

Verkefnaskýrsla
24- 01



Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins

September 2001

Áhrif kítósans á
stöðugleika fiskafurða

Verkefni styrkt af
Nýsköpunarsjóði násmanna
sumarið 2001

Soffía Sveinsdóttir



Titill / Title	Áhrif kítósans á stöðugleika fiskafurða		
Höfundar / Authors	Soffía Sveinsdóttir		
Skýrsla Rf / IFL report	24 - 01	Útgáfudagur / Date:	20.09.2001
Verknr. / project no.	1535		
Styrktaraðilar / funding:	Nýsköpunarsjóður námsmanna Samstarfsaðili: Genís ehf		
Ágríp á íslensku:	<p>Markmið tilraunarinnar var að kanna áhrif kítósans sem íblöndunarefni í fiskhakk og lýsi til að auka geymsluþol.</p> <p>Verkefnið skiptist í tvo hluta. Fyrri hlutinn fólst í uppsetningu á flúrljómunaraðferð til að meta oxun lípíða. Í seinni hlutanum voru gerðar þrjár geymsluþolstilraunir. Í þeirri fyrstu var kítósani blandað í þorskhakk og örveruvöxtur skoðaður. Í næstu tilraun var kítósani einnig blandað saman við þorskhakk og voru áhrif á þrúnun fitu könnuð. Loks var kítósani blandað í lýsi og áhrif á þrúnun þess könnuð. Notað var þrenns konar kítósan; kítósanflögur og kítósangel með mismörgum keðjum (langar og stuttar keðjur).</p> <p>Í örverutilraun voru gerðar talningar á heildarfjölda, fjölda H₂S myndandi baktería og fjölda <i>Photobacterium phosphoreum</i>. Kítósangel í fiskhaki (0,03%) hafði ekki örveruhemjandi áhrif. Upphafsfjöldi örvera í hráefninu var hár og tilraunin var endurtekin með ferskara hráefni og meiri kítósanstyrk. Nær enginn örveruvöxtur var í hópi með uppleystum kítósanflögum (0,15%), en þess skal getið að þær voru leystar í edikssýru (0,04%) sem kann að hafa örveruhemjandi áhrif. Til að meta þrúnun lýsis voru gerðar mælingar á peroxíðgildi, anisíðingildi, flúorljómun og skynmati. Kítósangel í lýsi (200ppm) hafði engin áhrif á þrúnun lýsis metið með TBA, flúorljómun og skynmati. Niðurstöður bentu til þess að kítósangel (0,05%) með löngum keðjum hægði á þrúnun fitu.</p>		
Lykilorð á íslensku:	<i>kítósan, oxun lípíða, flúrljómun, örverur</i>		
Summary in English:	<p>The purpose of this study was to examine the effects of added chitosan to extend the shelf-life of fish mince and fish oil. The project was divided in two: In the first part, a fluorescent method to measure interaction compounds from lipid oxidation was developed. In the second, three storage studies were done. The effects of chitosan on lipid oxidation in fish oil and cod mince and the effect of chitosan on microbial growth in cod mince was evaluated. Chitosan flakes and two types of microcrystalline chitosan gel were used (long and short chains).</p> <p>Chitosan gel (0.03%) did not inhibit microbial growth in the cod mince, according to microbial measurements of total viable counts and counts of presumptive spoilers (H₂S producers and <i>Photobacterium phosphoreum</i>). However, because the number of microorganism was high in the raw material at the beginning of the experiment, it was repeated with fresher cod mince and higher concentration of chitosan. Instead of chitosan gel, chitosan flakes (0.15%) were used and 0.04% acid added to make the flakes soluble. The number of microorganism was lowered but it is not clear if the chitosan alone had this effect or if it was also caused by the added acid.</p> <p>Measurements of peroxide value, anisidine value, fluorescence and sensory analyses were done on the fish oil. Chitosan gel (200ppm) did not have any effect on lipid oxidation in the fish oil. Measurements of TBA, fluorescence and sensory analyses were done to evaluate lipid oxidation in the cod mince. Chitosan gel (0.05%) inhibited lipid oxidation in the cod mince.</p>		
English keywords:	<i>Chitosan, fluorescence, antimicrobial activity, lipid oxidation</i>		

Efnisyfirlit

I. UPPSETNING FLÚRLJÓMUNARAÐFERÐAR

1 INNGANGUR	1
2 AÐFERÐ.....	2
3 UNDIRBÚNINGUR SÝNA.....	2
3.1 Lýsi	2
3.2 Fiskhold	2

II. GEYMSLUPÓLSTILRAUNIR

1 INNGANGUR	3
2 EFNI OG AÐFERÐIR.....	5
2.1 Kítósan	5
2.2 Kítósanlausnir	5
2.3 Örverutilraun I.....	5
2.4 Örverutilraun II	5
2.5 Lýsistilraun	6
2.6 Þrúnunartilraun.....	7
2.7 Heildarfjöldi og fjöldi H ₂ S myndandi baktería	7
2.8 Malthus aðferð	7
2.9 Skynmat á lýsi.....	8
2.10 Skynmat á þorskhakki	8
2.11 Peroxíð gildi (PV).....	8
2.12 Anisidin gildi (AV).....	8
2.13 Totox	9
2.14 Flúrljómun	9
2.15 TBA gildi.....	9
2.16 Sýrustig (pH).....	9
2.17 Tölfræði	9

3 NIÐURSTÖÐUR	10
3.1 Örverutilraun I	10
3.2 Örverutilraun II	12
3.3 Lýsistilraun	14
3.4 Þránunartilraun	18
4 UMRÆÐA OG LOKAORÐ	21
5 ÞAKKARORÐ	22
Heimildaskrá	23
Viðauki 1 Niðurstöður mælinga.....	i
Viðauki 2 Fituútdráttur með Bligh og Dyer	iv

Myndaskrá

I. UPPSETNING FLÚRLJÓMUNARAÐFERÐAR

Mynd 1.	Yfirlit yfir oxun fitusýra	1
Mynd 2.	Myndun Schiff basa	1

II. GEYMSLUPOLSTILRAUNIR

Mynd 3.	Grunnbygging kítíns	3
Mynd 4.	Bygging kítósans, eingöngu glúkósamín	3
Mynd 5.	Niðurstöður talninga á heildarfjölda örvera (TVC) í þorskhakki (tilr. I)	10
Mynd 6.	Niðurstöður talninga á H ₂ S myndandi bakteríum í þorskhakki (tilr. I)..	10
Mynd 7.	Niðurstöður talninga á <i>Photobacterium phosphoreum</i> í þorskhakki með Malthus tæki (örverutilraun I)	11
Mynd 8.	Niðurstöður talninga á heildarfjölda örvera (TVC) í þorskhakki (tilr. II)	12
Mynd 9.	Niðurstöður talninga á H ₂ S myndandi bakteríum í þorskhakki (tilr. II)..	13
Mynd 10.	Niðurstöður skynmats á þráa lýsis	14
Mynd 11.	Niðurstöður flúrljómunarmælingar á lýsi	14
Mynd 12.	Niðurstöður mælinga á peroxíð gildi (PV) í lýsi	16
Mynd 13.	Niðurstöður mælinga á anisidín gildi (AV) í lýsi	16
Mynd 14.	Niðurstöður útreikninga á Totox í lýsi	17
Mynd 15.	Niðurstöður Torry skynmats til að meta ferskleika þorskhakks	18
Mynd 16.	Niðurstöður skynmats til að meta skemmdareinkenni þorskhakks	18
Mynd 17.	Niðurstöður flúrljómunarmælingar á vatnsfasa (δF_{aq}) þorskhakks	19
Mynd 18.	Niðurstöður flúrljómunarmælingar á lífrænum fasa (δF_{or}) þorskhakks ..	19
Mynd 19.	Niðurstöður mælinga á TBA gildi þorskhakks	20

Töfluskrá

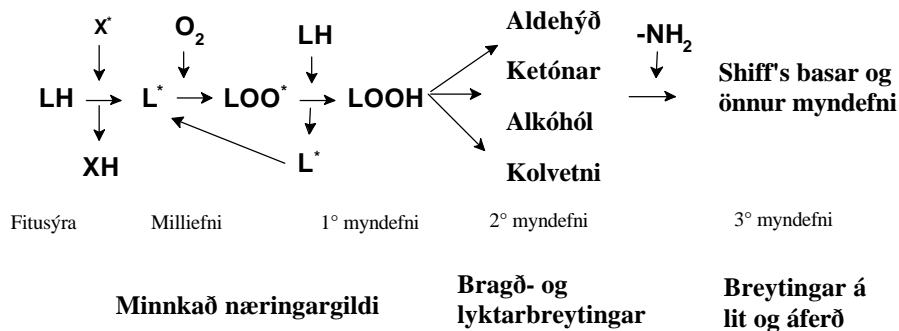
II. GEYMSLUPÓLSTILRAUNIR

Tafla 1.	Upplýsingar um eðliseiginleika kítósans.....	5
Tafla 2.	Yfirlit yfir hópa og aðstæður í lýsistilraun.....	6
Tafla 3.	Yfirlit yfir sýnatökur og mælingar á lýsi.....	6
Tafla 4.	Einkunnastigi fyrir skynmat á lýsi.....	8
Tafla 5.	Torry einkunnastigi fyrir mat á ferskleika soðins magurs fisks	8
Tafla 6.	Einkunnastigi til að meta skemmdareinkenni (þrái, súr, TMA lykt) á þorskhakki.....	8
Tafla 7.	Niðurstöður mælinga á sýrustigi (pH) þorskhakks í örverutilraun II ...	12

I. UPPSETNING FLÚRLJÓMUNARADFERÐAR

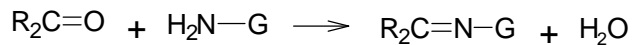
1. Inngangur

Þránun er hluti af skemmdarferli sjávarfangs og annarra matvæla. Þránun er aðallega oxun lípíða, þá einkum fjölómattaðra fitusýra, og veldur meðal annars aflitun, bragð- og lyktarbreytingum (Auborg, 1999a). Þránun er vandamál í matvælum, sérstaklega þeim sem innihalda mikið magn af fjölómettuðum fitusýrum, eins og sjávarfang. Lípíð í fiski skiptist aðallega í tvo flokka. Hlutlaus lípíð eru þríglýseríð sem eru fituforði fisksins. Hinn flokkurinn er skautuð lípíð, fosfólípíð, sem eru í himnum. Himnulípíðin oxast frekar því þau eru ómettaðri en þríglýseríðin (Undeland, 1998). Fitumagn er mjög misjafnt eftir tegundum. Þorskur inniheldur um 0,5% fitu sem er aðallega himnulípíð en lax inniheldur um 15-20% fitu, bæði forðafitu og himnulípíð.



Mynd 1. Yfirlit yfir oxun fitusýra og áhrif hennar. LH er fitusýra, X[•] er hvati, L[•] er alkyl stakeind, LOO[•] er peroxíð stakeind, LOOH er peroxíð (Undeland, 1998).

Oxun er efnaferli í nokkrum skrefum og er oft erfitt að mæla hversu langt oxunin er komin vegna þess að myndefnin eru hvarfgjörn og hvarfast fljótt áfram. Niðurbrotsefnunum er skipt í 1° myndefni (vetnisperoxíð, peroxíð) og 2° myndefni (alkóhól, aldehyð, ketónar, kolvetni). Karbonylfni (aldehyð, ketónar) eru hvarfgjörn og hvarfast gjarnan við efni sem eru til staðar í fiskholdinu og innihalda amínóhóp. Sem dæmi má nefna prótein, fríar amínósýrur og fosfólípíð. Rafsækinn karbonylhópurinn hvarfast við kjarnsækinn amínóhóp og mynda Schiff basa sem kallast 3° myndefni lípíðoxunar. Þessi efni gefa einkennandi flúrljómun. Með því að mæla flúrljómun má því fylgjast með þránun, t.d. í lýsi eða fiskholdi.



Mynd 2. Myndun Schiff basa.

