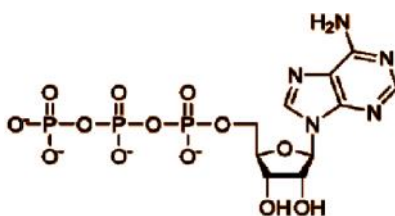


# Dynamikken i nedbrytningen av ATP i *post mortem* torskemuskel (*Gadus morhua* L.) og K-verdi som ferskhetsindikator

Ragnar Lillevoll

Mastergradsoppgave i fiskerifag

Studieretning for marine næringsmidler (30 stp.)



*Adenosin trifosfat*

Institutt for marin bioteknologi

Norges fiskerihøgskole

Universitetet i Tromsø

Tromsø, Norge

Juni 2007





## Forord

Denne oppgaven markerer den uungåelige slutten på en flott studietilværelse her i Tromsø. Tiden ved UiTø og NFH har gitt meg masse nye venner og enda mer kunnskap å ta med videre i livet.

En stor takk går til min veileder, førsteamanuensis Bjarne Landfald, for hans ivrige pennestreker, doble utropstegn, spørsmålstegn, fete typer (i str. 20), under- og overstreknings og piler hit og dit. At han i tillegg har satt av helgetid for å gjøre dette, er bare å ta av seg hatten for. Og for all annen hjelp og veiledning på lab'en og i felt, takk!

Jeg vil også takke avdelingsingeniør ved IMAB Hanne Mæhre for all uvurderlig hjelp og veiledning i forbindelse med gjennomføring av analyser på laboratoriet, og for å ha svar på ihvertfall de fleste av mine spørsmål.

Til slutt vil jeg takke mine foreldre, Tone Steffensen og Tor Arne Lillevoll, for all støtte gjennom studietiden. Den økonomiske biten har vært viktig, men aller viktigst har den moralske støtten vært. Uten deres oppmuntring og motiverende innspill, hadde ikke studietiden fram til en mastergrad vært like lett. Det gjelder forsåvidt også livet for øvrig. Igjen, takk!

Tromsø,

Juni 2007

Ragnar Bjarne Lillevoll



## Sammendrag

En forsøksgruppe av oppdrettet atlantisk torsk (*Gadus morhua* L.) ble i forkant av slakting utsatt for stressende aktivitet ved hjelp av O<sub>2</sub>-sjokk, mens en kontrollgruppe ble avlivet direkte med slag mot hodet. Fra begge grupper ble foretatt prøver gjennom en fullstendig fersklagringsperiode, fra tidspunkt 0 (umiddelbart *post mortem*) og fram til 10 døgn. Særlig vekt ble lagt på den tidligste lagringsfasen, med hyppige uttak det første døgnet *post mortem*. Ved bruk av HPLC-analyser av perklorsyreektrakter av muskel fra de ulike prøveuttakene var det mulig å følge degraderingen av ATP gjennom hele perioden. Ut fra de molare konsentrasjonene av ATP og dets degraderingsprodukter, beregnet på grunnlag av HPLC-analysen, ble det beregnet en ferskhetsindeks, K-verdi, for hvert prøveuttak i lagringsperioden. Målsetningen var å se på dynamikken av nedbrytningen til ATP for å klarelegge om K-verdien kunne brukes som en ferskhetsindikator i tiden før mikrobielle endringer gjør seg gjeldende. Det ble også undersøkt om stressingen av fisk i forkant av slakting ville påvirke nedbrytningsdynamikken til ATP og K-verdien. I tillegg ble pH i de enkelte prøvene logget for å se om stressingen ga noen effekt på pH-verdien.

K-verdien viste en markant, og tilnærmet linær økning fra aller første prøveuttak og ut hele islagringsperioden. Det kunne derimot ikke pekes på forskjeller mellom den stressa og ustressa gruppa som var store nok til å kunne konkludere at stressingen hadde noen effekt på nedbrytningsdynamikken for ATP generelt eller K-verdien spesielt. For pH ble det observert en forventet lavere pH for den stressa fisken i prøveuttaket umiddelbart etter avliving. Overraskende nok vedvarte denne forskjellen ut hele lagringstida, uten at det kunne pekes på noen åpenbar årsak til dette.



# Innholdsfortegnelse

Forord .....	3
Sammendrag .....	5
Innholdsfortegnelse .....	7
1. Bakgrunn .....	9
1.1. Autolytisk nedbrytning .....	9
1.2. ATP-nedbrytning .....	10
1.3. Bakteriell nedbrytning .....	11
1.4. Formål .....	12
2. Materialer og metoder.....	13
2.1 Feltarbeid.....	13
2.2 Analyse av ATP og dets degraderingsprodukter .....	14
HPLC-metoden.....	14
Ekstraksjon .....	14
Bestemmelse av produktkonsentrasjon og K-verdi .....	15
2.3 Totalt flyktig nitrogen (TVN).....	16
Utstyr .....	16
Reagenser .....	16
Fremgangsmåte.....	17
3. Resultater.....	19
3.1 Degradering av ATP.....	19
3.2. K-verdi .....	23
3.3. pH-måling .....	25
3.4. Totalt flyktig nitrogen (TVN) .....	26
4. Diskusjon .....	27
4.3. ATP og dets degraderingsprodukter.....	27
4.4. K-verdi.....	30
4.5. pH-målinger .....	31
4.6. TVN.....	32
5. Konklusjon .....	33
6. Litteraturliste .....	35





# 1. Bakgrunn

## 1.1. Autolytisk nedbrytning

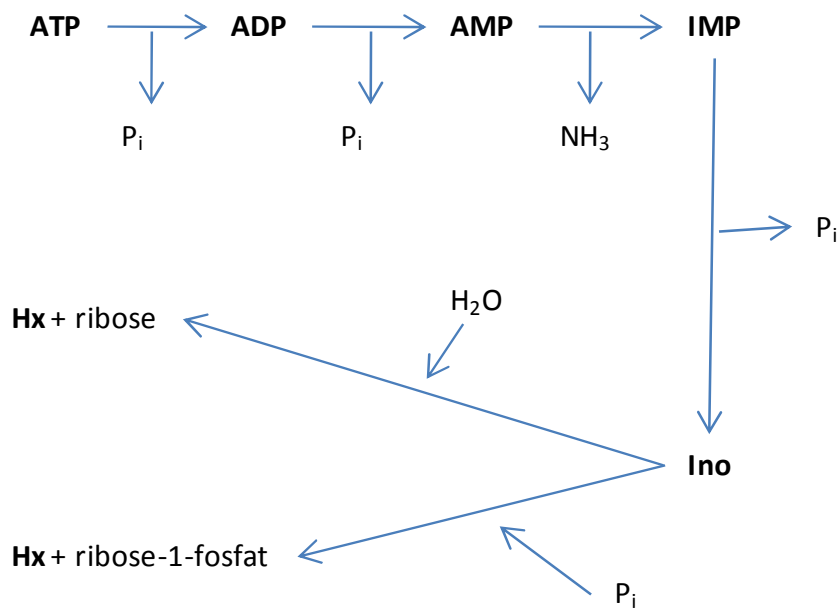
Den autolytiske nedbrytningen av vevet i en organisme er enzymatiske prosesser som starter før mikrobiologisk nedbrytning har begynt å gjøre seg gjeldende.

Adenosintrifosfat (ATP) er en energirik fosfatforbindelse som er essensiell i de metabolske prosessene i celler. På dødstidspunktet slutter hjertet å slå og blodet som i fisk tar opp oksygen gjennom gjellene, slutter å strømme. Selv en tid etter død vil muskelcellene opprettholde et visst nivå av ATP. Siden oksygentilførselen er avbrutt er, det svært begrenset hvor mye energi som kan hentes fra næringskildene som er tilstede i cellene. Under aerobe forhold forbrennes fett og glykogen gjennom Krebs' syklus til CO<sub>2</sub> og vann og det dannes ATP først og fremst gjennom oksidativ fosforylering (Campbell & Farrell, 2003). Når oksygentilførselen kuttes, opphører den oksidative fosforyleringen og videre syntese av ATP skjer kun anaerobt gjennom glykolysen. Sluttproduktet av den anaerobe metabolismen er laktat. Glykolysen produserer kun 2 molekyler ATP per molekyl glukose, mens aerob respirasjon til sammenligning skaffer til veie 36-37 molekyler ATP (Foegeding, Lanier, & Hultin, 1996). Derfor vil nivået av ATP i muskelen raskt synke og fisken vil gå inn i *rigor mortis*.

Laktatproduksjonen *post mortem* avhenger av mengden glykogen som er igjen i muskelen ved slakting. Laktatopphopningen bidrar til en senkning i pH-verdien, og hos villfanget atlantisk torsk er det typiske at pH ved slakting ligger i området 7,0-7,5 og faller ned til 6,2-6,5 (Huss, 1983). Hos oppdrettstorsk vil *post mortem* pH gjerne synke til den nedre delen av dette området (Rustad, 1992). Torsk som utsettes for fysisk stress i forkant av slakting, har blitt vist å nå ultimat pH-nivå raskere, i tillegg til at pH like etter slakting er lavere enn hos fisk som ikke har gjennomgått fysisk stressende aktivitet (Kristoffersen et al., 2006). Huss (1983) peker på at det er laktatopphopningen i muskelen som er hovedårsaken til en surere *post-mortem* pH. Imidlertid har senere studier vist at det vel så mye er hydrolysering av ATP og den umiddelbare frigivningen av H<sup>+</sup>-ioner og dannelse av redusert nikotinamide adenin dinukleotid (NADH + H<sup>+</sup>) som er bidrar til dette (Foegeding et. al, 1996; Kristoffersen et. al, 2006 ).

