



UIT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Norges fiskerihøgskole – Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

Måling av pH i *pre-rigor* fiskemuskel - en analytisk utfordring

—
Vetle Skjold

Masteroppgave i Fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp)

November 2017



Måling av pH i *pre-rigor* fiskemuskel

- en analytisk utfordring

Vetle Skjold

Masteroppgave i Fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp)

Norges fiskerihøgskole
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi
Norges arktiske universitet



Tromsø, november 2017



Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Norges fiskerihøgskole (NFH). Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE) ved Universitetet i Tromsø (UiT). Den markerer slutten av en spennende og utfordrende femårig utdanning i fiskeri- og havbruksvitenskap.

Tusen takk til professor Ragnar L. Olsen for eksepsjonell veiledning, støtte og hjelp. Med sin enorme kunnskap, gode tålmodighet og ikke minst sin evne til å formidle fagstoff på en forståelig måte til en enkel bergenser.

I tillegg vil jeg takke stipendiat Lars Dalheim for god hjelp til både forsøkene på havbruksstasjonen og alle spørsmålene på lab. Og ikke minst kullet 2012 i fiskeri- og havbruks vitenskap, for fem uforglemmelige år med mye god stemning, både på og utenfor universitetet. Takk til Trygve Johansen ved siden av meg på masterkontoret for jevnlig avbrytelser og makrell i tomat-lunsjer.

Jeg vil også takke hunden min Stein, mine foreldre og søsken for moralsk og økonomisk støtte gjennom studietiden. Og ikke minst for å passe Stein mens jeg satt og skrev i innspurten.

Og sist, men ikke minst, vil jeg takke Gud for å ha gjort meg til en Ateist.

Tromsø, 15. November 2017

Vetle Skjold

Sammendrag

I *post mortem* fiskemuskel kan måling av muskel-pH benyttes som en enkel metode for å vurdere både slakteprosedyre og kvaliteten på muskelkjøttet. Dette ettersom pH kan påvirke egenskaper som filetspalting, tekstur, fasthet, drypptap og farge. I de fleste studier er muskel-pH enten bestemt ved å måle direkte i intakt muskel med stikkelektrode, alternativet er å homogenisere muskel i en vannbasert væske før måling. Da sistnevnte metode ble utviklet var det vanlig å tilsette natriumiodoacetat i løsningen for å blokkere glykolysen. Det ble gjort fordi hastigheten på glykolysen akselererer kraftig når muskelen males opp, som igjen fører til reduksjon i pH. Tilsetningen av enzymhemmer er viktigst ved undersøkelse av fiskemuskel *pre-rigor* ettersom det i *post-rigor* muskel er lite eller ingen metabolsk aktivitet. I flere nyere publikasjoner hvor det har vært undersøkt pH i *pre-rigor* fiskemuskel, har ikke denne enzymhemmeren vært tilsatt. Dette har sannsynligvis ført til rapportering av for lave pH-verdier i fiskemuskel i *pre-rigor*.

Målet med oppgaven var å undersøke hvordan pH i *post mortem* fiskemuskel i *pre-rigor-fase* utviklet seg ved homogenisering av muskel med og uten tilsetning av enzymhemmer. Som kontroll ble muskel-pH målt med stikkelektrode i muskelen.

Resultatene viser at ved tid 0 er pH allerede redusert fra 0,2-0,3 enheter i homogenatene både med og uten natriumiodoacetat. Dette indikerer at allerede i oppmalingsøyeblikket, før enzymhemmeren har fått virke, så har pH-reduksjonen startet. I fiskemuskel oppmalt uten tilsatt enzymhemmer reduseres pH raskt den første timen etter homogenisering, deretter stabiliserer den seg. I kontrast til pH i muskel homogenisert i tilstedeværelse av natriumiodoacetat, hvor pH holder seg stabil fra tid 0 og gjennom lagringsperioden på 48 timer. "Endelig" muskel-pH i homogenat tilsatt kun 0,15 M KCl er mye høyere enn hva man får ved å bruke stikkelektrode. Hovedkonklusjonen ble at homogenisering av muskel er lite egnet for måling av pH i *pre-rigor* muskel. Bruk av stikkelektrode som skader vevet minst mulig anbefales.

Summary

In *post mortem* fish muscle, measuring muscle pH can be used as a method for assessing both the slaughter procedure and the quality of the fish meat. This is because pH affects properties such as fillet gaping, texture, firmness, drip loss and colour. In most publications the muscle pH has been measured either by inserting an electrode directly into the muscle. Alternatively homogenizing the muscle in water based liquid, before determining the pH in the suspension. When the latter method was developed, sodium iodoacetate was added to the solution to inhibit glycolysis. Since the rate of glycolysis accelerates when the muscle is minced, there is a rapid decrease of pH. The addition of this enzyme inhibitor is crucial in the study of *pre-rigor* fish muscle. This is not necessary in the *post-rigor* phase since there is no metabolic activity. In recent studies of pH in *pre-rigor* fish muscle using this method, enzyme inhibitor has not been added. This has probably led to reporting too low pH values in the *pre-rigor* phase.

The main objective of this thesis was to investigate the development of pH in the *pre-rigor* phase of *post mortem* fish muscle with and without the addition of enzyme inhibitors. As a control, the muscle pH was measured in the intact muscle by using electrode.

The results show that at time 0 the pH has already reduced with 0.2-0.3 pH-units in the homogenates both with and without sodium iodoacetate. This indicates that at the time of mincing, before the enzyme inhibitor has affected the enzymes, the pH reduction has started. In fish muscle minced without added enzyme inhibitor, the pH is rapidly reduced during the first hour after homogenization, and then stabilizes. In contrast to the pH of the muscle homogenized in the presence of sodium iodoacetate, where the pH remains stable from time 0 and throughout the 48-hour storage period. "Ultimate" muscle pH in homogenate only added 0.15 M KCl is much higher than using the electrode directly in intact muscle. The main conclusion was that homogenization of the muscle is an unsuitable method for measuring the pH in *pre-rigor* muscle. Use of stick electrode directly in the muscle is recommended as it does not compromise the tissue in the same way.

Forkortelser

AA – Aminosyre

Acetyl CoA – Acetyl coenzym A

ADP – Adenosin difosfat

ATP – Adenosin trifosfat

ECM – Extracellulær matrix

FADH – Flavin adenin dinucleotid

GDP – Guanosin difosfat

GTP – Guanosin trifosfat

KCl – Kaliumklorid

MMP – Matrix metalloproteinase

NADH – Nikotinamid adenin dinucleotid

Na₂EDTA – Ethylenediaminetetra-acetic acid disodium salt

PM – *Post mortem*

P_i – inorganisk fosfat

TMA – Trimetylamin

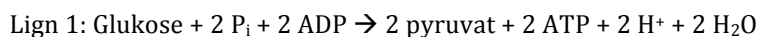
TMAO – Trimetylaminoksid

Innhold

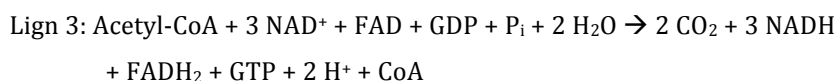
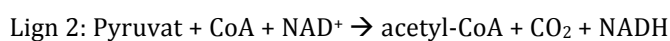
1 Introduksjon	13
2 Bakgrunn.....	17
2.1 Muskelkontraksjon og dødsstivhet.....	17
2.2 <i>Post mortem</i> glykolyse og pH-utvikling	19
2.3 Enzymatisk nedbryting	23
3 Materialer og metoder.....	25
3.1 Kjemikalier	25
3.2 Råstoff og slaktemetode	25
3.3 Måling av pH	25
3.4 Laktatmåling i muskel	27
4 Resultater.....	28
4.1 Muskel-pH <i>post mortem</i> i laks	28
4.2 Muskel-pH <i>post mortem</i> i torsk.....	30
4.3 Effekt av oppmalingsgrad på pH i laksemuskel	32
4.4 Effekt av oppmalingsgrad på pH i torskemuskel.....	33
4.5 Effekt av ulike konsentrasjoner natriumiodoacetate på pH i homogenisert laksemuskel.....	35
4.6 Effekt av Na ₂ EDTA på pH i homogenisert laksemuskel	36
4.7 Muskel-pH i <i>post-rigor</i> laksemuskel	38
4.8 Måling av laktatnivå i muskel.....	39
5 Diskusjon.....	40
6 Konklusjon.....	43
Referanseliste	44

1 Introduksjon

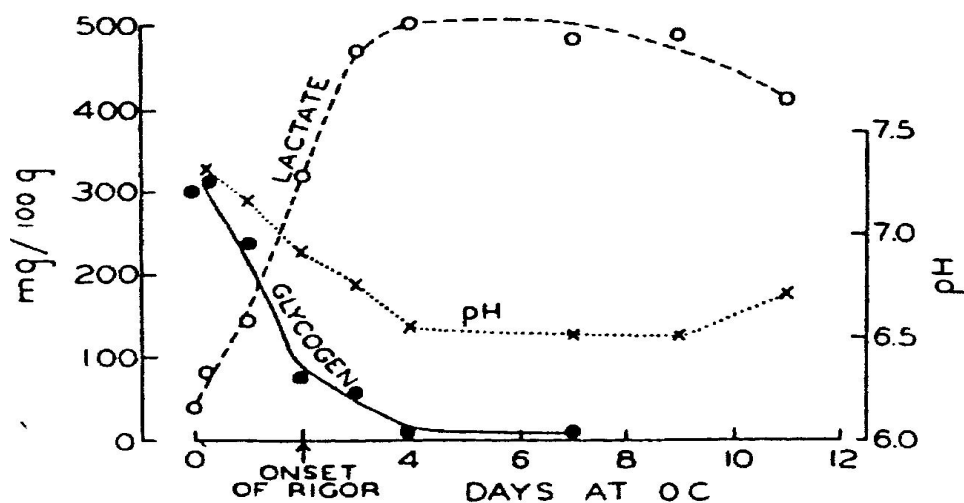
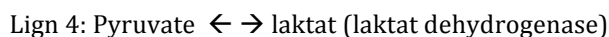
Glukose dannes fra glykogen i vev, for eksempel muskel, deretter brytes det ned anaerobt i glykolysen til pyruvat (Lign 1).



Omdannelsen av pyruvat til acetyl-CoA (lign 2) er et bindeledd mellom glykolysen og sitronsyresyklusen. Acetyl-CoA går inn i sitronsyresyklusen og her dannes det reduserte kofaktorer; NADH + FADH₂ (lign 3).

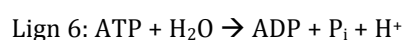


Kofaktorene oksideres igjen ved at oksygen tar opp elektronene i elektrontransportkjeden. Samtidig skjer det en oksidativ fosforylering ved at ATP dannes fra ADP og uorganisk fosfat. I en muskel etter død (*post mortem*) vil det ikke være tilgjengelig oksygen og pyruvat vil omdannes til melkesyre (Lign 4 og 5). Se også figur 1 som oppsummerer prosessen.



Figur 1. *Post mortale* endringer i pH, glykogennedbryting og laktatakkumulering i fiskemuskel (Hentet fra Huss 1983, etter Fraser *et al.* 1967).

Mekanismene bak pH-reduksjonen i *post mortem* muskel har vært omdiskutert. Tidligere har det vært antatt at det skyldes "lactic acidosis" - produksjonen av melkesyre som igjen fører til reduksjon i pH. Men Foegeding *et al.* (1996) og Robergs *et al.* (2004) mener det ikke er grunnlag for å påstå at melkesyre bidrar i særlig grad til pH-fall, selv om pH-fall og produksjon av melkesyre korrelerer. Det er i dag bred enighet om at pH-fallet skyldes dannelsen av ett H⁺-ion for hvert ATP som hydrolyseres. Det vil si at hastigheten på pH-fallet reguleres av ATPase-aktiviteten (lign 6) (Newbold & Scopes 1971; Scopes 1974a, 1974b; Hamm 1977; Bowker *et al.* 2004a, 2004b).



Det har også blitt foreslått at når elektrontransporten og oksidativ fosforylering stopper opp (hindres) på grunn av oksygenmangel, så vil ATP-syntetase i mitokondriene kunne katalysere motsatt reaksjon (lign 6) (St-Pierre *et al.* 2000). Dette fører antakelig til økt produksjon av H⁺ og raskere pH-fall.

Surhetsgraden (pH) i *post mortem* muskel er en viktig kvalitetsindikator som relativt enkelt kan brukes til å vurdere kvaliteten på muskelkjøttet og slakteprosedyren. Her er pH rett etter slakt, det påfølgende fallet og ultimate pH viktige parametere. Egenskaper i kjøttet som påvirkes av pH inkluderer farge, drypptap, filetspalting, tekstur, fasthet (Offer & Knight 1988; Sigholt *et al.* 1997; Robb *et al.* 2000; Huff-Lonergan & Lonergan 2005; Lawrie & Ledward 2006; Mørkøre *et al.* 2008; Wilkinson *et al.* 2008). Selv om pH-utviklingen i mange tilfeller korrelerer med de nevnte *post mortale* endringene er det utfordrende å peke ut en spesifikk faktors påvirkning alene. Derfor er det, i en stor del av den ovennevnte litteraturen, konkludert med at pH-fallet og pH-utviklingen mest sannsynlig bare er en av flere ulike faktorer som virker inn. Muskel-pH ved slaktetidspunktet og det påfølgende fallet i pH er avhengig av art, omgivelsestemperatur og *ante mortem* stress og aktivitet.

For å måle pH i *post mortem* muskel kan en anvende flere ulike metoder. Det kan enten utføres ved å føre en stikkelektrode inn i et intakt stykke muskel (Jerrett & Holland 1998; Robb *et al.* 2000; Morzel *et al.* 2003; Kristoffersen *et al.* 2006a; Bagni *et al.* 2007; Erikson & Misimi 2008; Mørkøre *et al.* 2008; Roth *et al.* 2012). Eventuelt kan muskelen homogeniseres i, eller allerede homogenisert

muskel blandes ut i en vannbasert væske for så å måle pH med et ordinært pH-meter i suspensjonen (Bate-Smith & Bendall 1947; Boyd *et al.* 1984; Andersen *et al.* 1997; Sigholt *et al.* 1997; Einen & Thomassen 1998; Bugeon *et al.* 2003; Fan *et al.* 2008; Matos *et al.* 2010; Bensid *et al.* 2014; Cai *et al.* 2014; Li *et al.* 2015). Da den sistnevnte metode ble utviklet for mer enn 60 år siden, ble enzymhemmeren natriumiodoacetat tilsatt før oppmalingen/homogeniseringen startet. Dette ble gjort for å stoppe glykolysen ved fullstendig å inaktivere glykolysenzymet glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase. Dette ble gjennomført i de tidlige publiserte arbeidene om pH-utvikling i *pre-rigor* kjøttprodukter (Bate-Smith & Bendall 1947; Lawrie 1953; Bendall 1973; Padieu & Mommaerts 1960).

