

Nýjar matvælarannsóknir á Íslandi - Fiskprótein lofa góðu sem yfirborðsvirk efni fyrir ýrulausnir

Sigþór Pétursson

Háskólanum á Akureyri

Vefútgáfa: 13. desember 2006

Ágrip – Ýrumyndandi eiginleikar fiskpróteina voru rannsakaðir. Próteinin voru annars vegar dregin út við háan saltstyrk og hins vegar úr súrri lausn við pH 3. Í báðum tilfellum var um blöndu próteina að ræða en myosín (um 200 kDa) var þó í mestu magni í báðum próteinblöndunum. Próteinlausnirnar voru notaðar til þess að mynda 5% kornolíu-í-vatni ýrulausnir við herbergishita og pH 3. Hægt var að mynda ýrulausnir með litla ördröpa (meðalþvermál, $d_{3,2} < 1 \mu\text{m}$) sem voru stöðugar í meira en 9 daga með því að nota aðeins 0,2% prótein styrk. Jafnhleðslupunktur ýruagnanna var rúmlega pH 5 sem er svipað og jafnhleðslupunktur myosíns. Við lágt pH þöldu ýrulausnirnar um 150 mM saltstyrk við herbergishita. Án salts þöldu þær hitastig að 90°C í 30 mínútur. Hitapolið var mun minna ef 100 mM salt var til staðar, sérstaklega fyrir pH 3 útdregnu próteinin. Niðurstaða er að fiskprótein henta vel til að auka stöðugleika ýrulausna í matvælum.

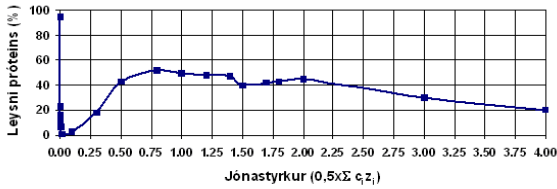
1. Inngangur

Um einn milljarður manna eða um 17% íbúa jarðarinnar fá stóran hluta dýrapróteins úr fiski en um 50% jarðarbúa eða um þrjú milljarðar manna fá 20% af dýrapróteini úr fiski. Það liggur í hlutarins eðli að í fiskvinnslu eins og flakaframleiðslu myndast mikill úrgangur eða aukaafurðir sem í flestum tilfellum fara í verðlitla framleiðslu. Hér er um skinn, bein, haus og sporða að ræða. Samkvæmt Food and Agricultural Organisation Sameinuðu þjóðanna (FAO) fóru um 34 milljónir tonna af 131 milljóna tonna heimsafla árið 2000 í verðlitla framleiðslu aðra en matvæli [1].

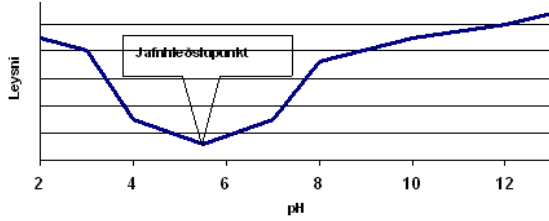
Hugmyndir um not aukaafurða úr fiskvinnslu og annars ódýrs sjávarfangs eiga sér langa sögu. Góð matvæli er hægt að selja háu verði og þess vegna þolir slík matvælaframleiðsla mikinn framleiðslukostnað eins og auðvelt er að sjá á starfsmannafjölda og tækjabúnaði frystihúsa hér á landi. Öðru máli gegnir um úrganginn úr aðalframleiðslunni en þar getur kostnaður við varðveislu sem hindrar skemmdir einfaldlega verið meiri en markaðsverðið þolir. Sem dæmi um notkun slíkra aukaafurða má nefna framleiðslu fiskimjòls sem minnkar umfang úrgangsins til muna með því að fjarlægja meirihluta vatnsins úr honum og breytir honum um leið í tiltölulega stöðugt efni sem þolir geymslu

miklu betur. Afskurður sem til fellur við flakaframleiðslu er einnig notaður beint sem dýrafóður. Í samamburði við ýmis önnur lönd er Ísland án efa framranga hvað snertir fullnýtingu sjávarfangs og má nefna framleiðslu þurrkaðra þorskhausa sem tiltölulega nýlegt dæmi um viðleitni í þessa átt [2].

