark.
- Sarath, G., Zeece, M.G., Penheiter, A.R. 2001. Protease assay methods. Í: Proteolytic enzymes: a practical approach. Í: Beynon, R., Bond, J.S. (ritstj.) Oxford University Press. New York, bls 45-76.

## Viðauki A5.1. Útdráttur á þorskinnyflum.

Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik. Ultra Turrax T25	<b>Ca. 10g af þorskinnyflum mixuð</b>	Hraði 8000 (gulur) 1 mín og 30 sek
	↓	
	<b>Buffer bætt í 4:1 (buffer:sýni)</b>	100 mM Tris, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 8,0 0,1 M natrium-fosfat, pH 6,0
	↓	
Með segulhræru	<b>Hrært í 3 ½ klst</b>	½ hámarkshraði
	↓	
Snúður: SS-34	<b>Spunnið</b>	15000 rpm 20 mín 2 °C
Sýni 1A og 1B tekin	↓	
	<b>Flot tekið frá</b>	Rúmmál mælt
	↓	
	<b>15% felling m/ ammóníumsúlfati</b>	Blandað vel
	↓	
	<b>Látið standa yfir nótt</b>	
	↓	
SS-34	<b>Spunnið</b>	15000 rpm 20 mín + 20 mín 2 °C
Tekin sýni 2A og 2B	↓	
	<b>Flot tekið frá</b>	Rúmmál mælt
Bontfalli hent	↓	
	<b>80% felling m/ ammóníum súlfati</b>	Blandað vel
	↓	
SS-34	<b>Spunnið</b>	15000 rpm 20 mín 2 °C
	↓	
	<b>Floti hellt af og <u>botnfall</u> <u>geymt</u></b>	12000 rpm 30 mín 2 °C
	↓	
	<b>Botnfall leyst upp</b>	100 mM Tris, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 8,0 0,1 M natrium-fosfat, pH 6,0
Rúmmál mælt	↓	
Geymt v/ -18 °C	<b>Fryst í N<sub>2</sub> (l)</b>	

## Viðauki A5.2. Heimtur

Þorskinnyfli og smokkfisksýni voru dregin út við pH 6,0 og pH 8,0 samkvæmt aðferð sem lýst var í kafla 5.2.1. Í útdrættinum voru tekin sýni á þremur stöðum, eftir fyrsta spuna (fyrir 15% saltfellingu), eftir annan spuna (eftir 15% saltfellingu) og eftir þriðja spuna (eftir 80% saltfellingu). Botnfallið eftir þriðja spuna var leyst upp í viðeigandi buffer og skilgreint sem lokasýni (endurleyst botnfall). Til að ákvarða heimtur útdráttarins voru gerðar mælingar á almennri próteasavirkni gagnvart 2% azoalbumini í 30 mín á sýninu sem var tekið eftir fyrsta spuna (tafla B, sýni 1) og á lokasýni (tafla A). Út frá þessum niðurstöðum var hægt að meta heimtur aðferðarinnar.

Tafla A. Próteasavirkni í þorskinnyflum (lokasýnum) sem dregin voru út við pH 6,0. Mælingar á próteasavirkni voru gerðar gagnvart 2% azoalbumin í 30 mín.

sýni	pH 6,0
	0,1035
	0,1070
	0,1080
	0,1047
<b>Meðaltal</b>	<b>0,1058</b>
<b>Staðalfrávik</b>	0,0021

Tafla B. Mæling á próteasavirkni sýna sem voru tekin á þremur stöðum í útdrætti á þorskinnyflum við pH 6,0. Mælingar á próteasavirkni voru gerðar gagnvart 2% azoalbumin í 30 mín.

Sýni	1	2	3
	0,0500	0,0520	0,0093
	0,0517	0,0512	0,0089
	0,0491	0,0456	0,0088
<b>Meðaltal</b>	<b>0,0503</b>	<b>0,0496</b>	<b>0,0090</b>
<b>Staðalfrávik</b>	0,0013	0,0035	0,0003

- 1: sýni tekið eftir fyrsta spuna
- 2: sýni tekið eftir annan spuna (15% mettn ammóníumsúlfat)
- 3: sýni tekið úr floti eftir síðasta spuna. (80% mettn ammóníumsúlfats)

Rúmmál e. fyrsta spuna (fyrir 15% saltfellingu): 48 mL  
Rúmmál á endurleystu botnfalli : 14 mL

Útreikningar:

$$(0,1058 \text{ ein}/150\mu\text{L}) * 14\text{mL} * 1000\mu\text{L} / \text{mL} = 9,9 \text{ einingar}$$

$$(0,0503 \text{ ein}/150\mu\text{L}) * 48\text{mL} * 1000\mu\text{L} / \text{mL} = 16 \text{ einingar}$$

$$9,9 / 16 = \underline{62\%} \Rightarrow \text{Heimtur útdráttarins eru því } 62\%$$

### Almenn próteasavirkni m.t.t. heimta

$$0,1058 \text{ einingar} / 150\mu\text{L} = 7,05 \cdot 10^{-4} \text{ einingar} / \mu\text{L}$$

(í þynntu sýni)

$$7,05 \cdot 10^{-4} \text{ einingar} / \mu\text{L} * 5 = 3,53 \cdot 10^{-3} \text{ einingar} / \mu\text{L}$$

(í óþynntu sýni)

$$3,53 \cdot 10^{-3} \text{ einingar} / \mu\text{L} * 14 \text{ mL} * 1000 \mu\text{L} / \text{mL} = 49 \text{ einingar (í heildar mL fjölda)}$$

$$49 \text{ einingar} / 10,0792 \text{ g} = 4,9 \text{ einingar} / \text{g sýni}$$

$$4,9 / 0,62 = \underline{7,9} \text{ einingar} / \text{g sýni m.t.t. heimta}$$

### Viðauki A5.3. Niðurstöður fyrir útreikninga á próteasavirkni fyrir smokkfisksýni 3, kolmunna, sandsíli og haustloðnu.

#### Smokkfisksýni 3

Sýni	ein / uL	ein	ein / g sýni	Meðaltal
pH 6,0 (A1)	0,000963	29,86	4,01	4,08
pH 6,0 (A2)	0,000949	29,43	4,15	
pH 8,0 (B1)	0,0007	27,69	3,95	3,89
pH 8,0 (B2)	0,0008	27,07	3,84	

Dæmi um útreikninga fyrir smokkfisksýni 3 (A1):

Meðaltal gleypnimælinga μL sýni notaðir í hvarf	=	einingar / μL
--	---	---------------

(einingar / μL) · (heildarrúmmál flots e. spinningu í  
μL) = einingar

einingar g sýni í upphafi	=	einingar / g sýni
------------------------------	---	-------------------

Útreikningar:

0,1445	=	9,56 · 10 <sup>-4</sup> einingar / μL
150 μL		

9,56 · 10<sup>-4</sup> einingar/μL · 31000 μL = 29,86 einingar

29,86 ein	=	4,01 einingar / g sýni
7,444 g		

Sama gert við A2, meðaltal tekið af A1 og A2.

#### Kolmunni

Sýni	ein / uL	ein	ein / g sýni	Meðaltal
pH 6,0 (A1)	1,41667E-05	0,38	0,06	0,07
pH 6,0 (A2)	1,83333E-05	0,48	0,08	
pH 8,0 (B1)	0,0001	2,31	0,38	0,27
pH 8,0 (B2)	0,0000	1,04	0,17	

#### Sandsíli

Sýni	ein / uL	ein	ein / g sýni	Meðaltal
pH 6,0 (A1)	4,83333E-05	1,31	0,22	0,16
pH 6,0 (A2)	2,26667E-05	0,61	0,10	
pH 8,0 (B1)	0,0002	4,76	0,79	0,73
pH 8,0 (B2)	0,0002	4,00	0,67	

#### Haustloðna

Sýni	ein / uL	ein	ein / g sýni	Meðaltal
pH 6,0 (A1)	4,83333E-05	1,26	0,21	0,16
pH 6,0 (A2)	2,26667E-05	0,61	0,10	
PH8,0 (B1)	0,0002	4,51	0,75	0,75
pH 8,0 (B2)	0,0002	4,48	0,75	

## Viðauki A5.4. Um sýnin.

Hér má finna samantekt á helstu upplýsingum um sýnin. Vigtun í upphafi, lokarúmmál og meðaltal mælinga á almennri próteasavirkni gagnvart 2% azoalbumini í 30 mín. Lokarúmmál fyrir þorskinnyfli og smokkfisksýni 2 er skilgreint sem rúmmál á endurleystu botnfalli. Lokarúmmál fyrir smokkfisksýni 3, kolmunna, sandsíli og loðnu er skilgreint sem rúmmál á floti eftir fyrsta og eina spunann í útdrættinum.

### Loðna

Sýni	Þyngd	Loka-rúmmál	Meðaltal gleyfnimælinga
pH 6 (A1)	6,047 g	26,0 mL	0,0073
pH 6 (A2)	5,989 g	27,0 mL	0,0034
pH 8 (B1)	6,009 g	26,5 mL	0,0255
pH 8 (B2)	6,004 g	28,0 mL	0,0240

### Sandsíli

Sýni	Þyngd	Loka-rúmmál	Meðaltal gleyfnimælinga
pH 6 (A1)	5,985 g	27,0 mL	0,0073
pH 6 (A2)	5,973 g	27,0 mL	0,0034
pH 8 (B1)	6,055 g	28,0 mL	0,0255
pH 8 (B2)	6,002 g	25,0 mL	0,0240

### Kolmunni

Sýni	Þyngd	Loka-rúmmál	Meðaltal gleyfnimælinga
pH 6 (A1)	6,220 g	27,0 mL	0,0021
pH 6 (A2)	6,230 g	26,0 mL	0,0028
pH 8 (B1)	6,159 g	26,5 mL	0,0131
pH 8 (B2)	6,194 g	27,0 mL	0,0058

### Smokkfisksýni 3

Sýni	Þyngd	Loka-rúmmál	Meðaltal gleyfnimælinga
pH 6 (A1)	7,444 g	31,0 mL	0,1445
pH 6 (A2)	7,086 g	31,0 mL	0,1424
pH 8 (B1)	7,018 g	38,0 mL	0,1093
pH 8 (B2)	7,057 g	32,0 mL	0,1269

### Þorskinnyfli

Sýni	Þyngd	Loka-rúmmál	Meðaltal gleyfnimælinga
pH 6,0	10,0792 g	14,0 mL	0,1058
pH 8,0	10,0192 g	20,0 mL	0,5149

### Smokkfisksýni 2

Sýni	Þyngd	Loka-rúmmál	Meðaltal gleyfnimælinga
pH 6,0	4,978 g	14,0 mL	0,1184
pH 8,0	4,995 g	20,0 mL	0,0857



## Viðauki A5.5. Almenn próteasavirkni mæld gagnvart 2% azoalbumini í 30 mín.

Sýni voru dregin út við pH 6,0 og pH 8,0 samkvæmt aðferðum í kafla 2.1. Lokasýni voru mæld gagnvart 2% azoalbumini í 30 mín. Lokasýni fyrir þorskinnyfli og smokkfisksýni 2 eru skilgreind sem endurleyst botnfall en lokasýni fyrir smokkfisksýni 3, kolmunna, sandsíli og loðnu eru skilgreind sem flotið eftir fyrsta og eina spuna í útdrætti.

