

Verkefnaskýrsla Rf

11 - 04



Rannsóknastofnun  
fiskiðnaðarins

Nóvember 2004

Kolmunni sem markfæði

Margrét Geirsdóttir  
Ragnar Jóhannsson



<b>Titill / Title</b>	<b>Kolmurni sem markfæði</b>		
<b>Höfundar / Authors</b>	<i>Margrét Geirsdóttir og Ragnar Jóhannsson</i>		
<b>Skýrsla Rf / IFL report</b>	04-11	<b>Útgáfudagur / Date:</b>	4. nóvember 2004
<b>Verknr. / project no.</b>	1613		
<b>Styrktaraðilar / funding:</b>	<i>Rannís</i>		
<b>Ágríp á íslensku:</b>	<p>Markmið verkefnisins er að svara rannsóknaspurningunni: Hvaða lífvirkni er hægt að fá fram hjá peptíðum unnum úr kolmunna með ensímum? Lífvirkni er forsenda þess að unnt sé að nota kolmunna sem markfæði.</p> <p>Hráefni eru kolmunnaprótein sem hafa verið einangruð með nýrri aðferð. Þekkt ensím sem framleidd eru á iðnaðarskala verða notuð til að vatnsrjúfa hin einangruðu prótein mismikið og kanna eiginleika þeirra oligopeptíða sem myndast við ensímiðurbrotið. Á fyrsta starfsári verður skimað hvaða eiginleika mismunandi ensím laða fram hjá hráefninu með tilliti til líffræðilegrar virkni, vinnslueiginleika og efnasamsetningar. Samstarfsaðilar þátttakenda í Frakklandi hafa mikla reynslu af mælingum á lífvirkni og verður m.a. leitað til þeirra með þær mælingar. Á seinni starfsárum verða afurðir þáttaðar í hluta með síun til að einangra hluta til notkunar í markfæði og/eða aðrar afurði og tilraunir á dýrum/fólki til að kanna in vivo virkni. Einkaleyfishæfni ferla og afurða verður skoðuð.</p> <p>Í þessari fyrstu verkefnaskýrslu er greint frá niðurstöðum fyrstu sex mánaða verkefnisins.</p>		
<b>Lykilorð á íslensku:</b>	<i>Ensímvatnsrof, Kolmurni, Vinnslueiginleikar, Lífvirkni, Markfæði</i>		
<b>Summary in English:</b>	<p>The aim of the project is to answer the question: What kind of bioactive properties do peptides produced by enzyme hydrolysis of blue whiting have? Bioactivity of some kind is needed if they are to be used in functional food.</p> <p>The partners in the project have studied enzyme hydrolysis using enzyme blends with success. The collaborating institutes and universities in France have a great experience in the analysis of bioactive properties. The substrate for hydrolysis will be blue whiting proteins isolated with a novel process. Known commercially available enzymes will be used to hydrolyse the proteins to different degrees of hydrolysis (%DH). The properties of the hydrolysates will be analysed. The work during the first year is on analysing what kind of chemical composition, bioactive and physical properties the different hydrolysates have. The work in the second is on fractionation of the most promising hydrolysate using membrane filtration and other post hydrolysis processes in order to use them as ingredients in functional food or feed products. The development of the functional food or feed and an intervention study to see if the components show the same activity in people/animals as in the in vitro tests.</p> <p>In this report results from the first six months of the project are presented.</p>		
<b>English keywords:</b>	<i>Enzyme hydrolyses, Blue whiting, Functional properties, Bioactive properties, Functional food</i>		

# Efnisyfirlit

1. Inngangur .....	1
2. Tilraunir á rannsóknastofu .....	3
2.1. Efni og aðferðir .....	3
2.2. Niðurstöður og umræður .....	8
3. Örsíun vatnsrofinna próteina.....	18
3.1. Efni og aðferðir .....	18
3.2. Niðurstöður og umræður .....	19
4. Ályktanir.....	20
5. Næstu skref.....	21
6. Heimildir .....	22

# 1. Inngangur

**Markmið** verkefnisins er að svara rannsóknasurningunni: Hvaða lífvirkni er hægt að fá fram hjá peptíðum unnum úr kolmunna með ensínum? Lífvirkni er forsenda þess að unnt sé að nota kolmunna sem markfæði.

**Framkvæmd** Hráefni eru kolmunnaprótein sem hafa verið einangruð með nýrri aðferð (Hultin & Kelleher, 1999; Hultin o.fl., 2000). Þekkt ensím sem framleidd eru á iðnaðarskala verða notuð til að vatnsrjúfa hin einangruðu prótein mismikið og kanna eiginleika þeirra oligopeptíða sem myndast við ensímiðurbrotið. Á fyrsta starfsári verður skimað hvaða eiginleika mismunandi ensím laða fram hjá hráefninu með tilliti til líffræðilegrar virkni, vinnslueiginleika og efnasamsetningar. Samstarfsaðilar þátttakenda í Frakklandi hafa mikla reynslu af mælingum á lífvirkni og verður m.a. leitað til þeirra með þær mælingar. Á seinni starfsárum verða afurðir þáttaðar í hluta með síun til að einangra hluta til notkunar í markfæði og/eða aðrar afurði og tilraunir á dýrum/fólki til að kanna *in vivo* virkni. Einkaleyfishæfni ferla og afurða verður skoðuð.

**Gildi Hagrænt** Árið 2003 voru veidd 500.000 tonn af kolmunna sem öll fóru til bræðslu. Í verkefninu er notuð ný vinnsluaðferð til að nýta uppsjávarfisk sem gefur möguleika á að nýta hráefni til manneldis og auka framlegð vinnslunnar. **Umhverfislegt** minnkaður úrgangur og aukin nýting hráefnis til manneldis. **Þekkingarlegur** Aukin þekkingar á vinnslu, vinnslueiginleikum og notagildi fiskpróteina. Þekking á sviði rannsókna á lífvirkni peptíða sem er nýtt rannsóknasvið á alþjóðlegan mælikvarða. Verkefnið er hluti af námi til Doktorsprófs í matvælafræði og M.S. prófs í iðnaðarverkfræði.

**Nýnæmi** Rannsóknir á samspili vatnsrofs með ensínum og vinnslueiginleikar og lífvirkni hafa ekki verið framkvæmdar á Íslandi. Samspil vatnsrofs kolmunnapróteina einangruð með nýrri aðferð og lífvirkni þeirra hefur ekki verið framkvæmd áður og er þar um alþjóðlegt nýnæmi að ræða. Mælingar á lífvirkni eru framanlega á sviði rannsókna á próteinum og næringarfræði á alþjóðlegan mælikvarða.

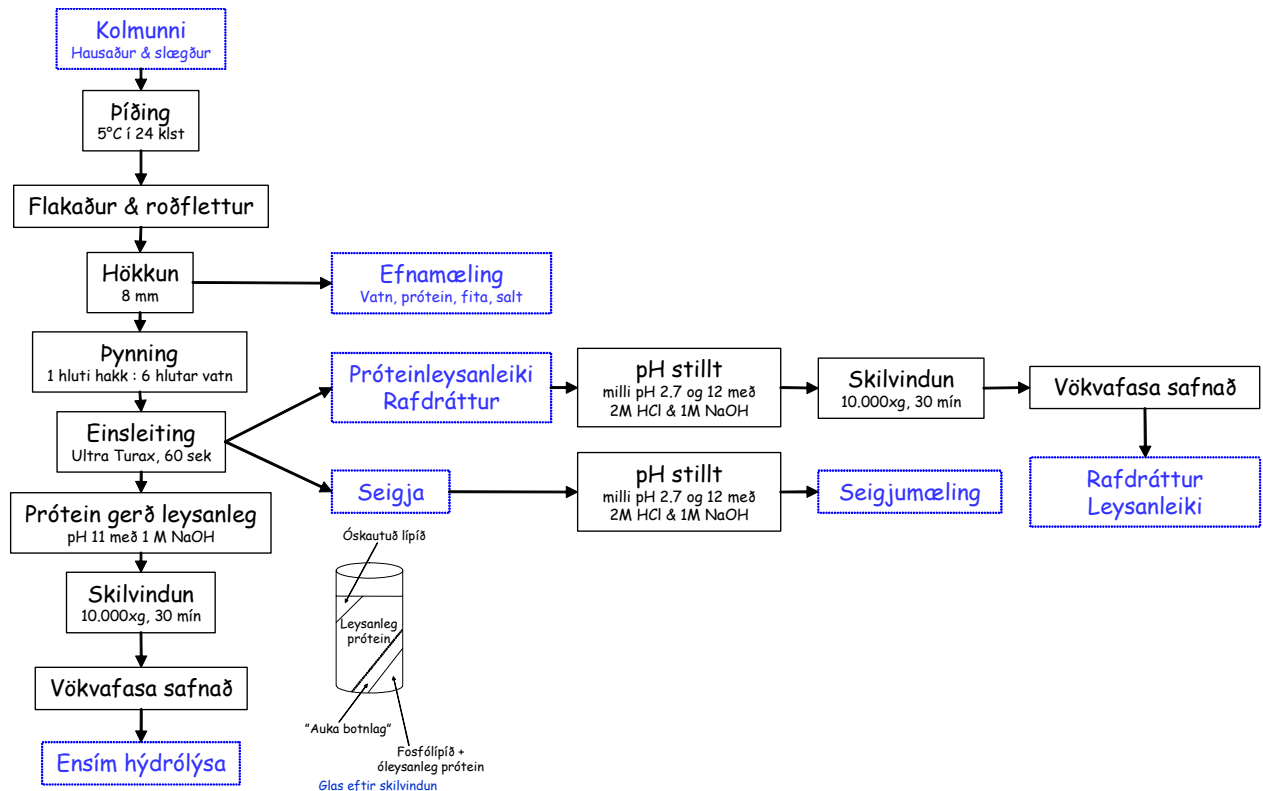
Í þessari skýrslu er greint frá niðurstöðum fyrir fyrstu 6 mánuði verkefnisins. Frá upphafi verkefnis hefur verið unnið að verkþáttunum Uppsetningu mæliaðferða, Tilraunahögun, Vatnsrof kolmunna, Efnafræðilegir eiginleikar og Vatnsrof & þáttun með örsíun.