Þessi hefðbundna nýting aukaafurða er virðingarverð en því er ekki að leyna að hér er um verðlitla framleiðslu að ræða. Upp úr miðri síðustu öld komu fram hugmyndir um að einangra og hreinsa prótein úr fiskúrgangi eða vatnsrjúfa það þannig að það mætti nota til manneldis vegna óumdeildra næringarfræðilegra gæða próteinsins. Strax á áttunda áratugnum kom hins vegar í ljós að það er eitt að framleiða hlutina og annað að fá einhvern til þess að kaupa þá og almennt má segja að menn græddu ekki á slíkum próteinþykknunum eða hydrólýsötum [3–6]. Surimi framleiðsla er þó dæmi um notkun próteins úr tiltölulega verðlitlum fiskum [7]. Á síðustu árum hafa hugmyndir manna um virðisauka á slíkum verðlitlum afurðum beinst að eðlisvirkni próteina (e. functional properties) sem geta haft mikla þýðingu í matvæla- og fóðurframleiðslu [8–11]. Það er tiltölulega einfalt að einangra próteinblöndur og jafnvel einstök prótein úr fiski [12]. Notkun slíkra próteina krefst þess að eiginleikar þeirra



Mynd 1. Áhrif jónastyrks á leysni próteina.



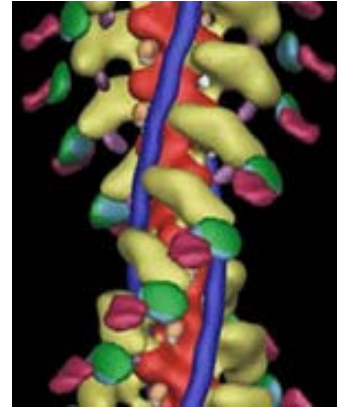
Mynd 2. Leysni próteina í beinfiskum við mismunandi sýrustig (pH).

séu vel skilgreindir en til þess þarf rannsóknir sem helst hafa verið stundaðar innan háskóla eða opinberra rannsóknastofnana [13, 14]. Þær rannsóknir sem hér er lýst fjalla um notkun próteina úr þorskhaldi til þess að auka stöðugleika olíu-í-vatni ýrulausna.

Hluti próteina í fiski eða svokölluð vöðvafrymisprótein (e. sarcoplasm protein) eru leysanleg í vatni eða þunnum saltlausnum. Þessi prótein skolast burt við surimi framleiðslu og er einfaldlega hent í flestum tilfellum. Leysni stærsta hluta próteinanna, aðallega myosin og actin eykst hins vegar með auknum saltstyrk og nær hámarki við um 5% styrk sem samsvarar jónastyrk um 0,8. Það er þó athyglisvert að leysni þessara próteina eykst aftur ef salt og leysanlegu próteinin eru fjarlægð og þau leysast fullkomlega í hreinu vatni eins og sýnt er á mynd 1 [15].

Annað atriði sem hefur áhrif á leysni próteina er sýrustigið en almennt má segja að leysnin sé minnst við jafnhleðslupunktinn (sjá mynd 2). Eðlissvipting próteina getur þó skipt verulegu máli í þessu sambandi.

Bygging vöðvapróteina (e. actomyosin complex) hefur verið rannsökuð með nútíma aðferðum og birtir Ron A. Milligan myndir á heimasíðu sinni [16] sem fengnar eru með rafeindasmásjá við lágt hitastig. Mynd 3 sýnir byggingu vöðvapróteina með 25–30 Å upplausn sem er minna en 20 föld tengislengd einfalds C-C tengis. Það er athyglisvert að sjá hvernig þessi prótein eru undin saman og svo þau verða ekki skilin að án verulegrar eðlissviptingar þó svo einstök

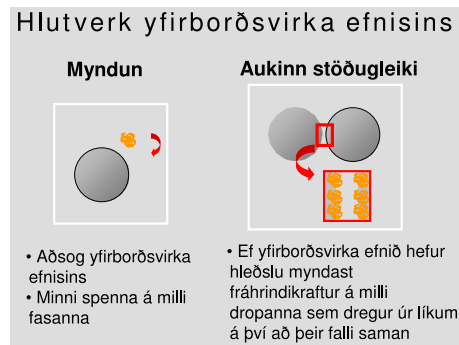


Mynd 3. Actomyosin complex. Myosin er gult, F-actin er rautt, trópomyosin er blátt og 'myosin light chains' eru grænar og dökkrauðar.