Margar aðferðir eru notaðar til að meta þránun á hinum ýmsu stigum oxunarinnar. Sem dæmi má nefna að peroxíð gildi (PV) er mælikvarði á 1° myndefni meðan anisidín gildi (AV) og thiobarbituric acid gildi (TBA) eru mælikvarði á magn 2° myndefna. Ákveðin takmörkun háir þessum mælingum því oxun er flókið ferli og oft erfitt að mæla þessi gildi (Undeland 1998). Því hafa rannsóknir undanfarið ár beinst að þróun betri aðferða til að meta þránun. Flúrljómun er ein þeirra og hafa ýmsar rannsóknir verið gerðar

síðastliðin ár þar sem flúrljómun við ýmsar bylgjulengdir er notuð til að meta þránun. Wold og Mielnik (2000) notuðu flúrljómun til að meta þránun í hökkuðum kjúklingum. Þeir mældu gleypni (excitation, ex) við 365, 380 og 400 nm, bæði fyrir föst sýni og þar sem þeir drógu fituna út í klóróform. Bæði voru borin saman við TBA gildi og fékkst betri fylgni fyrir klóróformútdráttinn. Undeland og Lingnert (1999) notuðu mældu gleypni (ex) við 367nm og ljómun (emission, em) við 420nm til að meta þránun síldar. Auborg o.fl. (1997) notuðu tvö ex/em gildi, 393/463 og 327/415 fyrir sardínur. Var bæði mælt fyrir klóróformfasa og vatnsfasa fituútdráttar (Bligh og Dyer, 1959). Þeir fundu út að fosfólípíð sem amínógjafar mynda Schiffbasa sem eru óleysanlegir í vatnsfasa en þar sem prótein er amínógjafinn myndast vatnsleysanleg flúrljómandi efni. Eftir því sem líður á oxunarferlið, myndast meira af vatnsleysanlegum flúrljómandi efnum. Gildið fyrir klóróformfasann jókst í upphafi en eftir 9 mánuði fór það minnkandi (Auborg og Medina, 1997).

Í þessu verkefni er markmiðið að setja upp flúrljómunaraðferð og athuga hvort hægt sé að nota hana til að meta þránun (3° myndefni) í lýsi og fiskhakki.

2. AÐFERÐ

Flúrljómun er mæld á Perkin-Elmer LS 50 B flúrljómunarmæli. Stuðst er við aðferð, sem þróuð var af Auborg o.fl. (Auborg og Medina 1997; Auborg o.fl., 1997; Auborg o.fl., 1998). Útslag er mælt við bylgjulengdirnar ex/em 393/463 nm og ex/em 327/415 nm.

Flúrljómunargildið er

$$dF = \frac{F_{393/463}}{F_{327/415}} \quad (1)$$

$$\text{þ.s. } F_{393/463} = \frac{F}{F_{st}} \quad (2)$$

F er útslagið, F_{st} er útslag quininesúlfat-staðals ($1\mu\text{g/mL}$ í $0,05\text{M H}_2\text{SO}_4(\text{aq})$)við viðkomandi bylgjulengdir. $F_{327/415}$ er fengið á sama hátt. Fyrir mælingar á fiskholdi er δF_{aq} flúrljómunargildi fyrir vatnsfasa og δF_{or} gildi fyrir klóróformfasa.

3. UNDIRBÚNINGUR SÝNA

3.1 Lýsi

1,67g lýsi er vigtað í 25mL mæliflösku. Fyllt að marki með klóróformi. (Auborg og Medina, 1997) og mælingar gerðar á þessari lausn.

3.2 Fiskhold

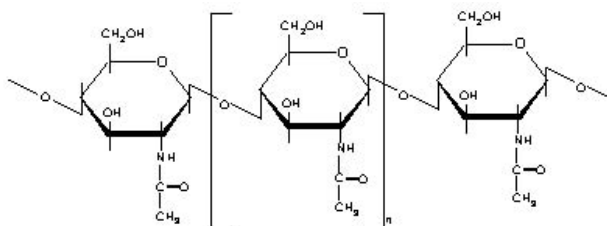
Fituútdráttur er framkvæmdur samkvæmt Bligh og Dyer (1959). Aðskilnaður verður á vatnsfasa og klóróform fasa sem er safnað í 10 mL mæliflösku og fyllt að marki. Vatnsfasi er síaður frá fiskmassa og notaður beint. Mælingar eru gerðar bæði á klóróform fasa og vatnsfasa. (Auborg ofl., 1997). Sjá nánari verklýsingu í viðauka.

II. GEYMSLUÞOLSTILRAUNIR

1. INNGANGUR

Kítín er náttúruleg fjölíða sem er einn af meginþáttum í samsetningu ytri stoðgrindar hjá skordýrum og krabbadýrum. Fjölíðan er samsett úr amínósykranni N-asetýlgjúkósamín og er kítín næst algengasta fjölíðan í lífríkinu, næst á eftir sellulósa.

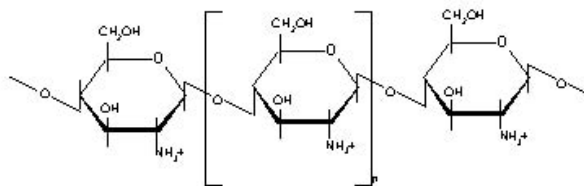
Ýmsar afleiður kítíns eru þekktar. Sú algengasta nefnist kítósan og er framleidd með því að nema brott asetýlhópa með vatnsrofi í sterkum lút. Hugtakið kítósan nær yfir allar samfjölíður (copolymers) N-asetýlgjúkósamíns og gljúkósamíns, sem hægt er að leysa í súrum vatnslausnum (pH < 6,5). Það eru því til kítósanefni sem innihalda



Mynd 3. Grunnbygging kítíns (www.genis.is, 2001)

misjafnt hlutfall af N-asetýlgjúkósamín og gljúkósamín einsykrum sem endurspeglast í misjöfnum efna- og eðliseiginleikum efnanna.

Vegna þess hve kítósanefni geta tekið á sig margbreytileg form hafa vísindamenn greint fjölbreytileg not fyrir þessi efni, bæði í lyfjaiðnaði, til lækninga, í matvælaíðnaði og í snyrtivörur svo eitthvað sé nefnt (Yamamoto o.fl. 2000; Chen og Heh, 2000).



Mynd 4. Bygging kítósans, eingöngu gljúkósamín (www.genis.is, 2001).

Nærtækt dæmi er að kítósan er aðalefnið í „Fat binder“, sem sér til þess að fita úr fæðu fari ómelt gegnum meltingarveginn. Rannsóknir sem tengjast matvælaíðnaði hafa einkum fjallað um himnur sem gerðar eru úr kítíni eða kítósan (Wiles o.fl., 2000). Minni áhersla hefur verið á rannsóknir sem tengjast notagildi kítínafleiða sem hjálparefni í matvæli.

Nokkrar rannsóknir hafa verið gerðar á örveruhamjandi áhrifum kítóans (Oh o.fl., 2000; Skonberg, 2000). Kítósan í majonesi reyndist hafa letjandi áhrif á örveruvöxt í styrkleikanum 3g/L (Covill og Roller, 2000). Tsai o.fl. (2000) blönduðu lausn kítósanfáliðu (oligosaccharide) út í mjólk í styrkleikunum 0,24% og 0,48%. Þeirra niðurstöður gáfu til kynna örveruhamjandi áhrif við 4°C en við hitun mjólkurinnar í 37°C hafði kítósaníð engin áhrif. Gerð var tilraun með hakkað kjöt og reyndist 1% kítósan hafa örveruhamjandi áhrif en ekki lægri styrkir (0,2% og 0,5%). Eins kom í ljós að hár upphafs fjöldi örvera dró úr áhrifum kítóans (Darmadji og Izumimoto, 1994).

Hvað varðar upplýsingar um þráavarnarvirkni kítíns og kítóans þá eru þær af skornum skammti. Janak Kamil o.fl. (2000) sáu marktækt minni þránun í soðinni síld sem

meðhöndluð hafði verið með mismunandi magni af kítósani, mælt með PV, TBA, CD (conjugated diens) og mælingum á propanali með "headspace" aðferð.

Í þessu verkefni var ætlunin að skoða með geymsluþolstilraunum hvort nota mætti kítósan sem íblöndunarefni í fiskafurðir til að auka stöðugleika þeirra. Gerðar voru þrjár tilraunir. Í þeirri fyrstu var kítósani blandað í fiskhakk og örveruvöxtur skoðaður (örverutilraun). Heildarfjöldi örvera (total viable count, TVC) var gerður. TVC telur ekki einungis skemmdarörverur og gefur því ekki rétta mynd af skemmdum heldur frekar hreinlæti sýnanna. Því hafa menn beint sjónum sínum að sértækum skemmdarörverum (specific spoilage organism) eins og H₂S myndandi bakteríum (presumptive spoilers) og *Photobacterium phosphoerum* (Dalgaard, 1995). Voru því einnig gerðar mælingar á þessum bakteríum. Í næstu tilraun var kítósani einnig blandað við fiskhakk en nú voru áhrif á þránun fitu könnuð (þránunartilraun). Loks var kítósani blandað í lýsi og áhrif á þránun þess könnuð (lýsistilraun). Til að meta þránunina var notað skynmat og hefðbundnar aðferðir eins og mælingar á peroxíðgildi (PV), anisidingildi (AV) og TBA-gildi. Að auki var flúrljómun mæld til að kanna hvort hugsanlega mætti nota flúrljómun til að meta þránunina.

2 EFNI OG AÐFERÐIR

2.1 Kítósan

Prenns konar kítósan var fengið hjá Genís ehf. Um er að ræða microcrystalline kítósangel (MCCh) og hins vegar þurrt kítósan í flögum (flögukítósan). Annað microcrystalline kítósanið er fáskyra en hitt fjölskyra (sjá töflu 1).

Tafla 1. Upplýsingar um eðliseiginleika kítósans (Jón M. Einarsson, 2001).

Nafn	Mólpungi [kDa]	Deacetyl stig [%]	Þurrefni [%]
MCCh 03 (fáskyra)	88	98	7,0
MCCh 04 (fjölskyra)	2370	97	4,7
Flögukítósan	267	82	95,7

Áður en geymsluþolstilraunir hófust voru gerðar fortílaunir með leysni kítósanefnanna þriggja og var ákveðið út frá því hvers konar lausnir voru útbúnar.

2.2 Kítósanlausnir

a) Útbúnar voru 1% (w/w) lausnir með MCCh 04 og MCCh 03 sem notaðar voru bæði í örverutilraun I og þrúnunartilraun þorskhakks. 1 g af kítósani var sett í 400 mL bikarglas ásamt 100 mL af afjónuðu vatni. Hrært var með segulhræru í 45 mín. Þá var 0,2mL af 96% edikssýru bætt út í og hrært í 30 mín til viðbótar. Lausnin var glær og frekar þykk.

b) Útbúin var 2% (w/w) lausn með flögukítósani sem notuð var í örverutilraun II. 1g af kítósani var sett í bikarglas, 50 mL af köldu kranavatni, sem látið var renna 10 mín fyrir notkun, var bætt út í og hrært með segulhræru í 10 mín. Þá var 1 mL af 96% edikssýru bætt út í og hrært í 20 mín til viðbótar. Lausnin var glær með gulum blæ og frekar þykk.

2.3 Örverutilraun I - þorskhakk

Roðflett og beinhreinsuð 2ja daga þorsklök frá Fiskbúð Hafliða voru hökkuð með Braun matvinnsluvél (Braun 4262, Kronberg Germany) í 15-20 sek á hraðastillingu 5. Þrír hópar voru notaðir, tvísýni af hverjum. Í einn hóp var blandað MCCh 03 lausn, í annan MCCh 04 lausn en í þann þriðja sama magni af afjónuðu vatni (viðmið). Styrkleiki lausna var 3,2% eða 0,03% styrkur af kítósani í hakkinu. Styrkur edikssýru er hverfandi í hakkinu.

Hakkið var geymt í kæli við 0-2°C og voru mælingar gerðar eftir 0, 3, 6 og 8 daga. Mældur var heildarfjöldi örvera, TVC (total viable count), fjöldi H₂S-myndandi baktería og loks fjöldi *Photobacterium phosphoreum* með Malthus-aðferð.

2.4 Örverutilraun II - þorskhakk

Fengnir voru þrír lifandi blóðgaðir og slægðir þorskar veiddir af Sindra RE degi áður. Fiskarnir voru roðflettir og beinhreinsaðir og hakkaðir með Braun hakkavél (Braun 4262,

Kronberg Germany) í 15-20 sek á hraðastillingu 5. Útbúnir voru tveir hópar, annars vegar með flögukítósanlausn (kítósan) og hins vegar með sama vatnsmagni (viðmið). Notaður var 7,7% styrkur af kítósanlausn sem þýðir 0,15% styrk af kítósan í sýninu. Styrkur edikssýru er 0,04% í hakkinu.

Hakkið var geymt í kæli við 0-2°C og mælingar voru gerðar eftir 0, 2, 5 og 8 daga. Mældur var heildarfjöldi örvera, TVC (total viable count) og fjöldi H₂S-myndandi baktería. Þekkt er að lækun sýrustigs minnkar örveruvöxt (Jónas Bjarnason, 1997) og því var sýrustig mælt í sýnunum. Sýrustig var stillt í hluta hópanna (V-sýra og K-sýra) og örverutalningar á þeim gerðar eftir 2 og 8 daga.