Framkvæmdin er tvíþætt. Vinna við fyrstu fjóra verkþættina fór að öllu leyti fram á rannsóknastofu en vinna við verkþáttinn Vatnsrof & þáttun með örsíun fór fram í tilraunaverksmiðju hjá HB á Akranesi, Prímex í Reykjavík og Saint-Nazaire í Frakkandi en það er stofun á vegum Univeristé du Nantes sem sérhæfir sig í örsíun sjávarfangs. Skýrslan er á sama hátt tvískipt, annars vegar tilraunir á rannsóknastofu og hins vegar tilraunir við örsíun á vatnsrofnum próteinum.

## 2. Tilraunir á rannsóknastofu

### 2.1. Efni og aðferðir

Yfirlit yfir framkvæmd verkefnisins og sýnatöku má sjá á mynd 1.



Mynd 1. Yfirlit yfir framkvæmd verkefnisins: Einangrun próteina fyrir ensímhýdrólýsu ásamt sýnatöku fyrir mælingar á efnasamsetningu, próteinleysanleika, rafdrátt og seigju.

#### 2.1.1. Hráefni

Veifar á kolmunna eru árstíðabundnar. Í fyrsta hluta verkefnisins var notað hausadur og slægður kolmunni sem hafði verið sjófrystur í blokkir í desember 2003. Blokkir voru geymdar við -24°C í frysti þangað til tilraunir fóru fram (ágúst til október 2004).

Fiskurinn var þíddur við 5°C í 24 klst fyrir notkun, flakaður og roðflettur og hakkaður í heimilishakkavél (Kenwood) í gegnum 8 mm göt. Prótein voru einangruð með því að blanda 6 hlutum af vatni á móti einum hluta hakks, lausn gerð einsleit í UltraTurax homogenizer í eina mínútu. Sýrustig stillt á pH 11 með 1 M NaOH. Stoðprótein skilin frá með skilvindun (10.000xg, 30 mínútur, Sorvall skilvinda) og vökvafrasa safnað fyrir niðurbrot með ensímum (mynd 1). Unnið var við kældar aðstæður.

### 2.1.2. Efnasamsetning

Magn vatns, fitu, próteins og salts í hráefni var mælt samkvæmt aðferðahandbók í gæðahandbók efnastofu Rf (Ghb-e-AM).

### 2.1.3. Próteinleysanleiki

Styrkur uppleystra próteina við mismunandi sýrustig var mældur með Biuret aðferð (Layne, 1957, Torten & Whitaker, 1964). Sýrustig stillt á mismunandi sýrustig (1M NaOH eða 2M HCl) í einsleitri próteinlausn, skilvinduð (10.000xg, 30 mínútur, Sorvall skilvinda) (mynd 1). Magn próteina í lausn mæld með biuret. Hlutfall leysanlegra próteina reiknað samkvæmt:

$$\text{Próteinleysanleiki} = \frac{\text{g leysanleg prótein í lausn skv Biuret}}{\text{Heildarmagn próteina, mælt með Kjeldahl}} \cdot 100$$

### 2.1.4. Seigja

Seigja mæld með Bohlin Visco 88 seigjumæli (mynd 2). Sýrustig stillt á mismunandi gildi eftir einsleitingu (mynd 1), lausn sett í 400 ml bikarglas. Magn sýnis 275 ml þannig að jafn mikið var af lausn fyrir ofan og neðan "mælisívalning" (spindle). Stillingar voru: Hraði 8 (1000 rpm eða 16,57 Hz) og spindle 30 (þvermál 30 mm). Program 6 notað til að umbreyta niðurstöðum í mPa·s .

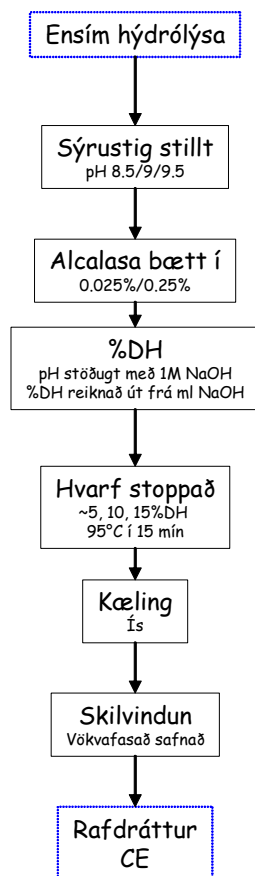


Mynd 2. Bohlin Visco 88. Seigjumælir notaður í verkefninu.

### 2.1.5. Ensímrof

Ensímrof framkvæmt í pH stat tæki (718 STAT Titrion) frá Metrohm. Mismunandi sýrustig og magn ensíms verður notað í verkefninu. Í fyrstu tilraunum var eftirfarandi framkvæmd notuð (mynd 3).

Ákveðið magn sýnis við herbergishita með þekkt magn af próteini sett í hvarfstöð pH stat tækis. Sýrustig stillt á rétt upphafssýrustig (8.5, 9.0 eða 9.5). Ensím bætt í (0.25 eða 0.025%) og pH stat tæki sett af stað. pH stat tæki sér um að bæta við basa til að viðhalda réttu sýrustigi á meðan á hvarfi stendur (160 mínútur). Sýni voru tekin við mismunandi stig vatnsrofs (%DH), hvarf stöðvað með hitun við 95°C í 15 mínútur og að því loknu kæld á ís. Vatnsleysanlegum hluta safnað eftir skilvindun (borðskilvinda, Wifug lab. centrif., Parrylane, Bradford, England, 4500 rpm, 10 mínútur) fyrir mælingu með rafdrætti og gelsíun (CE).



Mynd 3. Framkvæmd ensímhýdrólýsu.

### 2.1.6. Stig vatnsrofs (Degree of hydrolysis; %DH)

Stig vatnsrofs (Degree of hydrolysis, %DH) var reiknað frá magni og styrk basa sem var notað til að viðhalda stöðugu sýrustigi á meðan á ensímiðurbroti stóð. DH er skilgreint sem fjöldi peptíðtengja (h) sem hafa verið klofin sem hlutfall af heildarfjölda peptíðtengja samkvæmt (Adler-Nissen, 1986):

$$\%DH = \frac{h \times 100}{h_{tot}} = \frac{BN_B}{\alpha h_{tot} \times MP} \times 100$$

Þar sem

B = magn basa [ml]

$N_B$  = styrkur basa [M]

$\alpha$  = vatnsrofsstuðull (“average degree of dissociation”)  $\alpha$ -NH hópa (sjá neðar)

MP = magn próteins [g]

$h_{tot}$  = heildarfjöldi peptíðtengja. Upplýsingar um amínósýrusamsetningu kolmunnaflaka lágu ekki fyrir (verður mælt hjá samstarfsaðilum í USA). Á meðan var notast við  $h_{tot}$  gildi fyrir þorsk sem er 7,501 mequiv/g

$\alpha$ , vatnsrofsstuðull, var reiknaður skv.

$$\alpha = 10^{pH-pK} / (1 + 10^{pH-pK})$$

Þar sem

pH = sýrustig við ensímhýdrólýsu

pK = meðaltal jafnvægisfasta fyrir NH hópa amínósýranna.

pK gildi sem fall af hitastigi (T í Kelvin) var reiknað skv.:

$$pK = 7.8 + \frac{298 - T}{298T} \times 2400$$

### 2.1.7. Rafdráttur

Kolmunnaprótein leysanleg við mismunandi sýrustig (mynd 1) voru rafdregin. Einnig eftir ensímhýdrólýsu við mishátt stig vatnsrofs (%DH; mynd 3).

Sýni útbúið (100  $\mu$ L sýni, 190  $\mu$ L Laemmli sýnabuffer og 10  $\mu$ L mercaptoethanol blandað saman og soðið í amk 5 mínútur, kælt strax á ís), sýni sett á gel (4-15% Tris-HCl, línulegur stigull ("linear gradient") tilbúin gel frá Bio-Rad, 161-1104) og rafdregið (200V og 60mA fyrir hvert gel) með keyrslubuffer (9 g Tris, 43.2 g glysin, 3 g SDS, 600 mL eimað vatn og þynnt 1:5). Tvísýni af hverju sýni sett á gelin, 5 og 10  $\mu$ l. Gel fixerað (3% TCA lausn) í 15 mínútur, litað (0,1% Coomassie brilliant blue, 45% metanól og 7% ediksýra í vatni) í 30 mínútur og aflitað (45% metanól og 7% ediksýra í vatni) í 3x20 mínútur. Breiður staðall frá BioRad (161-0317) notaður með mólþunga frá 6.5 kDa til 200 kDa.

### 2.1.8. Gelfiltrun (Capillary electrophoresis; CE)

Sýni við mismunandi stig vatnsrofs voru mæld með CE (mynd 3). Aðferð til greiningar á peptíðum með capillary electrophoresis var byggð á aðferð Engvang og Nielsen (2000) og frá Henrik H. Nielsen (2004). Fosfatbuffer (100 mM, pH 2.75, filteraður gegnum 45 $\mu$ m filter og afgasaður) var notaður sem aðgreiningarbuffer (separation buffer). Fyrir fyrstu notkun hárpípusúlunnar eða langa geymslu var súlan skoluð með 1M NaOH (60 mín), 0.1 M NaOH (15 mín), H<sub>2</sub>O (5 mín), 100mM fosfórsýru (10 mín) og aðgreiningarbuffer (15 mín). Hitastig súlunnar var 25°C. Sýni var sprautað inn við þrýstinginn 15 kNsm<sup>-2</sup> og aðskilið við fastan straum (constant voltage of 15kV) í 20 mínútur. UV gleypni var mæld við 195 nm, 214 nm og 280 nm með DAD skynjara. Milli keyrslna var súlan hreinsuð (preconditioned) með 100 mM fosfórsýru í 5 mínútur og með greiningarbuffer í 8 mínútur. Aðgreiningarbuffer var endurnýjaður fyrir hverja keyrslu.