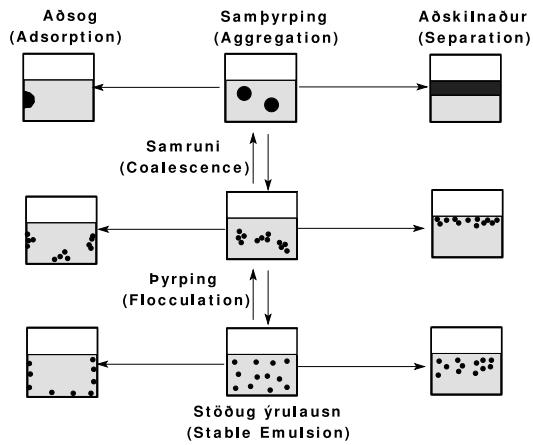
prótein kunnir að endurheimta ákveðna eðlissvirknieigleika aftur.

2. Stöðugleiki ýrulausna

Ýruagnir eru í eðli sínu óstöðugar í vatni og notkun yfirborðsvirkra efna gengur út á að auka stöðugleika þeirra eins og sýnt er á mynd 4. Þegar við ræðum um stöðugar ýrulausnir er vísað til stöðugleika innan ákveðins tímaramma. Á ensku er rætt um “kinetic stability” sem hefur hagnýta þýðingu þó lausnin sé varmafræðilega óstöðug. Notkun orðsins *stöðug* ýrulausn í þessari grein vísar þess vegna til þessa hraðfræðilega stöðugleika. Olían í olíu-í-vatni ýrulausn getur skilið sig frá vatnsfasanum eftir ýmsum leiðum eins og sýnt er á mynd 5. Agnirnar sem slíkar geta aðsogast á yfirborð ílátsins eða flotið upp sem endar með



Mynd 4. Yfirborðsvirk efni draga úr tilhneigingu olíuagna í vatni til þess að falla saman og skilja sig að.



Mynd 5. Olía getur skilið sig frá vatnsfasa eftir mismunandi leiðum.

olíulagi ofan á vatnsfasanum (e. creaming). Stundum dragast agnirnar saman og mynda agnaþyrpingar (e. flocs) sem geta fallið saman í stærra dropa (coalesce) sem eykur líkur á aðskilnaði olfunnar, annaðhvort með aðsogi eða floti.

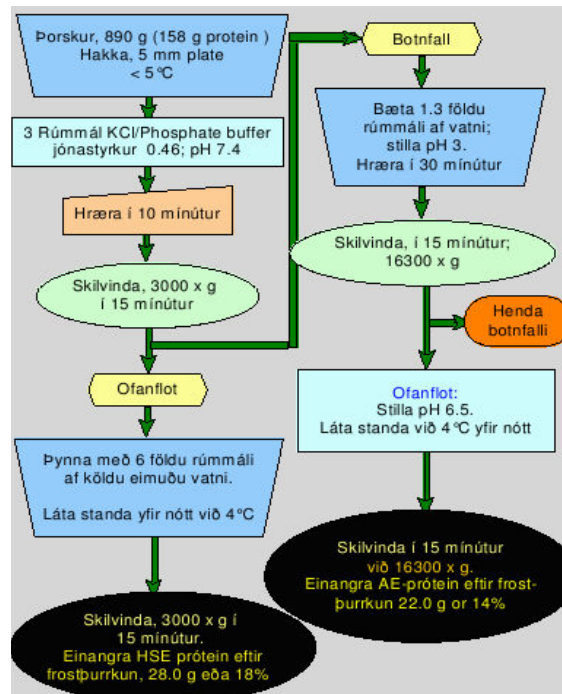
Þeir eiginleikar sem, eru ýmist mælikvarði á stöðugleika lausnanna eða hafa bein áhrif á hann og voru kannaðir í þessari rannsókn eru:

- Stöðugleiki með tilliti til aðskilnaðar olfunnar, „Creaming Stability“. Þetta má ákvarða án sérhæfðra mælitækja með því að láta ýrulausnina standa í tilraunaglassi og mæla einfaldlega þykkt olíulagsins sem skilur sig frá.
- Ákvörðun agnastærðar „Particle Size Determination“. Þetta er mælt með sérhæfðu „laser diffraction“ tæki. Stærðin er gefin sem „volume-average mean diameter“, $d_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$, þar sem n_i er fjöldi dropa með þvermálið d_i . Stærðin $d_{3,2}$ er beinn mælikvarði á stöðugleika agnanna þar sem þetta gildi fer stækkandi ef ýruagnirnar eru að falla saman.
- „ζ-Potential“. Hleðsla agnanna (e. ζ-potential) var mæld með „particle electrophoresis“ tæki (Zetamaster). Hleðsla agnanna er þýðingarmikil stærð og er mæld við mismunandi pH en ζ-spennan breytist frá jákvæðu gildi við lágt pH í neikvætt við pH fyrir ofan jafnhleðslupunkt agnanna. Þetta gefur sterka vísbendingu um það pH þar sem agnirnar eru stöðugastar en að öðru jöfnu eru óhlaðnar ýruagnir miklu líklegri til þess að falla saman en

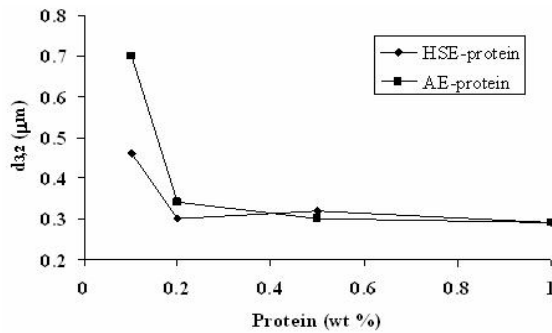
hlaðnar. Hleðsla agnanna skiptir líka máli ef á að hylja þær með fleiri en einu lagi. Þegar prótein eru notuð sem yfirborðsvirk efni getur súrustig lausnarinnar valdið eðlissviptingu próteinanna sjálfra og þannig gert agnirnar óstöðugar óháð ζ-spennunni.

3. Niðurstöður

Einangrun próteinanna. Áður en hafist var handa við að einangra próteinin úr þorskhöldinu var ákveðið að stefna að einfaldri framkvæmd sem gæfi sem mest af próteini fremur en að reyna að einangra einstök prótein. Mynd 6 sýnir flæðirit fyrir einangrun tveggja próteinblandna sem kallast HSE-prótein (e. high-salt-extracted) og AE-prótein (e. acid extracted). Eins og sjá má voru HSE-próteinin um 18% af heildarpróteininnihaldinu AE-prótein um 14% eða rúmlega 30% heimtur alls. Próteinin voru frostþurrkuð og varðveitt við -70°C. Þar sem þessi rannsókn lýtur að ýrumyndandi eiginleikum próteinsins er mikilvægt að fosfólípíð séu ekki til staðar í próteininu. Fosfólípíð eru í öllum frumuveggjum og eru góðir ýrumyndarar. Það er þess vegna þýðingarmikið að próteinin hafi skilist vel frá þeim. Tilvist þeirra í einangraða próteininu var ekki rannsökuð sérstaklega en það má benda á að afbrigði



Mynd 6. Flæðirit fyrir einangrun próteina.



Mynd 7. Áhrif próteinstyrks á meðalstærð ýruagna.

af þeirri aðferð sem hér var notuð gaf yfir 97% hreint myosin eins og lýst er í heimild 12 enda er próteinið gert leysanlegt í saltlausn við pH 7,4 en önnur prótein og frumuhlutar skildir frá með skilvindu. Að þessu loknu var próteinið fellt út eftir sex falda þynningu með eimuðu vatni.

3.1. Myndun ýrulausna

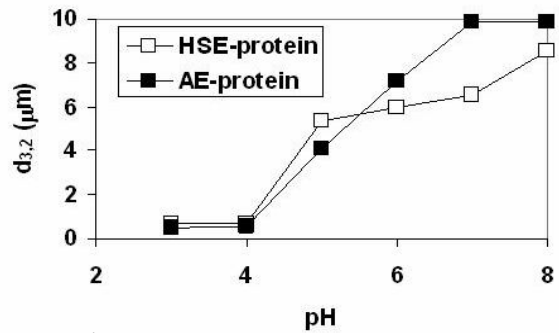
Ýrulausnir voru búnar til í 10 mM sítrat-imidasól buffer við pH 3. Lausnir af fiskpróteinum (0,1 til 1 wt%) voru útbúnar. Ýrulausnirnar voru síðan myndaðar með handýrumyndara og síðan tveggja þrepa háþrýsti “homogenizer” eða fitusprenki. Fyrst var athugað hvaða lágmarksstyrk af próteinunum þyrfti til þess að halda 5% olíu í vatnsfasanum. Ýmsar leiðir eru til tækur til þess að mæla eiginleika, þar með talinn stöðugleika, ýrulausnanna og áhrif umhverfisþátta á hann. Þeir umhverfisþættir sem fyrst og fremst voru athugaðir voru sýrustig, jónastyrkur og hitastig.