Det er vel kjent fra studier på kjøtt at *pre-rigor* muskel er særdeles sensitiv for fysiske skader slik som kverning eller homogenisering. Slik behandling fører til kraftig akselerert hastighet på glykolysen. Også ikke-optimal frysing *pre-rigor*, og deretter opptining fører til skader på cellemembranene med tilsvarende sterk økning av glykolysehastigheten (Dutson 1983). I et innledende forsøk nylig med 1 fisk ble det vist at glykolysehastigheten i *pre-rigor* laksemuskel, målt som reduksjon i pH, økte sterkt som følge av oppmaling (Joensen 2014).

I nyere undersøkelser av *pre-rigor* muskel-pH hvor muskelen har blitt malt opp har det i mange tilfeller kun blitt brukt en del muskel og ulike mengder destillert vann eller destillert vann med 0,15 M KCl (Rustad 1992; Sigholt *et al.* 1997; Lauritzsen *et al.* 2004; Manju *et al.* 2007; Esaiassen *et al.* 2008; Fan *et al.* 2008; Matos *et al.* 2010; Li *et al.* 2013; Bensid *et al.* 2014; Cai *et al.* 2014; Li *et al.* 2015; Li *et al.* 2016; Mendes *et al.* 2017). Bruk av natriumiodoacetat for å stoppe glykolysen når *pre-rigor* fiskemuskel har blitt oppmalt før måling av pH, har i disse tilfellene blitt glemt eller neglisjert. Det å ikke tilsette natriumiodoacetat før oppmaling har ganske sikkert ført til for lave pH-verdier i muskelen i disse publikasjonene.

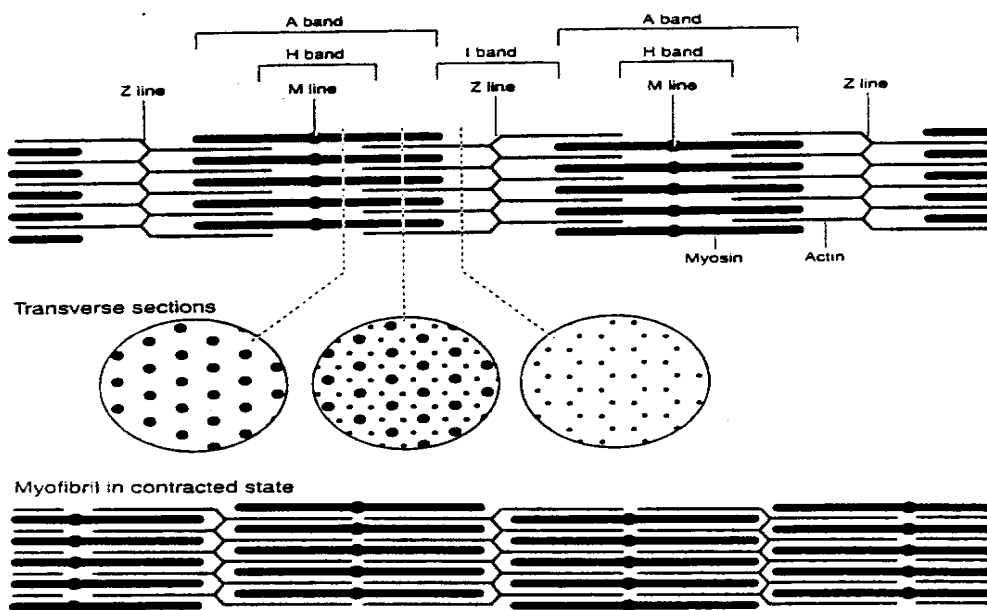
Måling av pH i *post-rigor* muskel ser ikke ut til å bli påvirket av metoden for måling. Her er det ikke funnet forskjell mellom måling med elektrode i intakt muskel, homogenisert muskel i destillert vann, eller homogenisert muskel ved tilsetning av natriumiodoacetat. Det skyldes at all metabolsk aktivitet på dette tidspunktet er avsluttet (Dutson 1983).

Hovedmålet med masteroppgaven var å undersøke hvordan pH i oppmalt muskel med og uten tilsatt natriumiodoacetat påvirket pH-utvikling *post mortem*. Størst vekt ble lagt på *pre-rigor*-fasen og både laks og torsk ble studert. Som kontroll ble pH målt ved å benytte stikkelektrode direkte i intakt muskel.

2 Bakgrunn

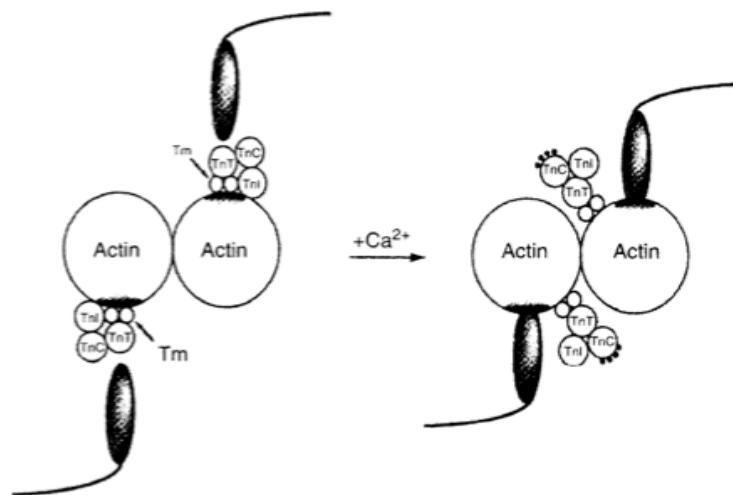
2.1 Muskelkontraksjon og dødsstivhet

En muskelfiber (celle) består av mange parallelle myofibriller. Disse myofibrillene inneholder kontraktile enheter i et langsgående repeterende mønster. En enhet av dette repeterende mønsteret kalles sarkomer. Sarkomeren strekker seg fra Z-linje til Z-linje og er bygd opp av to typer kontraktile protein, myosin og aktin. Når muskelen kontraherer fester myosinhodene til aktinmolekylene, I-båndet forkortes og det skapes et aktomyosin-kompleks (figur 2).



Figur 2. Illustrasjon av sarkomere (Burkitt *et al.* 1993).

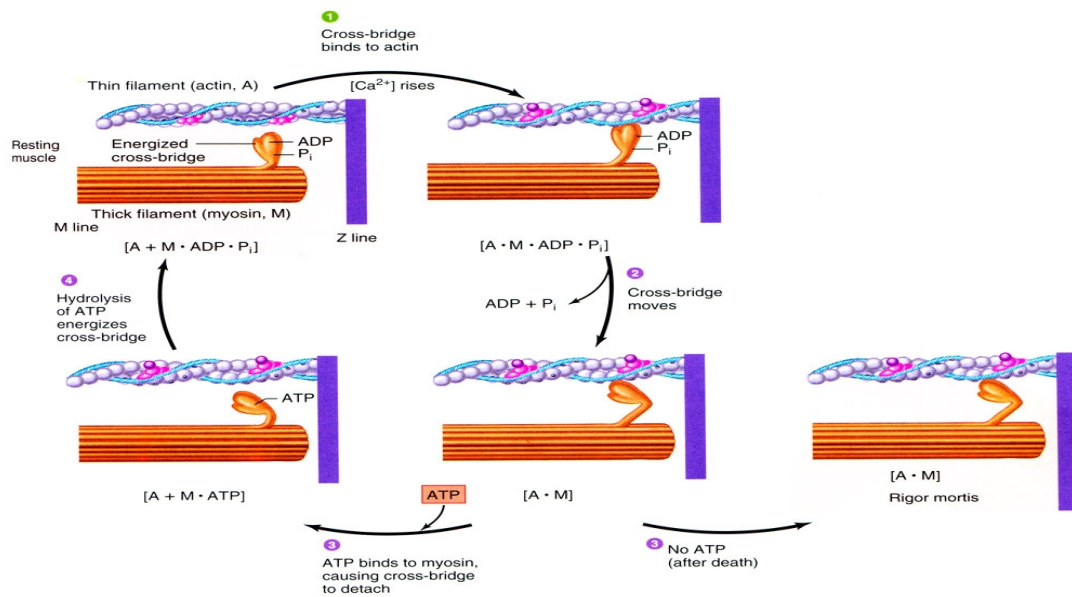
Muskelkontraksjonen starter ved at nerveimpulser til muskelceller fører til transport av kalsiumioner (Ca^{2+}) fra sarkoplasmatisk retikulum til myofibrillene. Her binder kalsiumionene seg til troponinkomplekset på aktin-filamentene. Det fører til en strukturell endring i komplekset, hvor tropomyosin forflytter seg slik at aktinets bindingssete blir frigjort, og myosinhodet kan feste seg (figur 3 og 4).



Figur 3. Regulering av kontraksjon og frigjøring av tropomyosin-troponin-komplekset (Chiang *et al.* 2007).

Aktomyosin-komplekset er avhengig av ATP for å løses opp, ved at kalsium aktivt blir pumpet tilbake inn i sarkoplasmatiske retikulum. Om ATP-nivået er for lavt, låses muskelen i aktomyosin-komplekset og muskelen går inn i *rigor mortis*, dødsstivhet på norsk (figur 4).

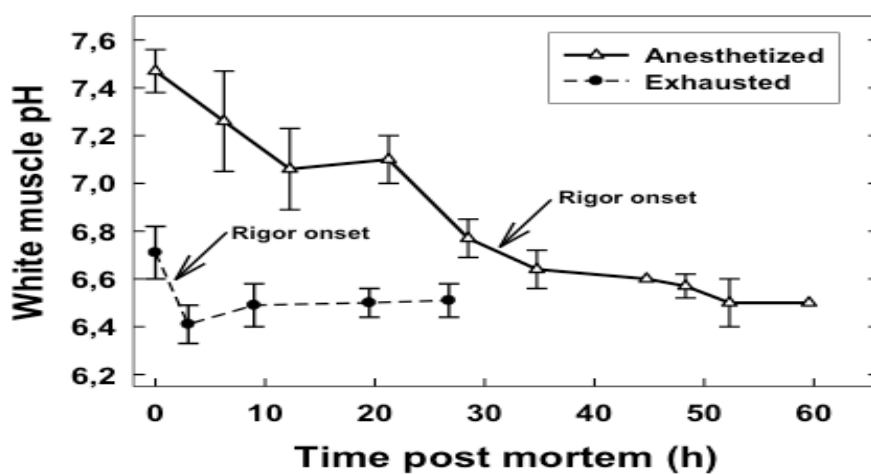
Under den anaerobe metabolismen i *post mortem* fiskemuskel vil ATP-innholdet holdes relativt stabilt en gitt tid på grunn av refosforylering med utgangspunkt i kreatinfosfat, og anaerob nedbryting av glukose. *Rigor mortis* inntreffer når det intracellulære ATP-nivået er blitt så lavt som 1-2 mM/g i vevet (Iwamoto *et al.* 1988). På hvilket tidspunkt ATP-nivået er så lavt at *rigor* inntreffer hos fisk avhenger av den biologiske tilstanden, art, stress og aktivitet *ante mortem* og lagringstemperatur (Love 1988; Haard 1992; Skjervold *et al.* 2001).



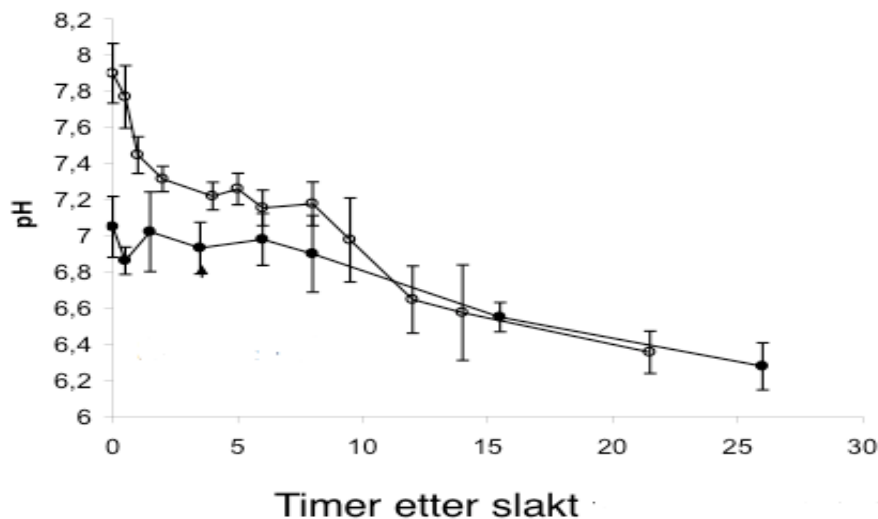
Figur 4. Interaksjonen mellom myosin og aktin ved kontraksjon av muskel. Og inntredelse av *rigor mortis* (Widmaier *et al.* 2011).

2.2 Post mortem glykolyse og pH-utvikling

Stress og aktivitet hos fisk *ante mortem* er påvist å påvirke muskelen *post mortem* både biokjemisk og fysisk. Det kan gi både høyere grad av filetspalting og mykere tekstur. (Sigholt *et al.* 1997; Robb *et al.* 2000; Kiessling *et al.* 2006; Roth *et al.* 2006; Misimi *et al.* 2008). En *ante mortem*-stresset fisk vil gå mye raskere inn i *rigor mortis* enn ustresset fisk (figur 5 og 6).

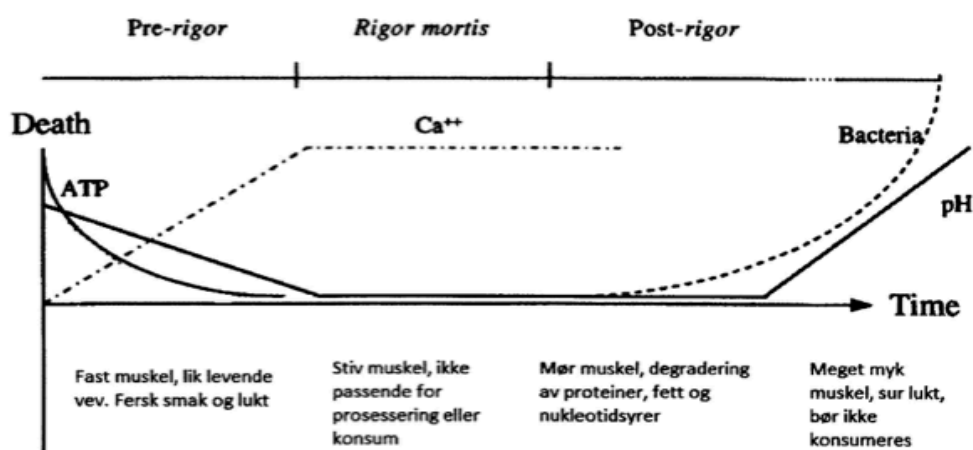


Figur 5. Muskel-pH hos oppdrettslaks *post mortem* bedøvet (Δ) eller utmattet (\bullet) før slaktning (Erikson & Misimi 2008).