### Þorskinnyfli

sýni	pH 6,0	pH 8,0
	0,4764	0,6074
	0,5252	0,6244
	0,4879	0,6164
	0,5117	0,6256
<b>Meðaltal</b>	0,5003	0,6185
<b>Staðalfrávik</b>	0,0222	0,0084

### Smokkfisksýni 2

Sýni	pH 6,0	pH 8,0
	0,1208	0,0736
	0,1208	0,0852
	0,1108	0,0900
	0,1212	0,0941
<b>Meðaltal</b>	0,1184	0,0857
<b>Staðalfrávik</b>	0,0051	0,0089

### Smokkfisksýni 3

	pH 6,0 (A1)	pH 6,0 (A2)	pH 8,0 (B1)	pH 8,0 (B2)
	0,1375	0,1348	0,1017	0,1269
	0,1476	0,1437	0,1169	0,1269
	0,1490	0,1392	0,1126	0,1263
	0,1438	0,1519	0,1060	0,1274
<b>Meðaltal</b>	0,1445	0,1424	0,1093	0,1269
<b>Staðalfrávik</b>	0,0051	0,0073	0,0068	0,0004

### Kolmunni

	pH 6,0 (A1)	pH 6,0 (A2)	pH 8,0 (B1)	pH 8,0 (B2)
	0,0022	0,0024	0,0117	0,0029
	0,0027	0,0026	0,0495	0,0042
	0,0012	0,0022	0,0080	0,0045
	0,0024	0,0038	0,0196	0,0115
<b>Meðaltal</b>	0,0021	0,0028	0,0222	0,0058
<b>Staðalfrávik</b>	0,0007	0,0007	0,0188	0,0039

### Sandsíli

	pH 6,0 (A1)	pH 6,0 (A2)	pH 8,0 (B1)	pH 8,0 (B2)
	0,0216	0,0371	0,0543	0,0611
	0,0272	0,0373	0,0502	0,0658
	0,0257	0,0363	0,0535	0,0605
	0,0276	0,0368	0,0548	0,0638
<b>Meðaltal</b>	0,0255	0,0369	0,0532	0,0628
<b>Staðalfrávik</b>	0,0027	0,0004	0,0021	0,0025

### Loðna

	pH 6,0 (A1)	pH 6,0 (A2)	pH 8,0 (B1)	pH 8,0 (B2)
	0,0060	0,0047	0,0332	0,0273
	0,0067	0,0023	0,0232	0,0239
	0,0094	0,0037	0,0232	0,0219
	0,0069	0,0029	0,0224	0,0228
<b>Meðaltal</b>	0,0073	0,0034	0,0255	0,0240
<b>Staðalfrávik</b>	0,0015	0,0010	0,0051	0,0024



## 6. kafli

# Prófun á útstreymi og virkni beitu

Soffia Vala Tryggvadóttir

Rósa Jónsdóttir

Prándur Helgason

Sveinbjörn Jónsson

---

## 6.1 Inngangur

Í beiturannsóknum bæði erlendum og innlendum, hefur verið vandamál að halda beitunni saman svo hægt sé að krækja í hana og að hún endist nægilega lengi í sjónum. Reyndar hafa verið alls konar grisjuefni sem umbúðir fyrir beituhráefni og bindiefni til að beitan haldist saman án umbúða (Lökkeborg, 1987). Illa hefur gengið að því leyti að yfirleitt hefur beitan leystst of fljótt upp eða losnað af krókunum. Þegar notuð hafa verið bindiefni þá verður útstreymið oft of lítið því að bindiefni getur hindrað útstreymi og gefið frá sér fráhrindandi efni.

Í EU verkefninu „Þróun beitu til línuveiða“ var þróuð ný aðferð og tækjabúnaður smíðaður til að framleiða beitu (pokabeitu) úr frystu hráefni (Soffía Vala Tryggvadóttir o.fl. 2002). Markmið þessa hluta verkefnisins um aðdráttar-afl beitu var að meta útstreymi frírra aminosýra og lyktarefna frá pokabeitunni. Útbúið var einfalt módelkerfi til að meta útstreymi frá beitunni, hún sett í saltlausn (sjávarselta 3%) og styrkur af niðurbrotsefnum í vatnsfasa mældur eftir mislangan tíma til að meta útstreymið frá beitunni. Einnig voru gerðar frumathuganir á virkni beitunnar við hefðbundnar línuveiðar.

## 6.2 Efni og aðferðir

Mældur var uppleysanleiki og útstreymi efna frá hefðbundnu beituhráefni í pokum og bitum. Tvær tegundir af beitu voru útbúnar úr sandsíli (*Ammodytes tobianus*) og smokkfiski (*Illus argentinus*). Beiturnar voru í saltlausn (sjávarselta 3%) og styrkur af niðurbrotsefnum í vatnsfasa mældur eftir mislangan tíma til að meta útstreymið frá beitunni. Hitastig var valið samkvæmt upplýsingum frá Hafrannsóknastofnuninni um meðalhita sjávar umhverfis landið (Tafla 6.1). Þannig fengust upplýsingar um hvenær mesta útstreymið er frá beitunni og hversu lengi það varir. Einnig voru gerðar prófanir á virkni beitunnar við hefðbundnar línuveiðar.

### Undirbúningur sýna

Frosin beita (5x10g beita/sýni) var sett á öngul og dýft ofan í 500 ml af saltvatni (3% NaCl) í plastflöskum (sjá mynd 6.1). Flöskunum var komið fyrir í hristibaði við 6°C (shaking bath SB-16, Dip cooler RU-200 og

Tafla 6.1. Hitastig sjávar á mismunandi veiðisvæðum og árstíma umhverfis Ísland.

Staðsetning	Árstíð	Hitastigsbil (°C)
Norðurströnd Íslands	Vetur	1 - 4
Norðurströnd Íslands	Sumar	6 - 8
Suðurströnd Íslands	Vetur	2 - 6
Suðurströnd Íslands	Sumar	8 - 12

(Heimild: Hafrannsóknastofnunin)



Mynd 6.1. Vatnslausnir eftir 240 mín dorg (frá vinstri: sandsíli í poka, smokkfiskur í poka smokkfiskur í bitum. Í pastflöskunum eru samsvarandi lausnir af beitunum.

Tempette Junior TE-8j frá Techne, Duxford Cambridge, England) í fjórar klukkustundir. Með þessu móti var reynt að líkja eftir hreyfingu beitunnar í sjó.

### Mælingar á fríum aminosýrum

*Undirbúningur sýna:* Við mælingar á fríum aminosýrum voru 2-3 g sýnis vegin í skilvindu-glös og 20 ml af saltsýru (0.1 N) og 1 ml af innri staðli bætt út í (norvaline). Eftir að sýnið hafði verið gert einsleitt með Ultra-Turrax homogenizer í eina mínútu var það sett í skilvindu við 15000 rev/min í 20 mínútur. Einn ml af floti var þynntur með eimuðu vatni fyrir aminosýrugreiningu.

*Tæki:* HPLC Hewlett Packard (HP) 1050 series (gradient) pumping system, HP autosampler, Varian 9070 fluorescence detector, Croco-cil columnheater and HP Chemstation datahandling system. The column (150x4.6 mm) from Hichrom, Reading UK, is packed with 3µm Spherisorb ODS-2 material and suitable guard columns of same packing material used.

*Afleiður og aðskilnaður með HPLC:* Amínósýruafleiður eru útbúnar, með OPA (o-phthalaldehyde) sem derivatization reagent, í sjálfvirka sýnaskammtaranum. Hvert sýni er keyrt þrisvar sinnum og fyrir hvert sýni er staðalblanda keyrð. A.m.k. einn blankur er keyrður. Amínósýruafleiðurnar eru aðskildar með „reversed phase chromatography using binary gradient elution“ við 25°C.

Solvent A: acetate/methanol/THF(tetrahydrofuran) pH 7,0 and B: methanol.

*Flæðihraði:* 1ml/mín.

*Bylgjulengdir:* Excitation 338nm and emission 456nm

*Staðlar:* Norvalin (innri staðall) og amínósýrustaðlar

### Mælingar á rokgjörnum efnum með gasgreini-massagreini:

*Undirbúningur sýna:* Fimm beitungum var dýft ofan í 500 ml af 3% saltlausn og látnar bíða í 240 mín. Sýnunum var síðan hellt í glerkrukku og fryst í um 24 tíma eða fram að mælingu. Sýnið var látið þiðna undir rennandi köldu vatni og 200 ml af sýni sett í 250 ml suðufloesku ásamt einum ml af 10 ppm C<sub>7</sub> ethyl ester innri staðal. Köfnunarefni var blásið í gegnum sýnið í eina klst, flæðið stillt á 100 mL/mín og lyktarefnum safnað á gildru með ásosefni (TENAX).

*Frásogun (desorption) með hita (ATD) og GC/MS mælingar:*

Fyrir GC/MS greiningar eru TENAX-gildirur settar í ATD (automatic thermal desorption) tæki, lyktarefnin frásoguð með hita og þeim sprautað inn á gasgreini.

*Tæki:* ATD (Automated Thermal Desorber), Perkin Elmer ATD 400.

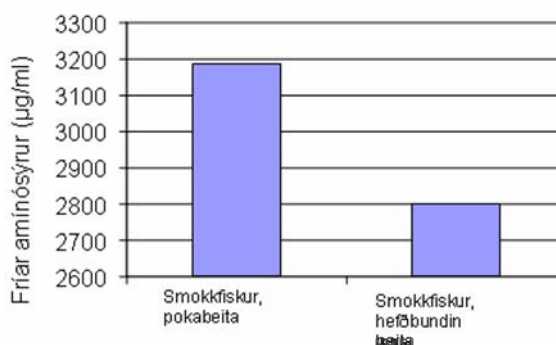
*Gasgreinir-massagreinir:* Hewlett Packard G1800C GCD Series II, GC Electron Ionization Detector. Súla: DB-5ms (30 m×0.25 mm×0.25 µm; J&W Scientific, Folsom, CA); Ferðafasi: Helium; Inntak (injector): 250°C; Nemi (detector): 280°C

*GC/MS hitaforrit:* upphafshitinn var 50°C og er honum haldið í 7 mínútur. Þá var hækkað í 120°C með hitastigli 5°C/mín og að lokum er hækkað í 220°C með hitastigli 10°C/mín. Þeim hita var haldið í 5 mínútur.

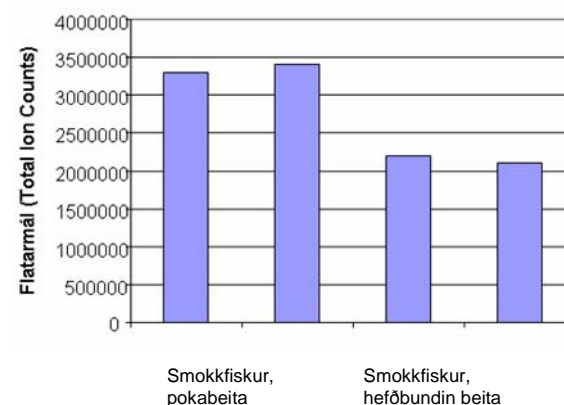
## 6.3 Niðurstöður og umræða

### 6.3.1 Mælingar á amínósýrum og lyktarefnum í útstreymi frá beitu

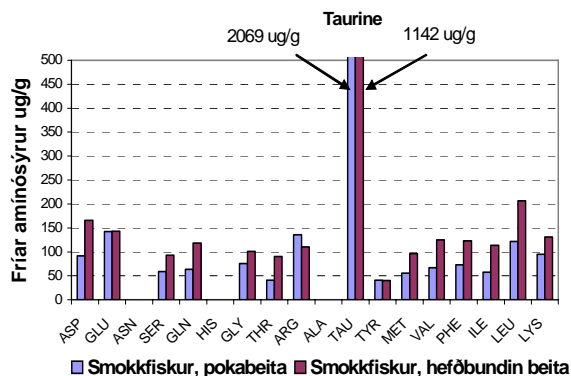
Magn frírra amínósýra í útstreymi frá röspuðum smokkfiski í pokum (pokabeita) mældist mun hærra en í hefðbundinni smokkfiskbeitu (Mynd 6.2) en um sama hráefni var að ræða. Þegar lyktarefnin voru skoðuð, þ.e. heildarflatarmál (total ion counts, TIC) með gasgreini-massagreini-mælingum (Mynd 6.3) mátti sjá sambærilegar niðurstöður, þ.e. mun meira magn af lyktarefnum var í útstreymi frá pokabeitu samanborið við hefðbundna beitu. Þessar niðurstöður eru eins og búast mátti við því við röspunina á beituhráefninu verður yfirborðsflatarmál meira og útstreymi af efnum úr pokabeitunni þar af leiðandi meira.



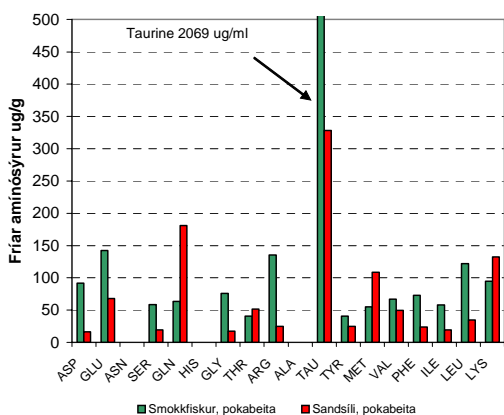
Mynd 6.2. Fríar amínósýrur í útstreymi frá smokkfiskbeitu í pokum (squid in bags) og frá hefðbundinni smokkfiskbeitu (traditional squid).



Mynd 6.3. GC-MS greining á rokgjörnum efnum (heildarflatarmál) í útstreymi frá smokkfiskbeitu í pokum (squid in bags) eða frá hefðbundinni smokkfiskbeitu (traditional squid).