3.2. Áhrif próteinstyrks á meðalstærð ýruagna

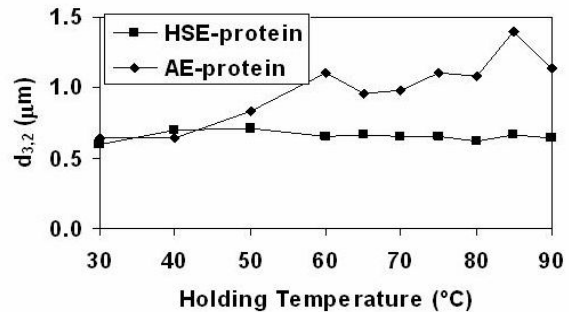
Fylgst var með stöðugleika ýrulausnar, sem var mynduð með 5% kornolíu og próteinstyrk frá 0,2 til 1%, í tvær vikur. Mynd 7 sýnir agnastærðina sem ber með sér að 0,2% styrkur nægir til þess að mynda stöðuga ýrulausn af þessu magni af olíu. Í öðrum tilraunum var 0,5% próteinstyrkur þó notaður.

3.3. Áhrif pH á hleðslu dropanna (ζ -spenna)

Ýrulausnir með báðum próteinblöndunum voru athugaðar á pH bilinu 3 til 8, en spennan fór úr +30 mV við pH 3 í um -20 mV við pH 8. Línurit af zeta spennunni á móti pH skar x-ásinn við rúmlega 5 sem er í góðu



Mynd 8. Áhrif sýrustigs pH á agnastærð ýrulausna.



Mynd 9. Áhrif hitunar við mismunandi hitastig í 30 mínútur á agnastærð.

samræmi við jafnhleðslupunkt fiskipróteina. Línuritið er ekki sýnt hér.

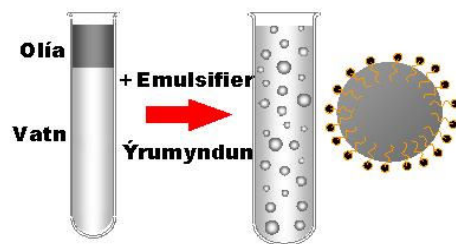
3.4. Áhrif pH á agnastærð

Áhrif pH á agnastærð var rannsökuð. Meðalagnastærðin er lítil, eða um 0,5 μm , fyrir neðan pH 4 en fyrir ofan 4 fer hún stækkandi sem bendir til þess að agnirnar fari að falla saman og við pH 8 er $d_{3,2}$ komið í 9 til 10 μm . Mynd 8 sýnir $d_{3,2}$ gildin fyrir pH 3 til 8.

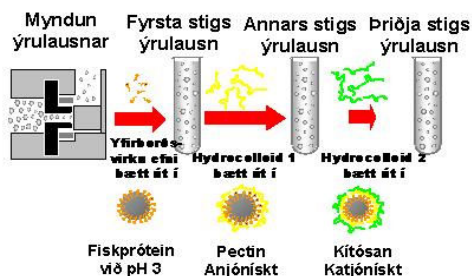
3.5. Áhrif hitastigs á agnastærð

Ýrulausnum var haldið við hitastig frá 30 til 90 $^{\circ}\text{C}$ í 30 mínútur, annars vegar án salts og hins vegar í tilvist 100 mM salts, og agnastærðin síðan mæld. Agnastærðin benti til þess að báðar ýrulausnirnar þyldu hitastig upp í 90 $^{\circ}\text{C}$ ef salt var ekki til staðar ($d_{3,2} \approx 0,6-0,7 \mu\text{m}$). Agnastærð lausnanna sem innihéldu 100 mM natríum klóríð benti til þess að sýruútdregna próteinblandan gæfi ekki alveg eins stöðugar

Heföbundin myndun ýrulausna



Myndun fjöllaga ýrulausna



Mynd 10. Myndun einfaldra og fjöllaga ýrulausna.