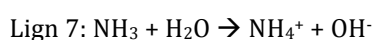
Figur 6. Muskel-pH hos oppdrettstorsk *post mortem* stresset (●) eller ikke-stresset (○) før slakt (Kristoffersen *et al.* 2006a)

Fisk som har vært stresset eller har hatt høy aktivitet før slakting har en lav muskel-pH ved tid 0. Årsaken er at mye av de energirike forbindelsene (glykogen, glukose) er blitt anaerobt brukt opp under *ante mortem* stress og aktivitet (Kristoffersen *et al.* 2006a; Erikson & Misimi 2008). I en levende fisk vil muskel-pH normalisere seg etter en viss periode, rundt 12 timer hos Atlantisk laks (Veiseth *et al.* 2006). Men *post mortem* vil ikke pH-en normalisere seg fordi blodsirkulasjonen har stoppet. Den lave pH-verdien i muskelkjøttet vil vedvare under lagring frem til bakterieantallet i produktet blir relativt høyt (Figur 7).

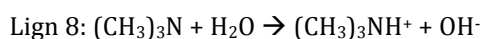


Figur 7. Endringer i fiskemuskel *post mortem* (nukleotidsyrer = nukleinsyrer) (modifisert fra Martinez *et al.* 1997).

Surhetsgraden i ferskt muskelkjøtt (filet) øker etter lagring i lang tid som vist i figur 7. Årsaken er at bakteriene som vokser produserer basiske avfallsprodukter; hovedsakelig ammoniakk, men også trimetylamin (TMA) hos noen fiskeslag. Mikroorganismer skiller ut proteolytiske enzymer og disse bryter ned muskelproteinene til frie aminosyrer (AA). Mikroorganismene tar så opp AA og bruker dem i hovedsak til to ting - syntetisering av egne proteiner, eller som energisubstrat. AA kan deamineres til α -ketosyrer, og disse kan inngå i sitronsyresyklusen, hvor energi (ATP) dannes. Ammoniakk vil reagere med vann og gi ammonium og hydroksidion (Lign 7).

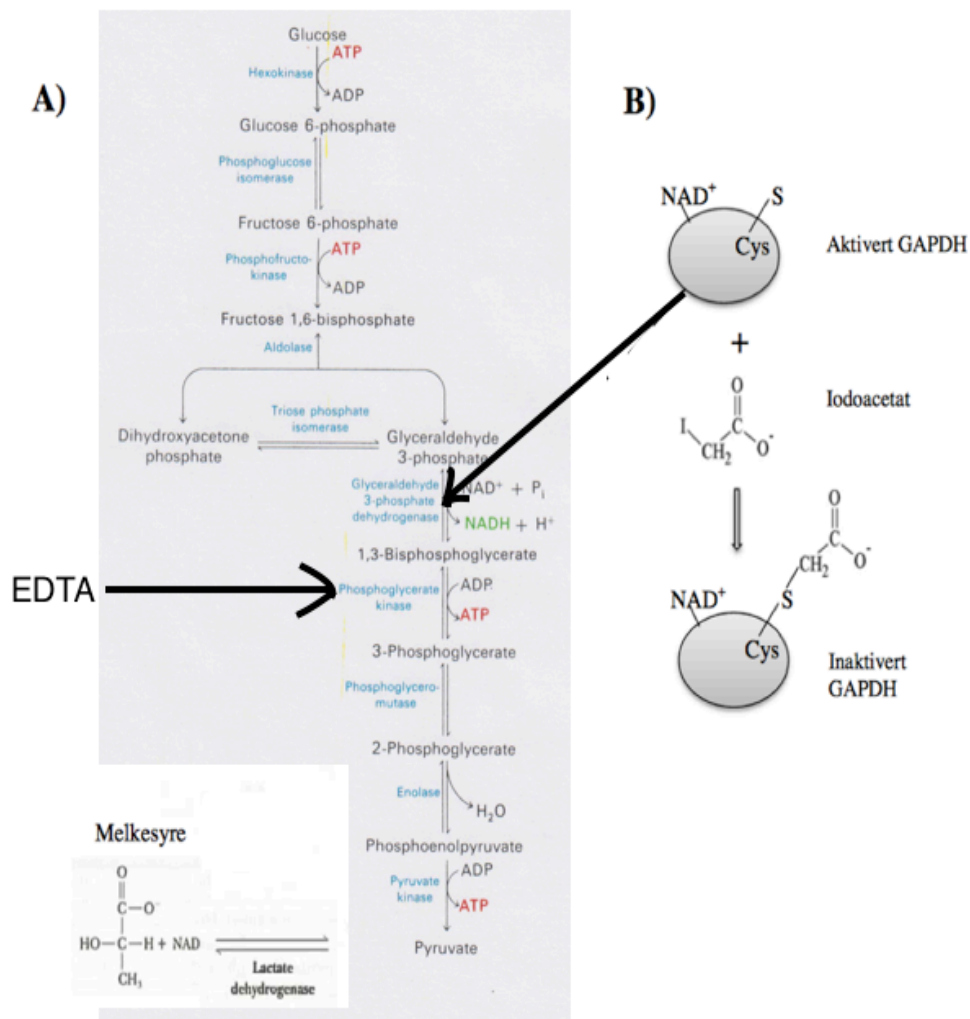


I de fiskeartene som inneholder trimetylaminoksid (TMAO) vil mikroorganismer kunne bruke oksygenet til respirasjon. TMA som dannes vil i kontakt med vann danne OH^- (Lign 8).



Økningen i konsentrasjon av hydroksidion (OH^-) gir økt pH.

Som også nevnt i introduksjonen kan pH-utvikling i muskel *post-mortem* ha stor betydning for kvalitet. I mange forskningsarbeider har man derfor målt pH i muskel hos både landdyr og fisk. Forskning på kvalitet av kjøtt fra dyr har mye lengre tradisjon enn det å studere egenskaper til fiskekjøtt. I de første årene der man studerte egenskaper til dyrekjøtt for minst 60-70 år siden, fant man ut at i *pre-rigor* tilstand måtte natriumiodoacetat tilsettes før oppmaling og måling av pH. Ellers får man en feilaktig lav pH-verdi (Bate-Smith & Bendall 1947; Bendall 1973; Dutson 1983). Natriumiodoacetat virker ved å inaktivere enzymet glycerinaldehyd-3-fosfat dehydrogenase i glykolysen (Figur 8A). SH-gruppen til aminosyren cystein lokalisert i det aktive setet hos glycerinaldehyd-3-fosfat dehydrogenase binder seg til natriumiodoacetat, inaktiverer enzymet og glykolysen hemmes (figur 8B) (Schmidt & Dringen 2009). I tillegg ble det tilsatt KCl sammen med natriumiodoacetat i suspensjonen før oppmaling av muskel. Det ble gjort fordi en av ulempene med å male opp muskel i natriumiodoacetat er at pK i muskel-bufferne endres ved at den ioniske styrken senkes. Men tilsetning av 0,15 M KCl vil eliminere det problemet (Bendall 1973).



Figur 8. A) Oversikt over trinnene i glykolysen og anaerob nedbryting av pyruvat til laktat (modifisert fra Stryer 1988). **B)** Hvordan natriumiodoacetat inaktiverer glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase (Nelson & Cox 2000).

En annen mulighet for å stoppe glykolysen er å bruke enzymehemmeren Na_2EDTA . Na_2EDTA hemmer enzymet 3-fosfoghlycerate kinase. Dette enzymet virker i leddet av glykolysen som bryter ned 1,2-bifosfoghlycerate til 3-fosfoghlycerate (figur 8A). Enzymet er avhengig av magnesium for aktivitet, og teorien er at Na_2EDTA binder metallet og dermed reduserer aktiviteten (Varga *et al.* 2012).

2.3 Enzymatisk nedbryting

Som det fremgår av figur 7 begynner det en enzymatisk nedbryting av muskelproteiner på slutten av *rigor mortis*. Proteolytiske enzymer spiller en viktig rolle og det første synlige tegn på slik aktivitet er oppløsning av dødsstivheten. Dette skjer ved at proteolytiske enzymer spalter peptidbindinger i proteiner som forankrer aktomyosin-komplekset til z-linjene (Foegeding *et al.* 1996). I den første *post-rigor*-fasen er det endogene enzymer som bryter ned muskelvev, mens eksogene enzymer fra bakterier dominerer i slutten av holdbarhetstiden (figur 7). Sannsynligvis er det to hovedtyper proteolytiske enzymer som hydrolyserer myofibrillproteiner i tidlig *post-rigor*-fase. Calpainer som er sarkopasmatiske enzymer og lysosomale katepsiner (Ouali 1992; Delbarre-Ladrat *et al.* 2004a; Delbarre-Ladrat *et al.* 2004b). Andre proteinaser som for eksempel matrix metallproteinaser står høyst sannsynlig også for nedbryting av bindevevskomponenter, blant annet kollagen (Kubota *et al.* 2001).

Katepsiner

Katepsiner er med noen unntak lysosomale proteaser med et surt pH-optimum. I en levende organisme bryter de ned skadede proteiner og proteiner som skal omsettes, i lysosomene. I *post mortem* fiskemuskel er det sannsynlig at lysosomale katepsiner både bryter ned myofibriller (Yamashita & Konagaya 1990; Ladrat *et al.* 2003) og bindevev (Sato *et al.* 1997). Lysosomene inneholder minst 13 typer katepsiner, inndelt i gruppene cysteine-, serine- og asparaginsyre-proteinaser, etter de ulike mekanismene i det aktive setet. Det antas å være katepsinene B, L, H og D som bidrar i nedbryting av muskelen (Aoki *et al.* 2000; Chéret *et al.* 2007). Chéret *et al.* (2007) konkluderte med at katepsin H-proteolyse i *post mortem* fiskemuskel er av liten betydelighet. I hovedsak er det katepsinene B, D og L som står for nedbrytingen av den myofibrillære strukturen i fiskemuskel (Delbarre-Ladrat *et al.* 2006; Wang *et al.* 2011). Spesielt er katepsin D forbundet med uønskede endringer i fastheten til muskelen hos regnbueørret som teksturforandringer og nedbryting av muskelstruktur (Godiksen *et al.* 2009). Hos Atlantisk laks er det vist signifikant

negativ korrelasjon mellom katepsin L-aktivitet og muskelfasthet (Bahuaud *et al.* 2010).

Calpainer

Calpainer er kalsiumavhengige, intracellulære cysteinproteinaser med nøytralt pH-optimum. De består av to grupper - μ -calpain og m-calpain. Både μ -calpain og m-calpain krever kalsiumkonsentrasjoner på henholdsvis mikro- og millimolar-nivå for aktivitet. Calpainer er knyttet til starten på den proteolytiske nedbrytingen av myofibriller. Tilsatt laksemuskel ble det dannet titin-liknende degraderingsprodukter i myofibrillene (Geesink *et al.* 2000; Delbarre-Ladrat *et al.* 2004a). Det er kanskje naturlig å tro at calpainer, og særlig μ -calpain, er viktig *post-rigor* på grunn av den store økningen i intracellulær kalsiumkonsentrasjon.

Matrix metalloproteinaser

Matrix metalloproteinaser (MMP) er en stor familie kalsium-avhengige zinkholdige endopeptidaser. De spiller en signifikant rolle i proteolyse av ekstracellulær matriks (ECM), inkludert kollagen, elastin, gelatin, matriks glykoproteiner og proteoglykaner (Verma & Hansch 2007). Sannsynligvis er denne proteolytiske nedbrytingen av ekstracellulære strukturelle proteiner en viktig årsak til bløtgjøring av fiskemuskel (Kubota *et al.* 2003).

3 Materialer og metoder

3.1 Kjemikalier

Natriumiodoacetat (bioultra, $\geq 98\%$, nr. I9148) og kaliumklorid (puriss. P. A. $\geq 99,5\%$, nr. 60130) var fra Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany. Ethylenediaminetetra-acetic acid disodium salt (Na_2EDTA) (molecular biology grade, nr. 443882) var fra BDH Laboratory Supplies, Poole, England.

3.2 Råstoff og slaktemetode

Laks (*Salmo salar* L.) brukt i forsøkene var oppdrettet ved landanlegget på Havbruksstasjonen i Kårvika. Den samme gruppe laks ble brukt i hvert forsøk. Forsøkene varierte i tid fra februar til oktober 2017. Fôret brukt var fra Skretting. Gjennomsnittsstørrelsen var 1243 g og 46 cm lang. Varierende mellom 820-2000 g og 39-52 cm avhengig av slaktetidspunkt.

Torsk (*Gadus morhua* L.) brukt i undersøkelse av muskel-pH var fra sjøanlegget til Havbruksstasjonen i Tromsø. Disse torskene var villfanget og vedlikeholds-fôret med lodde og sild. Gjennomsnittsstørrelsen var 8,35 kg og 88 cm lang.

Torsk brukt i undersøkelse av effekten av oppmalingsgrad, var oppdrettet ved landanlegget på Havbruksstasjonen i Kårvika. Den veide 650 g og var 35 cm lang. Fôret brukt var fra Skretting.

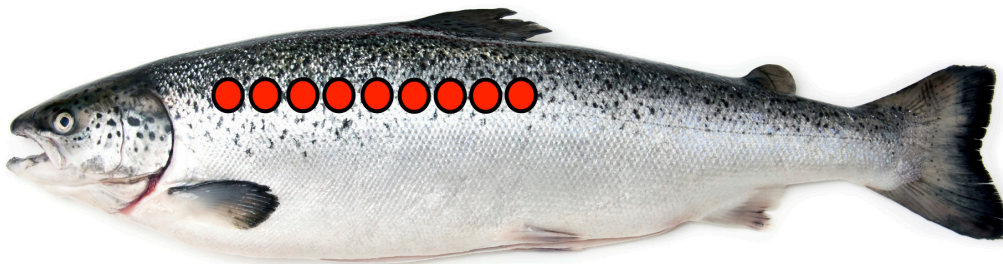
Alle fiskene ble håvet ut av karet så raskt og skånsomt som mulig. De ble så avlivet med et kakk i hodet med en stump gjenstand. Fordi det var et mål å starte pH-målingene så raskt som mulig, ble ikke fisken bløgget.