2.5 Lýsistilraun

Tilraunin er sett upp með smækkaðri þáttatilraun (fractional factorial design) í tölfræðiforritinu Unscrambler v7.5. Skoðaðar voru þrjár breytur; hiti+ljós, loft og kítósan og voru notaðir fjórir hópar, K, H, L og HKL. Sjá töflu 2.

Tafla 2. Yfirlit yfir hópa og aðstæður í lýsistilraun.

	Nafn	Breytur ^b			Aðstæður
		Hiti/ljós	Loft	Kítósan	
1	K1	÷	÷	+	Lýsi með kítósan í dimmum kæli (4,5 ± 0,5 °C)
2	K2	÷	÷	+	
3	H1	+	÷	÷	Lýsi án kítósans í hita (22,4 ± 0,9 °C) og ljósi ^a
4	H2	+	÷	÷	
5	L1	÷	+	÷	Lýsi án kítósan í dimmum kæli (4,5 ± 0,5 °C) og lofti
6	L2	÷	+	÷	
7	HKL 1	+	+	+	Lýsi með kítósan í hita (22,4 ± 0,9 °C), ljósi ^a og lofti
8	HKL 2	+	+	+	

^a Ljós = lampi við bylgjulendirnar 420-750 nm

^b ÷ þýðir án breytu, + þýðir með breytu

Erlenmayerflöskur, 300 mL, voru notaðar fyrir hópa L og HKL. Þær voru opnar fyrir lofti og hrært í lýsinu með segulhræru. Ílát H og K voru ferkantaðar, lokaðar glerflöskur, 250 mL. Magn lýsis var u.þ.b. 250 mL fyrir hvern hóp. Að auki var viðmið (V) geymt í ísskáp allan tímann (án ljóss og lofts) og mælingar gerðar til samanburðar (geymt í sams konar flösku og H og K).

Keypt var þorskalýsi frá Lýsi hf. (lotunúmer 101911. Keypt 11. júní 2001) Notað var MCCh 04 kítósan sem leyst var upp í lýsinu sjálfu. Styrkleiki þess í lýsinu var 200 ppm.

Tafla 3. Yfirlit yfir sýnatökur og mælingar á lýsi.

Dagar	Dags	Mælingar	Hvaða hópar mældir
0	12.06.	Skynmat, flúrljómun, AV, PV.	Viðmið
14	26.06.	Skynmat, flúrljómun	Allir hópar auk viðmiðs
28	10.07.	Skynmat, flúrljómun	Allir hópar auk viðmiðs
65	16.08.	Skynmat, flúrljómun, AV, PV.	Allir hópar auk viðmiðs

2.6 Pránunartilraun á þorskhakki

Roðflett og beinhreinsuð 2ja daga þorsklök frá Fiskbúð Hafliða voru hökkuð með Braun matvinnsluvél (Braun 4262, Kronberg Germany) í 15-20 sek á hraðastillingu 5. Þrír hópar voru notaðir, tvísýni af hverjum. Í einn hóp var blandað MCCh 03 lausn, í annan MCCh 04 en í þann þriðja sama magni af afjönuðu vatni. 5,0% styrkleiki af lausnum eða 0,05% styrkur af kítósani í hakkinu.

Hakkið var geymt í frysti við $-24\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Mælingar voru gerðar eftir 0, 14, 49 og 70 daga. Mæld var flúrljómun, TBA-gildi og skynmat til að meta ferskleika og skemmdareinkenni.

2.7 Heildarfjöldi og fjöldi H₂S myndandi baktería

Fisksýnin voru tekin reglulega (dagar 0-3-6-8) á geymslutímabilinu, 25 g blandað með 225 g kældum þynningarvökva MRD (Oxoid) og sýnin möguð í 1 mín. Tífoldar þynningar voru einnig gerðar í kældum þynningarvökva MRD. Járn æti (Gram o.fl, 1987) var notað til hefðbundinnar mælingar á heildarörverufjölda og fjölda H₂S-myndandi baktería (presumptive spoilers). Yfirborðssáningaraðferð var notuð og innihélt ætið 1% NaCl. Ræktað var við 15°C í 4-5 daga.

2.8 Malthus aðferð

MALTHUS tækið var notað til hraðvirkari mælingar á heildarörverufjölda og fjölda *Photobacterium phosphoreum*. Þessi gerill finnst víða í sjávarumhverfinu og er einnig hluti af þarmaörveruflóru fisks (van Spreekens, 1974; Dalgaard, 1995).

Fjöldi *Photobacterium phosphoreum* var kannaður samkvæmt Dalgaard o.fl. (1996). PPDm æti (pH 10) var búið til, gerileytt, skammtað í dauðhreinsaðar Malthus sellur sem voru geymdar yfir nótt við 5°C í loftfirrðri krukku (Oxoid HP011AP) og fyllt með 100% CO₂. 0,5 mL af hverju sýni var skammtaður í 2 sellur, elektróðurnar og tapparnir settir á og sellurnar látnar í Malthus baðið (15°C). Þegar svörun fékkst var tímalengdin (detection time, DT) fyrir hvert sýni skráð niður. Fjöldi *Photobacterium phosphoreum* var áætlaður út frá staðalkúrfunni:

$$\text{Log fjöldi} / \text{g} = -0,1256 * \text{DT} + 8,2771 \quad (3)$$

Þessi staðalkúrfa fékkst með því að bera saman DT niðurstöðurnar og hefðbundar talningar einangraðra *P. phosphoreum* stofna (Lauzon, 2001).

2.9 Skynmat á lýsi

Lyktað var af lýsi til að meta þráa og notast við einkunnastiga í töflu 4. Fjórir vanir dómara mátu sýnin í hvert skipti.

Tafla 4. Einkunnastigi fyrir skynmat á lýsi.

Einkunn	Lýsing
0	enginn þrái
1/2	á mörkum
1	vottur
2	lítill
3	greinilegur
4	mikill þrái

2.10 Skynmat á þorskhakki

Hakkið var gufusóðið og smakkað til að meta ferskleika þess og hvort skemmdareinkenni kæmu fram. Fjórir vanir dómara mátu sýnin í hvert skipti og var stuðst við tvo einkunnastiga, annan fyrir ferskleika (tafla 5) og hinn fyrir skemmdareinkenni (tafla 6).

Tafla 5. Torry einkunnastigi fyrir mat á ferskleika soðins magurs fisks.

Lykt	Bragð	Einkunn
Dauf lykt af sætri soðinni mjólk, sterkju	Vatnskennt, málmkennt. Ekki sætt en kjötkennt munnhrif, e.t.v. örlítill sæta	10
Skelfisk-, þörungalykt, soðið kjöt	Sætt, kjötkennt, einkennandi fyrir tegundina	9
Minnkandi hlutlaus lykt	Sætt, einkennandi en daufara	8
Sag, timbur, vanilla	Hlutlaust	7
Soðin mjólk, soðnar kartöflur	Bragðlítið (í átt að óbragði)	6
Mjólkurkönnulykt, soðinn þvottur	Aðeins súrt, vottur af óbragði	5
Súr mjólk, mjólkursýra, TMA-lykt	Aðeins beiskt, súrt, vottur af TMA (sigið), óbragð	4
Ediksýru-, smjörkýru-, sápu-, rófulykt	Sterkt beiskt, TMA bragð, örlítið súlfít	3

Tafla 6. Einkunnastigi til að meta skemmdareinkenni (þrái, súr, TMA lykt) á þorskhakki:

Einkunn	Lýsing
0	enginn skemmdarlykt
1/2	á mörkum
1	vottur
2	lítill
3	greinileg
4	mikil skemmdarlykt

2.11 Peroxíð gildi (PV)

Mælt samkvæmt AOCS Official Method Cd 8-53.

2.12 Anisidín gildi (AV)

Mælt samkvæmt ISO/FDIS 6885.

2.13 Totox

Er skilgreint sem

$$\text{Totox} = 2 \cdot \text{PV} + \text{AV} \quad [\text{meq/kg}] \quad (4)$$

2.14 Flúrljómun

Flúrljómun var mæld með Perkin-Elmer LS 50 B flúrljómunarmæli. Mælt eins og lýst er í I. hluta skýrslunnar, „Uppsetning flúrljómunaraðferðar“ með þeirri breytingu að ekki er leiðrétt með staðli vegna þess að staðalefnið (quinine súlfat) barst ekki í tæka tíð.

2.15 TBA

Mælt samkvæmt Tarladgis ofl. JAOCS, 37 44 (1954).

2.16 Sýrustig (pH)

20g af fiskhakki voru vegin og sett í bikarglas ásamt 80 mL af afjónuðu vatni. Hrært var með segulhræru í 10 mín. Sýrustig blöndunnar var mælt með PHM 80 Portable pH meter.

2.17 Tölfræði

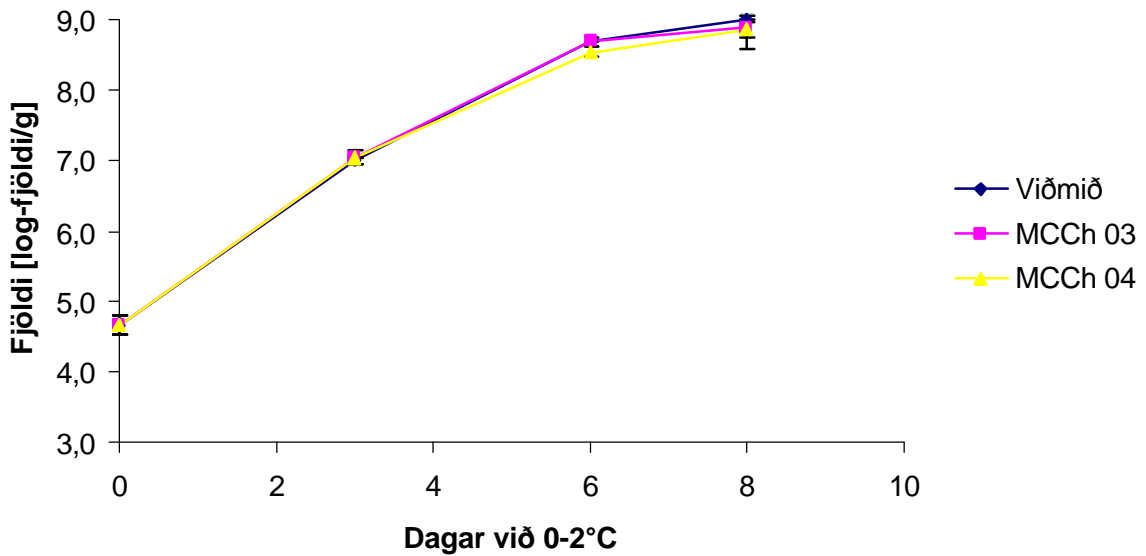
ANOVA var reiknað með forritinu NCSS 2000 and PASS Trial (Copyright 2000 by Jerry Hintze). Notað var Duncan's Multiple-Comparision Test með 95% öryggismörk ($p = 0,05$) til að meta marktækni milli hópa.

Fjölbreytugreining (Multivariate Analysis) var gerð með forritinu Unscrambler v7.5 (CAMO ASA, Norway).