## 1.2. ATP-nedbrytning

Cellulær nedbrytning av ATP (adenosin trifosfat) til hypoxantin (Hx) foregår ved at ATP først defosforyleres til ADP (adenosin difosfat). Deretter defosforyleres ADP til AMP (adenosin monofosfat). AMP deamineres til IMP (inosin monofosfat), som i neste omgang defosforyleres og danner inosin. Til slutt spaltes ribose fra inosin og sluttproduktet er hypoxantin (fig. 1).



**Figur 1:** Nedbrytningen av ATP til hypoxantin. ATP= adenosin trifosfat, ADP=adenosin difosfat, AMP=adenosin monofosfat, IMP=inosin monofosfat, Ino=inosin, Hx=hypoxantin.

Huss (1983) referer til en undersøkelse der ATP og glykogen blir vist å forsvinne fra muskelen hos torsk etter 3-4 dager fersklagret ved 0°C. IMP forsvinner etter ca. 1 uke, mens Hx øker kraftig etter 6 dager (Fraser et al., 1967). Hos trålfanget fisk hevdes denne prosessen å gå raskere, siden denne fangstmetoden utsetter fisken for betydelig stress og aktivitet som fører til en hurtigere forbrenning av glykogendepotene (Huss, 1983). Prosessen der ATP omdannes til hypoxantin har noen kvalitetsrelaterede implikasjoner. Blant annet er IMP satt i sammenheng med den ettertraktede lukten av fersk fisk, mens hypoxantin har skal ha bitter smak (Huss, 1983).

Degraderingsproduktene av ATP har vært brukt som utgangspunkt for å beregne en ferskhetsindeks for fersklagret fisk. K-verdien går i prinsippet ut på å beregne den molare andelen som Hx og inosin utgjør av total mengde ATP + degraderingsprodukter:

$$K - verdi (\%) = \frac{[Hx] + [Ino]}{[ATP] + [AMP] + [ADP] + [IMP] + [Hx] + [Ino]} \times 100$$

Dette er en prosentverdi, og verdien øker ettersom kvaliteten synker (Huss, 1983).

### **1.3. Bakteriell nedbrytning**

Artssammensetning- og lokalisering av bakterier på levende og nyfanget fisk avviker i stor grad fra det man finner på fisken *post-mortem*. Floraen hos levende fisk består hovedsaklig av psykrotrofe gram-negative bakterier. Arter av *Shewanella*, *Pseudomonas* og *Vibrio* er typisk for fisk i tempererte farvann, og disse finnes stort sett på skinn, gjeller og i tarm. Så lenge fisken er levende, vil immunforsvaret hindre bakterier i å etablere seg i muskelen. Når fisken dør, kollapser denne beskyttelsen og bakterier vil kolonisere skjell-lommene. Under lagring vil de vandre videre inn mellom muskelfibrene og inn i muskelen (Gram, 1995). Ved islagring gjelder dette imidlertid kun et fåtall av bakteriearter, og det skjer på de senere stadier av bedervelsesprosessen. I hovedsak vil bakterieaktiviteten forgå på overflaten (Huss, 1983). Bedervet marin fisk utvikler sulfidlukt, og dette skyldes hovedsaklig *Shewanella putrefaciens* (Gram & Huss, 1996), som kan vokse ved 0 °C, dvs. under islagring. Denne bakterien benytter trimetylaminoksid (TMAO) som terminal elektronakseptor, og når denne forbindelsen brytes ned, dannes trimetylamin (TMA). Dannelsen av TMA er hovedårsaken til den spesielle fiskelukten under lagring, og mengden TMA kan benyttes som en kvalitetsindikator for marin hvitfisk. TMA er også hovedbidragsyteren til økningen i mengden totalt flyktig nitrogen (TVN) i islagret ferskfisk (Huss, 1983). Kvalitetsforskrift for fisk og fiskeprodukter av 1996 opererer med en grenseverdi for TVN i tørkede og fullsaltede råvarer på 35 mg / 100 g prøve (Lovdata.no, 1996). For kjølt ferskt råstoff er grenseverdien for TMA satt til 3 mg / 100 g prøve, mens det ikke er utarbeidet noen tilsvarende verdi for TVN. Det er imidlertid hevdet at omregnet fra TMA vil en tilsvarende verdi for TVN være litt under 30 mg / 100 g prøve (Akse et al., 2006).

## 1.4. Formål

Atlantisk torsk (*Gadus morhua* L.) har i all historisk tid vært en essensiell del av norske havfiskerier, og er nå en interessant art i forbindelse med intensiv oppdrett. I et stadig mer kresent marked, er det av kommersiell interesse å kunne begrense de forringende faktorer omkring avlving og lagring fram til produktene ligger klar for salg i fiskedisken.

Det er flere faktorer som kan indikere kvaliteten på matfisk etter slakting, og ved siden av mer kvalitative metoder som sensorikk, er mikrobiell aktivitet er en av dem. Sistnevnte kan imidlertid ikke sies å ha noen effekt før flere dager etter slakting (Huss, 1983), og sier oss lite om hva som skjer kvalitetsmessig i muskelen de første dagene etter slakting, spesielt det første døgnet.

ATP er en energibærer i cellene og post-mortem brytes denne forbindelsen ned til mellomprodukter for til slutt å ende opp som hypoxantin. Konsentrasjonen av disse produktene avtar og stiger sukksesivt gjennom prosessen. IMP (inosinmonofosfat) er satt i sammenheng med god smak av fersk fisk, mens Hx (hypoxantin) bidrar til et gradvist tap av denne (Huynh et. al, 1992). Degraderingsproduktene av ATP benyttes til beregning av K-verdien (andel inosin og hypoxantin av totale ATP-degraderingsprodukter), og denne har vært benyttet som en ferskhetsindikator for fersklagret fisk. Lise Hermansens (2006) masteroppgave viste tydelige forskjeller i K-verdien på prøver tatt først ved slaktetidspunktet og så i butikk 3 dager etterpå. Det ble imidlertid ikke tatt prøver de første timene og døgnet etter slakting.

Hovedfokuset for min oppgave var å se på dynamikken i ATP-nedbrytningen for å klarlegge om K-verdien kan brukes som ferskhetsindikator før mikrobielle faktorer gjør seg gjeldende. Prøvene skulle tas gjennom en fullstendig fersklagringsperiode, fra tidspunkt 0 etter slakting, med særlig vekt på det første døgnet. Dvs. prøveuttak etter 0, 2, 4, 8, 12 og 24 timer, i tillegg til 48 timer og annet hvert døgn fram til og med 10 døgn. I tillegg skulle jeg se på om det er grunn til å si at stresset fisk vil avvike fra en kontrollgruppe med hensyn til degradingen av ATP og dermed også K-verdien.

## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Feltarbeid

Feltdelen av forsøket ble foretatt på sjøanlegget til Havbruksstasjonen i Tromsø den 24. januar 2007.

16 individer av oppdrettstorsk (*Gadus morhua L.*) med en rund snittvekt på  $2,4 \pm 0,6$  kg ble benyttet i forsøket. Kontrollgruppen ble slaktet umiddelbart på merdkanten ved hjelp av slag i hodet med en jernstang og deretter bløgget. De 8 andre individene ble påførst stress før slakting. Stressingen besto i O<sub>2</sub>-sjokk ved å holde fisken i håv over vannkaret i 2-3 minutter, la den hvile i ca. 1 minutt i vannet for deretter å gjenta behandlingen. Stressingsforsøket ble forhåndsgodkjent av Forsøksdyrutvalget etter søknad.

Etter stressing og avliving ved slag mot hodet ble fisken raskt sløyd og deretter skåret opp i 6 skiver. Umiddelbart etter slakting ble én skive fra hvert individ pH-bestemt med et håndholdt WTW 330/Set-1 stikk pH-meter (Wissenschaftliche Werkstätten, Weilheim, Tyskland), og merket. 2 g torskemuskel fra samme skiva ble raskt veid ut og tilsatt 18 ml 0,42M perklorsyre med 0,05 mg/ml allopurinol (AP) som internstandard for HPLC-analysen. Dette ble homogenisert med en Ultra Turrax T25 i 5-6 sekunder, overført til plastflasker og satt på kjølerom fram til bruk. Med unntak av stressingen gjennomgikk kontrollgruppen samme behandling.

Skivene som ikke ble pH-bestemt og homogenisert på stedet, ble pakket i zip-lock poser, nummerert og fersklagret på is i kjølerom. Bestemmelsen av pH og homogeniseringen som ovenfor ble gjentatt på nye skiver 2, 4, 6, 12, 24 timer, og 2, 4, 6, 8 og 10 døgn etter slakting. Prøveuttakene fra 4 timer og utover ble foretatt på laboratorium ved NFH.

Ved hvert prøveuttak (2t, 4t, 6t osv.) ble det brukt 4 paralleller fra 4 ulike individer, de samme 4 i de seks første uttakene, deretter 4 nye i de resterende. Etter uttak av muskelprøver ble den resterende delen av skivene frosset ned for senere analyser av flyktig nitrogen.

## 2.2 Analyse av ATP og dets degraderingsprodukter

### HPLC-metoden

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) er en kromatografisk metode der en væskeprøve pumpes under høyt trykk gjennom en kolonne med finpartikulær stasjonærfase slik at komponentene i prøven separeres. Elueringstidspunktet for komponentene blir registrert av en detektor koblet til en datamaskin som lagrer og bearbeider kromatogrammene og fremstiller dem grafisk og tabellvis.