ýrulausnir við hitastig yfir 40°C eins og mynd 9 sýnir ($d_{3,2} \approx 1.0-1.4$ mm).

4. Lokaorð

Þær niðurstöður sem eru ræddar hér að framan sýna að fiskprótein hafa góða yfirborðsvirknieiginleika sem gefa stöðugar ýrulausnir. Það er í sjálfu sér enginn skortur á yfirborðsvirkum próteinum sem geta aukið stöðugleika ýrulausna og eru mjólkurprótein ef til vill besta dæmið um prótein sem eru mikið notuð við myndun ýrulausna, en er samt enn hent í stórum stíl vegna þess að það svarar ekki kostnaði að hirða þau. Þýðing rannsókna á nýjum yfirborðsvirkum próteinum hefur fyrst og fremst þýðingu til þess að auka fjölbreytnina. Það kom til dæmis í ljós að þær ýruagnir sem hér voru rannsakaðar eru stöðugar við lágt pH (3-4) en ekki í hlutlausum lausum þar sem ýruagnir sem búnar eru til með mjólkurpróteinum eru stöðugri. Þetta gefur möguleika á myndun ýrulausna sem eru stöðugri við lágt pH, en næstum öll matvæli hafa pH um og undir hlutlausu. Þessir eiginleikar hafa einnig þýðingu fyrir myndun fjölhúðaðra ýrulausna og stýrða losun sem hefur vaxandi þýðingu í matvæla- og lyfjaidnaði og víðar. Fjölbreytni yfirborðsvirkra efna í þessu sambandi er þess vegna þýðingarmikil í sjálfu sér. Mynd 10 sýnir myndun fjölhúðaðrar ýrulausnar sem notar prótein sem fyrsta lag, anjónískt efni eins og kítósan sem annað lag og katjónískt efni eins og pektín til þess að mynda þriðja lagið. Svona ýrulausn býður upp á stýrða losun.

Oft er rætt um sérstæð bragðeinkenni fiskpróteina í neikvæðu samhengi, en það gildir að sjálfsögðu ekki um sjávarréttina sjálfa. Framleiðsla á súpum og sósum úr sjávarfangi er mikil nú þegar og fer vaxandi. Þess vegna er ástæða til að beina rannsóknum á notkun fisk-

próteina í átt að ýrulausnum af heilnæmum fjölmöttuðum fiskiolúum.

Þýðing rannsókna á ýrulausnum fyrir matvælaíðn aðinn má að lokum taka saman á eftirfarandi hátt:

- Þróun nýrra matvæla og aukin gæði eldri matvæla.
- Áferð, útlit, bragð og hilluending.
- Kostnaður, heilnæmi og seljanleiki.
- Örhúðun (e. encapsulation) og flutningur á virkum næringarþáttum (e. functional components).
- Vörn fyrir viðkvæm efni.
- Stýring á losun næringarefna (e. triggered release).

Summary: The ability of two protein fractions extracted from cod to form and stabilize oil-in-water emulsions was examined, a high salt extracted fraction and a pH 3 acid extracted fraction. Both fractions consisted of a mixture of several proteins, with the predominant one being myosin (~200kDa). The two protein fractions were used to prepare 5 wt% corn oil-in-water emulsions at ambient temperature and at pH 3.0. Emulsions with relatively small mean droplet diameters ($d_{3,2} < 1 \mu\text{m}$) and good creaming stability (> 9 days) could be produced at protein concentrations 0.2 wt% for both fractions. The isoelectric point of droplets stabilized by both protein fractions was just over pH 5, which is close to the isoelectric point of myosin. The emulsions were stable to droplet flocculation and creaming at relatively low pH (below 4) and NaCl concentrations (150 mM) when stored at room temperature. In the absence of salt, the emulsions were also stable to thermal treatment of 30 to 90°C for 30 minutes, but in the presence of 100 mM NaCl droplet flocculation and creaming were observed in some of the emulsions, particularly those stabilized by the AE-fraction. Our results suggest that protein fractions extracted from cod can be used as emulsifiers to form and stabilize food emulsions.