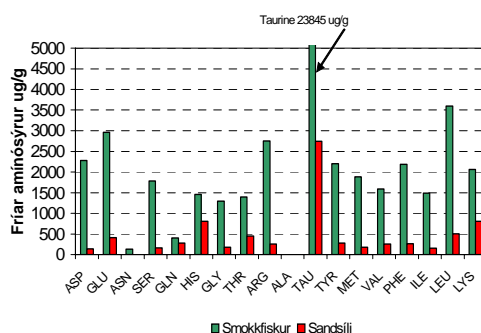
Mynd 6.4. Magn aminosýra í útstreymi frá smokkfiskbeitu í pokum (squid in bags) eða frá hefðbundinni smokkfiskbeitu (traditional squid).



Mynd 6.5. Aminosýrusamsetning í útstreymi frá pokabeitu (smokkfiski og sandsíli) eftir fjóra tíma í saltvatni.

Þegar magn og samsetning af einstökum fríum aminosýrum í útstreymi frá pokabeitu úr smokkfiski og hefðbundinni beitu úr smokkfiski var skoðað (Mynd 6.4) reyndist hlutfall ellefu af sautján aminosýrum aftur á móti vera hærra í hefðbundinni beitu en í pokabeitu. Þetta stafar af mun meira magni af aminosýrunni taurine (2069  $\mu\text{g/g}$ ) í útstreymi frá pokabeitunni samanborið við hefðbundna beitu (1142  $\mu\text{g/g}$ ). Taurine, sem getur haft lífvirkni (bioactive properties), er aminosýra sem finnst aðallega í fríu formi eða í stuttum peptíðum (Birdsall, 2003). Taurine er mjög vatnsleysanleg sem getur skýrt þetta mikla útstreymi frá pokunum. Þannig getur aminosýrusamsetningin í útstreymi frá beitum hugsanlega verið mismunandi eftir beitutegund en skoða þarf betur hvort það hefur áhrif á aðráttarafl beitunnar.

Aminosýrusamsetning í útstreymi frá pokabeitu úr smokkfiski og sandsíli (Mynd 6.5) reyndist vera mjög svipað og í hráefninu (Mynd 6.6) en magn aminosýra var þó mun minna í



Mynd 6.6. Aminosýrusamsetning beituhráefnis (smokkfisks og sandsílis).

röspuðu hráefninu. Magn einstakra aminosýra var mun hærra í smokkfiski en í sandsíli, sérstaklega hvað varðar taurine sem finnst að mestu í fríu formi eins og áður var getið. Þetta getur hugsanlega útskýrt vinsældir smokkfisks sem beitu og vekur upp spurningu um það hvort taurine hafi mikið aðdráttarafl fyrir fisk. Munurinn á magni einstakra aminosýra reyndist ekki vera eins mikill í útstreymi eins og í hráefninu og í sumum tilvikum, t.d. fyrir glutamine (GLN), threonine (THR), methionine (MET) og lysine (LYS), þá var magnið hærra í útstreymi pokabeitu með sandsíli miðað við pokabeitu með smokkfiski. Því er erfitt að segja til um hvort það er röspunin á hráefninu eða efnið í pokunum sem hefur áhrif á hlutfall og magn aminosýra í útstreiminu.

Eins og áður var nefnt þá var magn fríra aminosýra hærra (nema fyrir arginine (ARG) og taurine (TAU)) í útstreymi frá beitu úr smokkfiskbitum samanborið við pokabeitu úr smokkfiski (Mynd 6.4) en hér gætir huganlega áhrifa aðferðarinnar og tímans í saltvatni. Áhugavert væri að skoða betur útstreymi frá beitu sem þó er háð ýmsum náttúrulegum aðstæðum eins og veðri, sjávarstraumum og dýpt.

### 6.3.2 Veiðitilraunir

#### I. Nýting loðnu í pokabeitu

Ein tilraun var gerð á grunnslóð í maí 2004 í dagsbirtu, til veiða á steinbít. Markmiðið var að skoða hvort pokabeita með loðnu veiði jafnvel og sama hráefni beitt á hefðbundinn hátt (tvíkrækt, heil loðna). Beinn samanburður var gerður þar sem notaðir voru tveir balar (500 beitur/bala). Niðurstaðan var neikvæð og mikill munur var á pokabeitu og hefðbundinni beitu. Einungis 20-30 fiskar veiddust á pokabeitu en á

annað hundrað fiskar á hefðbundna beitu. Skýringin gæti verið sú að sjónræn áhrif hafi neikvæð áhrif á pokabeitu, sem er í hvítum pokum. Þetta gildir a.m.k. fyrir steinbít. Niðurstöður margra tilrauna gefa til kynna að sjónræn áhrif hafi neikvæð áhrif á pokabeitu á grunnslóð (hvít áberandi beita) og birtuskilyrði skipta því miklu máli. Þessar tilraunir voru gerðar í maí en aðrar tilraunir hafa verið gerðar á haustmánuðum. Pokabeitan hefur gengið vel við tilraunir þar sem sjónin eða birta hafa ekki áhrif. Ljóst er að huga þarf að birtuskilyrðum (dýpt og árstið) og jafnframt þarf að skoða hvort annar litur á beitupoka en hvítur skipti máli en sá möguleiki er fyrir hendi að skipta út lit á beitupokunum.

## II. Tilraun með þorsklóg

Pokabeita var útbúin með þorsklógi. Gall og lifur var hreinsaði frá og ekki nýtt, en slógið var lítillega blandað hrognum og sviljum. Hráefnið var fryst og síðan raspað niður og prófaðir voru 5 balar. Til viðmiðunar var notuð hefðbundin beita (smokkfiskur). Niðurstaða var ekki nægilega góð en skýringin gæti verið sú sama að litur pokans hafi haft áhrif. Hins vegar sáust krossfiskar og kuðungar í miklu mæli á pokabeitunni. Smokkfiskur er góð beita á krabbaveiðum og því spurning hvort þessi innvolsbeita henti við krabbaveiðar (hræatur). Beitan með þorsklóginu hefur lítið fituinnihald og leggst því meira á botninn miðað við hefðbundna beitu sem flýtur upp (þess vegna gæti hún hentað fyrir krabbar). Ætlunin er að prófa betur nýtingu innnyfla í samsettar beitur.

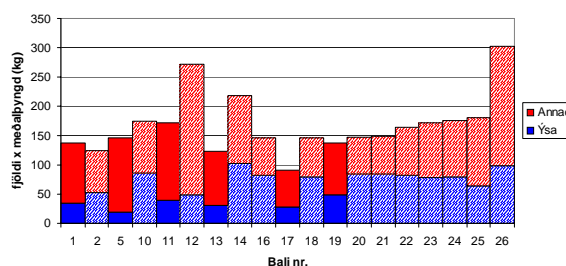
## III. Sjóstangveiði (uppstigningardagur, í dagsbirtu á grunnslóð (15-20 faðmar)

Pokabeitur með sandsíli voru prófaðar á sjóstangveiðum. Beitan gafst mjög vel og virtist hafa mikið aðdráttarafl. Til samanburðar voru notaðir gúmmíkrókar sem eru oft notaðir í sportveiðum en ekkert veiddist þá. Útstreymið frá beitunni skiptir miklu máli og komið hefur í ljós að pokabeitan hefur mikið útstreymi til að laða að fiskinn. Við hönnun á beitunni er hægt að stjórna hversu hratt útstreymið berst frá beitunni með því að nota misþétt efni í pokana. Við sjóstangaveiðar er jákvætt að útstreymið sé mikið og þá er gagnlegt að yfirborðsflötur pokanna sé mikill þannig að hann nái að tæmast á stuttum tíma. Stærðin á pokunum skiptir máli, því stærri pokar því meira útstreymi.

Gagnvart línuveiðum geta pokarnir verið minni en stærri við sportveiðar þar sem útstreymis-hraðinn þarf að vera meiri. Hugsanlegt er að aðlaga sérstakar beitur fyrir sportveiðar sem gætu einnig virkað vel á skak (handfæri).

## IV. Veiðiferð á Ólafi HF þann 27. apríl 2005

Línan var lögð á 55 faðma dýpi 15 sjómílu fyrir utan Reykjanes en upplýsingar um beiturar eru að finna í Töflu 6.1. Í pokabeiturnar var notaður innfluttur makrill en smokkfiskur og síld í hefðbundna beitu. Makrillinn var mjög feitur (23,8%) og linur og bitarnir þungir í sér þegar nýta átti hann í hefðbundna beitu. Vildu bitarnir detta af krókunum við lagningu línunnar. Sjómennirnir vildu skila honum aftur til heildsala en með því að raspa makrillinn niður og nota í pokabeitur reyndist hann vel eins og sjá má á Mynd 6.7. Veiðiárangur pokabeitu á grunnslóð liggur ekki fyrir ennþá.



Mynd 6.7. Fjöldi fiska x meðalþyngd (kg) afla (af ýsu eða öðrum fiski) í veiðiferð á Ólafi HF, þann 27. apríl 2005. Skástrikaðar súlur tákna pokabeitur en nánari upplýsingar um beiturar eru að finna í Töflu 6.1.

Tafla 6.1. Upplýsingar um beitur í veiðiferð á Ólafi HF, þann 27. apríl 2005.

Bali nr.	Beita	
1	Síld og smokkur	Hefðbundin beita
2	Makrill	Pokabeita
5	Síld og smokkur	Hefðbundin beita
10	Makrill	Pokabeita
11	Síld og smokkur	Hefðbundin beita
12	Makrill	Pokabeita
13	Síld og smokkur	Hefðbundin beita
14	Makrill	Pokabeita
16	Makrill	Pokabeita
17	Síld og smokkur	Hefðbundin beita
18	Makrill	Pokabeita
19	Síld og smokkur	Hefðbundin beita
20	Makrill	Pokabeita
21	Makrill	Pokabeita
22	Makrill	Pokabeita
23	Makrill	Pokabeita
24	Makrill	Pokabeita
25	Makrill	Pokabeita
26	Makrill	Pokabeita

## 6.4 Heimildir

Lökkeborg, S. 1987. Fishing experiments with an alternative longline bait based on nylon bags. International Council for the Exploration of the Sea – Fish Capture Committee. Conference proceedings. P 26.

Birdsall, T.C. 2003. Therapeutic Applications of Taurine. <http://www.thorne.com/altmedrev/fulltext/taurine3-2.html>

Soffia Vala Tryggvadóttir, Gunnar Páll Jónsson, Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir 2002. Artificial bait alternatives, mainly based on fish waste. CRAFT Q5CR-200-70427. Project report to EU. Icelandic Fisheries Laboratories, 09-02.

---



## Viðaukar

Viðauki 1. TAFT Proceedings and poster

Viðauki 2. Greinar, viðtöl og veggspjald

---

annað hundrað fiskar á hefðbundna beitu. Skýringin gæti verið sú að sjónræn áhrif hafi neikvæð áhrif á pokabeitu, sem er í hvítum pokum. Þetta gildir a.m.k. fyrir steinbít. Niðurstöður margra tilrauna gefa til kynna að sjónræn áhrif hafi neikvæð áhrif á pokabeitu á grunnslóð (hvít áberandi beita) og birtuskilyrði skipta því miklu máli. Þessar tilraunir voru gerðar í maí en aðrar tilraunir hafa verið gerðar á haustmánuðum. Pokabeitan hefur gengið vel við tilraunir þar sem sjónin eða birta hafa ekki áhrif. Ljóst er að huga þarf að birtuskilyrðum (dýpt og árstið) og jafnframt þarf að skoða hvort annar litur á beitupoka en hvítur skipti máli en sá möguleiki er fyrir hendi að skipta út lit á beitupokunum.

## II. Tilraun með þorsklóg

Pokabeita var útbúin með þorsklógi. Gall og lifur var hreinsaði frá og ekki nýtt, en slógið var lítillega blandað hrognum og sviljum. Hráefnið var fryst og síðan raspað niður og prófaðir voru 5 balar. Til viðmiðunar var notuð hefðbundin beita (smokkfiskur). Niðurstaða var ekki nægilega góð en skýringin gæti verið sú sama að litur pokans hafi haft áhrif. Hins vegar sáust krossfiskar og kuðungar í miklu mæli á pokabeitunni. Smokkfiskur er góð beita á krabbaveiðum og því spurning hvort þessi innvolsbeita henti við krabbaveiðar (hræatur). Beitan með þorsklóginu hefur lítið fituinnihald og leggst því meira á botninn miðað við hefðbundna beitu sem flýtur upp (þess vegna gæti hún hentað fyrir krabbar). Ætlunin er að prófa betur nýtingu innnyfla í samsettar beitur.