## 2.2. Niðurstöður og umræður

### 2.2.1. Hráefni

Við vinnslu hráefnis kom greinilega fram að seigja lausnar var meiri en hefur sést við próteineinangrun fyrir aðrar fisktegundir (þorsk, síld, loðnu). Var þetta sérstaklega áberandi við aðskilnað stoðpróteina frá þeim sem eru eftirsótt. Við skilvindun myndaðist þykkt, gelkennt botnlag og ljóst að prótein tapast í þessu skrefi og heimtur lækka.

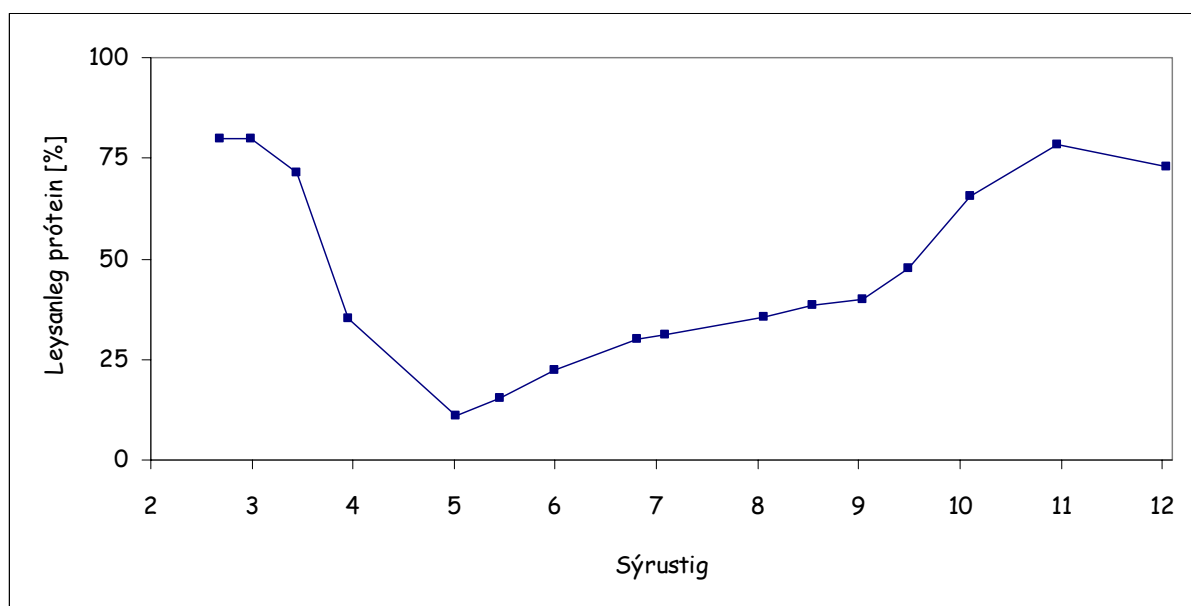
Ástæða fyrir þessari miklu seigju og myndun á þykku botnlagi er líklega að hráefni hefur verið lengi í frysti og prótein hafa afmyndast. Kolmunni er þorskfiskur og þolir því geymlu í frysti verr en til dæmis síld. Við næstu keyrslur verður komin ný vertíð á kolmunna og nýtt hráefni verður notað í verkefninu.

### 2.2.2. Efnasamsetning

Prótein  $18,5 \pm 0,4\%$  (meðaltal $\pm$ staðalfrávik,  $n=4$ ), vatn  $80,4 \pm 0,5\%$  ( $n=3$ ), fita  $0,2 \pm 0,1\%$  ( $n=3$ ), salt  $0,46 \pm 0,03\%$  ( $n=3$ ).

### 2.2.3. Próteinleysanleiki

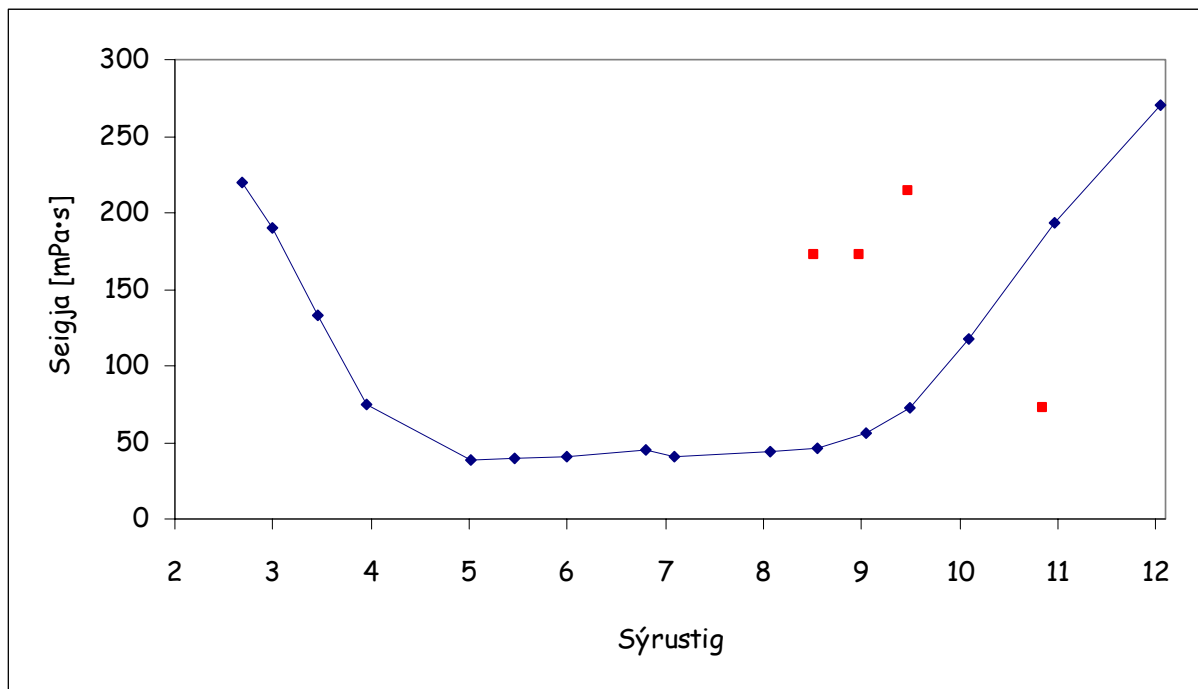
Hin mikla seigja hefur áhrif á leysanleikamælingu við mismunandi sýrustig (mynd 4) en hin mikla seigja veldur því að prótein “festast” í hinu þykka botnlagi. Til samanburðar þá var leysanleiki síldarpróteina við pH 2.7 um 90% (Margrét Geirsdóttir, 2001) en fyrir kolmunna er það hér um 80%. Er líklegt að áhrif frystigeymslu kolmunna valdi krossbindingu próteina og við það dregur úr leysanleika þeirra.



Mynd 4. Leysanleiki kolmunnapróteina í vatnslausn við mismunandi sýrustig.

#### 2.2.4. Seigja

Seigja próteinlausnar við mismunandi sýrustig var kannað (mynd 5). Aukin seigja við hátt og lágt sýrustig er greinileg. Með því að skoða niðurstöður úr SDS rafdrætti á hráefninu við mismunandi sýrustig er hægt að sjá hvernig hækkað og lækkað sýrustig frá upphafssýrustigi hefur áhrif á próteinin sem getur skýrt þessa breytingu (sjá kafla 2.2.7).

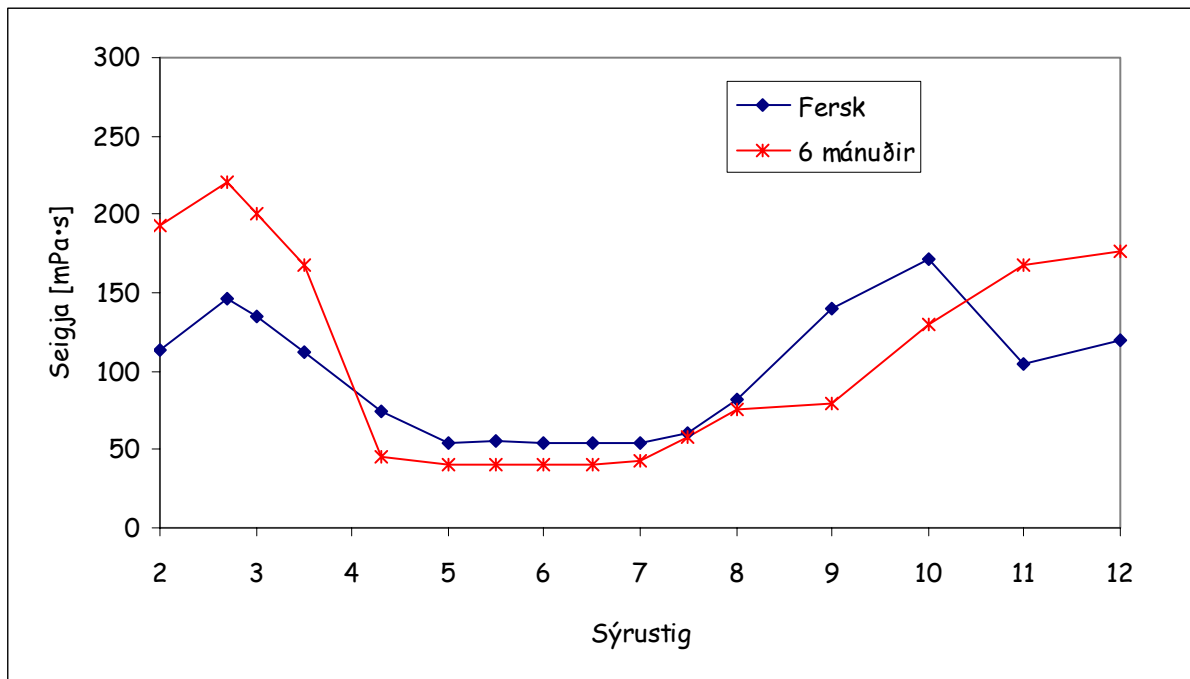


Mynd 5. Seigja kolmunnapróteina í vatnslausn við mismunandi sýrustig mælt með Bohlin seigjumæli. Rauðir punktar: prótein einangruð við pH 11 og að því loknu sýrustig lækkað.