Heimildir

- [1] Nomura, I. The state of world fisheries and aquaculture 2002, *FAO Fisheries Department*

- <http://www.fao.org/>
- [2] Sigurjon Arason. Utilization of Fish Byproducts in Iceland, in *Advances in Seafood Byproducts: 2002 Conference Proceedings*, ritstj. Peter J. Bechtel, Alaska 2003, bls. 43-62.
- [3] Shahidi, Fereidoon. Marine Oils and Bioactive Compounds as Nutraceuticals and Functional Food Ingredients: Current Status and Future Trends, in *Proceedings of the Trans Atlantic Fisheries Technology Conference, Reykjavik, Iceland, June 11 - 14, 2003*, pp 312-319.
<http://www.rfisk.is/taft2003/>
- [4] Gildberg, Asbjorn. Enzymes and Bioactive Peptides from Fish Waste Related to Fish Silage, Fish Feed and Fish Sauce Production, in *Proceedings of the Trans Atlantic Fisheries Technology Conference, Reykjavik, Iceland, June 11 - 14, 2003*, pp 328-319,
<http://www.rfisk.is/taft2003/>
- [5] Venugopal, V., Ghadi, S.V., Nair, P.M. (1992) *Asean Food Journal* 7, 3-12.
- [6] Finch, R. Whatever happened to fish protein concentrate. Prospects for success still not very bright, *Food Technology* 1977, 31, 44, 46-47, 49, 52-53.
- [7] *Surimi Technology*, Lanier, T.C. og Lee, C.M., ritstj., Marcel Dekker, NY, 1992.
- [8] Spinelli, J., Groninger, H., Koury, B., Miller, R., Functional Protein Isolates and Derivatives from Fish Muscle, *Process Biochemistry* 1975, 31-35.
- [9] Cofrades, S., Carballo, J., Careche, M., Colmenero, F.J. Emulsifying properties of actomyosin from several species. *Food Science and Technology – Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 1996, 29, 379-383.
- [10] Huidobro, A., Montero, P. and Borderias, A.J. Emulsifying properties of an ultrafiltered protein from minced fish wash water, *Food Chemistry* 1998, 61, 339-343.
- [11] Liceaga-Gesualdo A.M., Li-Chan E.C.Y, Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*), *J. Food Sci.* 1999, 64, 1000-1004.
- [12] Kristinsson, H.G., Evaluation of Different Methods to Isolate Cod (*Gadus Morhua*) Muscle Myosin, *J. Food Biochem.* 2001, 25, 249-256.
- [13] Guðmundur Örn Arnarson, Gelatin from fish skin for microencapsulation, *M.Sc. ritgerð, Háskóli Íslands*, 2002, 105 bls.
- [14] Sigthór Pétursson, E.A. Decker and D.J. McClements, Stabilization of Oil-in-Water Emulsions by Cod Protein Extracts, *J. Agric. Food Chem.* 52(12), 3996-4001 (2004).
- [15] M.T. Morrissey et al., in *Surimi and Surimi Seafood*, Jae W. Park, ed., Marcel Dekker 2000, bls. 147.
- [16] Milligan R.A.,
<http://www.scripps.edu/milligan/index.html>

Um höfundinn: Sigbór Pétursson lauk B.Sc. prófi í efnafræði við University of Edinburgh, Skotlandi árið 1970 og doktorsprófi í efnafræði kolhydrata frá University of Birmingham, Englandi árið 1979. Hann starfaði sem efnafræðikennari við Menntaskólann í Reykjavík árin 1970 til 1975. Árin 1978 til 1983 starfaði hann við rannsóknir á penisillín kljúfandi ensímum (beta-lactamósum) og penisillín myndandandi ensímum við Sir William Dunn School of Pathology og við Dyson Perrins Laboratory, University of Oxford. Frá 1984 til 1990 starfaði hann í Department of Biochemistry og við Dyson Perrins Laboratory, University of Oxford, við rannsóknir tengdar fáskyrum ónæmiskerfisins og efnasmíðum glykosidasa tálma. Frá 1990 hefur hann starfað við Sjávarútvegsdeild nú Viðskipta og raunvísindadeild Háskólans á Akureyri þar sem hann er nú prófessor. Fyrri hluta árs 2003 dvaldi hann sem Fulbright Scholar við Department of Food Science, University of Massachusetts, þar sem sú vinna sem greinin byggist á var framkvæmd.

Háskólanum á Akureyri
Borgum
600 Akureyri
sigthor@unak.is
Móttækin: 12. nóvember 2004