**Figur 2** HPLC-systemet med Waters 2695 separasjonsenhet og 2996 fotodiodedetektor (Bilde: waters.com).

Til dette forsøket ble det benyttet en Waters 2695 separasjonsenhet med en Waters 2996 fotodiodedetektor (Waters Corporation, MA, USA). Kolonnen var en Supelcosil-LC-18-T (Supelco, PA, USA) reversfase C-18 kolonne som ble operert ved romtemperatur. Som mobilfase ble det benyttet en vandig løsning av 215 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,3 mM tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAHS) og 3,5% acetonitril. Strømhastigheten gjennom kolonnen var på 1,5 ml/min. UV-absorpsjonen ble målt ved 205 nm (Sellevold et al., 1986).

### Ekstraksjon

2 g torskemuskel ble veid ut og tilsatt 18 ml 0,42 M perklorisyre med 0,05 mg/ml allopurinol (AP) som internstandard. Dette ble homogenisert med en Ultra Turrax T25 i 5-6 sek., overført til plastflasker og satt på kjølerom fram til bruk.

Perklorsyreekstraktene ble sentrifugert med en kjølesentrifuge (Sorvall med SS-34 rotor) ved 4 °C i 30 min med  $3000 \times g$ . 15 ml av supernatanten ble overført til plastflasker og pH-justert til 6,5-7,5 med 10 M KOH (evt. korrigeret ned igjen med konsentrert perklorisyre). Prøvene ble satt på kjølerom i ca. 1 time slik at saltet skulle felles skikkelig ut. Deretter ble 2 ml overført til reagensrør og frosset ned til de skulle analyseres.

HPLC-analysen ble utført på seks og seks prøver i slengen. Prøvene ble tint ved romtemperatur. Umiddelbart etter tining ble 200 µl pipettert til Eppendorfrør og sentrifugert med en Eppendorf Centrifuge 5417 R kjølesentrifuge (14000 x g, 4 °C og 1 minutt) for å fjerne eventuelt utfelt materiale fra det nøytraliserte ekstraktet. 100 µl ble overført til HPLC-vials og satt i autoinjektoren til analyse. Injeksjonsvolumet på HPLC-kolonna var 5 µl.

### **Bestemmelse av produktkonsentrasjon og K-verdi**

De ulike produkttoppene ble identifisert ut fra retensjonstid ved å sammenligne med kromatogrammet til en standardmiks tilsatt 250 µg/ml hver av ATP, ADP, AMP, IMP, inosin og hypoxantin.

HPLC-systemet fremstiller komponentene i prøvene grafisk i et kromatogram, der hver topp representerer ett produkt. For hvert prøveuttak ble det brukt fire paralleller. Etter HPLC-analysen ble det beregnet en gjennomsnittsverdi for arealet av hver enkelt produkttopp, og denne ble benyttet i beregningen av produktkonsentrasjonene. Forholdet mellom arealet av disse produkttoppene ( $A_{\text{produkt}}$ ) og arealet av internstandard (A<sub>AP</sub>) i prøven ble benyttet til å beregne konsentrasjonen av de ulike produktene (Hermansen, 2006; Bjarne Landfald, pers. medd.). Utfra standardkromatogrammet ble det beregnet areal-korreksjonsfaktorer ( $k_A$ ) for alle produktene i forhold til internstandard, AP. Med kjent mengde internstandard (250 µg/g muskel) i prøvene og kjente molekylvekter ( $M_w$ ) kunne det bestemmes en molar korreksjonsfaktor,  $k_M$ , for hvert produkt:

$$k_M = \frac{250}{(k_A \times M_w)}$$

Dermed kunne konsentrasjonen av de ulike produktene (µmol/g muskel) beregnes slik:

$$[\text{produkt}] = \left( \frac{A_{\text{produkt}}}{A_{\text{AP}}} \right) \times k_M$$

K-verdien ble bestemt ut fra andel inosin og hypoxantin av total molar mengde ATP + degraderingsprodukter:

$$K - verdi (\%) = \frac{[Hx] + [Ino]}{[ATP] + [AMP] + [ADP] + [IMP] + [Hx] + [Ino]} \times 100$$

## 2.3 Totalt flyktig nitrogen (TVN)

Denne analysen ble utført i henhold til Tectator Application Note AN 68/83. Analysen ble foretatt på prøveuttakene etter 4, 6, 8 og 10 døgn. Grunnen til at den ikke ble foretatt på prøveuttakene forut for 4 døgn var at det erfaringsmessig ikke var noen grunn til å forvente at man vil finne noen målbar økning i løpet av 4 døgn i islagret fisk (Bjarne Landfald, pers. medd.). For uttaket etter 4 døgn ble 7 prøver benyttet, i tillegg til at alle prøver ble analysert i duplikat (totalt 14 prøver). For de resterende prøveuttakene (6, 8 og 10 døgn) ble det gjort analyser på 2 prøver fra hver gruppe, det vil si 2 prøver fra den stressa fisken og 2 fra kontrollgruppa. Også her ble det analysert 2 paralleller (24 prøver totalt). I tillegg ble det kjørt 3 blanke prøver med de samme reagensene, men uten muskelprøve. Som kontroll ble det analysert en TMA-standard (20 mg TMA-N/100 ml).

## Utstyr

En Kjelttec 1002 Distilling Unit ble benyttet for å bestemme mengde totalt flyktig nitrogen i prøvene (figur 3).

## Reagenser

- 0,1% metylrødt indikator
  - o *0,1 g metylrødt ble løst i 100 ml metanol*
- 0,1% bromkreosolgrønt indikator
  - o *0,1 g bromkreosolgrønt ble løst i 100 ml metanol*
- Borsyreløsning
  - o *80 g borsyre ble løst opp i 1500 ml destillert H<sub>2</sub>O i en 2000 ml E-kolbe. Kolben ble varmet opp under omrøringen for at borsyren lettere skulle løse seg i vannet. 20 ml 0,1% bromkreosolgrønt og 14 ml 0,1% metylrødt ble tilsatt. Deretter ble løsningen titrert til omslag til en klar grønnfarge med 38,5 ml 1M NaOH. Til slutt ble det tilsatt destillert H<sub>2</sub>O til 2000 ml merket på kolben.*
- 0,10 M HCl
- Renset parafin
- Magnesiumoksid (MgO)



- 20 mg trimetylammin-N/100 ml løsning
  - o 0,1364 g TMA-HCl ble løst til 100 ml med destillert vann

## Frengangsmåte

De frosne torskeskivene fra hvert prøveuttak ble tint ved romtemperatur. Deretter ble det skåret ut muskelprøver som ble moset med stavmikser.



**Figur 3** Kjeltech 1002 under destillasjonsprosessen. Kjeldalrør (t.v.), og E-kolbe med borsyreløsning (t.h.).

1. 10 g av muskelprøven ble veid inn på et veiepapir (vanlig mellomleggspapir) og overført til et Kjeldahl destillasjonsrør (papiret fulgte også med i røret).
2. 50 ml destillert vann ble tilsatt og parafilm ble satt på røret. Det ble deretter ristet for å blande innholdet.
3. 10 ml av borsyreløsningen ble pipettert over i en 250 ml E-kolbe som ble satt i Kjeltec-enheten (fig. 3).
4. 3 ml rensset parafin og 1 g MgO ble tilsatt Kjeldahl-røret. Røret ble ristet og satt i Kjeltec-enheten.
5. Destilleringen ble kjørt i 6 minutter fra det ble observert bobling i Kjeldalrøret. Destillatet ble deretter titrert med 0,10 M HCl til fargeomslag fra grønt til rosa.
6. Som blindprøve ble veiepapiret og de andre reagensene benyttet.

I tillegg var det nødvendig å kontrollere at denne metoden fikk med seg alt det flyktige nitrogenet i prøven. Dette ble gjort ved å analysere en løsning med kjent nitrogeninnhold gjennom samme prosedyre som nevnt over. 10 ml av TMA standardløsningen (20 mg TMA-N/100 ml) ble destillert istedenfor 10 g muskelprøve.

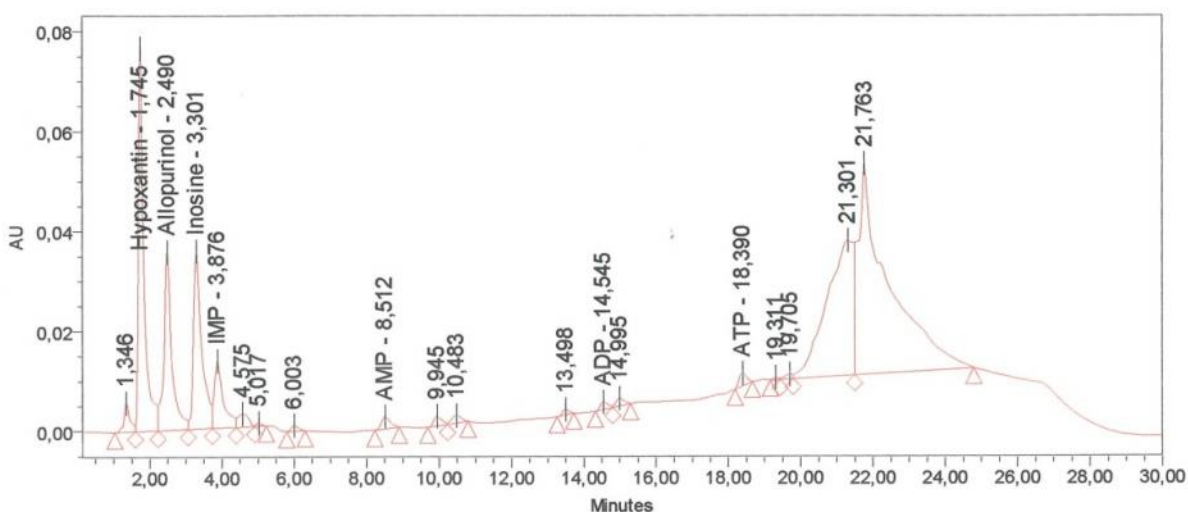


### 3. Resultater

Målsetningen med dette forsøket var å følge noen utvalgte kvalitetsindikatorer, med hovedfokus på ATP-degraderingsprodukter, gjennom en fersklagringsperiode. Gjennom det første døgnet av perioden ble det foretatt hyppige prøver for å klarlegge om stressing av fisken i forkant av slaktning hadde noen målbar effekt i forhold til disse parametrene.