Undeland og félagar (2002) sáu svipaða breytingu á seigju með sýrustigi í síldarpróteinum. Eftir því sem sýrustig var hækkað að pH 10 eða lækkað að pH 3.5 jókst seigja lausnar. Við öfgakenndara sýrustig minnkaði seigjan hins vegar mikið. Ekki verður vart við þessa breytingu hjá kolmunna. Frystigeymsla hefur þarna líklega áhrif. Sama rannsókn á síldarpróteinum sýndi til dæmis að eftir geymslu hráefnis í kæli við 4°C í 3 daga jókst seigjan umtalsvert eða við pH 2.7 úr 45 mPa·s í 110 mPa·s. Hækkun kom einnig fram við hátt sýrustig þó munurinn væri minni eða úr 31 mPa·s við pH 10.8 þar sem notast var við nýtt hráefni í 65 mPa·s eftir geymslu hráefnis.

Í íslenskri rannsókn var gerður samanburður á seigju síldarpróteina í vatnslausn við mismunandi sýrustig þar sem hráefni var annars vegar ferskt og hins vegar eftir geymslu í frysti í 6 mánuði við -24°C. Þegar ferskt hráefni var notað fengust svipaðar niðurstöður og í

hinni bandarísku rannsókn og seigja minnkaði við pH yfir 10 (mynd 6). Eftir geymslu hráefnis í frysti lækkar seigjan ekki við sýrustig hærra en pH 10 (Hlynsdóttir, 2004) svipað og hjá kolmunna. Í hinni íslensku rannsókn varð ekki vart við minni seigju þegar sýrustig er lækkað undir pH 3.5. Seigjulækkun var heldur ekki jafn mikil og Undeland og félagar fundu. Hér þarf að hafa í huga að í íslensku rannsókninni eru íslensk síldarflök notuð sem hráefni en í rannsókn Undeland og féлага er notast við síld veidd við strendur Massachusetts fylkis í Bandaríkjunum og notuð flök þar sem roð og fiturönd hafa verið fjarlægð, einungis hinn hvíti vefur síldarinnar notaður. Þetta hefur mikil áhrif á fituinnihald hráefnis, sem var 2.6% en 12.4% í íslensku rannsókninni. Frekari rannsóknir á kolmunna þar sem notast er við ferskt hráefni í næsta hluta verkefnisins mun sýna hvort svipaðir eiginleikar fást og hjá síldarpróteinum.



Mynd 6. Seigja síldarpróteina í vatnslausn við mismunandi sýrustig, fersk síldarflök og eftir 6 mánaða geymslu í frysti við  $-24^{\circ}\text{C}$  (Hlynsdóttir, 2004).

Eftir að prótein höfðu verið einangruð við pH 11 var sýrustig lækkað að nýju og fylgst með seigju (rauð tákn á mynd 5). Þau prótein sem voru leysanleg við pH 11 sýna aðra hegðun einangruð í lausn heldur en þegar öll próteinin eru í lausn. Nú hækkar seigjan þegar sýrustig er lækkað. Hugsanlegar eru tvær skýringar á þessari hegðun. Í fyrsta lagi að þegar vöðvatrefjapróteinin eru í lausn með öðrum próteinum svo sem bandvefspróteinum verða eðliseiginleikar próteinanna aðrir en í hreinni lausn vöðvapróteina. Í lausn með einangruðum vöðvapróteinum er netjubinding með öðrum hætti. Önnur skýring er sú að við hið háa sýrustig

breytist myndbygging próteinanna. Þegar sýrustig er lækkað að nýju geta þau því krosstengst sem þau gátu ekki áður. Undeland og félagar (2003) fengu svipaðar niðurstöður og mun meiri seigja mældist við pH 9 þegar sýrustig var lækkað. Í þeirri rannsókn var ekki unnið með einangruð prótein og lausnin ekki sett í skilvindu áður en sýrustigið var lækkað að nýju. Þessar niðurstöður benda því til að hreinleiki vöðvapróteina er ekki að hafa áhrif á seigjuna heldur myndbreyting próteina við hið háa sýrustig. Frekari rannsóknir þarf til að kanna hvaða breytingar eiga sér stað. Áhugavert verður að kanna hvort samskonar eiginleikar koma fram þegar nýtt hráefni fæst til tilrauna á þessari vertíð.

#### 2.2.5. Ensímrof

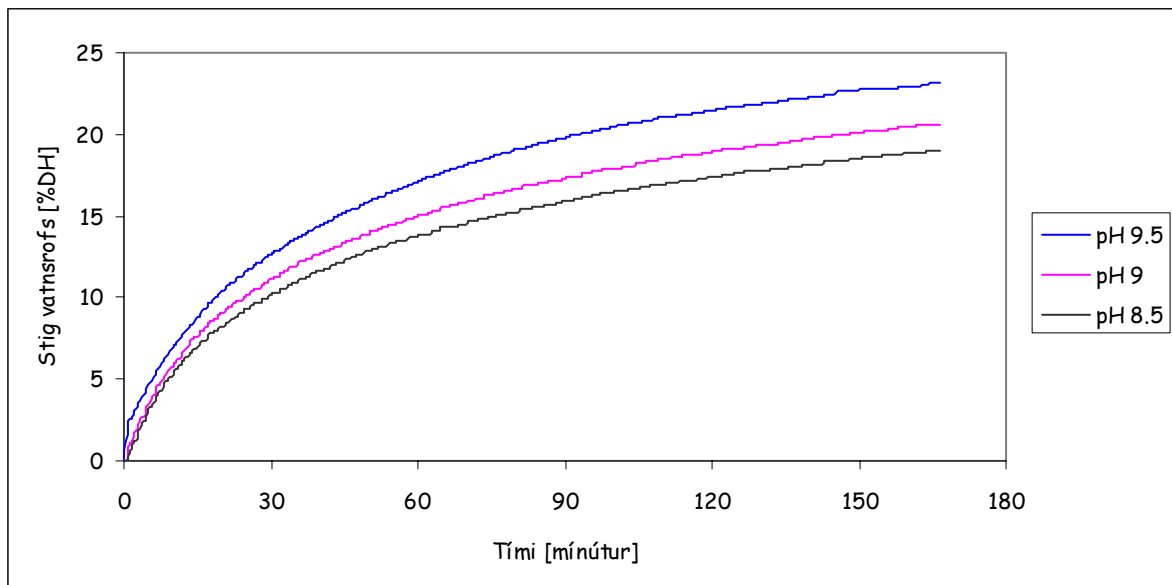
Í þessum fyrsta fasa verkefnis var notuð iðnaðarensímblandan Alkalasi frá Novo Nordisk við mismunandi sýrustig og mismunandi magn ensíms. Sýni fyrir rafdrátt og CE voru tekin eftir mishátt stig vatnsrofs (%DH) (mynd 3).

Samkvæmt upplýsingum frá framleiðenda er virkni ensímblöndunnar 2.4 AU/g. Virkni getur þó verið breytileg á milli framleiðslulota og einnig getur það breyst við geymslu. Virkni verður því mæld nákvæmlega í næsta verkhluta með tilbúnu hvarfefni (Suc-AlaAlaProPhe-*p*-nitroanilide) (Kristjánsson, 2001).

#### 2.2.6. Stig vatnsrofs

##### *Áhrif sýrustigs*

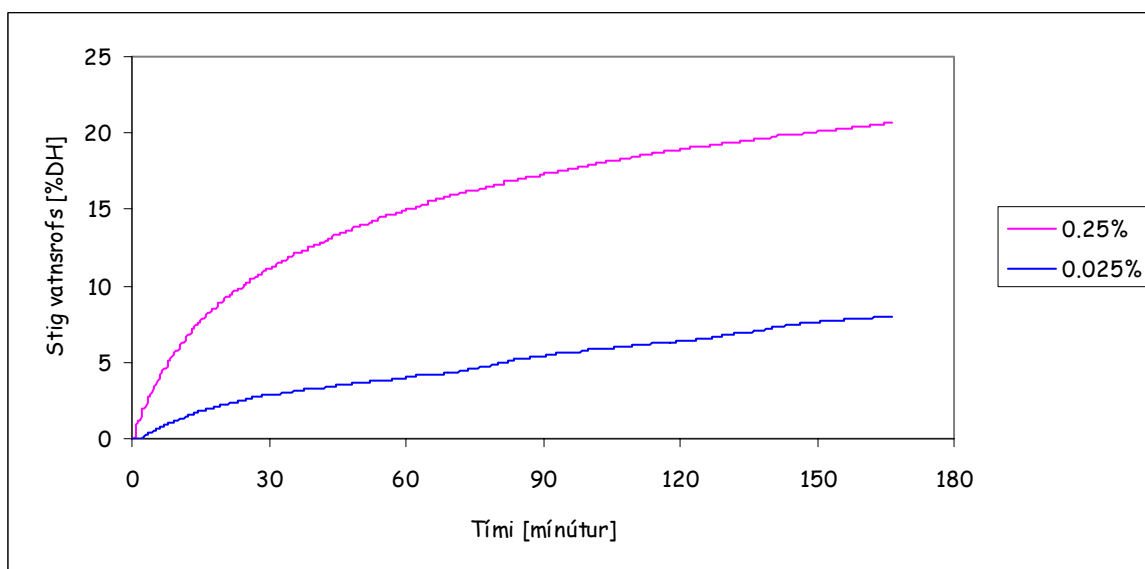
Samkvæmt upplýsingum frá framleiðenda er Alkalasi virkastur við pH 7.5 við 60°C. Það getur þó verið háð öðrum umhverfisaðstæðum. Við 22°C, 0.25% alkalasi (E/S hlutfall um 1/9) er ensímið virkara við hærri sýrustig (mynd 7).