3.3 Måling av pH

Muskelstykker ble tatt ut ved å skinne fisken fra brystfinne og bak til gattet i den ene fileten, for så å kutte ut muskelprøver på 25 g. Oppmalingen av muskelstykkene ble gjennomført ved bruk av en kvern av typen Ultra Turrax® (IKA T25B, IKA Werke GmbH, Tyskland), i 2x10 sekunder, og henholdsvis 1x5,

3x5 og 5x5 sekunder i forsøket hvor effekt av oppmalingsgrad ble undersøkt. Muskelstykkene som ble malt opp var tilsatt enten en løsning bestående av kun 0,15 M KCl, av 0,15 M KCl med 5 mM natriumiodoacetate, eller løsning bestående av 0,15 M KCl med 5 mM Na₂EDTA før oppmalingen ble gjennomført. Når andre blandingsforhold mellom muskel og væske, og andre konsentrasjoner natriumiodoacetat er benyttet, så er dette spesifikt nevnt i resultatene.

I den andre fileten på fisken ble det målt pH i intakt muskel ved hjelp av en stikkelektrode. Det ble snittet et hull på cirka 0,5 cm i skinnet med en skalpell hvorpå stikkelektroden ble ført inn. Det ble laget et nytt hull i fileten for hver nye måling (figur 9).



Figur 9: Måling av pH ved bruk av stikkelektrode. Sirklene indikerer hvor hullet i skinnet ble snittet og elektroden ført inn.

Til å gjennomføre pH-målingene ble det brukt et pH-meter av typen WTW 330i/SET pH-meter (Wissenschaftlich – Technische Werkstätten, Weilheim, Tyskland) med en glasselektrode av typen (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Sveits). pH-meteret har innebygd termometer som automatisk korrigerer for effekten av temperatur på elektroden. I tillegg ble pH-meteret jevnlig kalibrert etter brukermanualen.

Tiden (nullpunktet) ble startet i det kverningen var gjennomført og var i alle forsøkene mellom 5-10 minutter *post mortem* (pm). Deretter ble det gjennomført pH-målinger i homogenat og muskel jevnlig som vist på figurene i resultatseksjonen. Fisken ble veid og målt lengde på etter første pH-måling,

hvorpå utskårete muskelprøver ble plussset på den målte vekten. Fra tid 0 og fram til cirka 4 timer pm ble de homogeniserte prøvene og intakt filet lagret ved romtemperatur. Deretter ble prøvene lagret på kjølerom. I perioden 0 til cirka 4 timer ble prøvene analysert på Havbruksstasjonen og transportert til laboratoriet på Fiskerihøgskolen der de senere analysene ble gjennomført.

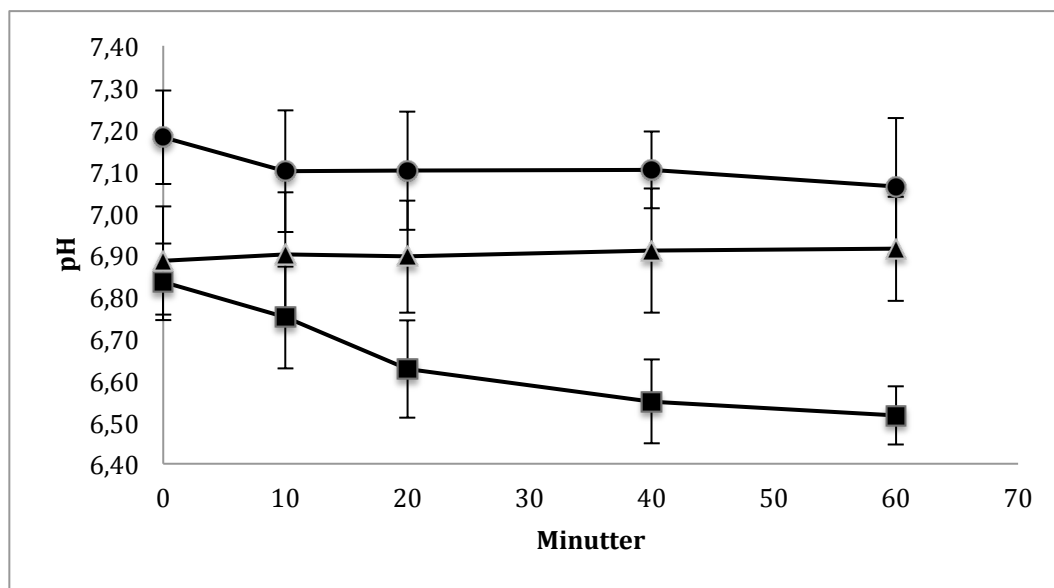
3.4 Laktatmåling i muskel

Laktatinnholdet i muskel ble målt med et Lactate pro™2 instrument (ARKRAY factory, Inc. - Konan-cho, Koka-shi, Shiga, Japan) Målingene ble gjennomført i intakt muskel ved å kutte et hull i muskelen på rundt 2 cm dypt og 2 cm bredt. Enden av målestripsen ble så presset mot muskelen for å trenge ut væske. I tillegg ble det målt laktatnivå i de ulike suspensjonene med homogenisert muskel i KCl med og uten natriumiodoacetat.

4 Resultater

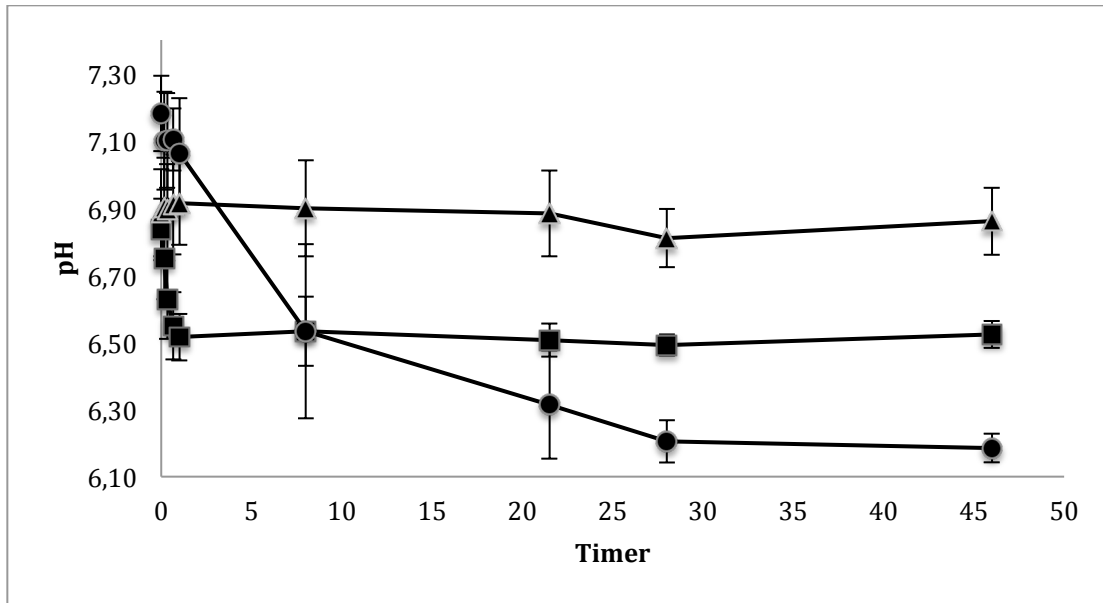
4.1 Muskel-pH *post mortem* i laks

Resultatene fra måling av pH i homogeniserte prøver og i intakt muskel er vist i figurene 10a til 10c. I intakt muskel ble pH målt med stikkelektrode til 7,18 ved tid 0 og 7,06 ved tid 60 min pm (figur 10a). For muskel homogenisert med 0,15 M KCl med 5 mM natriumiodoacetat ble verdiene funnet å være stabil ved cirka pH 6,90 i den første timen etter slakt og de påfølgende 46 timene (figur 10a og 10b). I homogenatet uten natriumiodoacetat falt pH raskt fra cirka 6,84 ved tid 0 til pH 6,52 etter 60 min (figur 10a) Allerede etter 10 og 20 min pm var pH blitt redusert til henholdsvis 6,75 og 6,63.



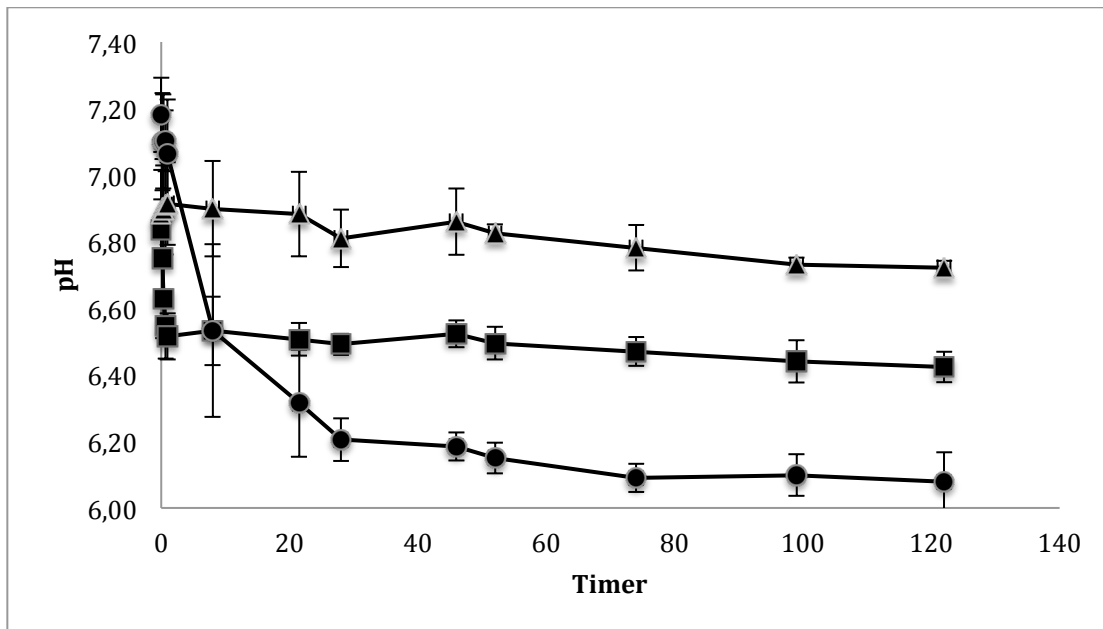
Figur 10a: Muskel-pH hos laks (n=6) fra 0-60 min *post mortem*. Oppmalt i 1:1 løsningsmiddel av muskel og 0,15 M KCl med (▲) og uten (■) 5 mM natriumiodoacetat. Målt direkte i muskel med stikkelektrode (●).

Fra 1 time til 46 timer pm skjedde følgende forandringer i målte pH-verdier. I intakt muskel ble pH målt til 6,53, 6,31, 6,21 og 6,19 etter henholdsvis 8, 22, 28 og 46 timer (figur 10b). I homogenatet uten enzymhemmer ble pH-verdiene funnet å være noenlunde stabil; cirka 6,5 i hele denne perioden. Med enzymhemmer ble det også observert stabil pH-verdi på cirka 6,8-6,9 i hele perioden (figur 10b og 10c).



Figur 10b: Muskel-pH hos laks (n=6) fra 0-46 timer *post mortem*. Oppmalt i 1:1 løsning av muskel og 0,15 M KCL med (▲) og uten (■) 5 mM natriumiodoacetat. Målt direkte i muskel med stikkelektrode (●).

Homogeniserte prøver og intakt fiskemuskel ble også analysert 52, 74, 99 og 122 timer pm. I intakt muskel var det fra 46 til 74 timer en nedgang i pH fra 6,19 til 6,09. For tid 99 og 122 timer etter slakt var pH uforandret, 6,10 og 6,08 henholdsvis (figur 10c).

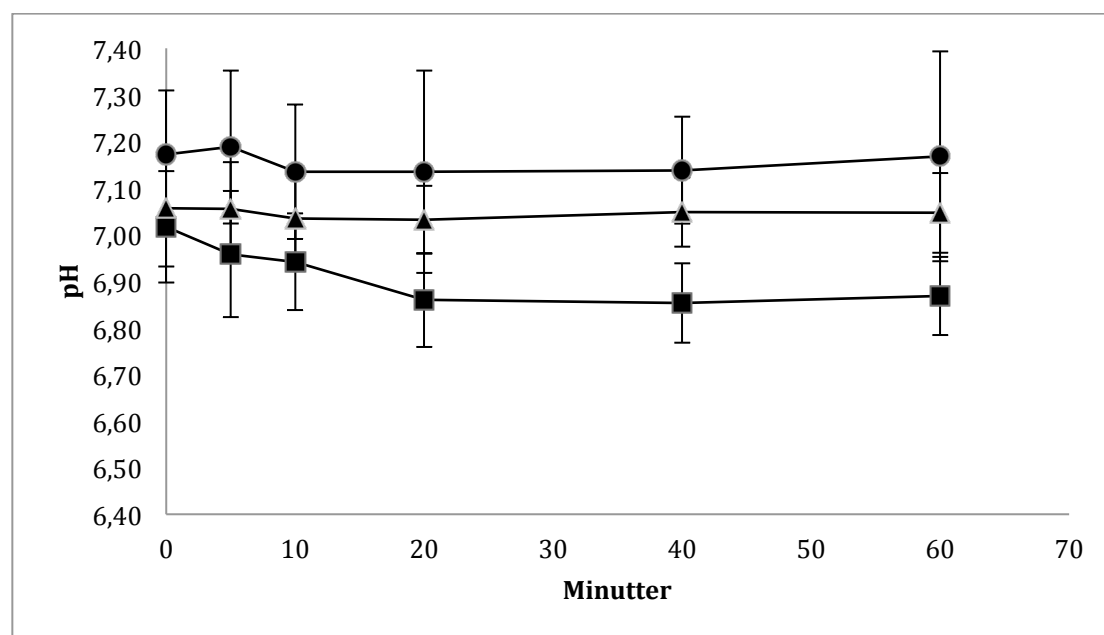


Figur 10c: Muskel-pH hos laks (n=6) fra 0-122 timer *post mortem*. Oppmalt i 1:1 løsning av muskel og 0,15 M KCL med (▲) og uten (■) 5mM natriumiodoacetat. Målt direkte i muskel med stikkelektrode (●).