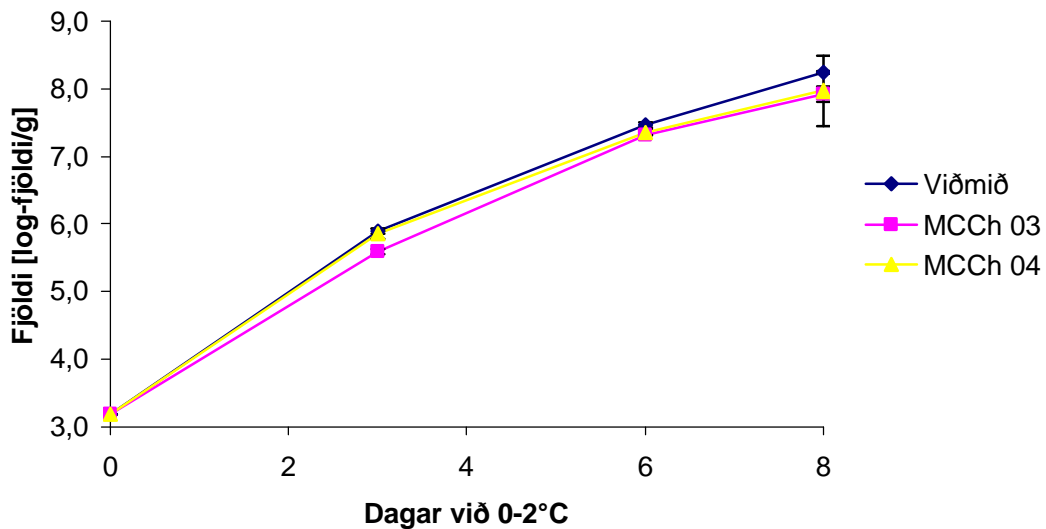
3 NIÐURSTÖÐUR

3.1 Örverutilraun I - þorskhakk

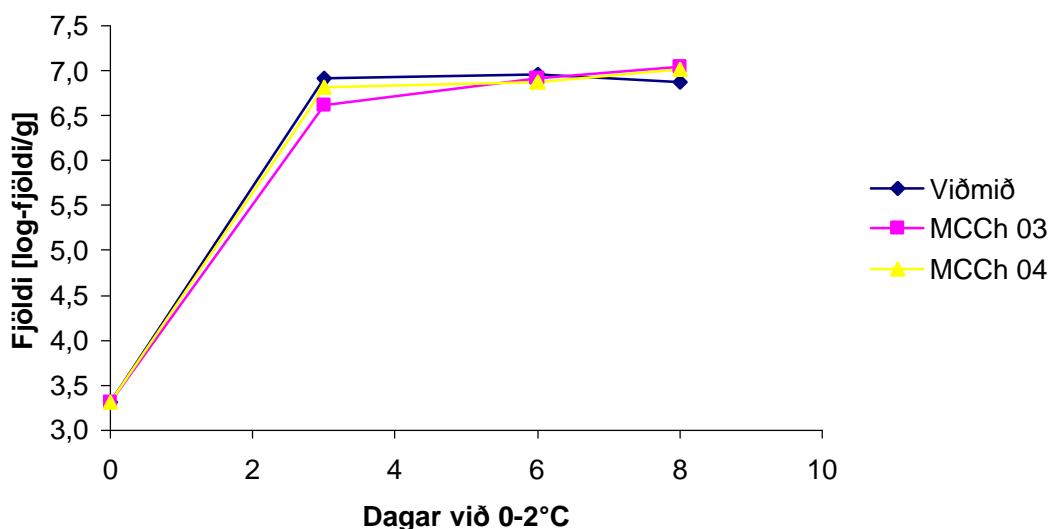
Mældur var heildarfjöldi örvera, fjöldi H_2S myndandi baktería og fjöldi *Photobacterium phosphoreum* í þorskhakki. Myndir 5, 6 og 7 sýna niðurstöður örverutalninganna í þorskhakki sem geymt var 8 daga í kæli ($0-2^\circ C$).



Mynd 5. Niðurstöður talninga á heildarfjölda örvera (TVC) í þorskhakki í örverutilraun I. Meðaltöl auk staðalfráviks.



Mynd 6. Niðurstöður talninga á H_2S myndandi bakteríum í þorskhakki í örverutilraun I. Meðaltöl auk staðalfráviks.



Mynd 7. Niðurstöður talninga á *Photobacterium phosphoreum* í þorskhakki í örverutilraun I Talning gerð með Malthus tæki og í einsýnum.

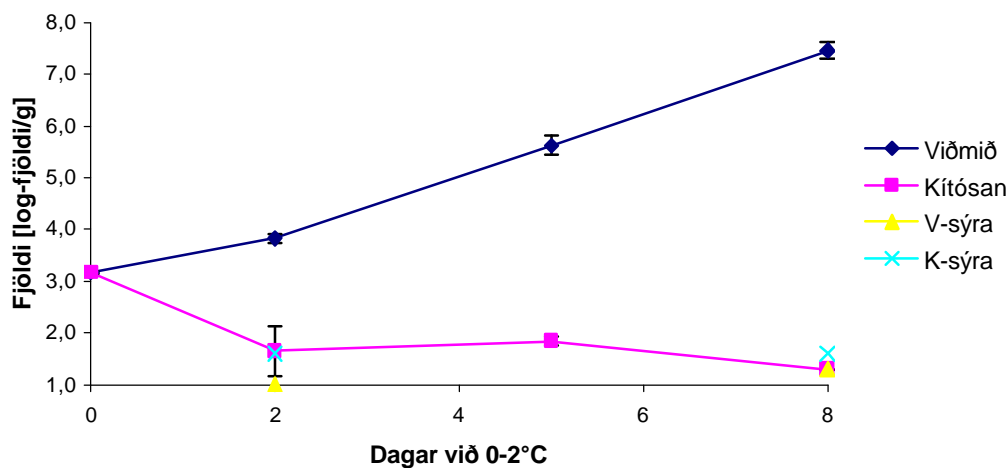
Ekki reyndist vera marktækur munur milli hópa nema eftir 3 daga þar sem MCCh 03 reyndist innihalda marktækt færri ($p = 0,023$) H_2S myndandi bakteríur (sjá mynd 6). Eftir 8 daga er fjöldi H_2S myndandi baktería lægri fyrir kítósanhópuna en fyrir viðmiðið en munurinn þó ekki marktækur. Talning á *Photobacterium phosphoreum* (mynd 7) gaf einnig til kynna að ekki væri neinn munur á örveruvexti í hópunum þremur. Samkvæmt þessum niðurstöðum virtist kítósan ekki hafa örveruhemjandi áhrif miðað við þær aðstæður sem notaðar voru í þetta skipti. Ástæðan fólst einkum í tvennu. Þorskurinn var orðinn 2ja daga gamall og reyndist upphafs fjöldi örvera mjög hár. Eðlilegt gerlamagn í flökum af nýveiddum fiski er 1.000-10.000/g eða log 3-4 (Lauzon, 2001) en hér var upphafs fjöldi 47.000/g eða log 4,66. Reyndar er eðlilegt að gerlamagn sé hærra í hakki því það er meira meðhöndlað en heil flök. Áhöld sem notuð voru við útbúning sýna voru ekki sótthreinsuð og getur því verið að örverur hafi leynst þar. Í heimildum (Darmadji og Izumimoto, 1994; Covill og Roller, 2000) kemur fram að kítósan hafði ekki örveruhemjandi áhrif þar sem upphafs fjöldi örvera var hár og fékkst sama niðurstaða í þessari tilraun. Eins gat haft sitt að segja að styrkur kítósans var frekar lágur, einungis 0,03%. Því var ákveðið að endurtaka þessa tilraun með nýrra hráefni, meiri kítósanstyrkleika og gæta fyllsta hreinlætis við undirbúning sýna.

3.2 Örverutilraun II - þorskhakk

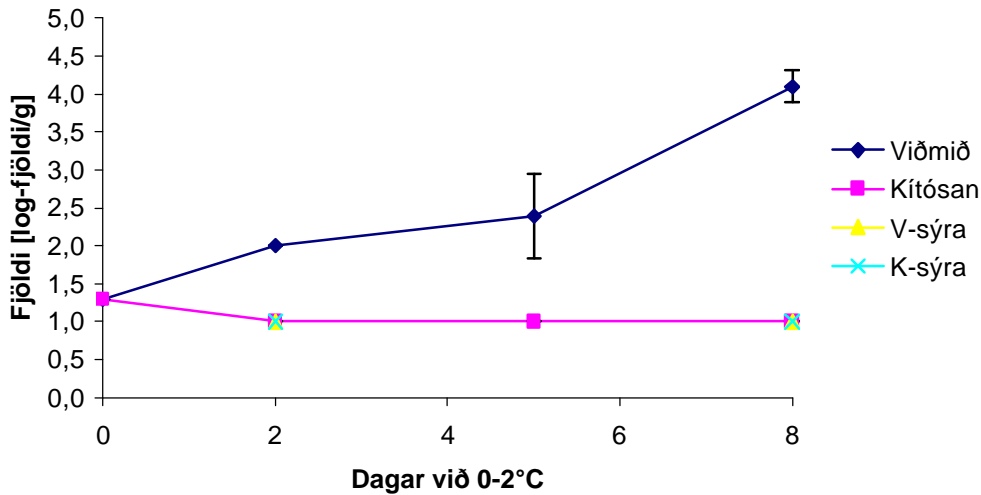
Sýrustig var mælt í hópunum viðmið og kítósan og þegar í ljós kom að töluverður munur var á sýrustiginu var það stillt í hluta hópanna (V-sýra og K-sýra). Niðurstöður sýrustigmælinganna í töflu 7. Heildarfjöldi örvera var talinn og einnig fjöldi H₂S myndandi baktería og má sjá þær niðurstöður á myndum 8 og 9.

Tafla 7. Niðurstöður mælinga á sýrustigi (pH) í þorskhakki.

Hópur	pH
Viðmið	6,76
Kítósan	5,40
V-sýra	5,29
K-sýra	5,38



Mynd 8. Niðurstöður talninga á heildarfjölda örvera (TVC) í þorskhakki í örverutilraun II. Meðaltöl auk staðalfráviks.



Mynd 9. Niðurstöður talninga á fjölda H₂S myndandi baktería í þorskhakki í örverutilraun II. Meðaltöl auk staðalfráviks.

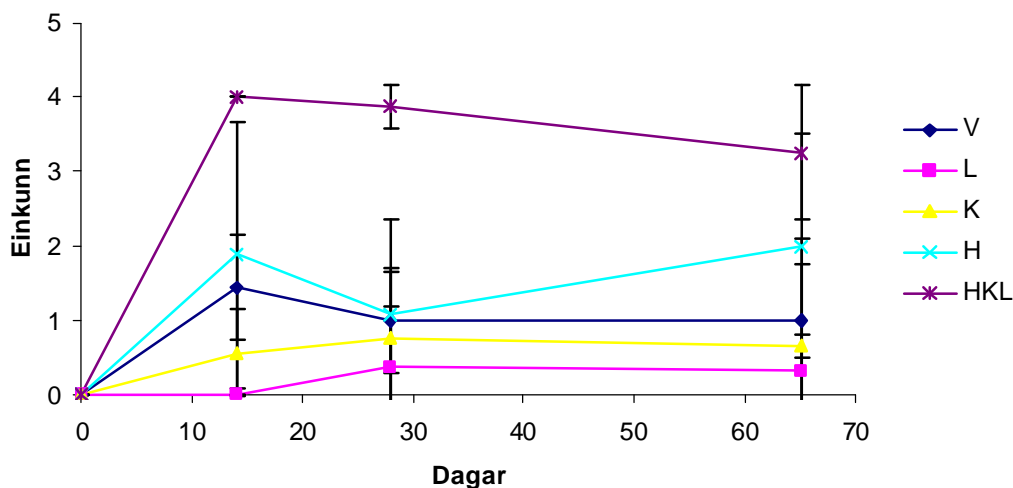
Marktækur munur var alla daga milli viðmiðs og kítósanhóps nema í upphafi, bæði fyrir heildartalningar ($p < 10^{-4}$) og fjölda H₂S myndandi baktería ($p = 0,001$). Eftir 2 daga var viðmið marktækt frábrugðinn ($p < 10^{-6}$) öllum hópum (kítósani, V-sýru og K-sýru) í heildarfjölda (mynd 8) og fjölda H₂S myndandi örvera (mynd 9). Eftir 8 daga var viðmið einnig frábrugðið öllum hópum ($p < 10^{-6}$). Ekki var marktækur munur milli V-sýru og K-sýru.

Niðurstöður gáfu til kynna að örveruvöxtur væri mestur í þeim hópi sem hvorki sýru né kítósani hefur verið bætt út í. Hóparnir kítósan og K-sýra voru nánast þeir sömu, örliðu vatni var bætt í K-sýru í samræmi við vökvamagn sem bætt var í V-sýru til að viðhalda fisk/vökva hlutfalli. Við íbót sýrunnar í viðmið minnkaði örveruvöxturinn töluvert og því ljóst að breyting á sýrustigi virtist vera ráðandi þáttur varðandi örveruvöxtinn. Sýrustig í V-sýru og K-sýru var ekki alveg það sama, V-sýra hafði lægra sýrustig upp á 0,09 (sjá töflu 7). Ekki var þó hægt að draga neinar ályktanir um hvort þessi munur hafði einhver áhrif á örverufjöldann, það er að kítósanið hafi eitthvað hjálpað til í K-sýru hópnum. Af niðurstöðunum var því ekki hægt að draga ályktanir um hvort kítósan hafi örveruhemjandi áhrif. Nánari rannsókn er þörf á þessu sviði, sérstaklega á microcrystalline kítósani því það leysist í vatni með svo lítilli sýruviðbót að áhrif hennar eru hverfandi.