#### 3.1 Degradering av ATP

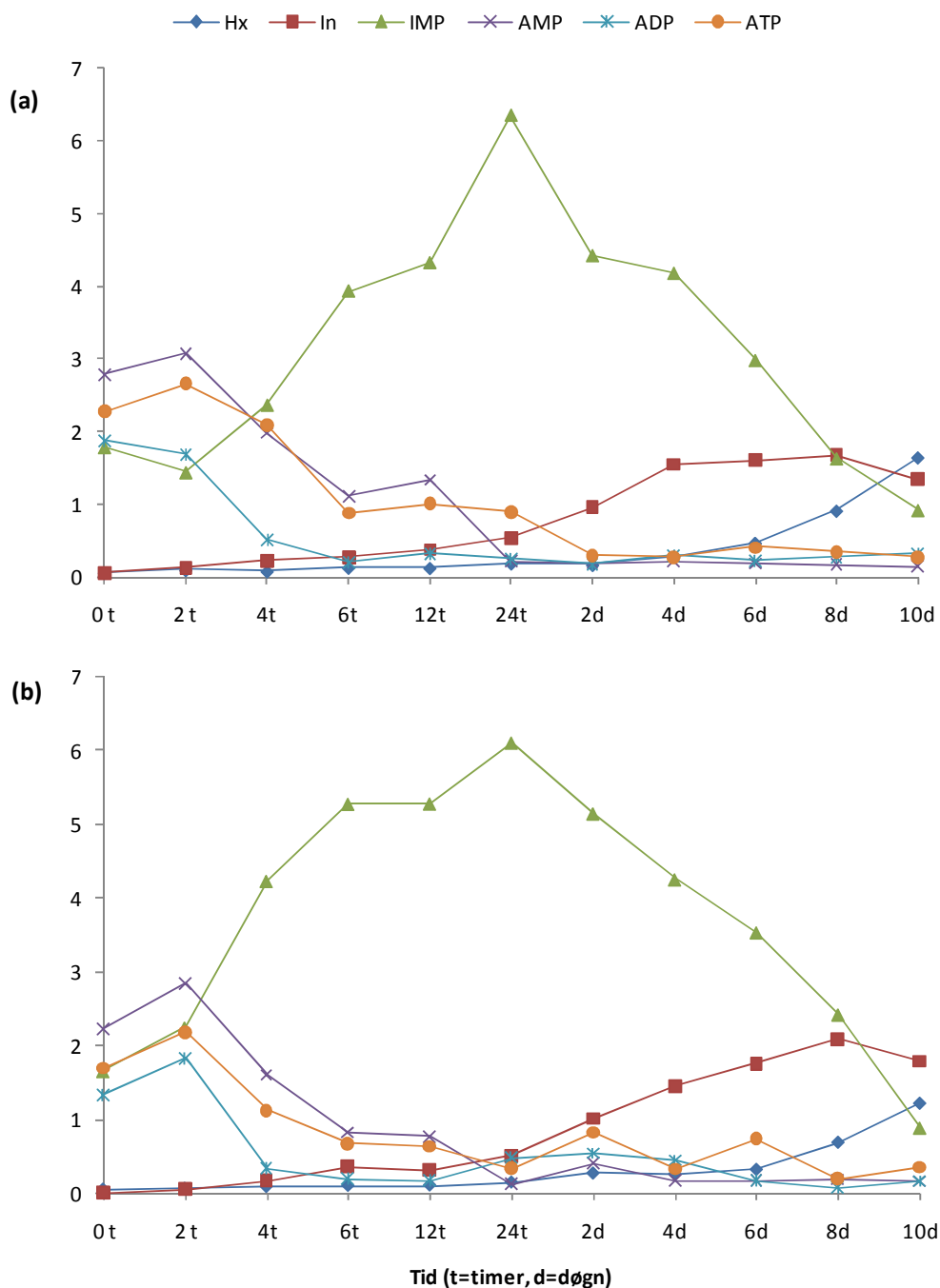
Standardavvikene for dette forsøket viste seg å bli relativt store i forhold til middelverdiene, og i noen tilfeller større enn middelverdien. De som uthever seg mest er verdiene for ATP i stressgruppa etter 6 døgn og 24 timer i kontrollgruppa.



**Figur 4:** Kromatogram av en prøve fra kontrollgruppa etter 10 dagers islagring. Tida oppgitt i minutter er retensjonstida for deteksjon av produktene.

HPLC-analysen av ekstraktene viste relativt god separasjon av ATP og degraderingsproduktene. Figur 4 viser et kromatogram fra seint i lagringsperioden der både hypoxantin og inosin er identifisert og godt separert og har blitt ganske fremtredende, og toppene for ATP, ADP, AMP og IMP har blitt tilsvarende små. Ved de første prøveuttakene som ble foretatt umiddelbart etter slaktning (maks. 5 min.) og etter 2 timer, viste forsøksgruppene relativt jevn fordeling mellom de fire nukleosid-fosfatene ATP, ADP, AMP og IMP. Alle lå i størrelsesområdet 1,3 til 3,1  $\mu\text{mol/g}$  muskel (fig. 5). Kontrollgruppa hadde gjennomgående noe høyere verdier enn stressgruppa, noe som trolig skyldtes individuelle variasjoner siden summen av degraderingsprodukter viste samme tendens (tabell 1). I begge forsøksgruppene hadde AMP høyest konsentrasjon ved disse første prøveuttakene. Mengden

av de ikke-fosforlyerte degraderingsproduktene inosin og hypoxantin lå så langt ned mot null (tabell 1) at de var neglisjerbare. I det samme tidsrommet (0-2 timer) avvek IMP-



**Figur 5:** Degraderingsforløpet hos atlantisk torsk gjennom en 10 dagers fersklagringsperiode for ei kontrollgruppe (a) og ei stressgruppe (b). Merk at grafene viser samtlige prøveuttakstidspunkt med lik avstand, uavhengig av faktisk tidsintervall.

konsentrasjonen i kontrollgruppa fra den stressa fisken ved at den fikk en liten nedgang på

0,35  $\mu\text{mol/g}$  (tabell 1). I stressgruppa fulgte IMP-konsentrasjonen den generelle trenden for nukleosidfosfatene med en liten økning.

**Tabell 1:** Middelerverdier av 3 eller 4 prøver og standardavvik (S.D.) for konsentrasjon av ATP og degraderingsprodukter i en kontrollgruppe (a) og en gruppe med stressa fisk (b). Verdier er oppgitt i  $\mu\text{mol/g}$  muskel. (\*) = totalt [ATP + degraderingsprodukter] for det enkelte prøveuttaket.

(a)

Tid	Hx		In		IMP		AMP		ADP		ATP		(*)Totalt
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD	
0 t	0,05	0,03	0,05	0,06	1,78	1,12	2,78	0,59	1,87	0,68	2,27	0,58	8,80
2 t	0,09	0,02	0,13	0,02	1,43	0,61	3,08	0,30	1,68	0,89	2,66	0,25	9,06
4t	0,07	0,01	0,21	0,01	2,36	1,80	1,98	0,12	0,52	0,59	2,09	0,79	7,23
6t	0,12	0,04	0,26	0,11	3,93	0,84	1,10	0,15	0,20	0,05	0,88	0,20	6,49
12t	0,12	0,05	0,37	0,17	4,32	0,74	1,33	0,25	0,31	0,29	1,00	0,25	7,45
24t	0,18	0,05	0,53	0,22	6,35	1,23	0,21	0,06	0,24	0,21	0,90	1,23	8,41
2d	0,16	0,04	0,95	0,44	4,42	0,77	0,18	0,05	0,17	0,06	0,29	0,16	6,17
4d	0,28	0,05	1,54	0,60	4,17	1,65	0,20	0,04	0,29	0,36	0,27	0,12	6,76
6d	0,46	0,13	1,61	0,33	2,98	0,92	0,18	0,08	0,23	0,09	0,41	0,05	5,85
8d	0,90	0,16	1,68	0,15	1,62	0,75	0,15	0,04	0,28	0,29	0,34	0,15	4,97
10d	1,63	0,10	1,33	0,18	0,91	0,58	0,13	0,04	0,32	0,29	0,27	0,13	4,60

(b)