For homogeniserte prøver med og uten natriumiodoacetat var det også bare en svak nedgang i målt pH-verdi. Med hemmer ble pH redusert fra 6,86 ved 46 timer til 6,72 ved 122 timer pm. Uten hemmer i homogenatet var verdien ved 46 timer og 122 timer pm henholdsvis 6,52 og 6,42. (figur 10c)

4.2 Muskel-pH *post mortem* i torsk

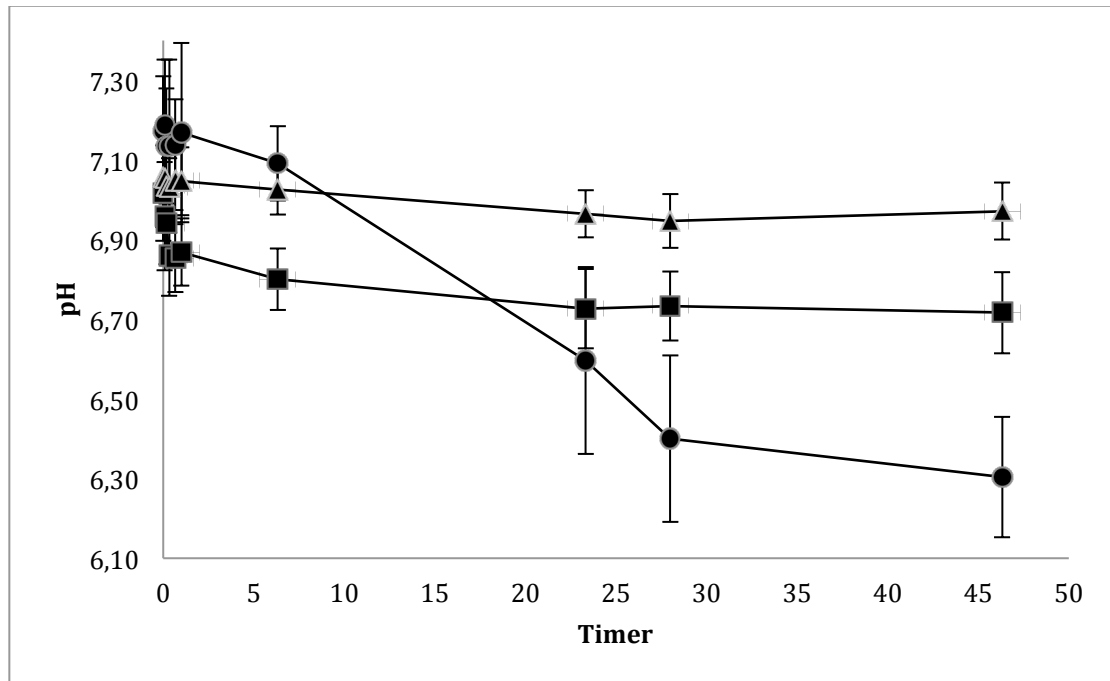
Resultatene fra måling av pH i homogeniserte prøver og i intakt muskel er vist i figurene 11a og 11b. I intakt muskel ble pH målt med stikkelektrode til 7,17 både ved tid 0 og ved tid 60 min pm (figur 11a). For muskel homogenisert med 0,15 M KCl og 5 mM natriumiodoacetat ble verdiene funnet å være stabil ved cirka pH 7,05 i den første timen etter slakt. I homogenatet uten natriumiodoacetat falt pH fra 7,02 ved tid 0 til pH 6,87 etter 60 min (figur 11a) Etter 10 og 20 min pm var pH blitt redusert til henholdsvis 6,94 og 6,87.



Figur 11a: Muskel-pH hos torsk (n=6) fra 0-60 min *post mortem*. Oppmalt i 1:1 løsning av muskel og 0,15 M KCL med (▲) og uten (■) 5 mM natriumiodoacetat. Målt direkte i muskel med stikkelektrode (●).

Fra 1 time til 46 timer pm skjedde følgende forandringer i målte pH-verdier. I intakt muskel ble pH målt til 7,09, 6,60, 6,40 og 6,30 etter henholdsvis

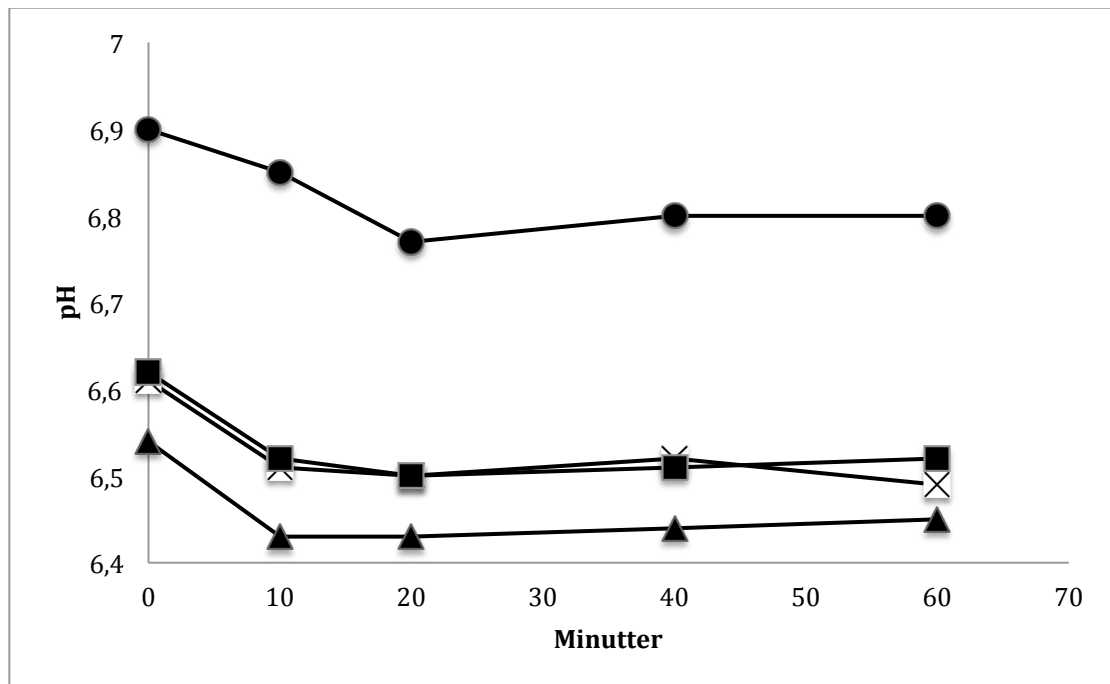
6, 23, 28 og 46 timer (figur 11b). I homogenatet uten enzymhemmer ble pH-verdiene funnet å reduseres noe frem til 23 timer til 6,73. Fra 23 timer til 46 timer holdt pH seg stabil på cirka 6,73. Med enzymhemmer ble det observert stabil pH-verdi på cirka 7,0 i hele perioden (figur 11b).



Figur 11b: Muskel-pH hos torsk (n=6) fra 0-46 timer *post mortem*. Oppmalt i 1:1 løsning av muskel og 0,15 M KCL med (▲) og uten (■) 5 mM natriumiodoacetat. Målt direkte i muskel med stikkelektrode (●).

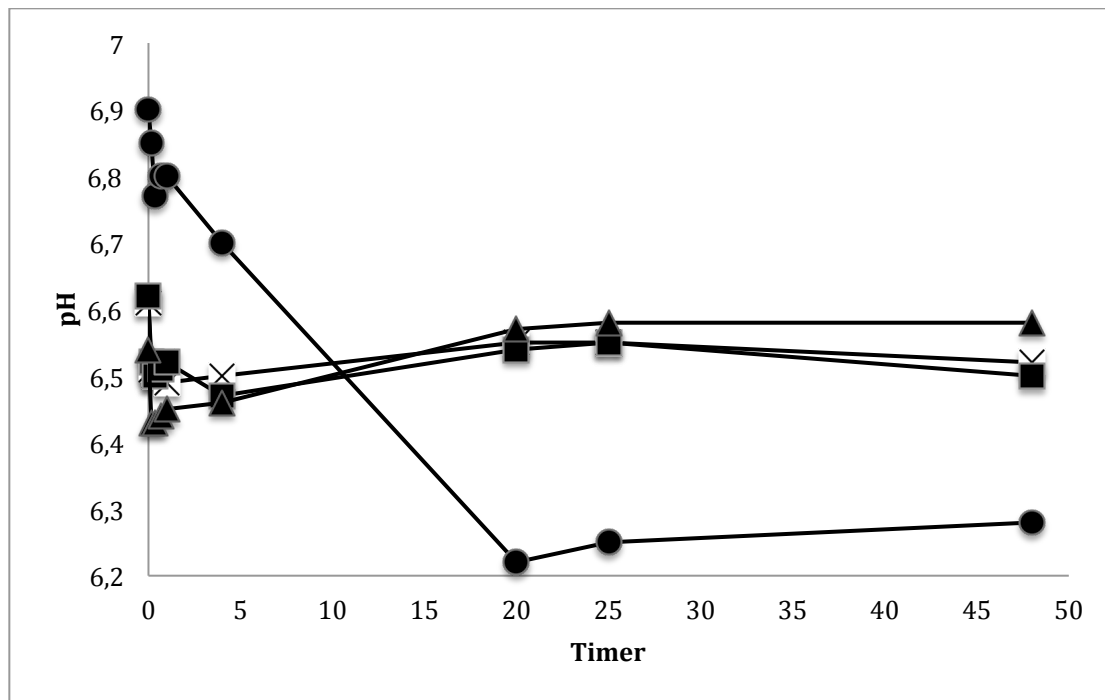
4.3 Effekt av oppmalingsgrad på pH i laksemuskel

Effekten av oppmalingsgrad på pH-utvikling ble studert ved å male opp laksemuskel i 5 sekunder enten 1, 3 eller 5 ganger. Før oppmalingen ble muskelen tilsatt lik del 0,15 M KCl. Muskel homogenisert i 5 sekunder 1 og 3 ganger hadde begge en pH på cirka 6,6 ved tid 0. Etter 10 min var den falt til cirka 6,51 for begge, og disse verdiene forandret seg ikke under videre lagring i 48 timer (figur 12a og 12b).



Figur 12a: Muskel-pH hos laks (n=1) fra 0-60 min *post mortem*. Oppmalt 1:1 løsning av muskel og 0,15 M KCl i henholdsvis 1x5 (x), 3x5 (■) og 5x5 (▲) sekunder. Målt direkte i muskel med stikkelektrode (●).

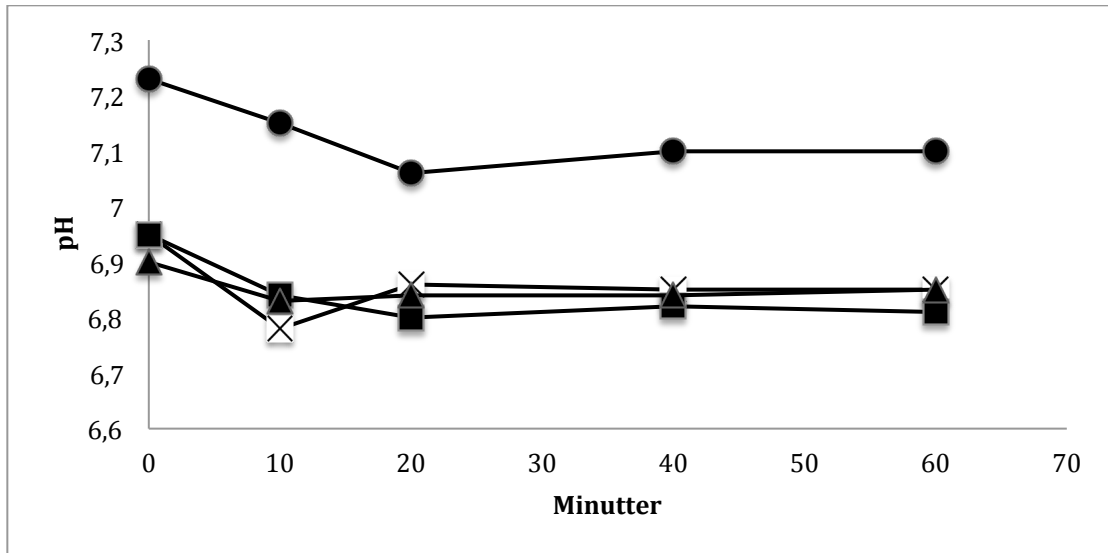
I homogenat oppmalt 5 sekunder 5 ganger ble pH målt til 6,54 ved tid 0. Ved 10 minutter hadde pH blitt redusert til 6,43 (figur 12a). Herfra økte pH tilsynelatende svakt gjennom lagringsperioden til 6,58 ved 48 timer (figur 12b). I intakt muskel ble pH målt med stikkelektrode til 6,9 ved tid 0 og 6,8 ved tid 60 min pm (figur 12a). Videre ble pH målt til 6,7, 6,22, 6,25 og 6,28 etter henholdsvis 4, 20, 25 og 48 timer (figur 12b).



Figur 12b: Muskel-pH hos laks (n=1) fra 0-48 timer *post mortem*. Oppmalt 1:1 løsning av muskel og 0,15 M KCl i henholdsvis 1x5 (x), 3x5 (■) og 5x5 (▲) sekunder. Målt direkte i muskel med stikkelektrode (●).

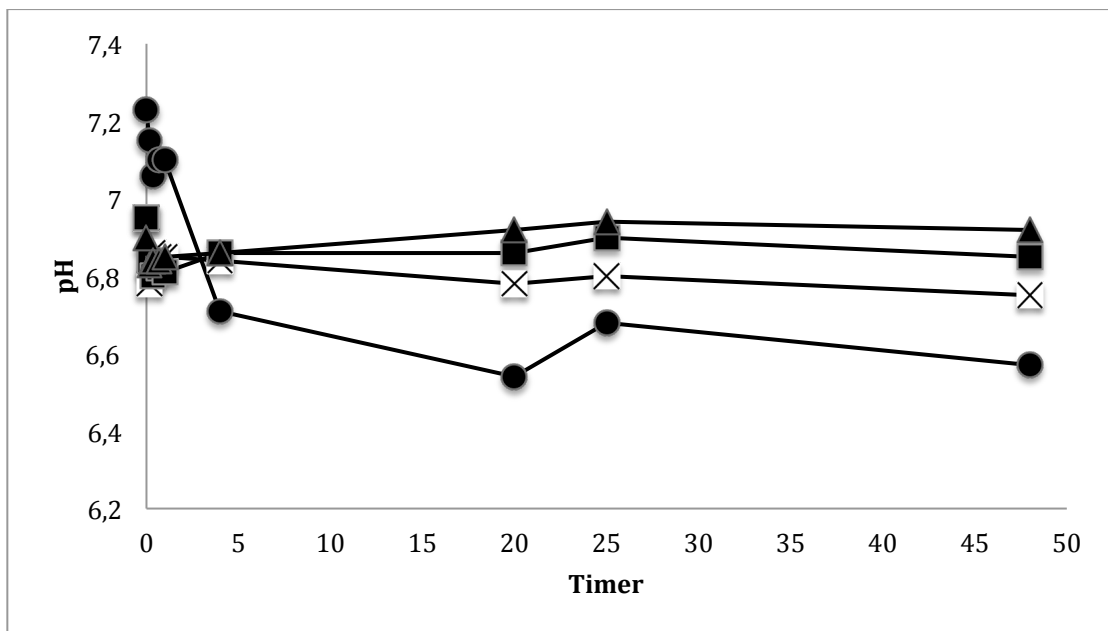
4.4 Effekt av oppmalingsgrad på pH i torskemuskel

Effekten av oppmalingsgrad på pH-utvikling ble studert ved å male opp torskemuskel i 5 sekunder enten 1, 3 eller 5 ganger. Før oppmalingen ble muskelen tilsatt lik del 0,15 M KCl. Muskel homogenisert i 5 sekunder 1 og 3 ganger hadde begge en pH på cirka 6,95 ved tid 0. Etter 10 min var den falt til cirka 6,78 og 6,84 for henholdsvis homogenatene oppmalt 1 og 3 ganger. Disse verdiene forandret seg ikke under videre lagring i 48 timer (figur 13a og 13b).