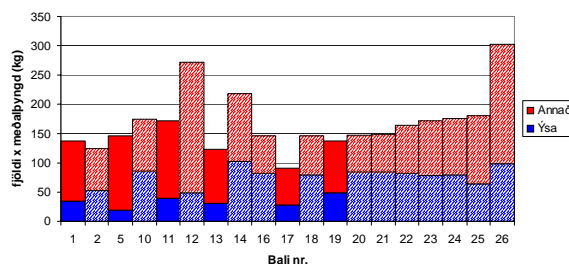
## III. Sjóstangveiði (uppstigningardagur, í dagsbirtu á grunnslóð (15-20 faðmar)

Pokabeitur með sandsíli voru prófaðar á sjóstangveiðum. Beitan gafst mjög vel og virtist hafa mikið aðdráttarafl. Til samanburðar voru notaðir gúmmíkrókar sem eru oft notaðir í sportveiðum en ekkert veiddist þá. Útstreymið frá beitunni skiptir miklu máli og komið hefur í ljós að pokabeitan hefur mikið útstreymi til að laða að fiskinn. Við hönnun á beitunni er hægt að stjórna hversu hratt útstreymið berst frá beitunni með því að nota misþétt efni í pokana. Við sjóstangaveiðar er jákvætt að útstreymið sé mikið og þá er gagnlegt að yfirborðsflötur pokanna sé mikill þannig að hann nái að tæmast á stuttum tíma. Stærðin á pokunum skiptir máli, því stærri pokar því meira útstreymi.

Gagnvart línuveiðum geta pokarnir verið minni en stærri við sportveiðar þar sem útstreymis-hraðinn þarf að vera meiri. Hugsanlegt er að aðlaga sérstakar beitur fyrir sportveiðar sem gætu einnig virkað vel á skak (handfæri).

## IV. Veiðiferð á Ólafi HF þann 27. apríl 2005

Línan var lögð á 55 faðma dýpi 15 sjómíluur fyrir utan Reykjanes en upplýsingar um beiturar eru að finna í Töflu 6.1. Í pokabeiturnar var notaður innfluttur makrill en smokkfiskur og síld í hefðbundna beitu. Makrillinn var mjög feitur (23,8%) og linur og bitarnir þungir í sér þegar nýta átti hann í hefðbundna beitu. Vildu bitarnir detta af krókunum við lagningu línunnar. Sjómennirnir vildu skila honum aftur til heilsala en með því að raspa makrillinn niður og nota í pokabeitur reyndist hann vel eins og sjá má á Mynd 6.7. Veiðiarangur pokabeitu á grunnslóð liggur ekki fyrir ennþá.



Mynd 6.7. Fjöldi fiska x meðalþyngd (kg) afli (af ýsu eða öðrum fiski) í veiðiferð á Ólafi HF, þann 27. apríl 2005. Skástrikaðar súlur tákna pokabeitur en nánari upplýsingar um beiturar eru að finna í Töflu 6.1.

Tafla 6.1. Upplýsingar um beitur í veiðiferð á Ólafi HF, þann 27. apríl 2005.

Bali nr.	Beita	
1	Síld og smokkur	Hefðbundin beita
2	Makrill	Pokabeita
5	Síld og smokkur	Hefðbundin beita
10	Makrill	Pokabeita
11	Síld og smokkur	Hefðbundin beita
12	Makrill	Pokabeita
13	Síld og smokkur	Hefðbundin beita
14	Makrill	Pokabeita
16	Makrill	Pokabeita
17	Síld og smokkur	Hefðbundin beita
18	Makrill	Pokabeita
19	Síld og smokkur	Hefðbundin beita
20	Makrill	Pokabeita
21	Makrill	Pokabeita
22	Makrill	Pokabeita
23	Makrill	Pokabeita
24	Makrill	Pokabeita
25	Makrill	Pokabeita
26	Makrill	Pokabeita

## 6.4 Heimildir

Lökkeborg, S. 1987. Fishing experiments with an alternative longline bait based on nylon bags. International Council for the Exploration of the Sea – Fish Capture Committee. Conference proceedings. P 26.

Birdsall, T.C. 2003. Therapeutic Applications of Taurine. <http://www.thorne.com/altmedrev/fulltext/taurine3-2.html>

Soffia Vala Tryggvadóttir, Gunnar Páll Jónsson, Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir 2002. Artificial bait alternatives, mainly based on fish waste. CRAFT Q5CR-200-70427. Project report to EU. Icelandic Fisheries Laboratories, 09-02.

---

# **VIÐAUKI I**

## ***TAFT proceedings and poster***

First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference (TAFT)

33rd WEFTA Meeting and 48th Atlantic Fisheries Technology

Conference, 11-14 June 2003, Reykjavik - Iceland 2003

First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference (TAFT)  
33rd WEFTA Meeting and 48th Atlantic Fisheries Technology Conference,  
11-14 June 2003, Reykjavik - Iceland 2003

### **Volatile compounds in artificial bait based on fish by-products**

Rósa Jónsdóttir, Soffia V. Tryggvadóttir and Guðrún Ólafsdóttir

Icelandic Fisheries Laboratories, PO Box 1405, Skúlagata 4, 121 Reykjavík, Iceland.  
E-mail: rosa@rf.is, soffiaf.is, gudrun@rf.is

#### **Abstract**

Volatile compounds of several types of bait were characterized to study the release of attractants that contribute to fresh fish odour. The aim is to develop bait composed of raw material that will have similar or more release of attractants than traditional bait. The objective was to develop bait from raw material used for meal production and byproducts from fish processing, for the long-lining deep-sea fishing fleet, mainly cod, haddock and hake. Volatile compounds were measured by using gas chromatography (GC/Olfactometry and GC/Mass Spectrometry). Fatty acid, free amino acid and chemical composition of bait were also measured. Variation in the key aroma compounds identified in bait explained the difference between bait samples and similar differences could be explained by the fatty acid, free amino acid and chemical composition.

#### **Introduction**

The development of successful bait for marine commercial species is an aim for many researchers dealing with chemoreception. Regarding gadiformes (cod, hake etc.) it is believed that its feeding behaviour is primarily mediated by chemosensory mechanisms (Pawson 1977). Although different types of substances are known to provoke responses in fish, chemosensory research involving behavioural and electrophysiological work have given strong support that free amino acids (specially L-stereoisomers) and other low molecular weight components of tissues are dominant in the aquatic environment in this respect (Ellingsen and Doving 1986).

Gadiformes fish live on live prey and are therefore very sensitive towards freshness. Preparation of bait material, like thawing, grinding mixing etc. seems to destroy the chemoreception that attracts the fish to the bait. It is known that enzyme activity (lipoxygenase and protease) in fish is involved in producing degradation compounds (flavor compounds and amino acids) (Josephson and others 1987) that may attract the fish when used in bait. The role of volatile compounds as attractants in bait has not been studied before.

#### **Materials and Methods**

**Samples.** Volatile compounds of different types of traditional and artificial bait were analyzed using gas chromatography/olfactometry (GC/O) and gas

chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Fatty acid, free amino acid and proximate analysis were done using traditional methods.

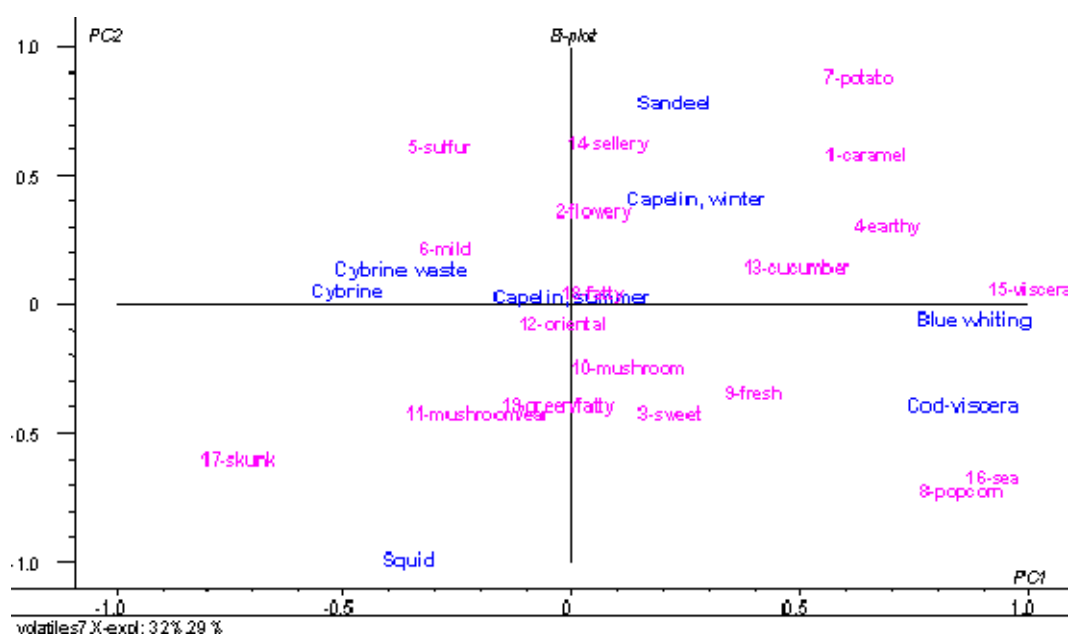
**Sampling and gas chromatography techniques.** Prior to GC/O and GC/MS analysis flavor samples were collected by a purge-and-trap sampling on Tenax traps (Olafsdottir and others 1985). Volatile compounds were separated on a fused silica capillary column, DB-5ms (J&W Scientific, Folsom, CA) using helium as a carrier gas. Details of the technique and identification of the volatiles are described elsewhere in the proceedings (Jónsdóttir and others 2003).

**Data handling.** Multivariate analysis was performed by the Unscrambler 7.5 software package (CAMO AS, Trondheim, Norway). The main variance in the data set was studied using Principal component analysis (PCA). Cross validation was used in the validation method

## Results and Discussion

Figure 1 shows a PCA biplot of the main volatile compounds identified in bait by GC/O. The figure shows that the combination of volatiles were similar in cybrine and cybrine waste, indicating that the cybrine waste could be used as a bait instead of cybrine. Cod viscera and blue whiting are most dissimilar from cybrine. The capelin samples and the sandeel are positioned near the middle on the first PC indicating their similarity. The squid sample had volatile composition unlike the other samples and had rather mild odour.

Boiled potato-like odour (7-potato) was identified as the most important odour in all the samples, except for squid where this odour was not detected. Other important odours were i.e. popcorn-like (8-popcorn), 1-octen-3-ol (10-mushroom) and viscera-like (15-viscera) odour. Volatiles that are characteristic for all the samples, i.e. mushroom, are in the middle of the PCA plot and do not contribute to the variation in the data.



**Figure 1.** PCA biplot of volatile components in traditional and artificial bait by GC/O. The numbers in odour descriptors give the compound no in table 1.

Table 1 shows the most characteristic volatile compounds identified in bait by GC/O and GC/MS. The boiled potato-like odour was identified as a combination of *cis*-4-heptenal and heptanal eluting close to each other from the column. Lipid derived components giving mushroom and cucumber odours were identified as 1-octen-3-ol and 2,6-nonadienal, respectively. Many compounds are still unidentified and need to be studied further. The results of fatty acid, free amino acid and proximate analysis were in agreement with the volatile composition and could explain the difference between the species.

**Table 1.** The most characteristic volatile compounds identified in bait by GC/MS and GC/O.

Compound no.	Possible compound	RI DB-5ms <sup>a</sup>	Odor	Identification <sup>b</sup>
7	<i>cis</i> -4-heptenal and heptanal	496	Potato, mushroom, geranium, shellfish, flesh	MS, 1, 2
8	2-acetyl-1-pyrroline	521	Pop corn	3
10	1-octen-3-ol	581	Mushroom, geranium, capelin	MS, 1, 2
12	ui	687	Oriental, spicy	2
13	2,6-nonadienal	760	Cucumber	MS, 1, 2
14	ui	776	Sellery, mild sweet	2
15	ui	797	Viscera, cybrine, heavy, vomit, waxy	2
16	ui	800	Sea-, shellfish-like, heavy	2
17	ui	826	Skunk	2

<sup>a</sup>Calculated ethyl ester retention index on DB-5ms capillary column

<sup>b</sup>Identification means: MS, mass spectra; 1, authentic standards; 2, odor identification; 3, odor identification and RI references  
ui: unidentified

## Conclusion

Variation in the key aroma compounds identified in bait explained the difference between bait samples and similar differences could be explained by the fatty acid, free amino acid and chemical composition.