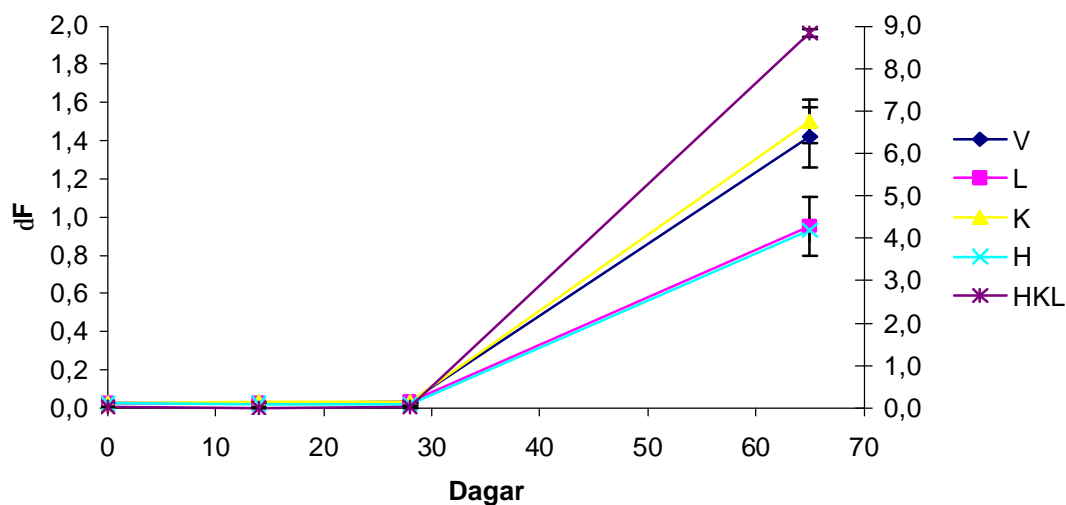
Ef upphafsgildin eru skoðuð í báðum örverutilraunum er ljóst að með auknu hreinlæti má ná heildar örverufjölda niður í það sem eðlilegt getur talist. Í seinni tilrauninni var upphafsfjöldinn 1.450/g eða log 3,16 sem telst venjulegt fyrir fersk flök.

3.3 Lýsistilraun

Gerðar voru skynmatsprófanir á lýsinu og má sjá þær niðurstöður á mynd 10. Eins voru gerðar mælingar á flúrljómandi efnunum og þær niðurstöður má finna á mynd 11.



Mynd 10. Niðurstöður skynmats á þránun í lýsi. Meðaltöl ásamt staðalfrávikum.



Mynd 11. Niðurstöður flúrljómunarmælingar á lýsi. Meðaltöl auk staðalfráviks. Ásinn hægra megin á við HKL en vinstra megin við alla hina hópana.

Niðurstöður mælinga á skynmati og flúrljómun (myndir 10 og 11) gáfu til kynna að einhver þránun hafi átt sér stað á tilraunafmabilinu. HKL var sá hópur sem þránaði mest samkvæmt bæði skynmati og flúrljómun en mæliaðferðunum bar ekki alveg saman um þránun hinna hópanna. Í skynmati var HKL marktækt frábrugðinn ($p = 0,008$) hinum hópunum í lokin (dagar = 65) en milli hinna hópanna reyndist ekki marktækur munur á

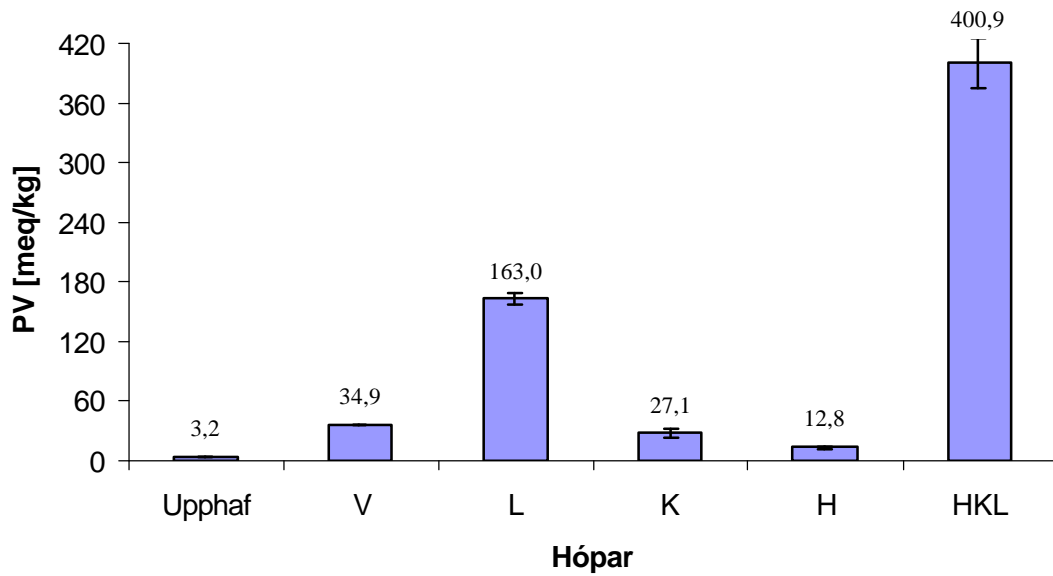
einkunnum. Dómarar voru þó sammála um að munur væri á milli hópa varðandi lykt en tengdu það ekki við þránun heldur aðra þætti. Til dæmis þótti sítruslykt af L hópi en hópur H þótti helst líkjast þrárrí matarolíu. Útlit hópanna var líka mismunandi. HKL lýsið þykknaði meðan á tilrauninni stóð og dökknaði örlítið. Það benti til að fitusýrukeðjurnar hafi fjölliðast og að brúnun hafi átt sér stað. Það eru einkenni skemmdarferlis matvæla og brúnun er hliðarhvarf myndefna oxunarinnar. L lýsið lýstist hins vegar örlítið meðan á tilrauninni stóð. Hinir hóparnir breyttust ekkert í útliti.

Flúrljómunarmælingar gáfu til kynna að mesta þránunin hafi orðið í HKL, næst mest fyrir V og K en minnst fyrir L og H. Það kom á óvart þar sem fyrir V og K voru geymd í kæli, myrkri og án lofts. Hiti, ljós og loft hvetja þránun og því hefði mátt búast við að meiri þránun kæmi fram fyrir L og H. Flúrljómunarmælingar voru gerðar til að athuga hvort mætti nota þær til að meta oxun lípíða. Fundið hefur verið út (Auborg og Medina, 1997) að sum 3° myndefni lípíðoxunar gefa einkennandi flúrljómun en þessi efni myndast við hvarf karbonylefna við amínóhóp ýmissa efna sem finnast í matvælum, svo sem próteina. Lýsi er nánast hrein fita og inniheldur því lítið sem ekkert magn af fríum amínóhópum.

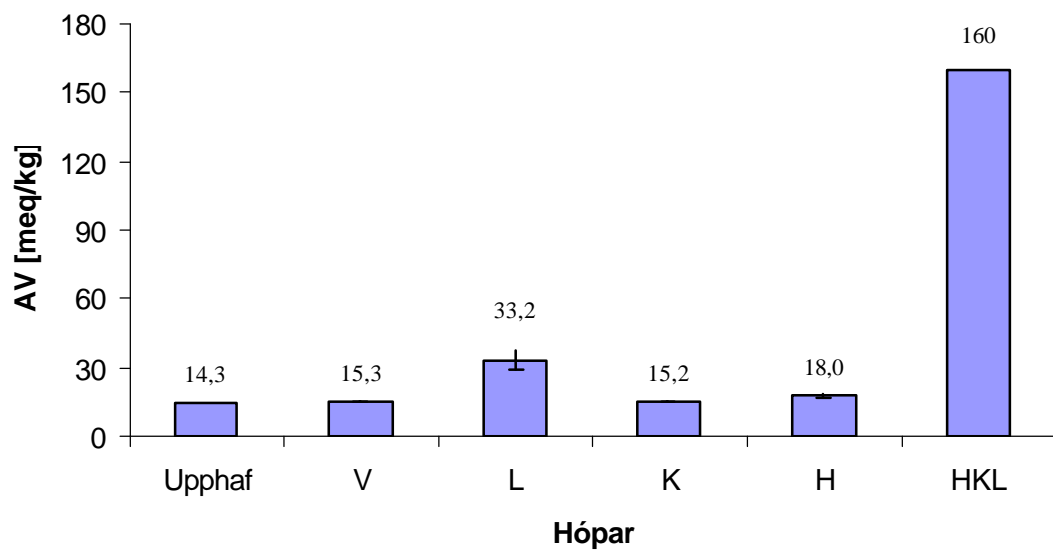
Þessi tilraun gaf til kynna að við geymslu á lýsi fáist hærra δF gildi. Í upphafi var gildið mjög lágt og líklegt að það hafi verið bakgrunnssekkja í tækinu. Í lok tilraunarinnar fékkst stökk í δF gildinu og bendir til að þránun hafi verið komin vel á veg. Það kom heim og saman við að flúrljómunarmælingar eiga að mæla 3° myndefni þránunarinnar en ekki þránun á fyrri stigum. Spurningin er sú hvaða efni flúrljóma, hvort lýsið innihaldi eitthvað af amínóefnum eða hvort það séu annars konar efni sem flúrljóma. HKL hafði greinilega fjölliðast í lokin og sást það á þykkt lýsisins. Einkenni flúrljómandi efna er arómatískt kerfi eða mikið "conjugerað", það er með tvítengjum og eintengjum á víxl þannig að rafeindaflæði sé mikið. Það er ekki ólíklegt að fjölliðurnar hafi verið fjölómettaðar út frá samsetningu þorskalýsis svo vel hugsanlegt er að þær hafi flúrljómað. Annað sem hafa ber í huga er að kítósan inniheldur amínóhópa (sjá mynd 4) og hafa rannsóknir sýnt að kítósan myndar Shiff basa (Tirkistani, 1998). Því er hugsanlegt að flúrljómun megi skýra að einhverju leyti af flúrljómun þessara Shiff basa.

Aðrir hafa mælt flúrljómun á olíu. Auborg og Medina (1997) mældu flúrljómun í niðurlögðum sardínunum. Þær voru meðal annars lagðar í olíu og var flúrljómun mæld í olíunni. Niðurstöðurnar gáfu til kynna að hægt væri að nota flúrljómunina til að meta oxun en hafa ber í huga að sardínur lágu í olíunni svo vel er hugsanlegt að efni úr sardínunum hafi borist út í olíuna. Af þessu er ljóst að nánari rannsókna á flúrljómunarmælingum á lýsi er þörf.

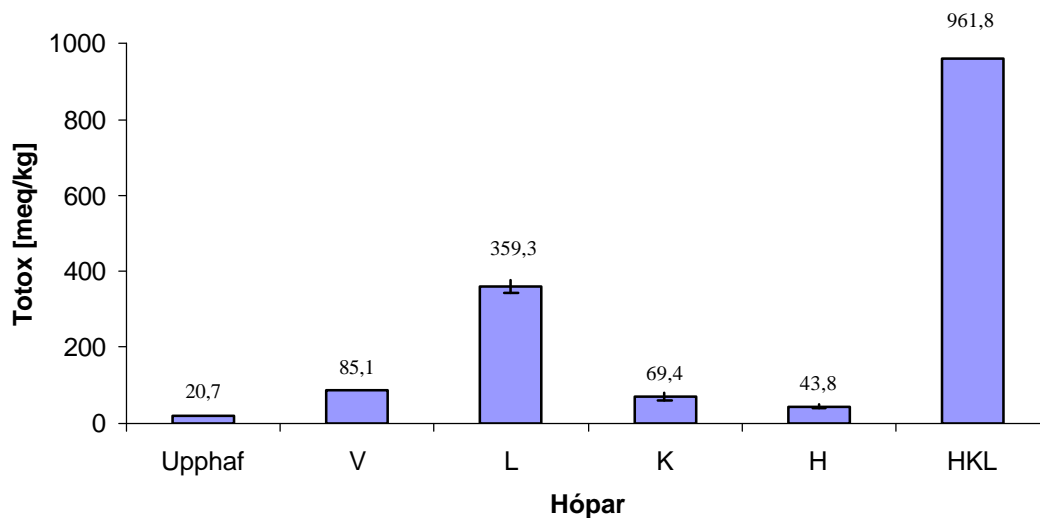
Í upphafi og í lokin voru mæld peroxíð (PV) og anisidín gildi (AV). Þær niðurstöður ásamt niðurstöðum útreikninga á Totoxi má sjá á myndum 12, 13 og 14.