Figur 13a: Muskel-pH hos torsk (n=1) fra 0-60 min *post mortem*. Oppmalt 1:2 løsning av muskel og 0,15 M KCl i henholdsvis 1x5 (x), 3x5 (■) og 5x5 (▲) sekunder. Målt direkte i muskel med stikkelektrode (●).

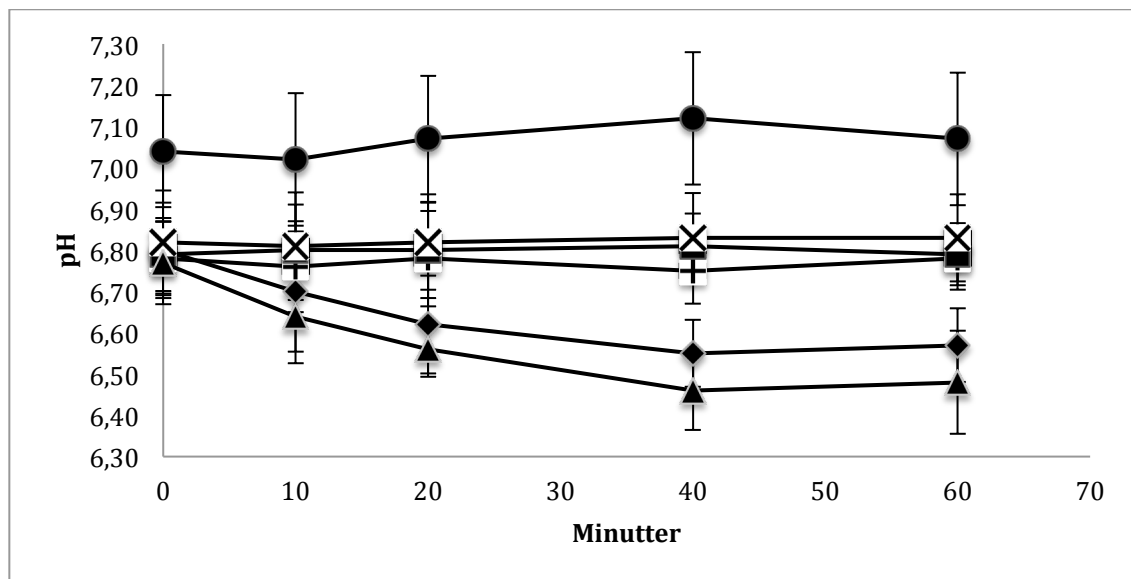
For prøven homogenisert 5 ganger var pH cirka 6,9 ved tid 0. Ved 10 minutter var pH redusert til 6,83 (figur 13a). Herfra var det tilsynelatende en svak pH-økning gjennom lagringsperioden til 6,92 ved 48 timer (figur 13b). I intakt muskel ble pH målt med stikkelektrode til 7,23 ved tid 0 og 7,1 ved tid 60 min pm (figur 13a). Videre ble pH målt til 6,71, 6,54, 6,68 og 6,57 etter henholdsvis 4, 20, 25 og 48 timer (figur 13b).



Figur 13b: Muskel-pH hos torsk (n=1) fra 0-48 timer *post mortem*. Oppmalt 1:2 løsning av muskel og 0,15 M KCl i henholdsvis 1x5 (x), 3x5 (■) og 5x5 (▲) sekunder. Målt direkte i muskel med stikkelektrode (●).

4.5 Effekt av ulike konsentrasjoner natriumiodoacetate på pH i homogenisert laksemuskel

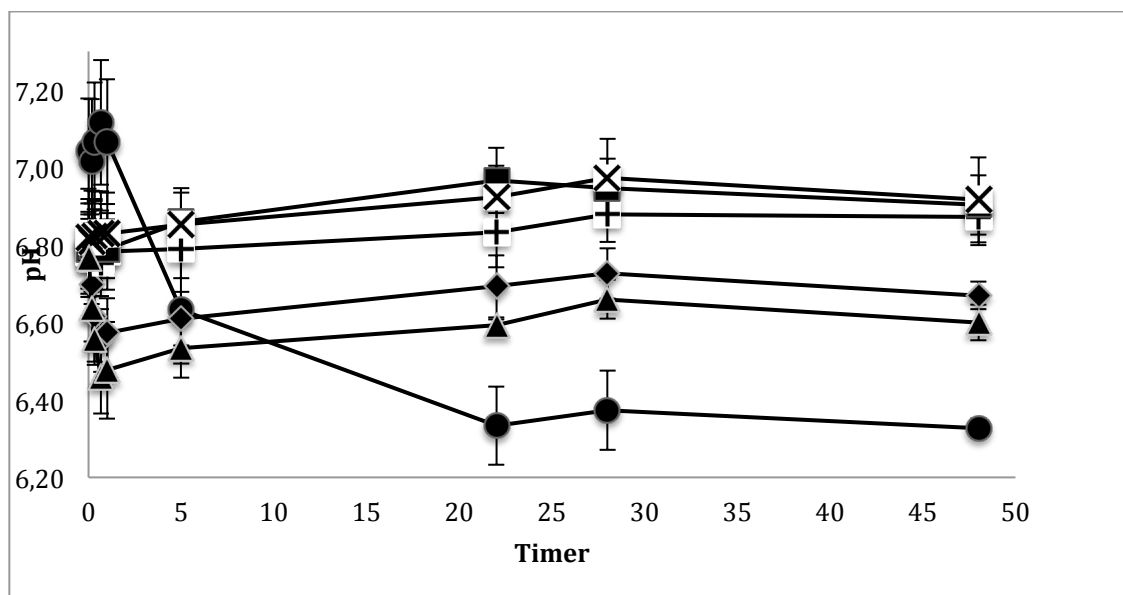
I dette forsøket ble det studert hvordan ulike konsentrasjoner av natriumiodoacetat (0; 0,2; 1,0; 5; og 20 mM) tilsatt løsningen med 0,15 M KCl påvirket fall i muskel-pH hos laks pm. I homogenatene tilsatt 1 mM, 5 mM og 20 mM natriumiodoacetat ble pH målt til å være cirka 6,8 ved tid 0 og denne holdt seg stabil de første 60 min pm (figur 14a). For muskel homogenisert med 0,2 mM natriumiodoacetat og homogenatet uten tilsatt natriumiodoacetat falt pH raskt fra cirka 6,80 ved tid 0 til henholdsvis pH 6,57 og 6,48 etter 60 min (figur 14a). Allerede etter 10 og 20 min pm var pH blitt redusert til henholdsvis 6,70 og 6,62 i homogenatet tilsatt 0,2 mM, og 6,64 og 6,56 uten tilsatt enzymhemmer. I intakt muskel ble pH målt med stikkelektrode til 7,04 ved tid 0 og 7,07 ved tid 60 min pm (figur 14a).



Figur 14a: Muskel-pH hos laks (n=3) fra 0-60 min *post mortem*. Oppmalt i henholdsvis 0,15 M KCl (▲), 0,15 M KCl med 0,2 mM natriumiodoacetate (◆), 0,15 M KCl med 1 mM natriumiodoacetate (+), 0,15 M KCl med 5 mM natriumiodoacetate (■) med 0,15 M KCl med 20 mM natriumiodoacetate (x). Målt direkte i muskel med stikkelektrode (●).

Fra 1 time til 46 timer pm skjedde følgende forandringer i målte pH-verdier. I homogenatene tilsatt 5 og 20 mM natriumiodoacetat ble pH målt til cirka 6,90 de resterende 46 timer (figur 14b). For prøven tilsatt 1 mM

natriumiodoacetat ble pH funnet å holde seg mellom 6,75 og 6,85 ut lagringsperioden, mens homogenat tilsatt 0,2 mM natriumiodoacetat ble funnet å ha pH-verdier mellom 6,6 og 6,7. I homogenatet uten enzymhemmer ble pH-verdiene funnet å være mellom 6,5-6,6 fra 1 time og de påfølgende 48 timer (figur 14b) I intakt muskel ble pH målt til 6,63, 6,33, 6,37 og 6,33 etter henholdsvis 5, 22, 28 og 48 timer (figur 14b).



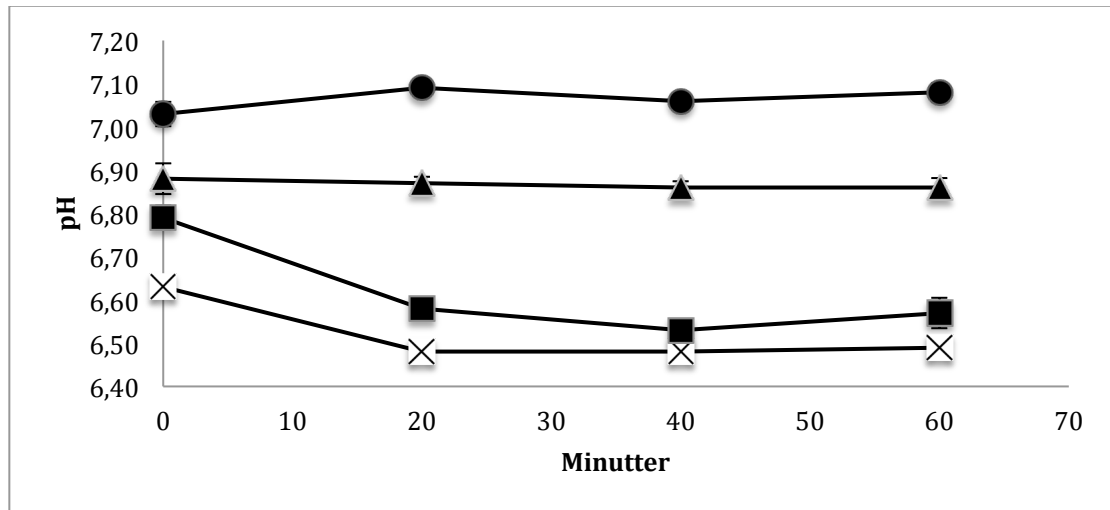
Figur 14b: Muskel-pH hos laks (n=3) fra 0-48 timer *post mortem*. Oppmalt i henholdsvis 0,15 M KCl (▲), 0,15 M KCl med 0,2 mM natriumiodoacetate (◆), 0,15 M KCl med 1 mM natriumiodoacetate (+), 0,15 M KCl med 5 mM natriumiodoacetate (■) og 0,15 M KCl med 20 mM natriumiodoacetate (x). Målt direkte i muskel med stikkelektrode (●).

4.6 Effekt av Na₂EDTA på pH i homogenisert laksemuskel

I dette forsøket ble det undersøkt om Na₂EDTA kunne hemme det raske fallet i pH i homogenisert laksemuskel. For prøven homogenisert med 5 mM Na₂EDTA var pH 6,63 ved tid 0 og pH 6,49 etter 60 min. Allerede etter 20 minutter var pH redusert til 6,48 (figur 15a). Fem timer pm ble pH funnet å være redusert til 6,40. Det ble målt frem til 48 timer og under lagringsperioden var det tilsynelatende en svak pH-økning til 6,49 ved 48 timer (figur 15b). I homogenatet uten enzymhemmer falt pH raskt fra cirka 6,79 ved tid 0 til pH 6,57 etter 60 min. Etter

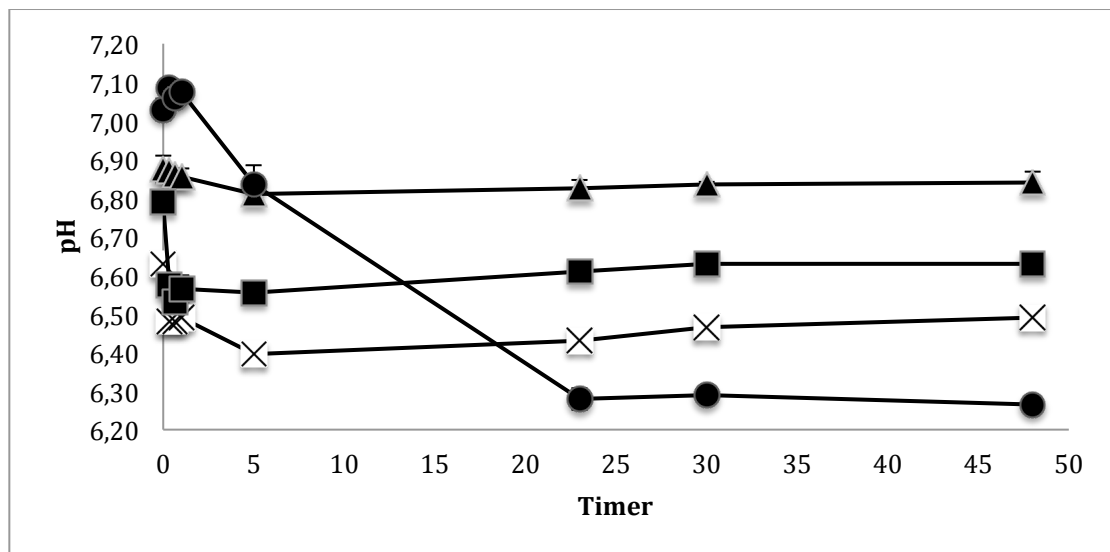
20 min pm var pH blitt redusert til 6,58 (figur 15a). Videre ut lagringsperioden til 48 timer holdt pH seg stabil rundt 6,60 (figur 15b).

For muskel homogenisert med 0,15 M KCl og 5 mM natriumiodoacetat ble verdiene funnet å være stabil ved cirka pH 6,85 gjennom hele lagringsperioden (figur 15a og 15b).