## Acknowledgments

Icelandic Fisheries Laboratories, University of Iceland and Dimon ehf. wish to thank The Icelandic Centre for Research, RANNÍS and the European Commission for their support.

## References

- Acree T, Arn H. 1997. <http://www.nysaes.cornell.edu/fst/faculty/acree/flavornet/index.html>; Flavornet, Cornell University.
- Ellingsen OF, and Doving KB. 1986. Chemical fractionation of shrimp extracts including bottom food search behavior in cod (*Gadus morhua* L.). Chem. Ecol 12: 155-168.
- Josephson DB, Lindsay RC and Stuijber DC. 1987. Enzymic hydroperoxide initiated effects in fresh fish. J Food Sci 52: 596-600 .
- Jónsdóttir R, Ólafsdóttir G, Hauksson S and Einarsson JM. 2003. Volatile flavor compounds in seafood flavorants. First Joint Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference (TAFT), 11-14 June 2003, Reykjavik, Iceland. Proceedings.
- Olafsdottir G, Steinke JA, Lindsay RC. 1985. Quantitative performance of a simple Tenax-GC adsorption method for use in the analysis of aroma volatiles. J Food Sci 50: 1431-1436.
- Pawson M.G.1977. Analysis of a natural chemical attractant for whiting (*Merlangius merlangus* L.) and cod (*Gadus morhua* L.) using a behavioural bioassay. Comp Biochem Physiol 56A: 129-135.

# Volatile Compounds in Artificial Bait based on Fish By-products

Rósa Jónsdóttir, Soffia Vala Tryggvadóttir and Guðrún Ólafsdóttir  
Icelandic Fisheries Laboratories, P.O. Box 1405, Skulagata 4, IS-121 Reykjavik, Iceland

Volatile compounds and chemical composition of several types of traditional and alternative baits for long-line fisheries were characterized to study the release of attractants that contribute to fresh fish odor from the bait. The result reported herein are from two ongoing projects; "**Artificial bait alternatives, mainly based on fish waste**" that focuses on utilization of fisheries by-products and raw material used for fish meal production in artificial bait and "**Attractants in bait - Fatal attraction**" where the release of attractants from the bait are studied.

## Objectives

### Overall objectives:

- to develop artificial bait for the long-lining deep-sea fishing fleet, mainly cod and hake (Figure 1).

### Objectives of this study:

- to study the release of attractants that contribute to fresh fish odor from the bait.
- to study the enzyme activity (lipoxygenase and protease) in raw material
- to study the role of the enzymes in producing degradation compounds (flavor compounds and amino acids) that attract the fish.
- The hypothesis is that by using raw material with lipoxygenase activity more concentration of fresh fish volatile compounds will be developed.

## Analysis of volatile compounds

**Samples** of raw material for traditional and alternative bait were characterized.

**Purge-and-trap** sampling to concentrate volatile compounds

**Gas chromatographic analysis** to separate compounds using a fused silica capillary column, DB-5ms (J&W Scientific, Folsom, CA).

**GC/Olfactometry** measurements to identify compounds based on their characteristic odor are performed on a HP 5890 instrument. The effluent was sniffed by two persons describing the odor. Intensity of each odor was determined using scale from 0 - 5: 0: not present; 5 = very strong.

GC/MS measurements to identify volatiles based on their mass spectra were performed on a HP G1800C GCD. Mass spectra gives information about the molecular structure of the compounds.

Fatty acid, amino acid and proximate analysis were done using traditional methods.



Figure 1. Fishing with long-lining

## Results

**Boiled potato-like** odor (see Figure 2, as 7-potato) was the most characteristic odor in all sample except for squid were this odor was not detected. This odor was identified as a combination of **cis-4-heptenal** and **heptanal** (Table 1). Other important odors were **popcorn-like** (Fig 2; 8-popcorn), which may be 2-acetyl-1-pyrroline and lipid derived compounds giving **mushroom** (Fig 2; 10-mushroom) and **cucumber-like** (Fig 2; 13-cucumber) odors identified as 1-octen-3-ol and 2,6-nonadienal, respectively. Many compounds, some of them key aroma compounds, are still unidentified and need to be studied further.

Table 1. Key aroma compounds identified in bait by GC/O and GC/MS

Compound no.	Possible compound	RI DB-5ms <sup>a</sup>	Odor	Identification <sup>b</sup>
7	cis-4-heptenal and heptanal	496	Potato, mushroom, geranium, shellfish, flesh	MS, 1, 2
8	2-acetyl-1-pyrroline	521	Pop corn	3
10	1-octen-3-ol	587	Mushroom, geranium, capelin	MS, 1, 2
12	ui	687	Oriental, spicy	2
13	2,6-nonadienal	760	Cucumber	MS, 1, 2
14	ui	776	Sellery, mild sweet	2
15	ui	797	Viscera, cybrine, heavy, vomit, waxy	2
16	ui	800	Sea-, shellfish-like, heavy	2
17	ui	826	Skunk	2

<sup>a</sup>Calculated ethyl ester retention index on DB-5ms capillary column

<sup>b</sup>Identification means: MS, mass spectra; 1, authentic standards; 2, odor identification; 3, odor identification and RI references  
ui: unidentified

## Conclusion

- Variation in the key aroma compounds explains the difference between bait samples

- Similar differences between bait samples can be explained by the variation in fatty acid and free amino acid content. The results of proximate analysis were also in agreement with the volatile composition

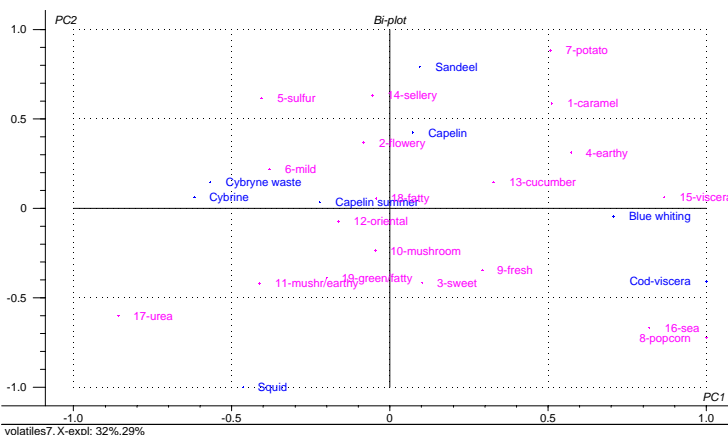


Figure 2. PCA biplot of volatile components in bait identified by GC/O. The numbers in odor descriptors indicates the number of compounds in Table 1.



These projects were partly financed by:  
**The Icelandic Centre for Research, RANNÍS:**  
Attractants in bait - Fatal attraction  
**The European Commission:**  
Artificial bait alternatives, mainly based on fish waste  
(Q5CR-2000-70427)  
In collaboration with **Dimon ehf.** and **University of Iceland**





## **VIÐAUKI II**

- 1. Soffía Vala Tryggvadóttir, Rósa Jónsdóttir, Guðrún Ólafsdóttir. Aðdráttarafl beitu. Ægir, 97. árgangur 9. tölubl. 2004. Bls. 34-37.**
- 2. Viðtal við Sveinbjörn Jónsson og Ólaf Gústafsson skipstjóra sem birtist í Fiskfréttum, 14. maí 2004.**
- 3. Viðtal við Sveinbjörn Jónsson um beituframleiðsluna á Ísafirði. Ægir, 97. árgangur 5. tölubl. 2004. Bls. 35-37.**
- 4. Veggspjald**

# Aðdráttarafl beitu



Soffía Vala Tryggvadóttir.



Rósa Jónsdóttir.



Guðrún Ólafsdóttir.

Greinarhöfundar eru sérfræðingar á rannsóknasviði Rannsóknastofnunar fiskiðnaðarins.

Heildarmarkaður fyrir beitu á Íslandi er tæpur milljarður króna á ári. Stór hluti þeirrar beitu sem flutt er inn til landsins er smokkfiskur og sandsíli. Íslenski fiskveiðiflotinn notar u.þ.b. 450 milljón beitur og ef miðað er við að meðalbeita vegi um 20 g þá eru þetta um 10 þús. tonn af hráefni sem flutt eru inn til beitu-gerðar, fyrir utan mikinn afskurð sem nýtist ekki. Það er augljóst að ávinningurinn af því að nýta úrgang sem til fellur í fisk- og skelfiskvinnslu innanlands og eins ódýra uppsjávarfiska í beitu í stað þess að flytja inn dýra beitu er augljós. Þess má einnig geta að veiðar á smokkfiskinum *Illus* Argentinus, sem aðallega hefur verið veiddur við Falklandseyjar hafa gengið mjög illa að undanförmu og hefur nánast orðið aflabrestur á þessu ári. Þessi tegund af smokkfiski er ein af vinsælustu beitum til línuveiða á Íslandi og er því ljóst að þörf er á nýjum möguleikum fyrir beitu. Þá hefur smokkfiskur og makrill verið nýttur í auknum mæli til manneldis á undanförmum árum. Þessi samkeppni hefur leitt til hækkunar á verði beitu auk þess sem ljóst er að ekki er æskilegt að nota fisk í beitu sem nýtist til manneldis. Það er því nauðsynlegt að rannsaka möguleika þess að nýta annað hráefni fyrir beitu.

## Rannsóknarverkefni um beitu styrkt af ESB og Rannís

Verkefnið „Þróun á beitu til línuveiða“ er CRAFT-verkefni sem

styrkt var af Evrópusambandinu og er nýlokið. Í CRAFT-verkefnum er lögð áhersla á að rannsóknastofnanir og háskólar aðstoði meðalstór og lítil fyrirtæki við ákveðna rannsóknar- og þróunarvinnu. Fyrirtækin eiga síðan einkarétt á að nýta sér niðurstöður verkefnisins. Beituverkefnið var samstarfsverkefni Íslendinga, Spánverja og Portúgala en íslensku aðilarnir voru Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins og Veiðarfærasalan Dímón ehf. í Reykjavík. Meginmarkmið verkefnisins var að þróa beitu til línuveiða á þorski og ýsu, sem byggðist á að nýta bræðslufisk og afskurð og úrgang sem til fellur í fisk- og skelfiskvinnslu.

Skilyrði sem framleidd beita þarf að hafa er að:

- gefa betri eða sambærilegan árangur og hefðbundin beita
- vera samkeppnishæf í verði
- vera þægilegri og ódýrari í notkun
- vera alltaf fáanleg
- vera hönnuð með tilliti til vélvæðingar við beitningu
- vera náttúruvæn
- gefa möguleika á sérhæfðum línuveiðum m.t.t. tegunda og stærðar.

Samhliða Evrópuverkefninu setti Rf ásamt Háskóla Íslands á fót verkefnið „Aðdráttarafl beitu“, sem fékk 2ja ára styrk frá Rannsóknarsjóði Íslands (Rannís), til að efla enn frekar þróunarvinnuna. Rannís styrkurinn stuðlaði að grunnrannsóknum varðandi

efnasamsetningu niðurbrotsefna og frekari rannsóknum á ensím-virkni sem hvatarmyndun niðurbrotsefna í beituhráefni. Ekki hefur áður, svo vitað sé, verið skodað á þennan hátt eðli og orsakir útstreymis niðurbrotsefna frá beitu.

## Tækjabúnaður - ný beitutækni

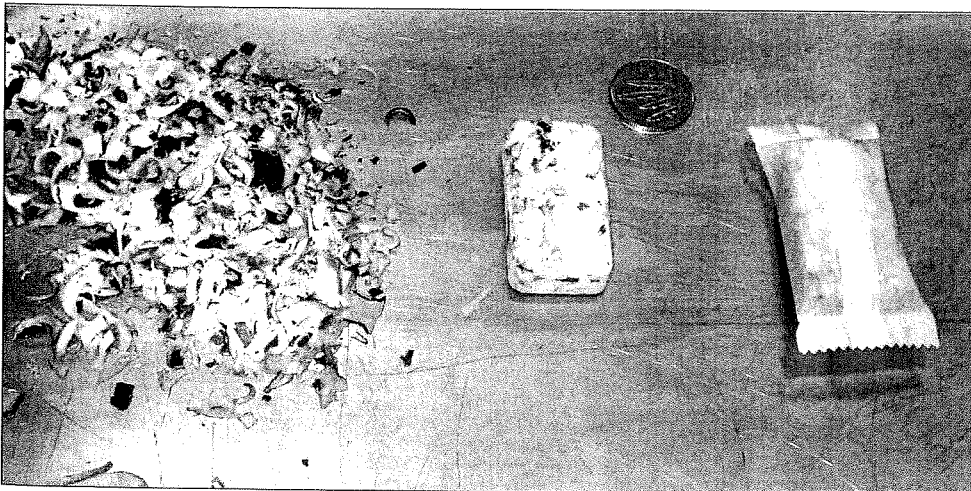
Í verkefninu var þróuð ný aðferð og sérstakur tækjabúnaður smíðaður til að framleiða beitu úr frystu hráefni. Í framhaldi af þessari þróunarvinnu var stofnað fyrirtækið Aðlöðun ehf. og beituverksmiðja sett upp í gamla Norðurtangahúsinu á Ísafirði. Fyrirtækið er þegar búið að fá einkaleyfi fyrir þessari tækni. Framleiðslutækni byggir á því að raspa, móta og pakka frystu hráefni við frystiádstöðu þannig að hráefnið og framleiðslan þiðnar ekki fyrir en beitan er lögð í sjó.