Mynd 12. Niðurstöður mælinga á peroxíð gildi (PV) í lýsi. Meðaltöl auk staðalfrávika. Upphaf er mæling gerð í byrjun (dagar = 0), hinar mælingar eru gerðar í lok tilraunar (dagar = 65).



Mynd 13. Niðurstöður mælinga á anisidín gildi (AV) í lýsi. Meðaltöl auk staðalfrávika. Upphaf er mæling gerð í byrjun (dagar = 0), hinar mælingar eru gerðar í lok tilraunar (dagar = 65).



Mynd 14. Niðurstöður útreikninga á Totoxi í lýsi. Meðaltöl auk staðalfrávik. Upphaf er í byrjun (dagar = 0), annað í lok tilraunar (dagar = 65).

Ljóst var að í öllum tilvikum hafði þránun átt sér stað á tilraunátímabilinu. Fyrir PV og Totox reyndist marktækur munur ($p < 10^{-6}$ fyrir bæði) milli allra hópa nema milli V og K en eini munurinn á hópunum var sá að K innihélt kítósan en V ekki. Fyrir AV ($p < 10^{-6}$) voru HKL og L marktækt frábrugðin öllum öðrum hópum.

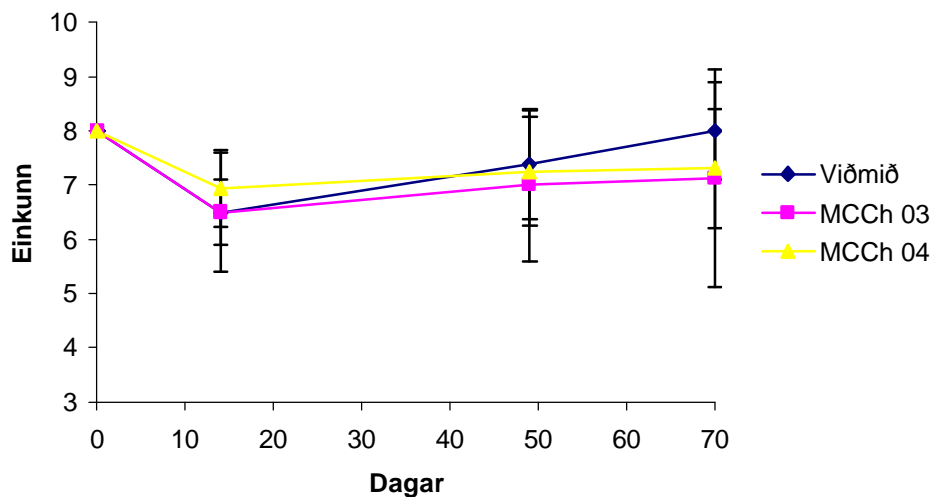
PV er mælikvarði á 1° myndefni þránunnar. Það vex í upphafi en lækkar svo aftur er 1° efnin hvarfast áfram í oxunarferlinu (Margrét Bragadóttir, 1996). Anisidin er mælikvarði á 2° niðurbrotsefni þránunar og eykst með tíma. Totox segir til um heildarþránun í sýninu.

Vegna þess að einungis var um eitt gildi að ræða, bara í lok tilraunar, var erfitt að segja til um út frá PV-gildi hvort V, K og H voru í upphafi þránunnar eða hvort 2° efnin hafi þegar verið farin að myndast. Hins vegar var ljóst út frá gildunum að L var á toppi PV-kúrfunnar miðað við gildi í lýsistilraunum á Rf (Margrét Bragadóttir, 1996). Af AV mátti ráða að mesta þránunin átti sér stað í HKL og var það í samræmi við bæði skynmat og flúrljómun. Næst mesta þránunin var í L en það var hvorki í samræmi við flúrljómun né skynmat. Totox gaf sömu niðurstöðu til kynna. Til að fá betri upplýsingar um þránunina hefði þurft að mæla PV og AV í hvert skipti sem mælingar voru gerðar en ekki bara í upphafi og í lokin. PV og AV eru dýrar mælingar og ekki reyndist unnt að gera fleiri mælingar í þessu verkefni vegna takmarkaðs fjármagns.

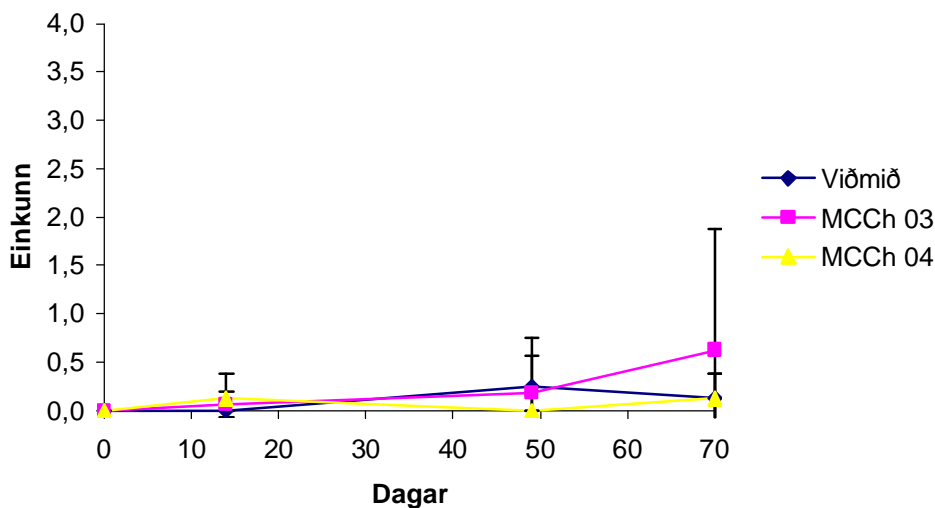
Í HKL voru hvetjandi þættir, hiti, ljós og loft (O_2). Í L var loft (O_2) eini hvetjandi þátturinn. Totox mælingar bentu til þess að loft hafi haft mest áhrif á oxun lípíða. Hins vegar fékkst út frá uppsetningunni (smækkuð þáttatilaun) að allar breytur, kítósan meðtalið, hefðu jákvæð áhrif á þránunina.

3.4 Þránunartilraun

Tvenns konar skynmat var gert á þorskhakkinu, annars vegar til að meta ferskleika og hins vegar skemmdareinkenni. Niðurstöður er að finna á myndum 15 og 16.



Mynd 15. Niðurstöður Torry skynmats til að meta ferskleika þorskhakks sem geymt var í frysti við -24°C . Meðaltöl ásamt staðalfrávikum. Einkunnaskalinn er 3 - 10.

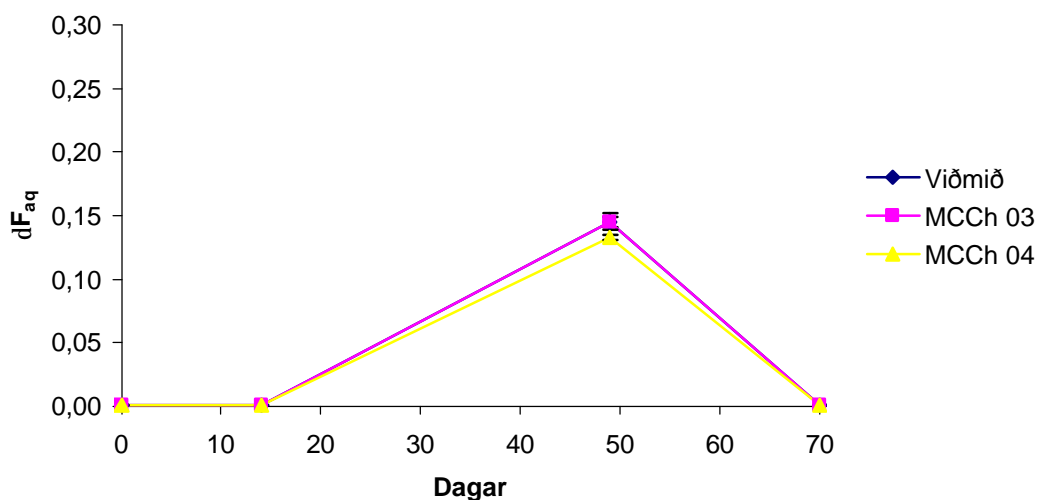


Mynd 16. Niðurstöður skynmats til að meta skemmdareinkenni þorskhakks sem geymt var í frysti við -24°C . Meðaltöl ásamt staðalfrávikum. Einkunnaskalinn er 0-4.

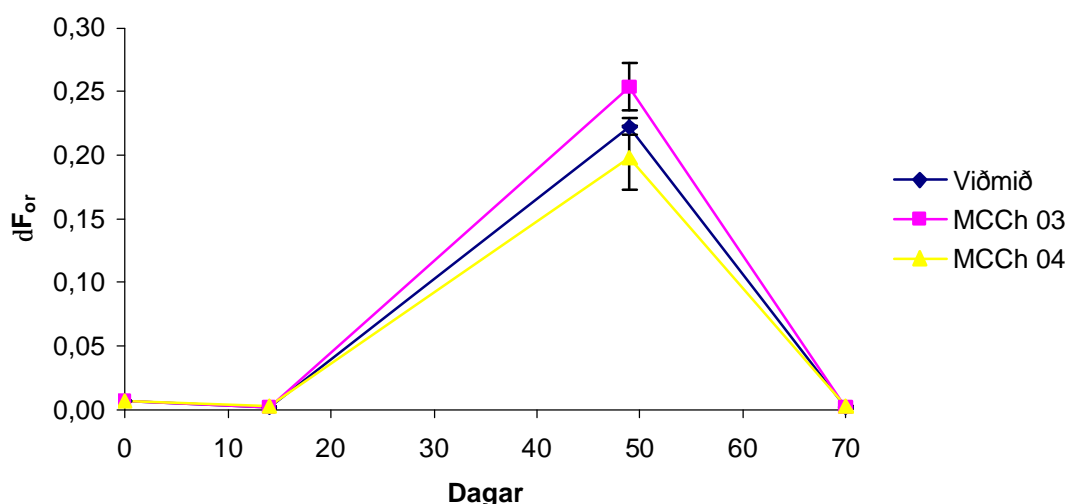
Niðurstöður beggja skynmata gáfu til kynna að frekar líttill munur væri milli hópa allan tímann. Allir hópar á 14. degi voru marktækt frábrugðnir upphafs- og lokamælingu á ferskleika (mynd 15) en á þann dag voru einkunnirnar lægst. Helsta skýringin er sú að dómarar höfðu notað einkunnastigana til að meta annars konar hráefni en höfðu ekki

fengið þjálfun til að meta ferskleika frosins þorskhakks. Marktækur munur ($p < 10^{-4}$) reyndist á ferskleika milli viðmiðs og kíttósanshópa í lokapunkti (mynd 15). Einum dómara fannst MCCh 03 skera sig úr hvað varðaði málmbragð og öðrum fannst vottur af TMA lykt af sama hópi. Tveimur dómurum fannst MCCh 04 sætara en hinir hóparnir. Allir dómara voru þó sammála um að lítið væri um skemmdareinkenni (mynd 16) og að hakkið væri vel hæft til neyslu allan tímann. Ekki reyndist marktækur munur milli hópa varðandi skemmdareinkennin.

Flúrljómunarmælingar voru gerðar bæði á vatnsfasa og lífrænum fasa fituútdráttar. Niðurstöður þeirra mælinga má sjá á myndum 17 og 18.

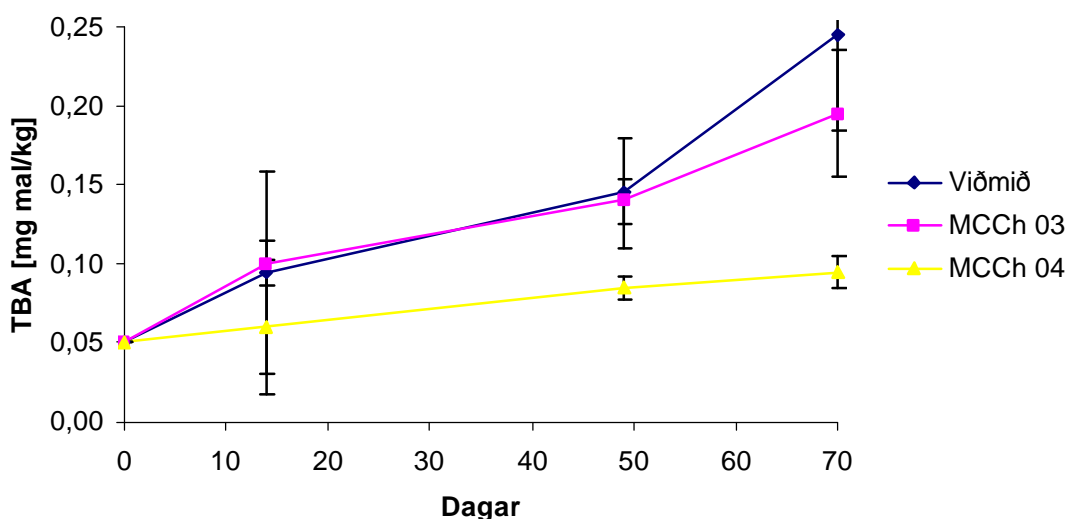


Mynd 17. Niðurstöður flúrljómunarmælingar á vatnsfasa (δF_{aq}) þorskhakks sem geymt var í frysti við -24°C . Meðaltöl ásamt staðalfrávikum.