Mynd 7. Stig vatnsrofs með tíma og sýrustigi. Einangruð kolmunnaprótein (21.7 mg/ml), Alkalasi (0.25%), 22°C.

### Áhrif magn ensíms

Magn ensíms hefur greinileg áhrif á hraða niðurbrot kolmunnapróteina (mynd 8). Notast var við 0.025% og 0.25% ensím. Einnig er hægt að setja þetta fram sem E/S hlutfall (ensím/hvarfefni hlutfall) sem er í þessu tilfalli 1/90 og 1/9.



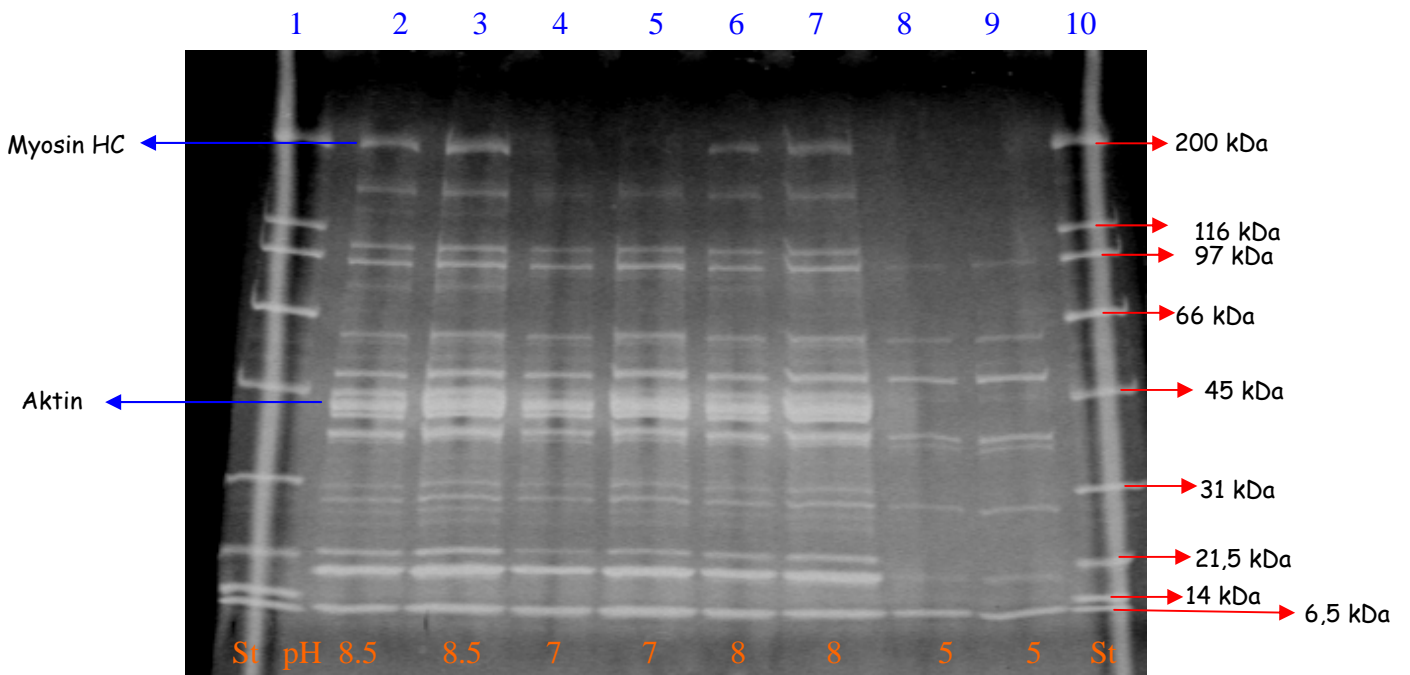
Mynd 8. Stig vatnsrofs með tíma og mismunandi magn ensíms. Einangruð kolmunnaprótein (21.7 mg/ml), Alkalasi (0.025%; 0.25%).

### 2.2.7. Rafdráttur

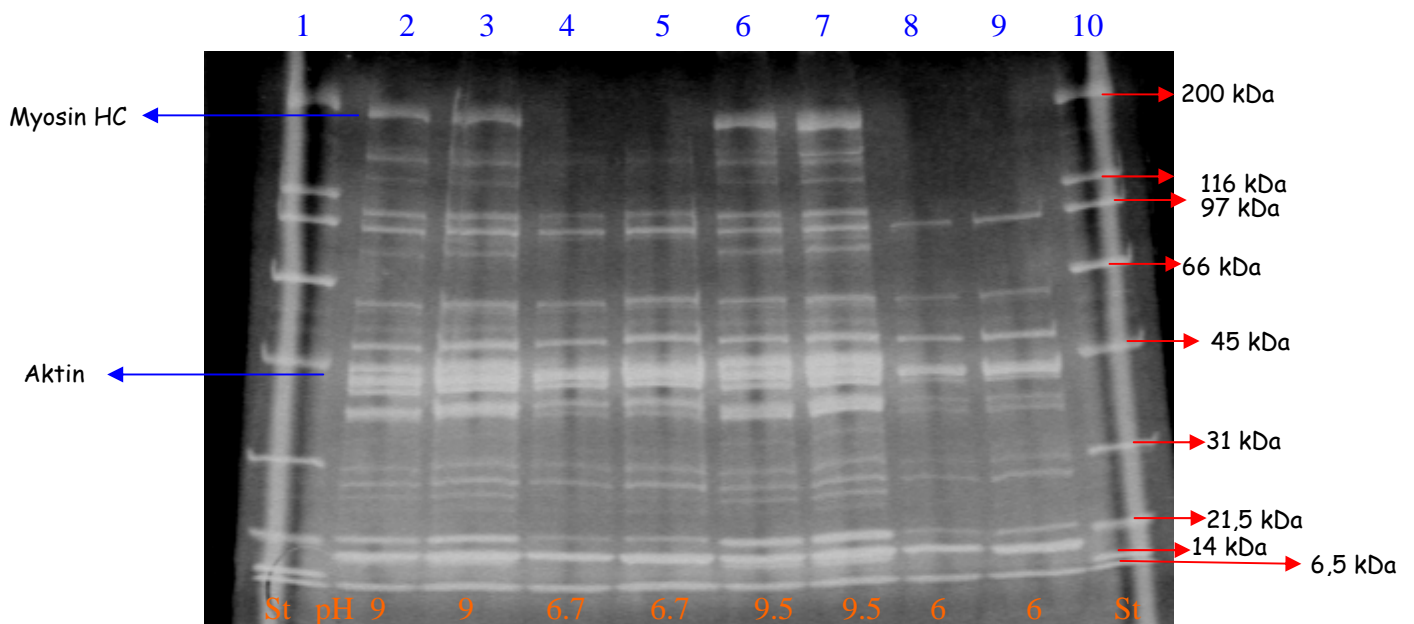
Með því að skoða SDS rafdráttarmyndir af kolmunnapróteinum sem eru leysanleg við mismunandi sýrustig er hægt að fylgast með hvaða mismunandi vöðvaprótein eru leysanleg. Sérstaklega er hægt að fylgjast með vöðvatrefjapróteinunum myosin og aktin. Myosin er stórt prótein og brotnar niður í einingar fyrir rafdráttinn. Stærsta einingin nefndist "Myosin heavy chain" (MHC) og er við tæplega 200 kDa (Thorarinsdóttir o.fl., 2002).

Með því að skoða rafdráttarmyndir (myndir 9-12) er hægt að sjá hvernig MHC er ekki leysanlegt við pH 5 til 8 - ekki band á rafdráttargeli við um 200 kDa á þeim rásum sem eru merktar rauðar í myndatexta. Við sýrustig hærri en pH 8.5 annars vegar og hins vegar við lægra sýrustig en pH 4 en myosin leysanlegt. Aktin er leysanleg og er það einungis við sýrustig pH 5 og pH 5.5 sem það er ekki sjáanlegt sem band við rafdrátt (mynd 9 & 11, undirstrikað í myndatexta).