Frosnar fiskblokkir af beituhráefni eru raspaðar, fisksagid er síðan mótað (stansað) í þetta bita (10-15 g) og pakkað í trefjaefnis-poka. Allur vinnsluferillinn fer fram í frystiskáp. Mótið sem beitan er steipt í myndar gat í miðjan beitukubbinn svo auðvelt er að krækja í hana. Skilyrðið er að hráefnið sé mjög ferskt þegar það er fryst. Í þróunarferlinum kom í ljós að við það að þíða upp hráefni til beitu-gerðar, hakka það, hræra og frysta aftur virtust ferskleika-einkenni hráefnisins eyðileggjast. Í fortíðraun sem gerð var á Rf var útbúin beita, annars vegar úr hráefni sem var látið þiðna og hins vegar úr frosnu hráefni sem notað var beint í beitungu. Niðurstöður úr tílraunaveiðum á þorski sýndu að tvífrysting og meðhöndlun á hráefninu virtist hafa slæm áhrif á virkni beitungar. Þetta kemur ekki á óvart þar sem þorskur lifir á lifandi æti og laðast því mest að útstreymi sem boðar ferskleika.

## Rannsóknir á beitu - útstreymi aðdráttarefna

Í bæði erlendum og innlendum beiturannsóknum hefur áherslan verið á þróun á tilbúnum beitum. Það hefur verið vandamál við línuveiðar að halda beitungu saman þannig að hægt sé að krækja í

Lengst til vinstri er raspað frosið hráefni. Í miðjunni er búið að móta töflu úr fiskraspinu og síðan er lokaútgáfa af pokabeitunni þegar búið er að pakka henni inn í trefjaefni.





Nýju pokabeitunni beitt fyrir tilraunaveiðar.

hana og að hún endist nægilega lengi í sjónum. Tilraunir hafa verið gerðar með alls konar grisjuefni sem umbúðir fyrir beituhráefni og eins hafa verið notuð ýmis bindiefni til að beitan haldist saman án umbúða. Þessar tilraunir gengu illa framan af, yfirleitt vildi beitan leysast of fljótt upp. Þegar bindiefni hafa verið notuð hefur útstreymið oft verið of lítið, því að bindiefni geta hindrað útstreymið og gefið auk þess frá sér fráhrindandi efni. Með tilkomu nýju pokabeitunnar sem þróuð var í verkefninu er þetta vandamál leyst. Notuð eru trefjafefni sem hafa ákveðið gegndræpi utan um beituna og tryggir þetta útstreymi beituhráfnisins í nægilegu magni í æskilegan tíma.

### Val á hráefni

Þorskur er ránfiskur sem veiðir sér til matar þannig að hann lifir á mjög ferskri fæðu. Reynslan sýnir að ekki þýðir að bjóða þorskinum upp á annað en mjög ferska beitu. Ýsan er aftur á móti hráæta og ladast að beitu þó hún sé ekki alveg fersk. Með vali á beituhráefni er því hugsanlega hægt að stýra að einhverju leyti hvaða tegund er veidd hverju sinni. Einnig er talið að stærð beitu geti að miklu leyti stjórnað

stærð fiska á línunni.

Beitan þarf að innihalda þau grunnefni sem laða fiskinn að. Fyrri rannsóknir hafa aðallega skoðað áhrif amínósýra í útstreyminu til að laða fisk að beitunni. Í „beitu“-verkefninu sem ESB styrkir er aðallega lagt út frá því að skoða samsetningu á fríum amínósýrum í beituhráefni eins og gert hefur verið í fyrri rannsóknum ásamt því að skoða heildarefnasamsetningu og fríar fitusýrur.

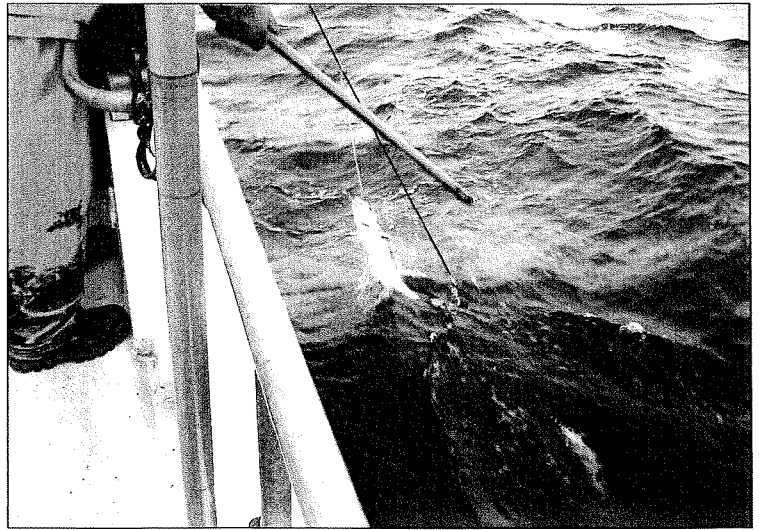
Gerðar hafa verið ítarlegar efnagreiningar á þeirri beitu, sem mest er notuð hér við land, svo sem smokkfiski, sandsfli og makríl. Eins hafa nákvæmar mælingar farið fram á ýmsu hráefni sem getur nýst í beitu eitt og sér eða í blöndu, svo sem lodna, kolmurri, bolfiskafskurður, kúffiskhrat, úrgangur eftir síldarflökun o.fl.

Frekari rannsóknir eru þörf á virkni annarra niðurbrotsefna í beitu. Ýmsar vísbendingar í verkefninu sýndu að ferskleiki beittunnar skiptir miklu máli til að laða fiskinn að beitunni. Rannsóknir á ferskleikalykt í fiski hafa sýnt að það er fyrst og fremst niðurbrot á fjölómettuðum fitusýrum vegna lipoxygenasa virkni, sem gefur ferska fiskilykt. Tilgátan í Rannís-verkefninu er sú að hægt sé að auka virkni samsettrar

beitu með því að nota hráefni sem inniheldur lipoxygenasa virkni, þannig að hún framleiði niðurbrotsefni sem gefa ferska fiskilykt. Jafnframt er tilgátan sú að hægt sé að auka virkni beittunnar með því að nýta proteasa virkni til að auka útstreymi amínósýra. Ekki hefur verið rannsakað áður hlutverk niðurbrotsefna frá fjölómettuðum fitusýrum (lipoxygenasa virkni) í því að laða fiskinn að agninu, né heldur er vitað til þess að proteasa virkni hafi verið sérstaklega skoduð í beitu. Í verkefninu var sérstaklega rannsökuð samsetning lyktarefna sem mynduð eru úr fjölómettuðum fitusýrum og gefa ferska fiskilykt frá beitu. Jafnframt var skoduð almenn proteasavirkni í beituhráefninu. Eins og búast mátti við var mikil virkni í innnyflum vegna meltingarensíma, en lítil í virkni í vöðva.

Ætlunin er að nota niðurstöður efnagreininga frá hefðbundinni beitu sem líkan fyrir samsetningu á tilbúnu beittunni. Í hefðbundinni beitu og mögulegu beituhráefni hefur verið mælt hlutfall hinna ýmsu næringarefna, svo sem fitu, próteins, vatns, salts og ösku. Auk þess hafa verið gerðar mælingar á fríum amínósýrum, fitusýrum og greining og mæling á rokgjöllum niðurbrotsefnum.

Líklegt er að útstreymi sem laðar fisk að beitunni sé samspil niðurbrotsefna með lítinn mólíkúlþunga, en kenningin er að fiskar laðist að ákveðnum amínósýrum, peptíðum eða lyktarefnum í leit að æti. Komið hefur í ljós að samsetning á rok-gjörnum efnunum í mismunandi hráefni skýrir breytileika á beituhráefni á svipaðan hátt og breytileikinn er skýrður vegna mismunandi fitusýrusamsetningar, amínósýrusamsetningar og efnainnihalds (fita, protein og vatn). Smokkfiskur, sem er ein vinsælasta beitan, hefur mjög hátt hlutfall af óbundnum amínósýrum. Sú tilgáta kom fram að hægt væri að bæta próteasa í beituhráefni til að auka framleiðslu óbundinna amínósýra og að hugsanlegt væri að nota fiskinnyfli til að auka myndun óbundinna amínósýra. Tiltölulega lítið er enn vitað um sértæka próteasavirkni í hráefninu sjálfu, sem þó gegnir sennilega lykhillutverki í myndun þessara niðurbrotsefna. Niðurstöðurnar nýtast til að velja hráefni í samsetta beitu þar sem reynt verður að líkja eftir samsetningu á hefðbundinni beitu eins og smokkfiski eða sandsíli, en nota ódýrara hráefni eins og afskurð, innyfli og loðnu. Ef tekst að framleiða beitu sem er sérhæfð í tegunda- og stærðarvali afla



Á línuveiðum.

myndi það minnka óæskilegan meðafla. Með því að nýta loðnu í beituframleiðslu í stað bræðslu gæti verðmætaaukningin orðið margföld. Loðna er helsta fæða þorsks á Íslandsmiðum og ætti því að vera vinsæl beita við línuveiðar hér við land. En roð loðnunnar er reyndar það þunnt að það gefur lítið hald fyrir línukróka. Það hefur þó verið stundað við beitningu á loðnu að tvíkrækja í hana en sú aðferð er tímafrek og er því lítið notuð. Ekki hefur verið hægt með góðum árangri að nota loðnu í vélbeitningu en þar sem stærð poka-

beitunnar er stöðluð ætti að verða auðvelt að vélvæða beitningu með henni. Með pokabeitunni gefst því gott tækifæri til að nýta loðnu í beitu og ekki ætti það að draga úr áhuganum að hér er um að ræða ódýrt innlent hráefni.

### Nýja pokabeitan

Nýja pokabeitan sem Aðlöðun hefur fengið einkaleyfi fyrir framleiðslu á hefur ótvíræða kosti fyrir utan að vera ódýrari en hefðbundin beita. Beitningin sjálf er mun fljótlegri og mikið snyrtilegri. Hráefni sparast þar sem hægt er að hafa beituna efnisminni en

Hér er verið að taka út raspað beituhráefni.



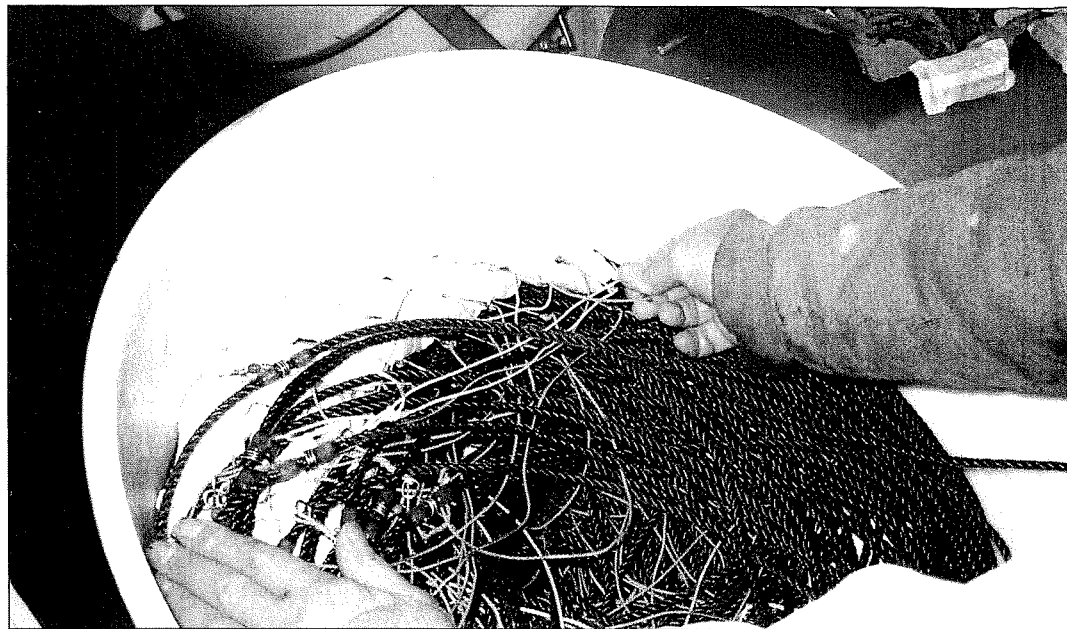


hefðbundna beitu og eins nýttist allt hráefnið til fulls. Beitan er auk þess alltaf tilbúin á krókinn og beitupokarnir frjóska ekki saman. Þá virðast sjófuglar lítið sækja í beitupokana, en ásókn þeirra hefur lengi valdið vandræðum við línuveidar.