Mynd 18. Niðurstöður flúrljómunarmælingar á lífrænum fasa (δF_{or}) þorskhakks sem geymt var í frysti við -24°C . Meðaltöl ásamt staðalfrávikum.

Fyrir vatnsfasa (mynd 17) var einungis marktækur munur ($p < 10^{-6}$) milli MCCh 04 og hinna hópanna eftir 49 daga. Fyrir lífrænan fasa (mynd 18) var marktækur munur milli allra hópa eftir 49 daga ($p < 10^{-6}$). Gildin voru mjög lág sem benti til lítillar þránunar en eftir 49 daga hækka öll gildi töluvert og lækka svo aftur. Við mælingarnar var ekki notaður staðall því hann barst ekki í tæka tíð. Því var möguleiki að um sveiflur í mælitækinu hafi verið að ræða. Mælingarnar voru fáar og á tiltölulega stuttu tímabili svo ekki var hægt að alhæfa neitt um tækið og hvort hægt sé að nota flúrljómunarmælingar til að meta þránun. Auborg og Medina (1997) voru með geymsluþolstilraunir í 12 mánuði og þá fékkst fram meiri þránun og aukning á δF gildunum. Þau sáu að δF_{or} óx, náði hámarki eftir 9 mánuði og lækkaði svo aftur meðan δF_{aq} óx jafnt og þétt yfir tilraunatímam. Skýringin var talin sú að mismunandi efni myndu myndast á geymsluþolstímanum og eftir því sem tíminn liði yrði meira af þessum efnun vatnsleysanleg.



Mynd 19. Niðurstöður mælinga á TBA á þorskhakki sem geymt var í frysti við -24°C . Meðaltöl ásamt staðalfrávikum.

Niðurstöður TBA mælinga má sjá á mynd 19. Af henni var ljóst að TBA gildi var lægra fyrir MCCh 04 hópin en hina hópana allan tímann. MCCh 04 hópurinn reyndist þó einungis marktækt frábrugðinn hinum hópunum í lok tilraunar ($p = 0,006$). Af þessum niðurstöðum mátti ráða að MCCh 04 kítósan hægi jafnvel á þránun fitu en MCCh 03 kítósan ekki. Niðurstöðurnar gáfu ástæðu til bjartsýni um að hægt sé nota kítósan til að auka geymsluþol fiskafurða með tilliti til þránunar fitu. TBA gildin voru lág allan tímann sem bendir til þess að þránun hafi ekki verið komin langt á veg. TBA gildi eru mjög mismunandi eftir tegundum og fituinnihaldi. Til dæmis er eðlilegt að TBA gildi mælist kringum 5 fyrir síld, sem er 14% feit án þess að hún sé talin skemmd. Hér voru gildin minni en 0,3 en þorskur inniheldur einungis 0,5% fitu og því eðlilegt að gildin séu lág (Ingibjörg Jónsdóttir, 2001).

4. UMRÆÐA OG LOKAORÐ

Uppsetning flúrljómunaraðferðar gekk vel og er stórt skref í átt að betri mælikvarða á þránun lípíða. Hins vegar er nánari athugana þörf, gera þarf raðir mælinga yfir langt tímabil til að kanna nákvæmlega mælisvið tækisins. Eins er hugsanlegt að mismunandi bylgjulengdir henti ólíkum sýnum eins og heimildir bentu til. Með uppsetningu aðferðarinnar á Rf skapast meiri möguleikar varðandi rannsóknir á þránun fitu.

Helstu ályktanir sem draga mátti af örverutilraun var að máli skipti hversu ferskt hráefnið var og eins að fyllsta hreinlætis sé gætt við undirbúning. Ekki reyndist kítósan hafa nein áhrif í fyrri tilrauninni og í þeirri seinni er ekki hægt að fullyrða neitt vegna sýrunnar sem notuð var til að leysa upp flögukítóسانیð.

Flögukítósan er óleysanlegt í vatni án sýru og vegna sýruáhrifa ekki heppilegt sem íblöndunarefni í fiskafurðir. Sýran hafði þau áhrif á hakkið að prótein eðlissviptust þannig að hakkið varð hvítt og stíft. Hins vegar var enginn útlitsmunur á viðmiði og kítósanhópum í fyrri tilraun þar sem microcrystalline kítóangel var notað. Það leysist frekar auðveldlega í vatni svo þeir kostir hvetja til frekari rannsókna á áhrifum microcrystalline kítóans.

Út frá niðurstöðum lýsistilraunar mátti draga þá ályktun að kítósan hafði ekki hemjandi áhrif á þránun lýsis. Uppsetningin var helst til flókin og innihélt of margar breytur til að skoða eingöngu áhrif kítóans en með samanburði V (sem var í raun fyrir utan uppsetninguna) og K sást greinilega að ekki er marktækur munur milli þessara hópa. Eins hefði þurft fleiri mælingar á PV og AV til að fá betri mynd af þróun lípíðoxunarinnar. Skynmat er mæling með hátt staðalfrávik því hún byggir á huglægu mati dómara. Hins vegar er skynmat heppilegt tæki til að fylgjast með hvers konar breytingar sem verða á hópunum á tilraunatímabilinu, þó svo að þær tengist ekki allar þránuninni. Flúrljómunarmælingin er á byrjunarstigi og er alls ekki fullþróuð aðferð. Því er ekki hægt að byggja neinar heildarályktanir um tilraunina sjálfa út frá henni.

Niðurstöður þránunartilraunar gáfu tilefni til að ætla að microcrystalline kítósan í löngum keðjum dragi úr þránun fitu í þorskhakki og því hugsanlegt að nota megi kítósan til að auka geymsluþol fiskafurða. Frekari rannsókna er þó þörf, einkum með tilliti til styrkleika kítóans í fiskafurðunum og hráefnis. Ákjósanlegt væri að prófa feitari fisk og lengri geymsluþolstíma til að fá betri heildarmynd um þránunina sem og flúrljómunaraðferðina sem verið er að þróa.

Þetta verkefni var eingöngu forprófun hvort hugsanlega mætti nota kítósan til að auka stöðugleika fiskafurða. Í stuttu máli sagt urðu niðurstöðurnar þær að skoða mætti nánar áhrif kítóans á þránun fitu í fiski en hins vegar gáfu niðurstöður ekki tilefni til að ætla að kítósan dragi úr þránun lýsis. Einn þátturinn í því er meðal annars léleg leysni kítóans í lýsinu. Niðurstöður örverutilrauna gáfu til kynna að nánari rannsókna væri þörf á örveruhemjandi áhrifum kítóans, einkum þó microcrystalline kítóans.

5. ÞAKKARORÐ

Mig langar til að þakka Nýsköpunarsjóði námsmanna fyrir fjárveitinguna og Genís ehf. fyrir upplýsingar og leiðbeiningar við efnisval. Leiðbeinendum mínum, Rósu Jónsdóttur og Guðrúnu Ólafsdóttur, þakka ég kærlega fyrir frábæra og lærdómsríka leiðsögn. Að lokum þakka ég Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins fyrir aðstöðuna og starfsfólki hennar hjálpsemina.

HEIMILDIR

AOCS Official Method Cd 8-53.

Auborg, S.P. 1999a. Lipid damage detection during the frozen storage of an underutilized fish species. *Food Research International*. 30, 497-502.

Auborg, S.P. 1999b. Recent Advances in Assessment of Marine Lipid Oxidation by Using Fluorescence. *JAOCS*. 76 (4), 409-419.

Auborg, S. og Medina, I. 1997. Quality Differences Assessment in Canned Sardine (*Sardina pilchardus*) by Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3617-3621.

Auborg, S.P., Gallardo, J.M. og Sotelo, C.G. 1997. Quality Assessment of Sardines During Storage by Measurement of Fluorescent Compounds. *Journal of Food Science*. 62 (2), 295-298.

Auborg, S.P., Pérez-Martín R. og Sotelo, C.G. 1998. Assessment of Quality Changes in Frozen Sardine (*Sardina pilchardus*) by Fluorescence Detection. *JAOCS*. 75 (5), 575-579.

Bligh, E. og Dyer, W. 1959. A rapid method of total extraction og purification. *Canadian Journal of Biochemistry og Physiology*. 37, 911-917.

Chen, R.H. og R.S. Heh, Film-formation time, skin hydration effects, og physicochemical properties of moisture masks containing different water-soluble chitosans. *Journal of Cosmetic Science*, 2000. 51(1): p. 1-13.

Covill, N. og Roller S. 2000. The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise og mayonnaise-based shrimp salads.

Dalgaard, P. 1995. Qualitative og quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 319-333.

Dalgaard, P., O. Mejlholm & H.H. Huss 1996. Conductance method for quantitative determination of *Photobacterium phosphoreum* in fish products. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 57-64.

Darmadji, P., og Izumimoto, M. 1994. Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*. 38, 243-254.

Fang, S.W., Chin, F.L. og Shih, D.Y.C. 1994. Antifungal Activity of Chitosan og Its Preservative Effect on Low-Sugar Cogied Kumquat. *J. of Food Prot.* 57 (2), 136-140.

- Gram, L., Trolle, G. og Huss, H.H. 1987. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 4, 65-72.
- Gram., L og Huss, H.H. 1996. Microbiological spoilage of fish og fish products. *International Journal of Food Microbiology.* 33, 121-137.
- Gray, J.I. 1978. Measurement of lipid oxidation: A rewiev. *JAOCS*, 55, 539-546.
- Ingibjörg Jónsdóttir. 2001. Munnlegar heimildir. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins. ISO/FDIS 6885.
- Janak Kamil, Y.V.A., Jeon, Y.J., Shahidi, F. 2000. Control of oxidation of cooked herring by chitosan. *IFT Abstracts.* 51A-41.
- Jón M. Einarsson. 2001. Munnlegar heimildir. Genís ehf.
- Jónas Bjarnason. 1997. Rotvarnarefni í fiskiðnaði. RF pistlar, Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins.
- Lauzon, H.L. 2001. Munnlegar heimildir. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins.
- Margrét Bragadóttir. 1996. Behavior of anisidine- og peroxide values in commercial cod liver oil. *IFL Report* 120.
- Oh, H.I., Kim, Y.J., Jang, J.H. og Jo, D.H. 2000. Antimicrobial activities of chitosan og their effect of addition on the storage stability of mayonnaise. *IFT Abstracts.* 14B-24.
- Skonberg, D.I. 2000. Extended shelf life of fresh fillets with chitosan coating. *IFT Abstracts.* 51A-30.
- Tarladgis o.fl. 1954. *JAOCS*, 37 44.
- Tirkistani, F.A.A. 1998. Thermal analysis of some chitosan Schiff bases. *Polymer Degradation og Stability.* 60, 67-70.
- Tsai, G.J., Wu, Z.Y., Su, W.H. 2000. Antibacterial activity of chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan og its application to milk preservation. *J Food Prot.* 63: 747-752.
- Undeland, I. 1998. Lipid Oxidation in Fillets of Herring (*Clupea harengus*) during Processing og Storage. Doktorsritgerð við matvælafræðadeild Chalmers tækniháskólans og SIK-The Swedish Institute for food og Biotechnology, Göteborg.

Undeland, I. og Lingnert H. 1999. Lipid Oxidation in Fillets of Herring (*Clupea harengus*) during Frozen Storage. Influence of Prefreezing Storage. J. Agric. Food Chem. 47, 2075-2081.

Undeland, I., Hall G. og Lingnert H. 1999. Lipid Oxidation in Fillets of Herring (*Clupea harengus*) during Ice Storage. J. Agric. Food Chem. 47, 524-532.

van Spreekens, K.J.A. (1974). The suitability of Long and Hammer's medium for the enumeration of more fastidious bacteria from fresh fishery products. Ant. Leeuw. 25, 213-219.