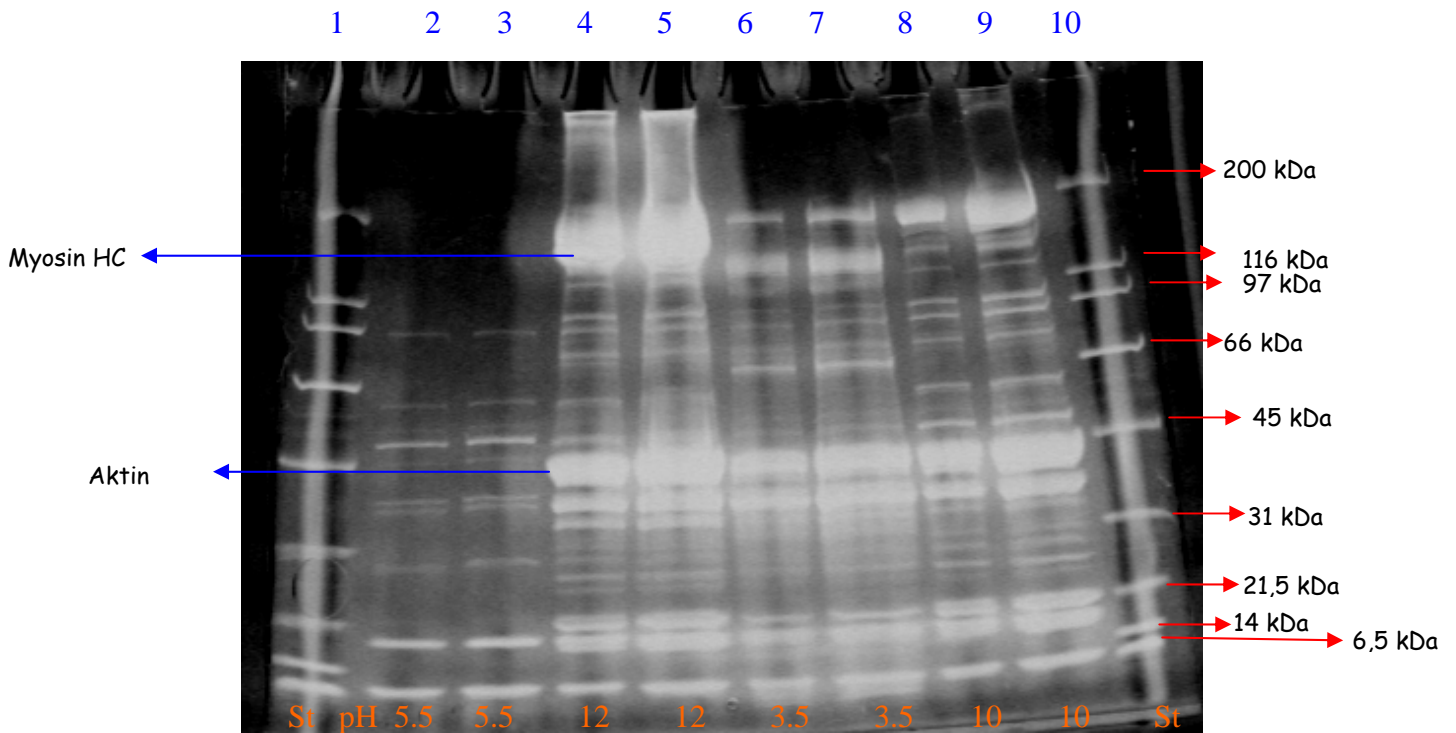
Einnig er áhugavert að skoða mun á rafdrætti við pH 11 og pH 2.7 þegar prótein eru sem leysanlegust. Er greinilegt að við pH 2.7 brotnar MHC frekar niður heldur en við pH 11. Með því að bera saman MHC band við pH 9.5, 10, 11 og 12 má sjá hvernig bandið breikkar og færast neðar í rásinni. Bendir það til niðurbrots MHC (Undeland o.fl., 2002; Undeland o.fl., 2003). Niðurbrot MHC við lágt og hátt sýrustig hefur áhrif á myndbyggingu próteinsins og til dæmis valdið því að hlutar próteinsins sem eru vatnsfælnir og voru grafnir inn í myndbygginguna liggja nú á yfirborði þess. Einnig getur niðurbrotið haft áhrif á hleðslu yfirborðsins.



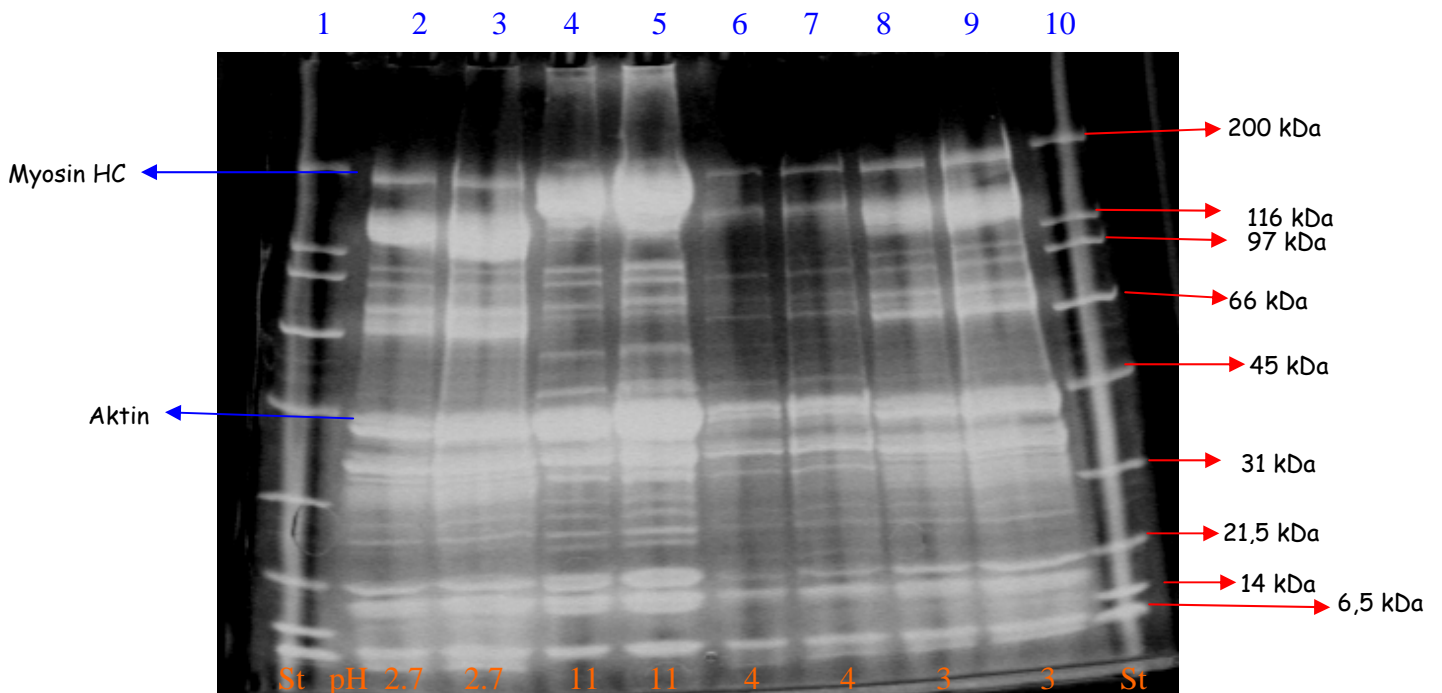
Mynd 9. SDS rafdráttur (4-15% Tris-HCl, línulegur stigull) á kolmunnapróteínum við mismunandi sýrustig. (Rásir 1&10) Staðall, (rásir 2&3) pH 8.5; (rásir 4&5) pH 7, (rásir 6&7) pH 8; (rásir 8&9) pH 5. Magn sýnis á rásun 2, 4, 6 og 8 var 5µl en á rásun 3, 5, 7 og 9 var magn sýnis 10 µl.



Mynd 10. SDS rafdráttur (4-15% Tris-HCl, línulegur stigull) á kolmunnapróteínum við mismunandi sýrustig. (Rásir 1&10) Staðall, (rásir 2&3) pH 9; (rásir 4&5) pH 6,7 (Neutral), (rásir 6&7) pH 9,5; (rásir 8&9) pH 6. Magn sýnis á rásun 2, 4, 6 og 8 var 5µl en á rásun 3, 5, 7 og 9 var magn sýnis 10 µl.

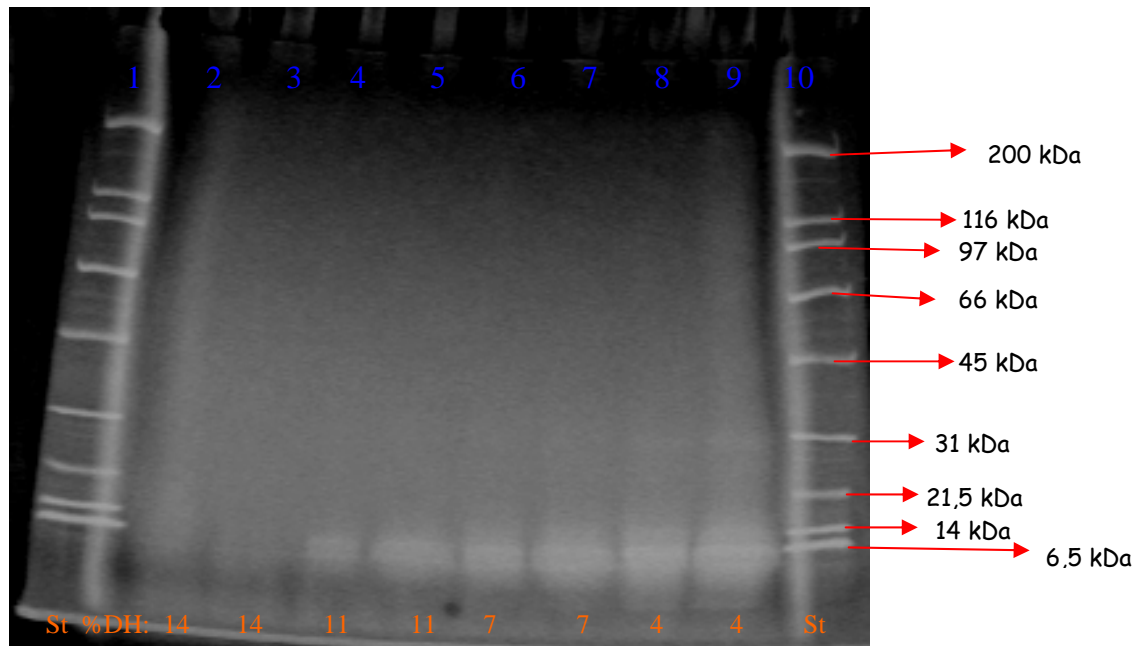


Mynd 11. SDS rafdráttur (4-15% Tris-HCl, línulegur stigull) á kolmunnapróteinum við mismunandi sýrustig. (Rásir 1&10) Staðall, (rásir 2&3) pH 5,5; (rásir 4&5) pH 12, (rásir 6&7) pH 3,5, (rásir 8&9) pH 10. Magn sýnis á rásum 2, 4, 6 og 8 var 5µl en á rásum 3, 5, 7 og 9 var magn sýnis 10 µl.