Tid	Hx		In		IMP		AMP		ADP		ATP		(*)Totalt
	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD	Avg.	SD	
0 t	0,04	0,01	0,00	0,00	1,66	0,61	2,22	0,42	1,33	0,80	1,69	0,38	6,95
2 t	0,06	0,02	0,05	0,06	2,25	0,24	2,85	0,66	1,83	0,25	2,18	0,49	9,21
4t	0,08	0,01	0,18	0,05	4,23	0,23	1,60	0,42	0,34	0,34	1,12	0,33	7,55
6t	0,10	0,02	0,36	0,13	5,28	0,31	0,82	0,41	0,20	0,16	0,67	0,17	7,42
12t	0,10	0,01	0,31	0,07	5,28	0,62	0,77	0,35	0,17	0,05	0,63	0,11	7,27
24t	0,14	0,03	0,51	0,18	6,10	0,57	0,13	0,01	0,48	0,58	0,33	0,23	7,69
2d	0,27	0,20	1,01	0,45	5,14	0,57	0,41	0,54	0,54	0,47	0,82	0,77	8,20
4d	0,25	0,01	1,45	0,24	4,25	0,60	0,17	0,05	0,45	0,41	0,32	0,12	6,90
6d	0,32	0,06	1,75	0,35	3,53	0,75	0,17	0,09	0,17	0,05	0,73	0,85	6,68
8d	0,68	0,25	2,09	0,69	2,42	0,93	0,19	0,03	0,08	0,03	0,19	0,03	5,66
10d	1,21	0,48	1,79	0,44	0,89	0,72	0,16	0,04	0,16	0,04	0,35	0,10	4,57

Utover 2 timers lagring viste nukleosidfosfatene (ATP, ADP, AMP og IMP) mer markante endringer, mens inosin og hypoxantin ennå ikke viste klare tegn til økning. For kontrollgruppa sank ATP og AMP omtrent synkront til rundt 1  $\mu\text{mol/g}$  ved 6 timers lagring. ADP fulgte ATP og AMP parallellforskjøvet med med ca. 1,5  $\mu\text{mol/g}$  hele veien fram til 4 timers-uttaket. Fra 4 timer og utover ble nedgangen mindre markant for ATP, AMP og ADP i begge gruppene og verdiene sank sakte mot null-verdier. En kan av figur 5 se flere fluktasjoner utover lagringstida for de sistnevnte forbindelsene, og 24 timers- og 2 døgnstuttakene for stressgruppa er kun basert på en middelerverdi av 3 stikkprøver da ett individ

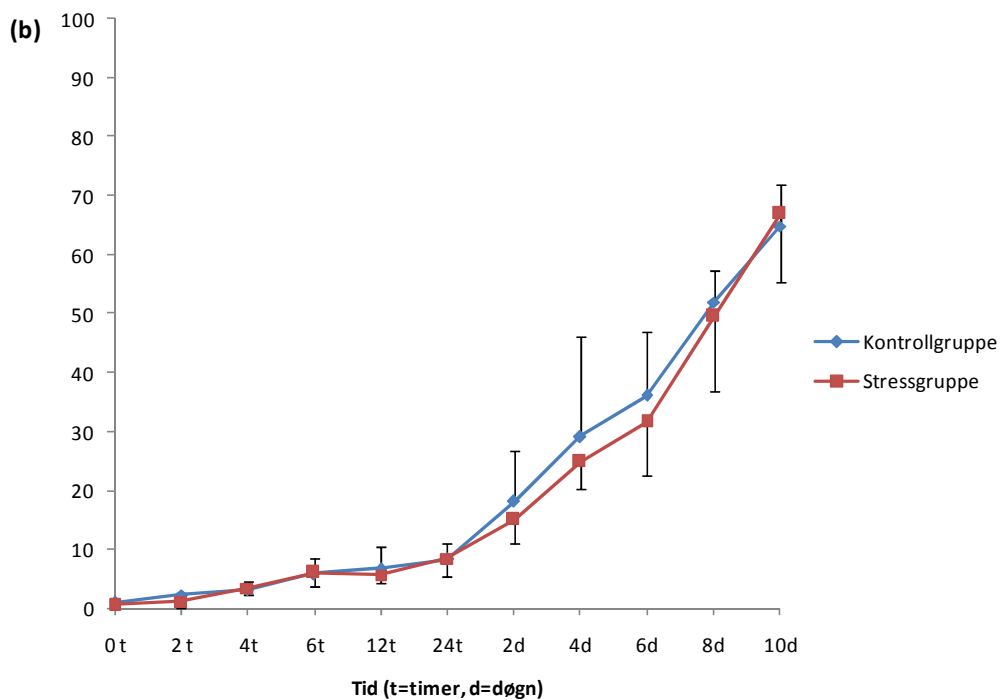
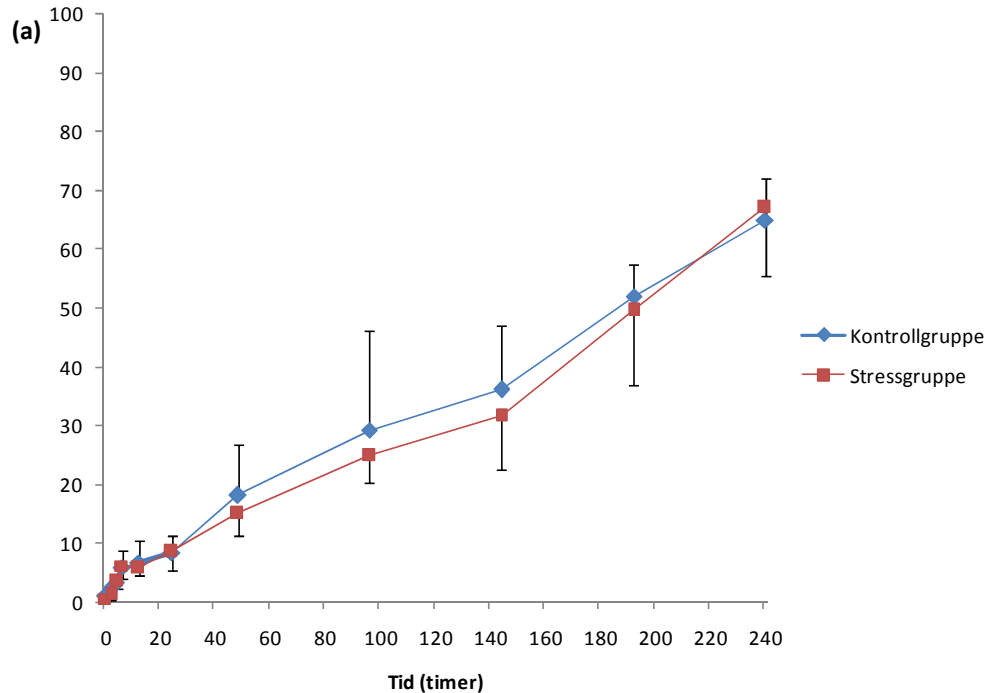
i hvert av disse uttakene ga ekstremverdier for ATP. Disse ble klassifisert som "outliers" og utelatt fra beregningen. Ingen av forbindelsene kunne utifra analysene sies å forsvinne helt fra muskelprøvene i løpet av en 10 dagers lagringsperiode.

IMP hadde hos både kontroll- og stressgruppa en bratt stigning fra 2 timers lagring mot maksimalverdien ved 24 timer på vel 6  $\mu\text{mol/g}$  (fig. 5). Inosin steg jevnt fra de første timene etter slakting og etter 24 timer gikk denne økningen åpenbart på bekostning av IMP, som sank jevnt resten av lagringsperioden. Inosin nådde i kontrollgruppa en maksimalverdi etter 8 døgns lagring på 1,7  $\mu\text{mol/g}$ , mens stressgruppa viste en noe høyere maksverdi med 2,1  $\mu\text{mol/g}$  på samme tidspunkt. Hypoxantin-konsentrasjonen viste liten økning i begge gruppene fram til 6 døgns lagring, og nådde sin maksimalverdi innenfor det siste lagringsdøgnet (10d) med for henholdsvis 1,2 og 1,6  $\mu\text{mol/g}$  for kontroll- og stressgruppa.

Det ble ikke gjennomført noen statistisk analyse for å avdekke eventuelle systematiske forskjeller mellom stresset og ustresset fisk med hensyn til ATP degradering. Figur 5 viser imidlertid at begge gruppene fulgte et likt mønster, og at det etter alt og dømme ikke er grunnlag for å hevde at de observerte små forskjellene skyldtes annet enn tilfeldig individvariasjon.

### 3.2. K-verdi

De beregnede K-verdiene for de to gruppene ved de ulike prøveuttakene er plottet i figur 6 a) og b) med punktvis og linær tidsakse.



**Figur 6:** Utvikling av K-verdien utover i islagringsperioden. (a) viser utviklingen i en linær tidsskala angitt i timer, mens (b) viser utviklingen med lik avstand mellom prøveuttakstidspunktene.