Wiles, J.L., et al. 2000. Water vapor transmission rates og sorption behavior of chitosan films. Journal of Food Science. 65 (7), 1175-1179.

Wold, J.P. og Mielnik, M. 2000. Nondestructive Assessment of Lipid Oxidation in Minced Poultry Meat by Autofluorescence Spectroscopy. Journal of Food Science. 65 (1), 87-95.

www.genis.is. 2001. Heimasíða Genís ehf.

Yamamoto, H., et al., Mucoadhesive liposomes: physicochemical properties og release behavior of water-soluble drugs from chitosan-coated liposomes. Stp Pharma Sciences, 2000. 10(1), 63-68.

Tafla v1. Niðurstöður talningar á H₂S myndandi bakteríum (Presumptive spoilers) [log-fjöldi/g]. Gefin eru upp meðaltöl ásamt staðalfrávikum (n = 2).

Dagar	Viðmið	MCCh 03	MCCh 04
0	3,18 ± 0,00	3,18 ± 0,00	3,18 ± 0,00
3	5,89 ± 0,04	5,60 ± 0,04	5,85 ± 0,08
6	7,47 ± 0,03	7,32 ± 0,00	7,36 ± 0,05
8	8,24 ± 0,02	7,92 ± 0,11	7,97 ± 0,52

Tafla v2. Niðurstöður heildarörverutalningar [log-fjöldi/g] (n = 2)

Dagar	Viðmið	MCCh 03	MCCh 04
0	4,66 ± 0,15	4,66 ± 0,15	4,66 ± 0,15
3	7,01 ± 0,05	7,05 ± 0,09 ^a	7,04 ± 0,00
6	8,71 ± 0,00	8,69 ± 0,06	8,54 ± 0,07
8	8,99 ± 0,02	8,90 ± 0,15	8,85 ± 0,27

^a marktækur munur milli MCCh 03 og hinna hópanna eftir 3 daga.

Tafla v3. Niðurstöður talningar á fjölda *Photobacterium phosphoreum* með Malthus aðferð [log-fjöldi/g] (n = 1).

Dagar	Viðmið	MCCh 03	MCCh 04
0	3,31	3,31	3,31
3	6,91	6,62	6,82
6	6,96	6,92	6,88
8	6,87	7,05	7,02

Tafla v4. Niðurstöður talningar á H₂S myndandi bakteríum (Presumptive spoilers) [log-fjöldi/g] í seinni tilraun. Gefin eru upp meðaltöl ásamt staðalfrávikum (n = 2).

Dagar	Viðmið	Kítósan	V-sýra	K-sýra
0	1,30 ± 0,00	1,30 ± 0,00	---	---
2	2,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
5	2,39 ± 0,55	1,00 ± 0,00	---	---
8	4,10 ± 0,21	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00

Tafla v5. Niðurstöður heildarörverutalningar [log-fjöldi/g] í seinni tilraun (n = 2).

Dagar	Viðmið	Kítósan	V-sýra	K-sýra
0	3,16 ± 0,02	3,16 ± 0,02	---	---
2	3,82 ± 0,09	1,65 ± 0,49	1,00 ± 0,00	1,60 ± 0,00
5	5,62 ± 0,19	1,84 ± 0,09	---	---
8	7,46 ± 0,16	1,30 ± 0,00	1,30 ± 0,00	1,60 ± 0,00

Tafla v6. Niðurstöður flúrljómunarmælinga (δF) á lýsi. Meðaltöl ásamt staðalfrávikum ($n = 4$).

Dagar	Hópar				
	V	L	K	H	HKL
0	0,024 ± 0,000	0,024 ± 0,000	0,024 ± 0,000	0,024 ± 0,000	0,024 ± 0,000
14	0,027 ± 0,001	0,027 ± 0,001	0,034 ± 0,002	0,023 ± 0,001	0,008 ± 0,009
28	0,033 ± 0,003	0,034 ± 0,001	0,032 ± 0,000	0,020 ± 0,003	0,022 ± 0,027
65	1,418 ± 0,157	0,952 ± 0,156	1,501 ± 0,114	0,933 ± 0,065	8,833 ± 0,085

Tafla v7. Skynmatseinkunnir fyrir þráa lýsi. Meðaltöl ásamt staðalfrávikum ($n = 8$).

Dagar	Hópar				
	V	L	K	H	HKL
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
14	1,44 ± 0,70	0,00 ± 0,00	0,56 ± 0,60	1,88 ± 1,80	4,00 ± 0,00
28	1,00 ± 0,70	0,38 ± 0,80	0,75 ± 0,90	1,06 ± 1,30	3,88 ± 0,30
65	1,00 ± 1,10	0,31 ± 0,50	0,66 ± 1,10	2,00 ± 1,50	3,25 ± 0,90

Tafla v8. Peroxíð, Anisidín og Totox fyrir lýsi. Meðaltöl ásamt staðalfrávikum ($n = 4$). Gildi án staðalfráviks byggja á einni mælingu.

Hópur	PV [eq/kg]	AV [eq/kg]	Totox [eq/kg]
Upphaf	3,2	14,3	20,7
V	34,9 ± 0,5	15,3 ± 0,2	85,1 ± 0,9
L	163,0 ± 5,3	33,2 ± 4,2	359,3 ± 17,4
K	27,1 ± 3,7	15,2 ± 0,2	69,4 ± 9,1
H	12,8 ± 1,4	18,0 ± 1,0	43,8 ± 4,7
HKL	400,9 ± 25,8	160	961,8

Tafla v9. Niðurstöður flúrljómunarmælinga á vatnsfasa (δF_{aq}) fyrir þorskhakk. Meðaltöl ásamt staðalfrávikum ($n = 4$).

Dagur	Hópar		
	Viðmið	MCCh 03	MCCh 04
0	0,0071 ± 0,0000	0,0071 ± 0,0000	0,0071 ± 0,0000
14	0,0020 ± 0,0004	0,0018 ± 0,0005	0,0027 ± 0,0006
49	0,2224 ± 0,0064	0,2535 ± 0,0186	0,1980 ± 0,0247
70	0,0020 ± 0,0003	0,0020 ± 0,0007	0,0027 ± 0,0004

Tafla v10. Niðurstöður flúrljómunarmælinga á lífrænum fasa (δF_{or}) fyrir þorskhakk. Meðaltöl ásamt staðalfrávikum ($n = 4$).

Dagur	Hópar		
	Viðmið	MCCh 03	MCCh 04
0	0,00088 ± 0,00000	0,00088 ± 0,00000	0,00088 ± 0,00000
14	0,00075 ± 0,00005	0,00063 ± 0,00038	0,00081 ± 0,00006
49	0,14521 ± 0,00385	0,14513 ± 0,00669	0,13311 ± 0,00203
70	0,00078 ± 0,00006	0,00091 ± 0,00002	0,00088 ± 0,00006

Tafla v11. Niðurstöður Torry skynmats á ferskleika þorskhakks. Meðaltöl auk staðalfráviks ($n = 8$).

Dagur	Hópar		
	Viðmið	MCCh 03	MCCh 04
0	8,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00
14	6,50 ± 0,60	6,50 ± 1,10	6,94 ± 0,70
49	7,38 ± 1,00	7,00 ± 1,40	7,25 ± 1,00
70	8,00 ± 0,90	7,13 ± 2,00	7,31 ± 1,10

Tafla v12. Niðurstöður skynmats til að meta skemmdareinkenni þorskhakks. Meðaltöl auk staðalfráviks ($n = 8$).

Dagur	Hópar		
	Viðmið	MCCh 03	MCCh 04
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
14	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,13	0,13 ± 0,25
49	0,25 ± 0,50	0,19 ± 0,38	0,00 ± 0,00
70	0,13 ± 0,25	0,63 ± 1,25	0,13 ± 0,25

Tafla v13. Niðurstöður mælinga á TBA fyrir þorskhakk. Meðaltöl auk staðalfráviks ($n = 4$).

Dagur	Hópar		
	Viðmið	MCCh 03	MCCh 04
0	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00
14	0,10 ± 0,06	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,04
49	0,15 ± 0,04	0,14 ± 0,01	0,09 ± 0,01
70	0,25 ± 0,06	0,20 ± 0,04	0,10 ± 0,01

Bligh og Dyer fituúdráttur

Sýnið á að innihalda 80% eða jafngildi þess, með því að bæta út í vatni og minnka jafnframt sýnamagnið. Þorskur inniheldur 80% vatn og þarf ekkert að bæta við þar en karfi inniheldur ca. 77% vatn svo þar þarf að minnka sýnið og bæta við vatni (sjá töflu um hlutfall vatns og fiskholds út frá fituprósentu). Þar sem um þrúnarmælingu er að ræða, er mikilvægt að kæla sýnið vel í ísbaði og byrgja fyrir ljósi með álpappír.

Sýni sett í skilvinduglas sem passar í minnsta rotorinn. Út í sýni er blandað 4 mL af klóróformi og 8 mL af methanóli. Hrært með mixara (Ultra-turraxT25 frá IKA-Labortechnik, minni gerðin) í 2 mín í ísbaði. Síðan er bætt við 4 mL af klóróformi og hrært í 1 mín til viðbótar. Þá er 4 mL af 0,88% KCl-lausn bætt úr í og hrært í 1 mín. Þetta er skilið í skilvindu (Sorwall) við 2500 rpm (1017xg) í 20 mín við 0-5°C. Neðri fasinn (klóróform, inniheldur fituna) er söginn undan í einu lagi með 10mL pípettu. Vatnsfasinn er síaður gegnum filterpappír og er tilbúinn til mælingar. Klóróformfasinn er síaður gegnum glersíu (Whatman GH/D) undir sögi. Síupappír er látinn yfir glersíuna og fyllt með Na₂SO₄ þurrkefni. Gott er að láta pípettuna standa augnablik til þess að vatn sem kann að hafa komið með fljóti upp. Klóróformfasanum er hellt í 10 mL mæliflösku, sogflaskan skolud með klóróformi og fyllt að marki í mæliflöskunni. Þá er klóróformfasinn tilbúinn til mælingar.

Bligh & Dyer fituúdráttur fyrir fiskhold

Sýni + vatn (g)	4
Klóróform* (mL)	4
Methanol* (mL)	8
Mix (mín)	2
Klóróform* (mL)	4
Mix (mín)	1
KCl-lausn (mL)	4
Mix (mín)	1

Aðskilnaður 2500rpm í 20 mín

* Klóróform og methanol eru blönduð 50-100mg/L af BHT sem er fituþráavörn.

B & D fituúrdráttur, útvigtun m.v. 4 g sýni og 80% vatnsinnihald						
Vatn [%]	Sýni [g]	Vatn [g]		Vatn [%]	Sýni [g]	Vatn [g]
80	4,00	0,00		39	1,31	3,69
79	3,81	1,19		38	1,29	3,71
78	3,64	1,36		37	1,27	3,73
77	3,48	1,52		36	1,25	3,75
76	3,33	1,67		35	1,23	3,77
75	3,20	1,80		34	1,21	3,79
74	3,08	1,92		33	1,19	3,81
73	2,96	2,04		32	1,18	3,82
72	2,86	2,14		31	1,16	3,84
71	2,76	2,24		30	1,14	3,86
70	2,67	2,33		29	1,13	3,87
69	2,58	2,42		28	1,11	3,89
68	2,50	2,50		27	1,10	3,90
67	2,42	2,58		26	1,08	3,92
66	2,35	2,65		25	1,07	3,93
65	2,29	2,71		24	1,05	3,95
64	2,22	2,78		23	1,04	3,96
63	2,16	2,84		22	1,03	3,97
62	2,11	2,89		21	1,01	3,99
61	2,05	2,95		20	1,00	4,00
60	2,00	3,00		19	0,99	4,01
59	1,95	3,05		18	0,98	4,02
58	1,90	3,10		17	0,96	4,04
57	1,86	3,14		16	0,95	4,05
56	1,82	3,18		15	0,94	4,06
55	1,78	3,22		14	0,93	4,07
54	1,74	3,26		13	0,92	4,08
53	1,70	3,30		12	0,91	4,09
52	1,67	3,33		11	0,90	4,10
51	1,63	3,37		10	0,89	4,11
50	1,60	3,40		9	0,88	4,12
49	1,57	3,43		8	0,87	4,13
48	1,54	3,46		7	0,86	4,14
47	1,51	3,49		6	0,85	4,15
46	1,48	3,52		5	0,84	4,16
45	1,45	3,55		4	0,83	4,17
44	1,43	3,57		3	0,82	4,18
43	1,40	3,60		2	0,82	4,18
42	1,38	3,62		1	0,81	4,19
41	1,36	3,64				
40	1,33	3,67				