Mynd 12. SDS rafdráttur (4-15% Tris-HC, línulegur stigull) á kolmunnapróteinum við mismunandi sýrustig. (Rásir 1&10) Staðall, (rásir 2&3) pH 2,7; (rásir 4&5) pH 11, (rásir 6&7) pH 4; (rásir 8&9) pH 3. Magn sýnis á rásum 2, 4, 6 og 8 var 5µl en á rásum 3, 5, 7 og 9 var magn sýnis 10 µl.

Sýni voru rafdreigin við mishátt stig vatnsrofs (%DH, mynd 3) við 4, 7, 11 og 14%DH (mynd 13).



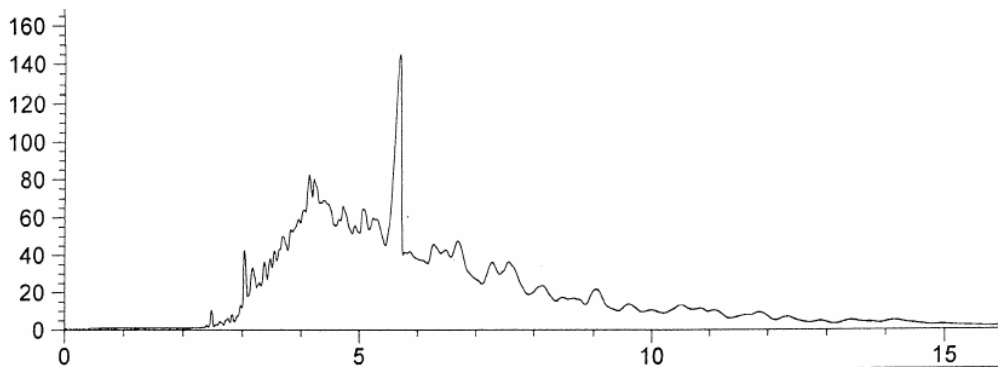
Mynd 13. SDS rafdráttur (4-15% Tris-HCl, línulegur stigull) af einangruðum vöðvapróteinum kolmunna eftir mislangt niðurbrot með 0,25% Alkalasa við pH 9, 22°C. (Rásir 1&10) Staðall, (rásir 2&3) 14%DH; (rásir 4&5) 11%DH, (rásir 6&7) 7%DH; (rásir 8&9) 4%DH. Magn sýnis á rásum 2, 4, 6 og 8 var 5µl en á rásum 3, 5, 7 og 9 var magn sýnis 10 µl.

Samanburður á niðurstöðum úr rafdrætti hráefnis (myndir 9 til 12) og eftir hydrolysu (mynd 13) sýna greinilega að mikið niðurbrot hefur átt sér stað. Við 4%DH er band við um 30 kDa sem smá hverfur og er ekki sjáanlegt við 14%DH. Við 4%DH sést breytt band við um 6.5 kDa sem minnkar eftir því sem hvarfstig (%DH) eykst. Við niðurbrot með ensímum myndast smáar einingar (peptíð) og greinilegt af mynd 13 að SDS rafdráttur á geljum notuðum hér gefa ekki nægjanlega greiningu á niðurbrotsefnum. Til eru gel til greininga á peptíðum. Betra er þó að nota öflugri greiningaraðferðir og í þessu verkefni er notast við gelfiltrun (CE).

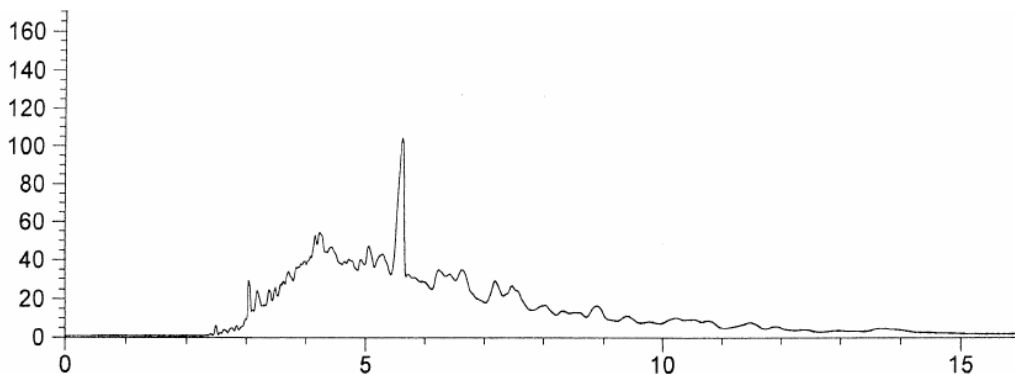
### 2.2.8. Gelfiltrun

Margar gerðir peptíða er að finna eftir ensímniðurbrot fiskpróteina. Erfitt getur reynst að greina einstaka peptíð út úr þeim fjölda með CE mælingu. Hins vegar gefur mælingin gott “fingrafar” af því hvað er að gerast við niðurbrotið. Til að greina betur nákvæmlega hvaða peptíð eru að myndast þarf að nota skiljunartækni og/eða safna mismunandi hlutlausnum af CE tækinu. Einnig þarf að hafa í huga að um nýjan tækjabúnað á Rf er að ræða og ennþá er verið að vinna að aðlögun tækjanna að peptíð mælingum.

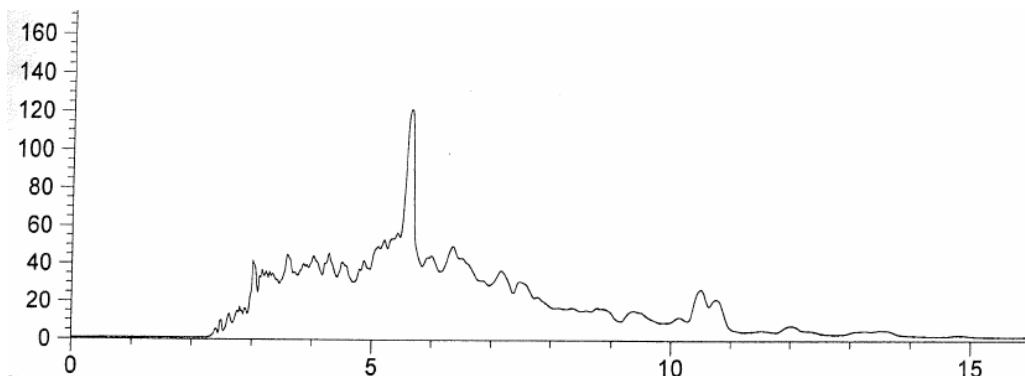
Það fyrsta sem vekur athygli við skoðun á myndum 14 til 16 er stór toppur á öllum myndum við um 5.5 mínútur. Líklega er þar um að ræða einingar frá ensímlöndunni. Til að kanna hvort svo sé þarf að keyra ensímið á CE (niðurstöður kynntar í næstu skýrslu). Ekki er mikill munur á CE við 4 og 6 %DH (myndir 14 og 15). Þegar lengra er gengið á ensímrofið við 16%DH kemur fram nýr toppur við 10.5 mínútur (mynd 16). Eru þá stærri peptíðeiningar myndaðar í meira magni heldur en við lægra hýdrólýsustig. Einnig hefur toppur frá 2-5 mínútur breikkað sem bendir til að fleiri smáar einingar hafi myndast, líklegast frjálsar amínósýrur, tví og þrípeptíð.



Mynd 14. Capillary electrophoresis mæling af vatnsrofnun kolmunnapróteinum við pH 9 með alkalasa. 4% DH.



Mynd 15. Capillary electrophoresis mæling af vatnsrofnun kolmunnapróteinum við pH 9 með alkalasa. 6% DH.



Mynd 16. Capillary electrophoresis mæling af vatnsrofnun kolmunnapróteinum við pH 9 með alkalasa. 16% DH.

### 3. Örsíun vatnsrofinna próteina

#### 3.1. Efni og aðferðir

##### 3.1.1. Hráefni

Vatnsrofin voru hreinsuð kolmunnaprótein sem framleidd voru í tilraunaverksmiðju á Akranesi. Vöðvapróteinin voru fengin úr sama hráefni og í öðrum mælingum, sjófrystur hausaður og slægður kolmunn í blokkum. Hausaður og slægður kolmunn var hakkaður í gegnum 6mm göt og örhakkaður í Stephan microcut frá Stephan Machinery Corp. Örskorið hakk var þvegið með 3 hlutum af vatni og vatn náð burtu með dekanter við um 3000xg (Alfa Laval). Hakk var endurleyst með 6 hlutum vatns og pH stillt við pH 10.8 og bandvefsprótein hreinsuð frá með sjálfskjótandi diskaskilvindu við um 6000xg (Alfa Laval). Sýrustig var því næst stillt á 5,6 og felld prótein hreinsuð út í dekanter við 3000xg.