Nýja pokabeitan er þökkud í trefjaefni sem henta vel til að stjórna útstreymi beituhráfnisins í nægilegu magni í æskilegan tíma. Efnid í trefjapokunum hefur einnig þá eiginleika að þegar það blotnar þá mýkist það og áferðin líkist helst roði á fiski. Pokabeitan hefur verið prófuð við raunverulegar aðstæður og lofar góðu. Þess má geta að trefjaefnið sem notað er í pokana er, samkvæmt upplýsingum frá framleiðanda, umhverfisvænt og eyðist í náttúrunni á nokkrum árum.

#### Lokaorð

Langtímamarkmiðið er að þróa beitu sem hægt verður að stjórna útstreyminu frá. Hugsanlegt væri að stjórna samsetningu beittunnar þannig að aðdráttarefni, sem eru til staðar í beittunni, leystust upp



Línunni með beittunni á komið fyrir í balanum.

þegar línan er lögð í sjó í ákveðinn tíma og í ákveðnu magni. Efnin sem kæmu frá beittunni væru breytileg þannig að hægt væri að stjórna hvaða fisktegund væri veidd. Seinni tíma markmið er beita sem þyrfti ekki kælingu

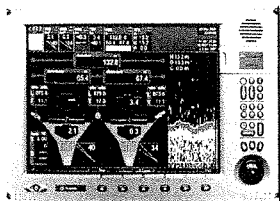
né frystingu, svokölluð "þurrbeita". Þá yrðu til staðar forverar lyktarefna, bundin hlutlausum massa, ásamt ensímum þar sem virkni myndi liggja í dvala þar til beitan blotnar.

## Aukin aflabrogð með Scanmar

Scanmar tryggir að trollið vinni rétt

### ScanBas - fullkomin stjórn á veiðunum

- 15" hágæða litaskjár með fullkominni skerpu
- 25 sinnum meiri gagnageta en eldri kerfi
- Sýnir upplýsingar frá allt að 16 nemum samtímis
- Auðskiljanleg myndræn framsetning
- Auðvelt að skipta á milli mynda með fjarstýringu
- Allt sem skiptir máli kemur fram á einni mynd



**SCANMAR**

Scanmar á Íslandi • Grandagarði 1a • 101 Reykjavík • Sími 551 3300 • Fax: 551 3345  
Netfang: scanmar@scanmar.is • Veffang: www.scanmar.no

# Framleiðsla á gervi-beitu hefst fljótlega

## — unnið er að lokafjármögnun

„Verksmiðjan er til staðar og við höfum þróað beitu sem sannað hefur ágætti sif. Næsta skrefið er að ljúka við fjármögnun og auka framleiðslugetu verksmiðjunnar til að fá hagstæðari rekstrarreiningu. Að því er unnið þessa dagana og ég vænti þess að framleiðsla á beitu fyrir almennan markað hefst fljótlega.“

Þetta voru orð Sveinbjörns Jónssonar, hugvitsmanns og framkvæðis, í samtali við Fiskiféttir en eins og fram hefur komið hefur Svein-

björn unnið að þróun á tilbúnni beitu undanfarnar ár. Fyrirtæki sem hann og fleiri aðilar standa að, Að-löðun hf., hefur fengið einkaleyfi

fyrir framleiðslu á beitu með nýrri tegni og komið upp verksmiðju til framleiðslunnar í Frystuhúsi Norðurtaraga á Íslandi. Aðaleigandi Að-löðunar er Veðfartravelslunum Dimon sem annast jafnfarni sölu á beittunni.

### Beita fyrir ýsu tilbúin

Takmi sem notuð er við framleiðsluna gerir þeim kleift að vinna blokkarfryst hráefni af ýmsu tagi og blanda þeim saman án þess að þjóa þau upp. Blandan er síðan sett í poka eða grísu sem miðjar efninu út í sjónum og dregur fiskinn til sín. Nú þegar er búið að þróa beitu sem myndi auka vax-hærni í limveidunum, hæði með til-liti til fiskteygunda og stærðar-fiska.



Sveinbjörn Jónsson við beitingu með pokabeitu.

### Þurfa að selja 30 millj. beina

Heildarmarkaður fyrir beitu á Íslandi er tæpur milljarður króna. Sveinbjörn sagði að þeir þyrftu að geta selt um 30 milljónir beina og ná um 12% markaðshlutfélagið með al krókafarmarksbáta til að verk-smiðjan yrði arðber. Framleiðslu-geða verksmiðjunnar er nú um 10 þúsund beittir á klukkustund og við hana stafa þrjú menn. Með þessum atkæstum er til dæmis hægt að framleiða beitu fyrir einn trilluróð-ur á hverri klukkustund. Svein-björn sagði að til að verksmiðjan yrðu arðber þyrfti að tvöfalda af-köstin eða þar um bil, annað hvort með því að hafa tvöfaldir vaktir eða bæta við annaru framleiðslu-línu. Fram kom hjá Sveinbjörni að

### Þarf nýja innmötun á beitingargvélar

Grísupbeitan er enn sem komið er aðeins notuð á dægróðrabættum sem eru með handþetta línu. Til að hún gagnast velarþáttum þarf nýja innmötun fyrir beitingargvélar. Sveinbjörn sagði að gera mariti ráð fyrir því þegar fjölbreynti í fram-leiðslu á beittum ykist og kostir þessar kærni beittir í ljós myndu framleiðendur beitingargvélar þróa véltannar þannig að þær gætu tekið tilbúna beittuna.

# Pokabeitan veiðir jafnvel af ýsu og venjuleg beita

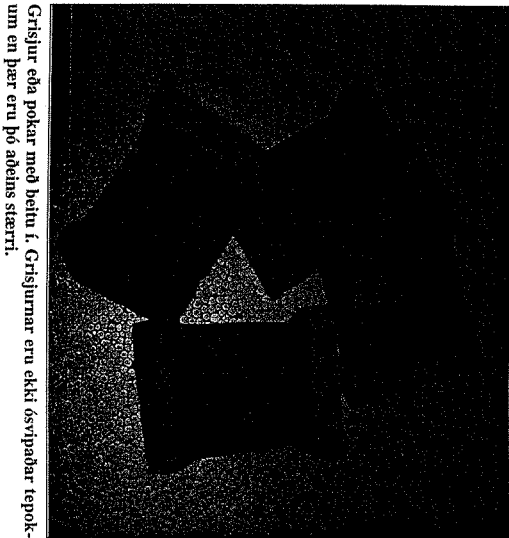
## — á réttu dýpi segir Ólafur Gústafsson, skipsjóri á Hrönn ís

„Ég hef farið með pokabeitu í nokkra róða og min niðurstaða er sú að hún skilar jafnmikilli veiði af ýsu og heitbundin beita gerir á dýpra vati.“ sagði Ólafur Gústafsson, skipsjóri á Hrönn Ís, í samtali við Fiskiféttir en hann er að prófa pokabeituna frá Sveinbjörni Jónsson þessa dagana. Þegar rent var við Ólaf nú í vikunni var hann að koma úr róðri með rúm þrjú tonn á 24 bala. Þar af voru fjórir balar með pokabeitu. „Ég lagði bala með pokabeitu á 43 fæðna dýpi um 10 mílur út af Svåg-

andarfíri. Ég lagði til skipstist bala með pokabeitu og bala með venju-legr beitu. Afliinn var að mestu ýsa. Ég fékk ágætisskot á summa balana og lítið sem ekkert inn á milli. Það var þó enginn munur á veiðitími milli beittvegunda. Þar sem einhver veiði var fékkst svipað á pokabeitu og venjulega beitu.“ sagði Ólafur.

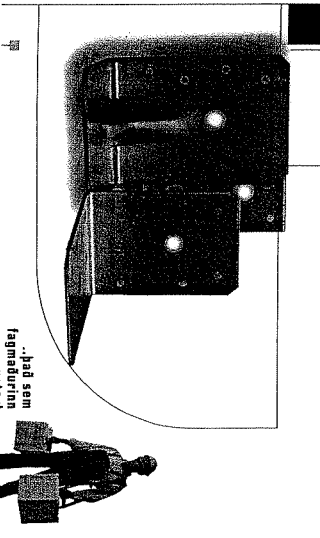
Fram kom hjá Ólafi af fyrir nokkru fékk hann um 400 kíló á einn bala með pokabeitu. Þá fékk hann svipað magn á tvo bala með venjulegri beitu af námost breinni

ýsu, eða um 300-400 kíló á hvorn bala. „Við fátum einnig þorsk og steinbit á pokabeituna en í sínu maili. Ég heiti aðallega með síli en einnig smokk í bland. Blandan er svipuð í pokabeitunni og þegar beitt er venjulega þannig að samanhurð-urinn á að vera markþekkur. Ég hef prófað pokabeituna í fríum róðrum og mér finnst þetta mjög spennandi verkefni. Hún veitir vel á ýsarlöð. Nú þarf að þróa þetta enn frekar og prófa fleiri hráefni í beittuna. Eink-um er þórf á að fá sérhæfða beitu fyrir þorskveiðar.“ sagði Ólafur.



Grísjur eða þokar með beitu í. Grísjurnar eru ekki ósviþarar tepok-um en þær eru þó aðeins stærri.

# BYGGINGAVINKLAR



— það sem fagnasturinn

Portland: **Kaupir Leif Halldórsson ÁR** ásamt öllum vafðihaimildum

Sveinbjörn Jónsson, forsvarsmaður beituverksmiðju á Ísafirði:

# Tel að við höfum nú þegar unnið ákveðið afrek

- en aukið fjármagn vantar til að ljúka fjármögnun og styrkja reksturinn

„Tæknilega hefur þetta gengið prýðilega. Við erum komnir með verk-smiðju á Ísafirði sem getur framleitt beitu í umtalsverðu magni. Það hefur verið lagt í mikla vinnu við rannsóknir og sumt af þeirri vinnu á sér ekki hliðstæðu í veröldinni, og nýtist vonandi við val á hráefni í framtíðinni. Fjárhagslega er þetta dæmi hins vegar nokkuð snúið, það er ljóst að töluverða fjármuni skortir inn í reksturinn,“ segir Sveinbjörn Jónsson, sem er í forsvari fyrir beituverksmiðju Aðlöðunar hf. í Norður-tangahúsinu á Ísafirði.

Aðlögun ehf., félag í eigu Sveinbjörns og Elínar Bergsdóttur, eiginkonu hans, festi kaup á Norðurtangahúsinu undir lok árs 2002 af Þróunarsjóði sjávarútvegsins og síðan hefur verið unnið að því að setja þar upp fullkomna beituframleiðslulínu, sem á undanföllum vikum hefur verið keyrð og gefið góða raun. Sveinbjörn segir að það sem af er lofi verksmiðjan góðu, tæknilega sé hún vel búin, þótt vissulega megi alltaf gera þar bragarbót. „En ég skal alveg viðurkenna að fjárhagslegt svigrúm okkar er takmörkunum háð, enda vil ég segja að við höfum ekki fengið verðugan stuðning við þetta verkefni. Þó vil ég taka það skýrt fram að sumir aðilar hafa stutt okkur í þessu verkefni, en hins vegar er hér um að ræða svo stórt viðfangsefni og án fyrirmyndar að betur má ef duga skal,“ segir Sveinbjörn.