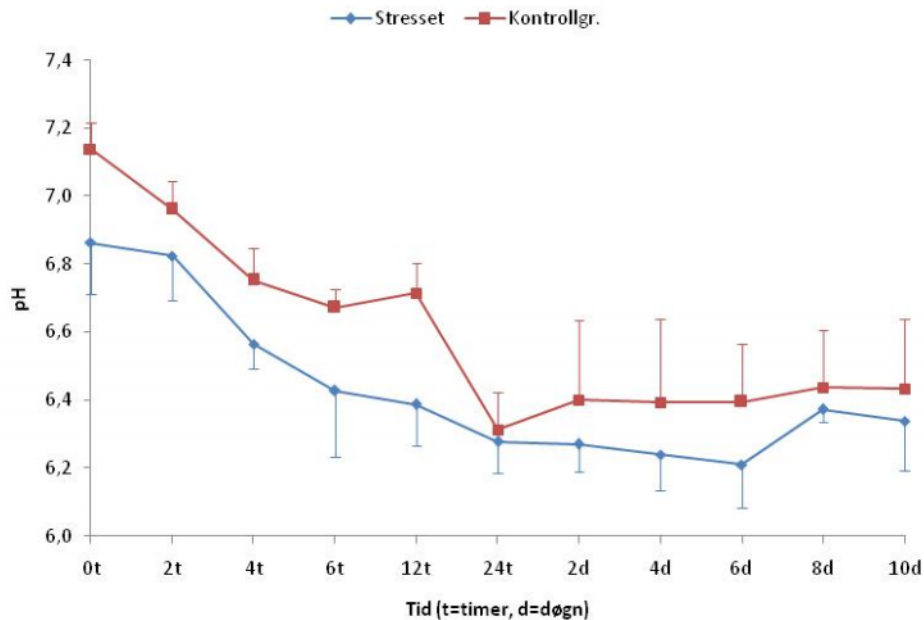
Figur 6 a) viser at økningen i K-verdien foregikk langs en tilnærmet linær kurve fra det aller første prøveuttaket, og når maksimalverdier på 65 og 67 % for henholdsvis kontroll og stressgruppa ble nådd etter 10 døgns islagring.

Det kunne observeres en liten forskjell mellom de to gruppene, men denne var i beste fall marginal, og var på sitt største fra 4 til 6 døgns lagring, da den nådde en maksimalverdi på 4 prosentpoeng. Det er imidlertid også her standardavviket er størst, og forskjellene er etter alt å dømme ikke statistisk signifikante.



### 3.3. pH-måling

Alt ved første uttak ble det demonstrert forskjell mellom kontrollgruppa og stressgruppa. Mens stressgruppa ble funnet å ha en pH umiddelbart *post mortem* på omlag 6,9, lå kontrollgruppa noe høyere med omlag 7,1. Figur 7 viser at denne differansen holdt seg gjennom hele islagringsperioden, og var meget sterkt statistisk fundamentert ( $p < 0,001$  ved 2-



**Figur 7:** Utvikling av *post mortem* pH-verdi i muskel hos atlantisk torsk (*Gadus morhua* L.) ved islagring, med standardavvik mellom 4 prøver for hvert punkt.

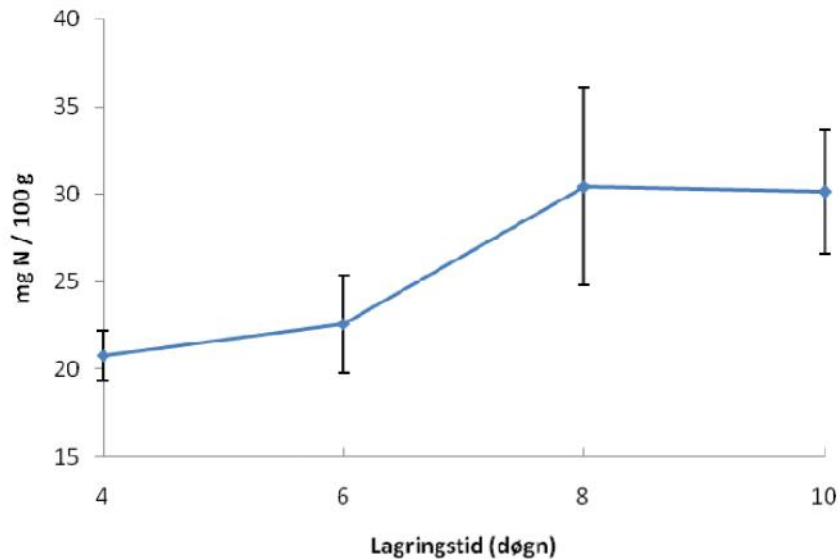
veis variansanalyse).

Stressgruppa nådde sitt nedre pH-nivå på mellom 6,2 og 6,3 etter 1 til 2 døgns islagring, mens kontrollgruppa nådde et noe høyere nedre pH-nivå etter like lang tid på omlag 6,4.

Det første døgnet var standardavvikene relativt lave, mens fra 24 timer og utover økte de, spesielt for kontrollgruppa.

### 3.4. Totalt flyktig nitrogen (TVN)

I denne presentasjonen er det ikke skilt mellom stressgruppe og kontrollgruppe, fordi det ikke var noen holdepunkter for at det var forskjell mellom de to med hensyn til TVN. Det ble benyttet prøver fra begge grupper, og de individuelle målingene viste ingen tendens til gruppeforskjell.



**Figur 8:** Utvikling av TVN i muskel av atlantisk torsk (*Gadus morhua L.*) ved fersklagring på is (0°C).

Figur 8 viser at TVN-analysen for 4 døgns-uttaket ga et relativt høyt nivå på 20,8 mg N/100 g med et standardavvik på  $\pm 1,4$ . Deretter steg middelverdiene med omlag 3 mg N/100 g til dag 6, før stigningen ble brattere og en maksimalverdi ble nådd etter 8 døgn med i overkant av 30 mg N/100 g. Nivået endret seg neglisjerbart fra 8 til 10 døgnsuttaket, men spredningen i disse målingene var stor. Spesielt ved uttaket etter 8 døgn var det en enkeltprøve som dro opp gjennomsnittet betydelig.

## 4. Diskusjon

### 4.3. ATP og dets degraderingsprodukter

HPLC-metoden som ble benyttet til å separere og identifisere ATP og dets degraderingsprodukter, viste seg å ikke være helt uproblematisk. Deteksjonen og identifiseringen av forbindelsene i preklorsyreektraktene var ikke alltid like presis, og spesielt gjaldt dette for de minste toppene. I flere tilfeller var det forbindelser man erfaringsmessig visste skulle være der, men som uten forklarlig grunn ikke ble registrert som topper i det hele tatt. Da måtte jeg gjøre skjønsmessige vurderinger av kromatogrammene for å se om topper med marginalt kortere eller lengre retensjonstider hadde arealverdier i samsvar med de andre parallellene i uttaket. Hvis det kunne sannsynliggjøres at dette var de uregistrerte degraderingsproduktene, ble analysen korrigert (Hanne Mæhre, pers.medd.). Denne usikkerheten problematiserte arealbergingene, og kan derfor gi en delvis forklaring på den tidvis store spredningen (ATP, figur 5b). I tillegg viste de nøytraliserte perklorsyreektraktene seg å være ustabile utover 5 timer i tint tilstand, og med en kjøretid per prøve på 45 min, kunne det derfor bare analyseres 6 prøver i slengen.

Hovedtrenden i resultatene fra denne analysen var i samsvar med tidligere undersøkelser. Konsentrasjonene av adenosinfosfatene (ATP, ADP og AMP) sank hurtig de første timene, samtidig som IMP økte kraftig og ble det dominerende av ATP-degraderingsproduktene. Etter 6 timer begynte også hypoxantin og inosin å øke, men i langt mindre grad. I de aller første uttakene (0 og 2 timer) kunne det observeres en ganske jevn fordeling mellom de fosforylerte forbindelsene (ATP, ADP, AMP og IMP), på tross av at en skulle forvente at ATP dominerer her (Huss, 1983). Spesielt skulle en slik antagelse være naturlig for kontrollgruppa som ikke gjennomgikk noen stressende aktivitet forut for slaktinga. Avvikene fra tidligere studier gikk både på de faktiske konsentrasjonene og på dynamikken i nedbrytinga.

Tidligere undersøkelser av ATP og dets degraderingsprodukter har i hovedsak blitt gjennomført på en dag-til-dag basis, og få om noen, har satt fokus på hvilke endringer som skjer innenfor det første døgnet *post mortem*. I dette forsøket har jeg derfor i tillegg til å følge utviklingen annet hvert døgnet, satt fokus på de første 24 timene. Først og fremst fordi det ville være naturlig å anta at en eventuell effekt av ulik behandling av fisken umiddelbart før slakting ville komme tydeligst frem i løpet av de første timene.

En studie gjort på atlantisk laks (*Salmo salar*) viser at ustresset laks har dobbelt så høyt innhold av ATP i muskelen som stresset. Umiddelbart etter slakting viste den stressede fisken en ATP-konsentrasjon på 10  $\mu\text{mol/g}$  tørrstoff av muskel, mens kontrollgruppa hadde så mye som 21  $\mu\text{mol/g}$  (Erikson et al., 1997).

Figur 5 indikerer liten forskjell mellom stresset og ustresset fisk i dette forsøket. Sistnevnte har et noe høyere nivå av ATP ved slakting, men differansene mellom de to er for små til at det kan konkluderes med at det er forskjell med hensyn til konsentrasjoner og dynamikk i nedbrytningen av ATP.

Den innledningsvis kommenterte usikkerheten knyttet til separasjonen av produktene, manifesterte seg særlig i markante fluktuasjoner i ATP-konsentrasjonen hos stressgruppa fra og med 2 døgns lagring og resten av lagringstida. Dette skjedde på tross av at de oppgitte middelveidene i perioden er bestemt ved gjentatt prøvetaking fra det samme utvalget av fisk. I tillegg kunne det observeres en økning i ATP-konsentrasjonen mellom de to tidligste uttakene både hos stressgruppa og kontrollgruppa. En slik uventet og usannsynlig utvikling kan vanskelig forklares med noe annet en tilfeldige variasjoner i analysen, siden det også her dreide seg om det samme utvalget av fisk.