Figur 15a: Muskel-pH hos laks (n=2) fra 0-60 min *post mortem*. Oppmalt i henholdsvis 0,15 M KCl (▲), 0,15 M KCl med 5 mM natriumiodoacetate (■) og 0,15 M KCl med 5 mM Na₂EDTA (x). Målt i intakt muskel med stikkelektrode (●).

I intakt muskel ble pH målt med stikkelektrode til 7,03 ved tid 0 og 7,08 ved tid 60 min pm (figur 15a). Videre ble pH målt til 6,84, 6,28, 6,29 og 6,27 etter henholdsvis 5, 23, 30 og 48 timer (figur 15b).



Figur 15b: Muskel-pH hos laks (n=2) fra 0-48 timer *post mortem*. Oppmalt i henholdsvis 0,15 M KCl (▲), 0,15 M KCl med 5 mM natriumiodoacetate (■) og 0,15 M KCl med 5 mM Na₂EDTA (x). Målt i intakt muskel med stikkelektrode (●).

4.7 Muskel-pH i *post-rigor* laksemuskel

Det ble også gjennomført et forsøk for å undersøke om enzymhemmere påvirket muskel-pH i laksemuskel 3 dager *post mortem*. En del laksemuskel ble homogenisert med lik del 0,15 M KCl; 0,15 M KCl med 5 mM natriumiodoacetat og 0,15 M KCl med 5 mM Na₂EDTA. I homogenat tilsatt 0,15 M KCl med Na₂EDTA ble pH funnet å være 5,87. For muskel homogenisert i 0,15 M KCl med natriumiodoacetat var pH-verdien målt 6,15. Homogenisert muskel uten tilsatt enzymhemmer var pH målt til å være 6,14. I intakt muskel målt med stikkelektrode ble pH-verdien funnet å være 6,37 (tabell 1). I utgangspunktet var pH i løsningene 0,15 M KCl; 0,15 M KCl med 5 mM natriumiodoacetate og 0,15 M KCl med 5 mM Na₂EDTA, henholdsvis 5,07; 5,73 og 4,67 (tabell 1).

Tabell 1. Muskel-pH hos laks (n=2) 3 dager *post mortem*. Oppmalt i 0,15 M KCl, 0,15 M KCl med 5 mM natriumiodoacetat eller 0,15 M KCl med 5 mM Na₂EDTA. Målt direkte i muskel med stikkelektrode.

Løsninger	Muskel-pH
0,15 M KCl (pH = 5,07)	6,14
0,15 M KCl med 5 mM natriumiodoacetate (pH = 5,73)	6,15
0,15 M KCl og 5 mM Na ₂ EDTA (pH = 4,67)	5,87
I intakt muskel med stikkelektrode	6,37

4.8 Måling av laktatnivå i muskel

I et innledende forsøk ble et instrument beregnet for å måle laktatnivå i blod utprøvd på muskel. Ved måling i blod settes målestriben inn i instrumentet og en bloddråpe tilføres. Laktatverdien avleses etter 10 sekunder og måleområdet er 0,5 til 25 mM laktat. I forsøket med muskel fant vi at i intakt laksemuskel var laktatkonsentrasjonen 3,7 mM tid 0. Verdiene økte noe de første 40 minuttene til 6,3 mM og reduseres til 3,4 mM ved 60 minutt. For suspensjon som inneholdt oppmalt torskemuskel og kun KCl, er laktatnivået på 20,5 mM ved tid 0 og holder seg relativt stabilt de første 60 minuttene. For torskemuskel malt opp tilsatt natriumiodoacetat er laktatnivået 14,8 mM ved tid 0. Øker jevnt frem til 60 minutter hvor laktatnivået da blir funnet å være 19 mM (tabell 2).

Tabell 2. Laktatmåling i muskel hos laks (n=2) og torsk (n=3) fra 0-60 min *post mortem*. Oppmalt torsk i 0,15 M KCl, og i 0,15 M KCl og 5 mM natriumiodoacetat. Målingene er i mM laktat. \pm er standardavviket.

Tidspunkt (min)	Laks - i intakt muskel	Torsk - KCl	Torsk - Natriumiodoacetat
0	3,7 \pm 2,8	20,5 \pm 1,4	14,8 \pm 2,7
10	3,8 \pm 2,7	20,9 \pm 0,8	17,0 \pm 1,5
20	4,6 \pm 5,7	19,8 \pm 1,6	18,5 \pm 1,6
40	6,3 \pm 3,8	21,0 \pm 1,9	18,0 \pm 1,7
60	3,4 \pm 2,1	20,4 \pm 2	19,0 \pm 2,1

5 Diskusjon

Muskel-pH *post mortem* blir ofte analysert i vitenskapelige studier fordi det kan gi viktig informasjon om slaktebetingelser, og muligheter for prosessering i *pre-rigor*-fase. Muskel-pH kan måles på 2 måter; enten ved å bruke en stikkelektrode direkte i intakt muskel, eller male opp muskelen i nærvær av vann eller ofte 0,15 M KCl. Den sistnevnte metoden ble utviklet for 60-70 år siden. Oppmalingen foregikk da med tilstedeværelse av natriumiodoacetat, en hemmer som blokkerer cystein i det aktive sted på glycerinaldehyd-3-fosfat dehydrogenase. Mange studier av pH i oppmalt *pre-rigor* fiskemuskel har imidlertid blitt gjennomført uten å bruke denne enzymhemmeren. Fokus i denne oppgaven var å dokumentere hva som skjer med muskel-pH under slike forhold.

Oppmaling av *pre-rigor* laks- og torskemuskel med 0,15 M KCl både med og uten natriumiodoacetat, førte til en øyeblikkelig reduksjon i pH på 0,2-0,3 enheter. Cohen (1987) og Jeacocke (1984) har foreslått at ødeleggelse av vev fører til en stor frigjøring av kalsium som øker hastigheten på nedbryting av glykogen kraftig. I tillegg kan vevsødeleggelse føre til bedre kontakt mellom enzymer, substrat og kofaktorer og derved gi raskere glykolyse (Hamm & van Hoof 1971; Newbold & Scopes 1971; Nowland & Dyer 1974). Dutson (1983) har rapportert at i kjøtt vil hastigheten på glykolyse øke kraftig som følge av vevsødeleggelse. At slikt fall i pH skjer også når natriumiodoacetat er tilstede kan være forårsaket av at det tar en viss tid før enzymhemmeren kommer i kontakt med glycerinaldehyd-3-fosfat dehydrogenaseenzymet i glykolyse-stoffskiftevegen.

I vår undersøkelse av *pre-rigor* muskel fra begge fiskeslagene oppmalt i 0,15 M KCl så vi et pH-fall de første 60 minuttene. Dette betyr at glykolysehastigheten er rask i muskel oppmalt med bare 0,15 M KCl den første timen etter slakt. Deretter stabiliserte den seg, og holdt seg stabil den påfølgende lagringsperioden. For torsk og laks var disse "endelige" pH-verdiene henholdsvis cirka 6,75 og 6,5. I *pre-rigor* muskel oppmalt i 0,15 M KCl med 5 mM natriumiodoacetat holdt pH seg derimot gjennomgående stabil gjennom hele lagringstiden. Det vil si at etter det innledende fallet i pH ved tid 0, så er glykolyse i stor grad blokkert med enzymhemmeren. Utviklingen i muskel-pH gjennomført med stikkelektrode i intakt muskel samsvarer med resultater i

andre publikasjoner hvor muskel-pH har vært undersøkt på en slik måte (Einen *et al.* 2002; Kristoffersen *et al.* 2007; Erikson og Misimi 2008). Her ble det i likhet med vår undersøkelse funnet at pH i en ustresset fisk ved tid 0 er relativt høy, og holder seg stabil de første 60 minuttene. Deretter forekommer det en reduksjon i pH som skjer i løpet av 25-35 timer. Når pH stabiliserer seg så vil fisken gå inn i *rigor mortis*, fordi det er lite eller ingen ATP igjen. I intakt muskel ble disse pH-verdiene, gjerne kalt endelig eller ultimat pH, målt til å være 6,3 og 6,1 for henholdsvis torsk og laks. Dette er omtrent tilsvarende som tidligere funnet i fôret villfanget torsk (Kristoffersen *et al.* 2006b) og noe lavere enn for oppdrettslaks (Erikson & Misimi 2008). Den høyere "endelige muskel-pH" i homogenatet sammenlignet med intakt muskel, har så vidt jeg har funnet ut ikke vært rapportert tidligere. Årsaken til den høyere "endelig pH" i homogenatet er vanskelig å forklare, men en mulighet er at den raske reaksjonshastigheten tidlig i glykolysen, fører til tidlig inaktivering av enzymene. Resultatene fra publikasjonene som har undersøkt muskel-pH ved å male opp muskelen, men uten tilsetning av enzymhemmer har vist pH mellom 6,0-6,2 ved tid 0. Det har heller ikke vært observert den påfølgende reduksjonen i pH, før *rigor mortis*, vi fant ved bruk av stikkelektrode i intakt muskel (se for eksempel Fan *et al.* 2008; Bensid *et al.* 2014; Mendes *et al.* 2017). Slike publiserte resultater er derfor misvisende med tanke på pH-forandringer *post mortem* i en intakt filet. I dette arbeidet kunne intakt filet ha også blitt homogenisert på ulike tidspunkt *post mortem*. Men så lenge fisken er i *pre-rigor*-fase vil sannsynligvis en for lav pH blitt målt tilsvarende det vi fant ved tid 0.

Det ble ikke funnet noe økning av pH ved lagring i 5 dager (120 timer). Dette betyr som forventet at bakterieveksten i prøvene er begrenset.

I forsøk på å undersøke om oppmalingsgraden har betydning for fall i pH, ble muskelen homogenisert ulike antall ganger i perioder på 5 sekunder. Det ble ikke funnet noe betydelig forskjell i pH i homogenatene med ulik oppmalingsgrad. I torskemuskel var pH tilnærmet lik i homogenatene uavhengig av oppmalingsgrad. I laksemuskel ble pH i homogenatet oppmalt 5x5 sekunder funnet å være i gjennomsnitt 0,1 enheter under muskel oppmalt 1x5 og 3x5 sekunder den første timen, men utover i lagringsperioden var pH tilnærmet lik. Dette betyr at selv en kort periode oppmaling fører til akselerert glykolyse.

I undersøkelsen av effekten av ulike konsentrasjoner natriumiodoacetat på muskel-pH ble det funnet at konsentrasjon på 0,2 mM ikke er tilstrekkelig for å fullstendig hemme glykolysen. Ettersom det ble funnet reduksjon i pH fra tid 0 og utover i lagringsperioden. I homogenat tilsatt konsentrasjonene 1, 5 og 20 mM natriumiodoacetat, holdt pH seg stabil gjennom hele forsøksperioden, og det ble konkludert med at 1 mM natriumiodoacetat var tilstrekkelig for å fullstendig hemme glyceraldehyd-3-fosfat dehydrogenase. Men for å være på den sikre siden bør 5 mM brukes.

Det ble undersøkt om Na₂EDTA kunne brukes for å hemme det raske fallet i pH ved oppmaling av laksemuskel. Teorien var å bruke Na₂EDTA for å binde opp magnesium som enzymet 3-phosphoglycerate kinase er avhengig av for å virke, og dermed hemme glykolysen, Det har tidligere vært gjennomført et forsøk på embryo av mus, hvor at tilstedeværelse av Na₂EDTA førte til signifikant lavere nivåer av intracellulært magnesium (Lane & Gardner 2001). Allerede ved tid 0 ble det observert lavere pH i homogenatet tilsatt Na₂EDTA enn både homogenat kun tilsatt 0,15 KCl og homogenat tilsatt 0,15 M KCl med 5mM natriumiodoacetat. I tillegg følger Na₂EDTA-homogenatet samme pH-utvikling som homogenatet tilsatt bare KCl, med pH-fall de første 60 minuttene, før den stabiliserer seg ut lagringsperioden. I løsningen tilsatt Na₂EDTA, uten muskel, er pH nesten 0,4 enheter lavere enn løsningen kun tilsatt 0,15 KCl. Det kan antas at dette bidrar til denne lave pH-verdien. Konklusjonen er at det ikke er mulig å bruke 5 mM Na₂EDTA for å hindre pH-fallet i homogenatet.

Bruk av enzymhemmere på *post-rigor* muskel ble også undersøkt. Muskelstykkene av laks ble oppmalt 3 dager *post mortem*. Her ble det funnet at homogenatene tilsatt kun KCl og KCl med natriumiodoacetat hadde samme pH. I intakt muskel målt med stikkelektrode var pH nesten 0,2 enheter høyere enn i begge homogenatene. I følge Dutson (1987) skal det være mulig å bruke både metoden hvor muskel males opp eller måling direkte i intakt muskel ved pH-undersøkelse i *post-rigor* muskel. Det forklares med at all metabolsk aktivitet på dette tidspunktet er avsluttet. Resultatene vi har funnet stemmer ikke helt overens med den påstanden, ettersom pH i intakt muskel i våre funn er høyere enn pH i homogenatene. Dette kan skyldes tilfeldigheter, og undersøkelsen vår er kun gjennomført på 2 laks. Verdien i intakt muskel 3 dager pm var i dette

forsøket også cirka 0,2 enheter høyere enn hva vi fant i de første forsøkene med laks (se figur 10c). Alternativt så er ikke endelig muskel-pH oppnådd etter 3 dager i analysen av intakt muskel 3 dager pm.

I laktatmålingene ble det funnet at laktatnivået i homogenatet tilsatt natriumiodoacetat var noe lavere enn i homogenatet uten enzymhemmer. I muskelen var nivået mye lavere enn i begge homogenatene. Satt i sammenheng med forskjellen registrert i pH mellom homogenat og måling gjennomført i intakt muskel ved tid 0 er det naturlig. Ettersom opphopningen av laktat korrelerer med nedgangen i pH. Dermed vil det være naturlig at laktatnivået er høyere i homogenatet enn i muskelen. Det skal nevnes at instrumentet brukt til laktatmålingene er beregnet på blod og standardavviket i målingene, spesielt i intakt muskel, er stort. I tillegg er målingene i intakt muskel gjennomført på laks, men målingene gjennomført i homogenat er gjennomført på torsk. For å undersøke om dette instrumentet beregnet på blod også kan anvendes på muskel burde nok forsøket ha vært med omfattende. For eksempel analysert laktatinnholdet i intakt muskel på samme tidspunkt under lagring som pH med stikkelektrode.

6 Konklusjon

Bruk av stikkelektrode i intakt muskel er sannsynligvis den eneste pålitelige metode for å bestemme pH i en *pre-rigor* fiskemuskel. Oppmaling av muskel selv med glykolysehemmeren natriumiodoacetat, er lite egnet.