## Átta ára verkefni

Forsaga þessa máls er sú að veiðarfæraverslunin Dímon í Reykjavík hóf að vinna að þessu verkefni árið 1996. Evrópusambandið kom síðan með fjárhagslegan stuðning inn í verkefnið og Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins tengdist því líka. Um áramótin 2000 var Sveinbjörn Jónsson ráðinn verkefnisstjóri að verkefninu, en hann hafði lengi verið sjómáður vestur á Suðureyri við Súgandafjörð. „Við fórum í tilraunir árið 2001 sem sýndi okkur fram

að á beituframleiðsla væri vel möguleg. Í framhaldinu settum við upp litla tilraunaverksmiðju í kjallaranum hjá Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins og nú er svo komið að búið er að setja upp alvöru verksmiðju vestur á Ísafirði. Þessi verksmiðja er fullnægjandi sem framleiðslutæki til þess að framleiða beitu í nægilegu magni til að það geti borið sig. Haustið 2002 framleiddum við á þremur mánuðum um 30 þúsund beitur, en það magn getum við nú framleitt á þremur klukkustundum. Afkastagetan er því umtalsverð,“

segir Sveinbjörn og bætir við að þessi mikla afkastageta geri það að verkum að auðvelt sé og tilrölulega fljótlegt að gera prufur með nýjar tegundir af beitungum í umtalsverðu magni. „Til þessa höfum við fyrst og fremst einbeitt okkur að hefðbundnum beitungum og því sem þeim líkist, en möguleikar okkar í hráefnisnotkun eru þó nánast endalausir.“

Beiturnar eru staðlaðar í stærð og lögun. „Núna erum við að framleiða staðlaðar beitur fyrir króka númer 7 og 11,“ segir Sveinbjörn.

Sveinbjörn Jónsson fyrir framan Norðurtangahúsið á Ísafirði.

Myndir: Halldór Sveinbjörnsson.



## Einkaleyfi í innanlandsmarkaði í höfn

Engar fyrirmyndir eru erlendis frá í beituframleiðslunni. „Nei, það er ekki. Hér innanlands fengum við hjá Aðlöðun hf. einkaleyfi á þessari framleiðslu um miðjan apríl. Erendis höfum við ekki spurnir af samskonar framleiðsluferli hvorki í beitu-, fôður- né matvælaíðnaði. Reyndar höfum við sótt um einkaleyfi erlendis til allra þessara þátta og það einkaleyfisferli er nú í gangi.“

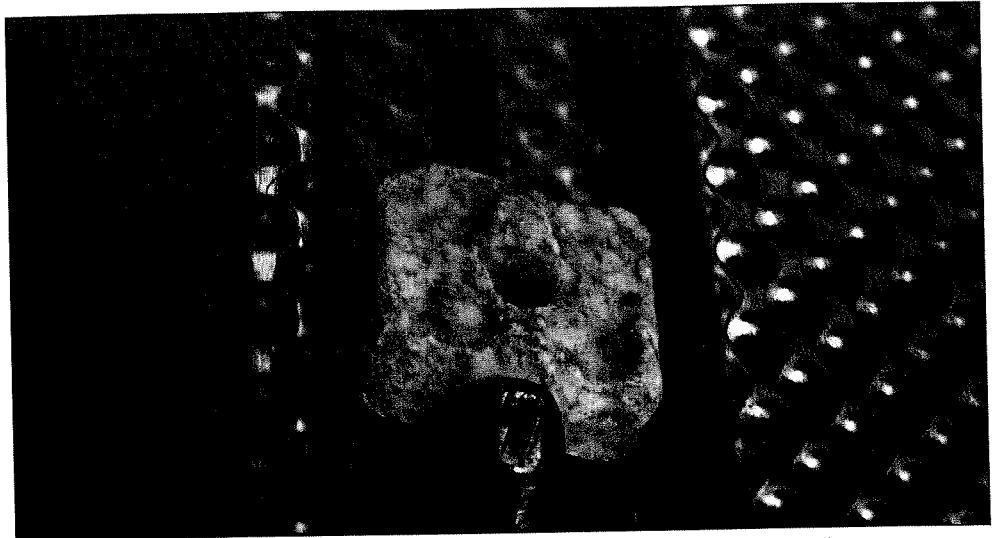
Sveinbjörn orðar það svo að hvernig sem þetta verkefni fari, þá sé það hans mat að unnið hafi verið ákveðið afrek varðandi tækniþróun o.fl. „Þetta er tvímælalaust merkilegt verkefni og ef okkur tekst að fjármagna það vel, þá tel ég að það geti orðið enn merkilegra. Ef við fáum inn í þetta þá fjármuni sem við teljum nauðsynlega á þessu stigi, þá er það mín bjargfasta skoðun að við verðum fljótlega farnir að blanda okkur í beitu- fôður- og matvælaframleiðslu á heimsmælikvarða.“

## Stór beituverkaður fyrir vestan

Sveinbjörn segir að auk innanlandsmarkaðarins séu þeir hjá Aðlöðun hf. vissulega að horfa til útflutnings á beitu en þó aðallega á tækni og þekkingu. „Það var hreint ekki tilviljun að við settum verksmiðjuna niður á Ísafirði. Línuútgerðin stendur sterkum fótum í mörgum sjávarplássum á Vestfjörðum og ég reikna með því að á þessu svæði sé smábátaflotinn að nota um 100 milljón beitur á ári. Það leit því vel út að staðsetja verksmiðjuna í nágrenni við þennan markað. Í annan stað var Norðurtangahúsið til reiðu með góðum frystigeymslum, sem eru nauðsynlegar fyrir slíka starfsemi - bæði fyrir hráefni og framleiðsluvörur.“

Sem stendur eru þrír menn starfandi í verksmiðjunni á Ísafirði, hvað sem síðan kann að verða því húsnæðið býður upp á margföldun tækjabúnaðar.

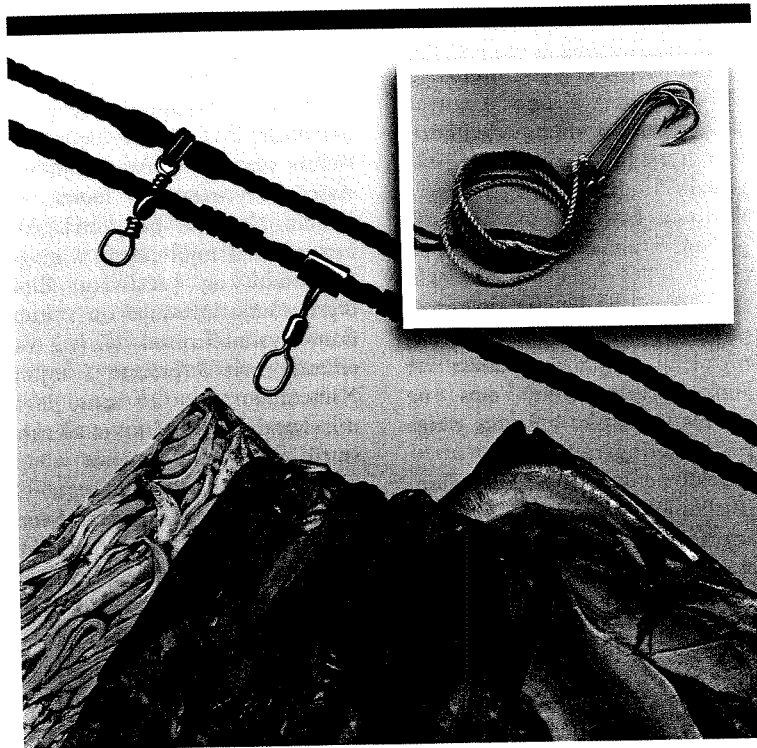
En telur Sveinbjörn að forsenda áframhaldandi þróunar þessa verkefnis sé að nýtt fjármagn komi inn í reksturinn? „Það skal ég ekkert segja til um. Hins vegar er það mín skoðun að þessi framleiðsluáferð muni innan tíðar ryðja sér til rúms í beituframleiðslu, fôðurgerð og jafnvel í



Sveinbjörn Jónsson: „Núna erum við að framleiða staðlaðar beitur fyrir króka númer 7 og 11.“

matvælaframleiðslunni á veraldarvísu. Frá upphafi þessa verkefnis hafa verið settar í það nokkur hundruð milljónir króna, aðallega af framkvæmdaaðilum verkefnisins, og nú liggur fyrir að þetta er

raunhæft dæmi. Við sjáum fyrir endann á verkefninu tæknilega og þekkingarlega tel ég að það gefi mikla möguleika, vegna þess einfaldlega að það gefur kost á svo mörgu í framhaldinu.“



## Ábót, sigurnaglalína og allar gerðir af beitu



Ísfell ehf • Fiskilóð 14 • P.O.Box 303 • 121 Reykjavík • Sími 5200 500 • isfell@isfell.is



# Þróun beitu til línuveiða

## (Artificial Bait Alternatives, mainly based on fish waste (Q5CR 2000-70427))

Verkefnið er Craft verkefni og er styrkt af Evrópusambandinu. Í Craft verkefnum er lögð áhersla á að rannsóknastofnanir og háskólar hjálpi meðalstórum og litlum fyrirtækjum við ákveðna þróunarvinnu. Fyrirtækin eiga síðan einkarétt á að nýta sér niðurstöður verkefnisins. Verkefnið hófst í mars 2001 og lýkur í mars 2003.

Markmið verkefnisins er að þróa beitu fyrir línuveiðar á bolfiski sem byggist á ódýrum uppsjávarfisktegundum og afskurði frá fiskvinnslunni.

### Þátttakendur

#### Ísland

- Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins, Reykjavík.
- Veifarærasalan Dímon ehf, Reykjavík.

#### Spánn

- Fundacion AZTI, Sukarrieta (rannsóknastofnun).
- Universidad de A Coruna, La Coruna (háskóli).
- Innaves s.a., Vigo (þróar og framleiðir beitningavélar).
- Fripalsa, Riveira (útgerðarfyrirtæki).

#### Portúgal

- Laranjinha Ida., Sines (útgerðar- og fiskvinnslufyrirtæki).



Við tilraunaveiðar, þar sem borin er saman veiðigeta tilraunabeitunnar og hefðbundinnar beitu.

### Staðan í dag



Eftir mikla þróunarvinnu sem er ekki lokið þykir innpakkaða beitan hér að ofan lofa bestum árangri.

Lengst til vinstri er raspað frosið fiskhræfni t.d. smokkfiskur, sandsili, afskurður og þess háttar. Í miðjunni er búið að gera töflu úr fiskraspinu og gata það í miðjunni (fyrir krókinn) og síðan er sýnd lokaútgáfan af beitunni þegar búið er að pakka henni inn í trefjaefni.

### Viðhorf beitningamanna til nýju beitunnar

- Mjög snyrtilegt að beita. Allur óþrífnaður sem fylgir beitningu hefðbundinnar beitu er liðin tíð.
- Mun fljótlega að beita nýju beitunni.
- Alltaf tilbúin á krókinn: Þarf ekki að þíða upp né skera í réttar beitustærðir eins og gildir um hefðbundna beitu.



Verið að beita með nýju beituna fyrir tilraunaveiðarnar á Suðureyri við Súgandafjörð.



### Þjóðarbúið

- Aukið verðmæti sjávarafurða. Ódýrt og vannýtt hráefni getur nýst í beitu.
- Vinsældir smokkfisks og makrils til mannelis hafa aukist verulega á undanföllum árum. Þessi samkeppni leiðir til hækkunar á vöruverði og jafnframt er ljóst að ekki er æskilegt að nota fisk í beitu sem nýtist til mannelis.
- Gerir línuveiðar hagkvæmari og stuðlar að frekari sókn í línuveiðar.
- Línuveiðar er mjög umhverfisvæn veiðiaðferð og færir fiskvinnslunni ferskan fisk, sem hefur orðið fyrir lágmarks hjaski við veiðar.
- Lifríkið í hafinu er lítil hættu búin þar sem línuveiðar eru stundaðar.

### Viðhorf sjómanna til nýju beitunnar

- Getur veitt svipað og hefðbundin beita.
- Sparar hráefni, þar sem hægt er að hafa beituna efnisminni en hefðbundna beitu (auðvelt að krækja í lítill stykki).
- Þarf síður að bleyta upp balann eftir geymslu í frosti þar sem beitan frýs ekki saman.
- Sjófuglar sækja ekki í beituna. Þegar lína með pokabeitunni er lögð þá gefur beitan, sem er enn frosin og innpökkuð frá sér svo litla lykt að fulginn laðast ekki að henni. Mikil vandræði eru oft hvað fuglar flækja sig í línunum.



European Commission  
Thematic Programme 1 -



Quality of Life and Management of Living Resources (QoL)  
Key Action 1 – Sustainable Agriculture, Fisheries and Forestry

Tengiliður: Soffía Vala Tryggvadóttir  
Sími 562-0240; e-mail: soffia@rf.is  
<http://www.rf.is/frettir/frett79.htm>