##### 3.1.2. Vatnsrof

Hreinsuðu próteinin voru vatnsrofin við 55-57°C í 106 mínútur. Notuð var Protamex/ Alkalasa ensímblanda og voru styrkhlutföll 96 grömm Protamex og 20ml af Alkalasi á hver 1000 kg hráefnis. Afvirkjun ensíma fór fram við 90°C í 5 mínútur.

Leysanlegi hluti peptíðblöndu var fluttur til GREPA í Saint-Nazaire í Frakkandi en það er stofun á vegum Univeristé du Nates sem sérhæfir sig í örsíun sjávarfangs.

##### 3.1.3. Örsíun

Prufaðar voru örsíur með 4 og 8 kDa “cut-off” og nanosía með 300 Da “cut-off”. Notuð var lítill tilraunaverksmiðjubúnaður frá VMA Industrie fyrir hólksíur sem var með lítið dautt rúmmál eða um 1,5 L. Notaðar voru PCl síur með 330 cm<sup>2</sup> flatarmál. Mælingar voru framkvæmdar með hitastýringu og var hiti stilltur á 15 °C, hraði streymis um síu var 2.5 m/sek og þrýstingur milli 8 og 35 bör. Mælingar voru framkvæmdar af Ragnari Jóhannssyni og Laurent Vandanjon frá Université du Bretagne-Sud.

##### 3.1.4. Efnamælingar

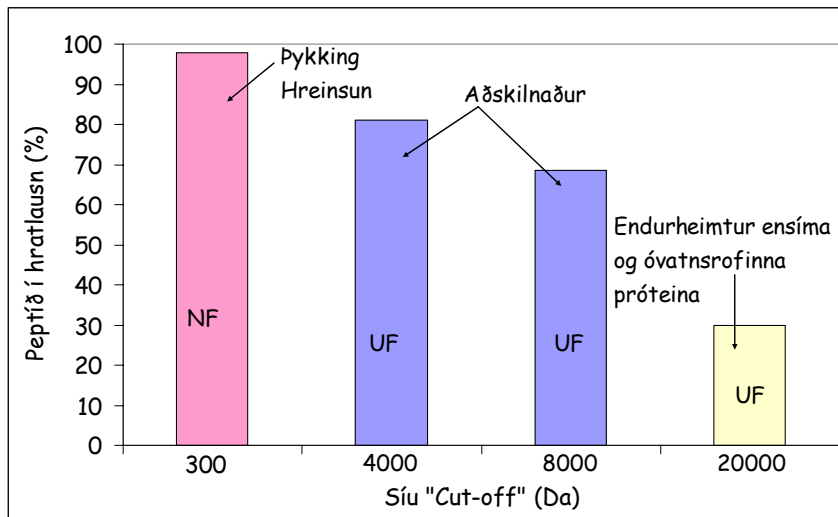
Mæld var styrkur próteina í síulausn (permeate) og hratlausn (retentate) með Biuret aðferð sem áður er lýst meðan á mælingum stóð og síðar með Kjeldal aðferð. HPLC greining var einnig gerð á þessum tveimur vökvafösum fyrir þessar þrjár síugerðir.

### 3.2. Niðurstöður og umræður

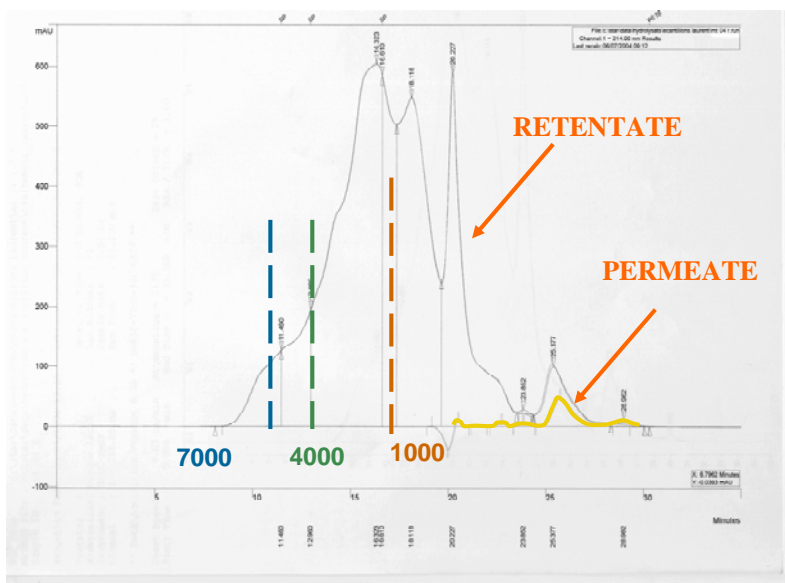
#### 3.2.1. Skiljunareiginleikar hinna mismunandi síustærða

Mælingar á próteinstyrk í síulausn sýndu að óverulegt magn próteina/amínósýra fer í gegnum síu með Cut-off gildi 300 dalton eða milli 2-3% (mynd 17). HPLC mælingar gefa til kynna að það sem fari í gegn sé einungis mjög smáar einingar sem samanstanda af einstaka amínósýrum og hugsanlega tvípeptíðum (mynd 18). Sía með gatastærð um 300 dalton er því kjörin til að styrkja lausn próteina við frekari vinnslu.

Á milli 70 til 80% af peptípum fara yfir í síuvökvafasa (permeate) (mynd 17) ef síustærðir 4 og 8 kDa eru notaðar. Þessar síustærðir má því nota til að aðskilja stærri peptíð frá þeim minni ef þess sé óskað. Sem stendur er verið er að framkvæma mælingar á hraða aðskiljunar sem fall af styrk hratlausnar (retentate) fyrir þessar opunarstærðir.



Mynd 17. Hlutfall peptíða sem verða eftir við síun með mismunandi gataopnun (Cut of) sía.



Mynd 18. HPLC greining á síulausn (permeate) og hratlausn (retentate) með 300 Da síu.

## 4. Ályktanir

Vandamál komu upp vegna aldurs hráefnis, allt bendir til að löng frystigeymsla á kolmunna valdi vandræðum við einangrun kolmunnapróteina fyrir ensímniðurbrot. Hefur það áhrif á heimtur próteina en einnig koma upp vandamál við að keyra hvarf vegna þess hversu mikil seigja lausnar er. Vonast er til að nýtt hráefni sem fæst nú á haustmánuðum minnki þetta vandamál.

Niðurstöður benda til (ástand hráefnis gæti sett hér strik í reikninginn) að Alkalasi við pH 9, 0.25% ensím, við 22°C gefi hvarfhraða sem leyfir að ná mismunandi miklu hvarfstigi (%DH) á ásættanlegum tíma (innan við 3 klst) fyrir áframhaldandi rannsóknir. Einnig hefur komið í ljós að rafdráttur gefur góða mynd af hráefni en er ekki gott tæki til að kanna niðurbrotsefni. Hins vegar er Capillary Electrophoresis mjög kröftugt tæki til þess. Ennþá þarf þó að gera frekari rannsóknir til að aðlaga hinn nýja tækjabúnað að verkefninu.

Niðurstöður tilrauna á notkun örsía lofa mjög góðu fyrir notkun til framleiðslu á peptíðum og vatnsrofnum próteinum.

## 5. Næstu skref

Þeim hluta verkefnisins sem snýr að uppsetningu tilrauna er að mestu lokið. Þegar nýtt hráefni fæst þarf að ljúka þeim hluta og kanna áhrfi hráefnis á mælingar.

Næstu skref að því loknu fela í sér myndun stærri sýna og mælingar á fleiri eiginleikum afurða s.s. vatnsheldi og lífvirkni í samstarfi við samstarfaðila í Frakklandi.

Notkun örsía við framleiðslu á peptíðum og aðgreiningu þeirra í misstórar einingar lofar mjög góðu og verður notast við þær í áframhaldandi rannsóknum.

## 6. Heimildir

Adler-Nissen J (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers, Barking UK.

Engvang K og Nielsen HH (2000). *In situ* activity of chymotrypsin in sugar-salted herring during cold storage. *J Sci Food Agric.* **80**:1277-1283.

Hlynsdóttir H (2004). MS ritgerð í undirbúningi.

Hultin HO og Kelleher SD (1999). Process for isolating a protein composition from a muscle source and protein composition. US Patent No 6,005,073. Dec 21st, 1999.

Hultin HO, Kelleher SD, Feng Y, Kristinsson HG, Richards MP, Undeland IA og Ke S (2000). U.S. Patent Application No. 60/230,397. "High Efficiency Alkaline Protein Extraction".

Kristjánsson MM (2001). Activity Measurements of Proteinsases using Syntheric Substrates. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, C2.1.1-C2.1.7.

Layne E (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Meth. Enzymol.* **3**, 450-451.

Margrét Geirsdóttir (2001). Prótein (surimi) úr loðnu. Rf skýrsla 37-01. Lokaskýrsla til Rannís. 25 bls.

Nielsen HH (2004). Persónulegar upplýsingar. Danish Institute for Fisheries Research. Dept. of Seafood Research. Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark.

Thorarinsdóttir KA, Arason S, Geirsdóttir M, Bogason SG og Kristbergsson K (2002). Changes in myofibrillar proteins during processing of salted cod (*Gadus morhua*) as determined by electrophoresis and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, **77**, 377-385.

Torten J og Whitaker JR (1964). Evaluation of the biuret and dye-binding methods for protein determination in meats. *J. Food Sci.* **29**, 168-174.

Undeland I, Kelleher SD og Hultin H. (2002). Recovery of functional proteins from herring (*Clupea harengus*) light muscle by an acid or alkaline solubiization process. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7371-7379.

Undeland I, Kelleher SD, Hultin H, McClements J og Thongraung C (2003). Consistency and solubility changes in herring (*Clupea harengus*) light muscle homogenates as a function of pH. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3992-3998.