Generelt for de to undersøkte gruppene av torsk, kan man si at konsentrasjonene av ATP og dets degraderingsprodukter avvok noe fra tidligere undersøkelser. Cappeln et al. (2002) bestemte en ATP-konsentrasjon i løpet av den første dagen etter slakting til  $4,8 \pm 0,1 \mu\text{mol/g}$  muskel i torsk. Fraser et al. (1967) fant at ATP-konsentrasjonen på dag 0 *post mortem* for uthvilt torskemuskel lå på  $5,9 \mu\text{mol/g}$  muskel og at den deretter falt til 0 mot dag 3. Til sammenligning fant jeg verdier på  $1,7 \pm 0,4$  og  $2,3 \pm 0,6 \mu\text{mol/g}$  muskel for henholdsvis stress- og kontrollgruppa ved det første, umiddelbare uttaket. Konsentrasjonene nådde ikke nivåer ned mot 0 før etter 8 døgns lagring, da begge gruppene viste en konsentrasjon på  $0,3 \pm 0,1 \mu\text{mol/g}$  muskel. Hermansen (2006) fant ATP-konsentrasjoner på  $0,4 \mu\text{mol/g}$  muskel den første dagen *post mortem*, ved en analyse av torskemuskel frosset inn mellom 6 og 12 timer etter slakting. Denne verdien er dermed i den andre enden av skalaen sammenlignet med mine funn. Den lange tiden det tok før ATP syntes å forsvinne, kan i stor grad tilskrives tilfeldige individvariasjoner, da flertallet av prøvene viste en mer forventet utvikling. Enkeltpøver med høye verdier dro opp både middelveidier og standardavvik kraftig.

Også når man sammenligner mine ADP-resultater med Fraser et al. (1967), avdekkes det forskjeller. Der sistnevnte fant 0,9  $\mu\text{mol/g}$  muskel slaktedagen, fant jeg på tilsvarende tidspunkt 1,9 (kontroll) og 1,3  $\mu\text{mol/g}$  muskel (stresset). Standardavviket var imidlertid høyt, spesielt for stressgruppa, som hadde S.D. på  $\pm 0,8$ . I tillegg er det uklart hvor lang tid etter slakting Fraser et al. gjorde sine målinger. Hos Hermansen (2006) ser man at ADP-konsentrasjonen i en prøve tatt 6 til 12 timer etter slakting ligger på 0,9  $\mu\text{mol/g}$  muskel, altså også lavere enn mine verdier.

Konsentrasjonen av AMP var høyere enn av ATP og de andre degraderingsproduktene i de to første uttakene. Etter 24 timer var den imidlertid nede på et nivå rundt 0,2  $\mu\text{mol/g}$  muskel, og dette vedvarte resten av lagringsperioden. Unntaket er en liten topp der den plutselig stiger til 0,4  $\mu\text{mol/g}$  muskel hos stressgruppa. Dette kan igjen forklares med høyt standardavvik, og enkeltprøver som drar opp middelveidien. Hermansen (2006) fant ikke AMP i det hele tatt i sine prøver.

IMP-konsentrasjonen, nådde i begge grupper høyere nivåer (6,4 (K) og 6,1  $\mu\text{mol/g}$  muskel (S)) enn hos Fraser et al. (1967) som fant konsentrasjoner på 5  $\mu\text{mol/g}$ . Hermansen (2006) målte verdier på hele 9  $\mu\text{mol/g}$  muskel. I mine målinger var IMP-konsentrasjonene på nivå med de andre fosforylerte forbindelsene allerede ved første prøveuttak, og maksimalverdien ble nådd innen 24 timer. Hermansen (2006) målte også klart høyere verdier i dagfersk fisk enn i prøver av fisk som hadde ligget noen dager på is. Öso ul og Öso ul (2002) gjorde en studie på regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) der IMP-konsentrasjonen hadde en 0-verdi på 12  $\mu\text{mol/g}$  muskel, mot mine 1,8 (K) og 1,7  $\mu\text{mol/g}$  muskel når ekstraksjonen ble gjort få minutter etter slakting. Selv om noe av den store forskjellen kan skyldes artsvariasjoner, så er det usannsynlig at de skulle være av slik størrelsesorden. Hos laks ser stressing igjen ut til å ha større effekt. Merkbart høyere IMP-innhold i muskelen er vist av Erikson et al. (1997) umiddelbart etter avliving, med 8  $\mu\text{mol/g}$  muskel tørrstoff for stresset fisk mens den ustressede ligger helt nede på 2  $\mu\text{mol/g}$ . Utover lagringstida minket forskjellen, og etter 7 dager nådde begge gruppene rundt 20  $\mu\text{mol/g}$  muskel tørrstoff. Etter dette sank nivået igjen fram til 13 dager til 12  $\mu\text{mol/g}$  for begge.

Inosin-konsentrasjonen er derimot høyere hos Fraser et al. (1967), og når 4,5  $\mu\text{mol/g}$  muskel mens mine verdier kulminerte på  $1,8 \pm 0,4$  (S) og  $1,3 \pm 0,2$   $\mu\text{mol/g}$  muskel (K) for kontrollgruppa etter 8 døgn. Også Hermansen (2006) fant høyere inosin-verdier, det vil si i

underkant 10  $\mu\text{mol/g}$  i prøver frosset inn mindre enn 12 timer etter slakting og vel 3,5  $\mu\text{mol/g}$  i butikkprøve av akseptabel sensorisk og mikrobiologisk kvalitet. Hos Erikson et al. (1997) steg inosin-konsentrasjonene fra 9 og 13  $\mu\text{mol/g}$  tørket muskel av laks for henholdsvis kontrollgruppe og stressgruppe, fra 7 til 13 dager.

Maksimalverdien for hypoxantin kom, som forventet, det siste lagringsdøgnet, og nådde henholdsvis  $1,2 \pm 0,5$  og  $1,6 \pm 0,1$   $\mu\text{mol/g}$  muskel. Hos Fraser et al. (1967) når hypoxantin sin maksimalverdi etter 11 dagers islagring med 5,5  $\mu\text{mol/g}$ , mens verdien etter 9 dagers lagring er på samme nivå (1,5  $\mu\text{mol/g}$ ) som jeg fant etter 10 døgn. Det er sannsynlig at en forlenging av forsøket hadde resultert i en vesentlig høyere maksimalverdi, siden kurvene for hypoxantin i figur 5 viser en tilnærmet eksponentiell økning i denne fasen. Hypoxantin hos Erikson et al. (1997) vist små forskjeller mellom stresset og ikke stresset. Konsentrasjonen for denne forbindelsen lå for begge gruppene på 2 til 3  $\mu\text{mol/g}$  tørket muskel etter 7 dager, og etter 13 dager steg de til 8 og 9  $\mu\text{mol/g}$  muskel.

#### **4.4. K-verdi**

Ut fra dette er arbeidet er det ikke grunnlag for å hevde at det er forskjeller mellom stresset og ikke-stresset torsk når det gjelder utviklingen av K-verdien. En undersøkelse gjort på laks (*Salmo salar*), viser noen grad av forskjell mellom stresset og ustresset fisk (Erikson et al., 1997). Imidlertid var denne forskjellen mest fremtrende tidlig i lagringsperioden (2 dager), med 29 % for kontrollgruppa og 39 % for stressgruppa. Etter det ble den ble mindre markant. Forskjellen mellom beregnet K-verdi i stresset og ustresset torsk i min studie var svært liten, om ikke ikke-eksisterende. Fremstillingen i figur 6 viser at det var en viss forskjell i middelveidene fra 1 til 9 døgns lagring, men i det samme tidsrommet var også standardavvikene såpass store for begge gruppene at man etter alt å dømme ikke kan konkludere med at det var noen signifikant forskjell mellom stresset og ustresset torsk. K-verdi kurven hos Erikson et al. (1997) avviker også fra den jeg har funnet for torsk ved at den ikke har en like linær utvikling, men var brattest inntil 2 dagers lagring, før både den stressede fisken og kontrollgruppa flater ut.

De beregnede for K-verdiene viste tydelig økning utover i lagringsperioden. Siden denne studien omfattet hyppig prøvetaking det første døgnet, gikk det klart fram (figur 6) at økningen var godt igang allerede innen dette tidsintervallet ved at det fant sted en liten

akkumulering av inosin. Innen 12 timer etter slakting hadde verdien økt fra 1 til 7% for kontrollgruppa og 6 % for stressgruppa og ved 24 timer var prosentene henholdsvis 8 % (K) og 9 % (S). Hermansen (2006) fant lignende verdier for oppdrettstorsk som var frosset inn på slaktedagen (7 %).

Det er på bakgrunn av dette klart at det skjer endringer i K-verdien umiddelbart etter slakting. Imidlertid blir spørsmålet om dette har noen praktisk verdi, ettersom verdiene som nåes i denne perioden er såpass små at det kan diskuteres om de har noen betydning for kvaliteten på kjøttet. Først utover fra 24 timers lagring kan en se en økning av noen betydning.

#### **4.5. pH-målinger**

Målingene av pH-verdier for stresset og ustresset torsk viste en viss grad av forskjell. Den stressede fisken hadde en verdi umiddelbart etter slakting på  $6,9 \pm 0,2$  (S.D.) mens den den ustressede hadde en verdi som på samme tidspunkt var på  $7,1 \pm 0,1$  (S.D.). At det var forskjell mellom de to gruppene i den initielle fasen var forventet, i og med at forbrukt ATP i forbindelse med stressinga skulle tilsi en lavere pH ved slaktetidspunktet. Forskjellen er imidlertid ikke så høy som observert tidligere: Kristoffersen et al. (2006) fant en pH på ca. 7,9 for ei ustressa kontrollgruppe av oppdrettstorsk, mens Huss (1983) oppgir en pH ved slakting på mellom 7,0 og 7,2. Det kan ikke pekes på noen umiddelbar årsak til et slikt avvik. Én mulighet kan være manglende teknisk kompetanse på måleutstyret som ble benyttet.

I motsetning til Kristoffersen et al. (2006)s studie, der stressgruppa og kontrollgruppa stabiliserer seg på et likt nivå innen 15 timer *post mortem*, så vi her at forskjellen ble opprettholdt gjennom resten av lagringsperioden (figur 6). Det kan vanskelig pekes på biokjemiske forhold som skulle tilsi lavere pH i stresset fisk. Snarere har enkelte studier vist en svak tendens til høyere ultimate nedre pH i stresset fisk (Ragnar L. Olsen, pers. medd.).

Kontrollgruppa stabiliserte seg på pH 6,4, som er høyere enn det som tradisjonelt har vært målt i fôret torsk (Kristoffersen et al., 2006) mens den stressa fisken sank til et nivå som er mer karakteristisk for denne typen råstoff, det vil si ca. 6,3 (Huss 1983, Kristoffersen et al. 2006; Landfald, 1991).

## 4.6. TVN

TVN-målingene ga uventede resultater. Etter 4 døgns lagring ga de en middelvei på 21 mg N/100 g muskel. Dette er ca. 2 ganger mer en det man tradisjonelt finner i prøver med ubetydelig mikrobiell kvalitetsforringelse (Huss & Asenjo, 1976). Huss & Asenjo (1976) fant TVN-verdier i filet av urensset atlantisk torsk på 10 mg N/100 g etter 2 dagers islagring. Etter 5 dager steg verdiene til 14 mg N/100 g. I en annen undersøkelse gjort ved FN-universitetet i Reykjavik (Banja, 2002), ble TVN for torsk lagret på is ved 0 °C målt til 14 mg /100 g muskel ved dag 1. Disse verdiene er litt nærmere funnene illustrert i figur 8. Gram (1995) fant 15 mg N / 100 g i filet hos torsk lagret på is 2 dager. Disse verdiene økte til deretter til 17 og 20 mg N / 100 g etter henholdsvis 5 og 7 dager, men ligger fremdeles noe lavere enn i mine analyser.

Etter 4 døgns lagring på is kan det forventes en ubetydelig økning av TVN fra bakgrunnsverdien i helt ferskt råstoff på grunn av bakteriell reduksjon av TMAO til TMA. Antall degraderingsbakterier på fisken er fremdeles for lavt i denne fasen til å forklare det TVN-nivået som ble påvist i dette arbeidet. Det var heller ingenting ved lukt eller slimdannelse på overflater som indikerte kraftig bakterievekst etter 4 døgn. De mest nærliggende feilkildene å tenke på, som avdamping under homogenisering og innblanding av lut eller ufullstendig ekstraksjon, må antas å gi lavere verdier. Feil styrke på titreringsløsningen eller ved selve titeratoren er også tenkelig, men slike feil ville blitt avdekket av I kontrollanalysen som ga en verdi på 19,5 mg N / 100 ml fra en utveid mengde på 20 mg / 100 ml TMA-N. Metoden fikk med seg 98 % av det flyktige nitrogenet i kontrollprøven. Graden av presisjon i metoden skulle altså være god nok. En annen mulighet er at de observerte avvikene fra andre undersøkelser kanskje kan relateres til metoden jeg benyttet. Bestemmelse av TVN ved hjelp av en destillasjonsprosess innebærer at prøvene kokes og det kan derfor være at ekstraksjonen har vært for røff, slik at flyktig N kan ha blitt frigjort ved degradering av aminosyrer og nukleotider. Jeg fant imidlertid én annen undersøkelse som kom fram til verdier på samme nivå som meg. Connell (1975) fant 19 mg N/100 g alt den første dagen hos islagret torsk. Etter den første dagen økte verdien for TVN til 23 mg N/100 g. Disse tallene er imidlertid bare referert i Huss (1983) og det er uklart hvilken metode som ble benyttet. Det ser altså ut til at det eksisterer en betydelig spredning i de målte nivåene av TVN i helt ferskt råstoff mellom ulike undersøkelser.



## 5. Konklusjon

- De høye verdiene som kom fram i TVN-analysen, gjør at man i etterpåklokskapens lys kan si at man burde tatt med prøver fra tidligere uttak.
- Mye som tyder på at K-verdien egner seg som en tidlig ferskhetssindikator i en islagringsperiode.
- Den tidligste fasen av islagringen (0-24 timer) er gjenstand for betydelige endringer i K-verdien i muskelen hos atlantisk torsk. Den lineære og jevnt stigende kurven til K-verdien bygger oppunder dette .
- Også nedbrytningsdynamikken i ATP gjennomgår endringer i den samme fasen.
- De små forskjellene observert mellom stressgruppa og kontrollgruppa i denne undersøkelsen gir lite statistisk hold for å hevde at stressing av fisken umiddelbart før slakting har særlig effekt på nedbrytningsdynamikken til ATP, og på K-verdien hos atlantisk torsk.
- Det er mulig at metoden som ble benyttet for å stresse fisken ikke har optimal effekt på torsk, siden andre studier har vist tildels store initielle forskjeller i f.eks. pH utvikling etter stressing av torsk med andre metoder.



## 6. Litteraturliste

- Akse, L., Tobiassen, T., Bjørkevoll, I., Eilertsen, G., & Joensen, S. (2006). Superkjølte torskeloins II - holdbarhet. Fiskeriforskning, Tromsø.
- Banja, B. A. (2002). Shelf life trial on cod (*Gadus morhua L.*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus L.*) stored on ice around 0 °C. The United Nations University, Reykjavik.
- Campbell, M. K., & Farrell, S. O. (2003). Biochemistry. Thomson, Brooks/Cole.
- Cappeln, G., & Jessen, F. (2002). ATP, IMP and glycogen in cod muscle at onset and during development of rigor mortis depend on the sampling location. *Journal of Food Science* 67, 991-995.
- Connell, J. J. (1975). Control of Fish Quality. Fishing News Ltd., London.
- Erikson, U., Beyer, A., & Sigholt, T. (1997). Muscle high-energy phosphates and stress affect K-values during ice storage of atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science* 62, 43-47.
- Foegeding, E. A., Lanier, T., & Hultin, H. (1996). Characteristics of edible muscle tissues. I: O. Fennema (red.), *Food Chemistry*. Marcel Dekker, Inc, New York, s. 879-942.
- Fraser, D. J., Dingle, J. R., Hines, J. A., Nowlan, S. C., & Dyer, J. (1967). Nucleotide degradation, monitored by thin-layer chromatography and associated post mortem changes in relaxed cod muscle. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 24, 18-37.
- Gill, T. A. (1990). Objective analysis of seafood quality. *Food Reviews International* 6, 681-714.
- Gill, T. A (1995). Autolytic changes. (H. H. Huss, red.) Quality and quality changes in fresh fish. Fisheries Technical Paper no. 348 , UN Food and Agriculture Organisation, Roma, s. 14-24.
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121-137.
- Gram, T. (1995). Bacteriological Changes. (H. H. Huss, Red.) Quality and quality changes in fresh fish. Fisheries Technical Paper no. 348 , UN Food and Agriculture Organisation, Roma, s. 5-13.
- Hattula, T. (1997) Adenosine triphosphate breakdown products as a freshness indicator of some fish species and fish products. Technical Research Center of Finland, Helsinki.
- Hermansen, L. (2006). Kvalitetsforringelse av ferskfisk i innenlands distribusjon og omsetning. Masteroppgave, Norges fiskerhøgskole, Universitetet i Tromsø, Tromsø.
- Huss, H. H. (1983). Fersk fisk - Kvalitet og holdbarhed. Fiskeriministeriets Forsøgslaboratorium, Lyngby.

- Huss, H. H., & Asenjo, I. (1976). Storage life of gutted and ungutted white fish. Annual Report, Technological Laboratory, Danish Ministry of Fisheries, Lyngby.
- Huynh, M. D., Mackey, R., & Gawley, R. (1992). Freshness assessment of Pacific fish species using K-value. I: (E. G. Bligh, red.), *Seafood Science and Technology* s. 258-268. , Fishing News Ltd., Oxford
- Kristoffersen, S., Tobiassen, T., Steinsund, V., & Olsen, R. L. (2006). Slaughter stress, post-mortem muscle pH and rigor development in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *International Journal of Food Science and Technology* 41, 861-864.
- Landfald, B. *Oppføring av torsk: tilvekst og kvalitet. Rapport nr. 1 fra pilotprosjekt, Myre.* Fiskeriforskning, Tromsø.
- Lovdata.no. (1996). *Kvalitetsforskrift om fisk og fiskevarer.* Hentet juni 3, 2007 fra Lovdata: <http://www.lovdata.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-19960614-0667.html>
- Rustad, T. (1992). Muscle chemistry and quality of wild and farmed cod. [Bok] *Quality Assurance in the Fish Industry* , 19-27.
- Ryder, J. M. (1985). Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products. *Journal of Food and Agricultural Chemistry* 33, 678-680.
- Sellevoid, O. F., Jynge, P., & Aarstad, K. (1986). High performance liquid chromatography: a rapid isocratic method for determination of creatine compounds and adenine nucleotides in myocardial tissue. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 18, 517-527.
- so ul, Y., & so ul, F. (2002). Degradation products of adenine nucleotide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored in ice and in modified atmosphere packaging. *Turkish Journal of Zoology* 26, 127-130.