- Hastigheten av glykolysen bestemt med måling av pH, økte kraftig som følge av homogenisering.
- Bruk av natriumiodoacetat i løsningen tilsatt muskelvev før homogenisering, forhindret ikke det initielle fall i pH ved tid 0.
- I tillegg førte oppmaling av muskel med bare 0,15 M KCl til en misvisende høy "endelig" pH *post rigor*.
- Som forventet førte bruk av natriumiodoacetatet til at muskel-pH forble stabil høy under lengre tids lagring av homogenat.

Referanseliste

- Andersen, U. B., Thomassen, M. S. & Rora, A. M. B. (1997). Texture properties of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of diet, muscle fat content and time of storage on ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **74**, 347-353.
- Aoki, T., Yamashita, T. & Ueno, R. (2000). Distribution of cathepsins in red and white muscle among fish species. *Fisheries Science* **72**, 776-782.
- Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finola, M., Brambilla, G. & Marino, G. (2007). Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **263**, 52-60.
- Bahuaud, D., Gaarder, M., Veiseth-Kent, E. & Thomassen, M. (2010). Fillet texture and protease activities in different families of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **310**, 213-220.
- Bate-Smith, E. C. & Bendall, J. R. (1947). Rigor mortis and adenosinetriphosphate. *Journal of Physiology-London* **106**, 177-185.
- Bendall, J. R. (1973). Post mortem changes in muscle. I: *Structure and Function of Muscle*. Vol. 2, pp. 243-309.
- Bensid, A., Ucar, Y., Bendeddouche, B. & Ozogul, F. (2014). Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parametres of gutted and beheaded anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during chilled storage. *Food Chemistry* **145**, 681-686.
- Bowker, B. C., Borel, C., Swartz, D. R., Grant, A. L. & Gerrard, D. E. (2004a). Influence of myosin heavy chain isoform expression and postmortem metabolism on the ATPase activity of muscle fibers. *Meat Science* **68**, 587-594.
- Bowker, B. C., Grant, A. L., Swartz, D. R. & Gerrard, D. E. (2004b). Myosin heavy chain isoforms influence myofibrillar ATPase activity under stimulated postmortem pH, calcium and temperature conditions. *Meat Science* **67**, 139-147.
- Boyd, N. S., Wilson, N. D., Jerrett, A. R. & Hall, B. I. (1984). Effects of brain destruction on post harvest muscle metabolism in the fish Kahawai (*Arripis trutta*). *Journal of Food Science* **49**, 177-179.
- Bugeon, J., Lefevre, F. & Fauconneau, B. (2003). Fillet texture and muscle structure in brown trout (*Salmo trutta*) subjected to long-term exercise. *Aquaculture Research* **34**, 1287-1295.
- Burkitt, H. G., Young, B. & Heath, J. W. (1993). Muscle. In: *Wheaters Functional Histology*, Churchill Livingstone, London, pp. 93-11.
- Cai, L. Y., Wu, C. S., Li, X. X., Zhong, K. L., Li, Y. C. & Li, J. R. (2014). Effects of different freezing treatments of physicochemical responses and microbial characteristics of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicas*) fillets during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology* **59**, 122-129.
- Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton, M. D. & Verrez-Bagnis, V (2007). Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry* **101**, 1474-1479.

- Chiang, W., Strasburg, G. M. & Byrem, T. M. (2007). In *Food Chemistry: Principles and Applications*, 2nd ed. Y.H. Hui (Ed.), Science Technology System, West Sacramento, CA.
- Cohen, P. (1987). Molecular mechanisms involved in the control of glycogenolysis in skeletal muscle by calcium ions and cyclic AMP. *Biochemical Society Transactions* **15**, 122-129.
- Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. & Fleurence, J. (2004a). Relative contribution of calpain and cathepsins to protein degradation in muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Food Chemistry* **88**, 389-395.
- Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. & Fleurence, J. (2004b). Proteolytic potential in white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during post mortem storage on ice: time-dependent changes in the activity of the components of the calpain system. *Food Chemistry* **84**, 441-446.
- Delbarre-Ladrat, C., Cheret, R., Taylor, R. & Verre-Bagnis, V. (2006). Trends in postmortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganisation of the myofibrillar structure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **46**, 409-421.
- Dutson, T. R. (1983). *The measurement of pH in muscle and its importance to meat quality*. 36th Reciprocal Meat Conference Proceedings. Tilgjengelig: <http://www.meatscience.org/docs/default-source/publications-resources/rmc/1983/the-measurement-of-ph-in-muscle-and-its-importance-to-meat-quality.pdf?sfvrsn=2> Hentet: 30.10.2017.
- Einen, O. & Thomassen, M. S. (1998). Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*) II. White muscle composition and evaluation of freshness, texture and colour characteristics in raw and cooked fillets. *Aquaculture* **169**, 37-53.
- Einen, O., Guerin, T., Fjæra, S. O. & Skjervold, P. O. (2002). Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon. *Aquaculture* **212**, 129-140.
- Erikson, U. & Misimi, E. (2008). Atlantic salmon skin and fillet color changes effected by perimortem handling stress, rigor mortis and ice storage. *Journal of Food Science* **73**, C50-C59.
- Esaiassen, M., Dahl, R., Eilertsen, G., Gundersen, B. & Sivertsvik, M. (2008). Pre-rigor filleting and brining of farmed cod: Influence on quality and storage stability. *LWT – Food Science and Technology* **41**, 724-729.
- Fan, W. J., Chi, Y. L. & Zhang, S. (2008). The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice. *Food Chemistry* **108**, 148-153.
- Foegeding, E. A., Lanier, R. C. & Hultin, H. O. (1996). Characteristics of Edible Muscle Tissues. I: Fennema, O. R. (red.). *Food Chemistry, Third Edition*. Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp. 879-942.
- Fraser, D. J., Dingle, J. R., Hines, J. A., Nowland, S. C. & Dyer, J. (1967). Nucleotide degradation, monitored by thin-layer chromatography and associated post mortem changes in relaxed cod muscle. *Journal of Fish Research Board of Canada* **24**, 1837.
- Geesink, G. H., Morton, J. D., Kent, M. P. & Bickerstaffe, R. (2000). Partial purification and characterization of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) calpains and an evaluation of their role in post mortem proteolysis. *Journal of Food Science* **65**, 1318-1324.

- Godiksen, H., Morzel, M., Hyldig, G. & Jessen, F. (2009). Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry* **113**, 889-896.
- Haard, N. F. (1992). Control of chemical composition of food quality attributes of cultured fish. *Food Research International* **25**, 289-307.
- Hamm, R. & van Hoof, J. (1971). Influence of grinding of beef muscle on breakdown of adenosinetriphosphate and glycogen post mortem. *Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und-Forschung* **147**, 193-200.
- Hamm, R. (1977). Postmortem breakdown of ATP and glycogen in ground muscle: A review. *Meat Science* **1**, 15-39.
- Huff-Lonergan, E. & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science* **71**, 194- 204.
- Huss, H. H. (1983). Fersk fisk, kvalitet og holdbarhed. *Fiskeriministeriets forsøglaboratorium*. Danmarks tekniske højskole. 2800 Lyngby.
- Iwamoto, M., Yamanaka, H., Abe, H., Ushio, H., Watabe, S. & Hashimoto, K. (1988). ATP and creatine-phosphate breakdown in spiked plaice muscle during storage, and activities of some enzymes involved. *Journal of Food Science* **53**, 1662-1665.
- Jeacocke, R. E. (1984). The control of post-mortem metabolism and the onset of *Rigor Mortis*. In A. J. Bailey (Ed.), *Recent Advances in the Chemistry of Meat* (pp. 41-57). London: The Royal Society of Chemistry.
- Jerrett, A. R. & Holland, A. J. (1998). Rigor tension development in excised "rested", "partially exercised", and "exhausted" chinook salmon white muscle. *Journal of Food Science* **63**, 48-52.
- Joensen, J. K. (2014). *Effekt av fileterings- og frysetidspunkt på kvalitet av ferske og tinte pre-rigor produserte laksefileter*. Masteroppgave, Norges fiskerihøgskole, UiT Norges arktiske universitet.
- Kiessling, A., Stien, L. H., Torslett, Ø., Suontama, J. & Slinde, E. (2006). Effect of *pre- and post-mortem* temperature on rigor in Atlantic salmon muscle as measured by four different techniques. *Aquaculture* **259**, 390-402.
- Kristoffersen, S., Tobiassen, T., Steinslund, V. & Olsen, R. L. (2006a). 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.
- Kristoffersen, S., Tobiassen, T., Esaiassen, M., Olsson, G. B., Godvik, L. A., Seppola, M. A. & Olsen, R. L. (2006b). Effects of pre-rigor filleting on quality aspects of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research* **37**, 1556-1564.
- Kubota, M., Kinoshita, M., Kubota, S., Yamashita, M., Toyohara, H. & Sakaguchi, M. (2001). Possible implication of metalloproteinases in *post-mortem* tenderization of fish muscle. *Fisheries Science* **67**, 965-968.
- Kubota, M., Kinoshita, M., Takeuchi, K., Kubota, S., Toyohara, H. & Sakaguchi, M. (2003). Solubilization of type I collagen from fish muscle connective tissue by matrix metalloproteinase-9 at chilled temperature. *Fisheries Science* **69**, 1053-1059.
- Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. & Fleurence, J. (2003). In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chemistry* **81**, 517-525.

- Lane, M. & Gardner, D. K. (2001). Inhibiting 3-Phosphoglycerate Kinase by EDTA Stimulates the Development of the Cleavage Stage Mouse Embryo. *Molecular Reproduction and Development* **60**, 233-240.
- Lauritzen, K., Akse, L., Johansen, A., Joensen, S., Sørensen, N. K. & Olsen, R. L. (2004). Physical and quality attributes of salted cod (*Gadus morhua* L.) as affected by the state of rigor and freezing prior to salting. *Food Research International* **37**, 677-688.
- Lawrie, R. A. (1953). The onset of rigor mortis in various muscles of the draught horse. *The Journal of Physiology* **121**, 275-288.
- Lawrie, R. A. & Ledward, D. A. (2006). *Lawrie's Meat Science (7th ed.)*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited (Chapter 5).
- Li, T., Li, J., Hu, W. & Li, X. (2013). Quality enhancement in refrigerated red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets using chitosan coatings containing natural preservatives. *Food Chemistry* **138**, 821-826.
- Li, K. F., Luo, Y. K. & Shen, H. X. (2015). Post mortem changes in Crucian carp (*Carassius auratus*) During storage in ice. *International Journal of Food Properties* **18**, 205-212.
- Li, Q., Li, D., Qin, N., Hong, H. & Luo, Y. (2016). Comparative studies of quality changes in white and dark muscles from common carp (*Cyprinus carpio*) during refrigerated (4°C) storage. *International Journal of Food Science and Technology* **51**, 1130-1139.
- Love, R. M. (1988). *The food fishes: their intrinsic variation and partial implications*. Farrand press, London, pp. 3-99.
- Manju, S., Jose, L., Gopal, T. K. S., Ravishankar, C. N. & Lalitha, K. V. (2007) Effects of sodium acetate dip treatment and vacuum-packaging on chemical, microbiological, textural and sensory changes of Pearlscale (*Eurostius suratensis*) during chill storage. *Food Chemistry* **102**, 27-35.
- Martinez, I., Olsen, R. L., Nilsen, H. & Soerensen, N. K. (1997). Seafood: Fullfilling market demands. *Outlook on Agriculture* **26**, 107-114.
- Matos, E., Goncalves, A., Nunes, M. L., Dinis, M. T. & Dias, J. (2010). Effect of harvesting stress and slaughter conditions on selected flesh quality creteria of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **305**, 66-72.
- Mendes, J. M., Dairiki, J. K., Inoue, L. A. K. A. & Jesus, R. S. (2017). Advantages of recovery from pre-slaughter stress in tambaqui *Colossoma macropomumn*(Cuvier 1816) agroindustry in the Amazon. *Food Science and Technology* **37**, 383-388.
- Misimi, E., Erikson, U., Digre, H., Skavhaug, A. & Mathiassen, J. (2008). Computer vision- based evaluation of pre- and postrigor changes in size and shape of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets during rigor mortis and ice storage: Effects of perimortem handling stress. *Journal of Food Science* **73**, E57-E68.
- Morzell, M., Sohler, D. & Van de Vis, H. (2003). Evaluation of slaughtering methods for turbot with respect to animal welfare and and flesh quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 19-28.
- Mørkøre, T., Mazo, P. I., Tahirovic, V. & Einen, O. (2008). Impact of starvation and handling stress on rigor development and quality of Atlantic salmon (*salmo salar* L.). *Aquaculture* **277**, 231-238.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2000). *Lehninger principles of biochemistry, Third Edition*. Worth Publishet, New York, USA.

- Newbold, R. P. & Scopes, R. K. (1971). Post mortem glycolysis in ox skeletal muscles – effects of mincing and of dilution with or without the addition of orthophosphate. *Journal of Food Science* **36**, 209-214.
- Nowland, S. S. & Dyer, W. J. (1974). Effect of mincing on glycolytic activity in pre rigor Atlantic cod (*Gadus morhua*) muscle stored in ice or frozen. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **31**, 473-476.
- Offer, G. & Knight, P. (1988). Structural basis of water-holding in meat. Part 2. Drip losses. I: Lawrie, R. A. (red.). *Developments in Meat Science*. Elsevier Science Publications, London, England, pp. 173-243.
- Ouali, A. (1992). Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie* **74**, 251-265.
- Padieu, P. & Mommaerts, W. F. H. M. (1960). Creatine phosphoryl transferase and phosphorylglyceraldehyde dehydrogenase in iodoacetate poisoned muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* **37**, 72-77.
- Robb, D. H. F., Kestin, S. C. & Warriss, P. D. (2000). Muscle activity at slaughter: 1. Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. *Aquaculture* **182**, 261-269.
- Robergs, R. A., Ghiasvand, F. & Parker, D. (2004). Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **287**, 502-516.
- Roth, B., Slinde, E. & Robb, D. H. F. (2006). Field evaluation of live chilling with CO₂ on stunning Atlantic salmon (*Salmo salar*) and the subsequent effect on quality. *Aquaculture Research* **37**, 799-804.
- Roth, B., Grimsbo, E., Slinde, E., Foss, A., Stien, L. H. & Nortvedt, R. (2012). Crowding, pumping and stunning of Atlantic salmon, the subsequent effect on pH and rigor mortis. *Aquaculture* **326**, 178-180.
- Rustad, T. (1992). Muscle chemistry and the quality of wild and farmed cod. H.H. Huss, M. Jacobsen, J. Liston (Eds.), *Quality assurance in the fish industry*, Elsevier Science Publishers, BV, London, pp. 19-27.
- Schmidt, M. & Dringen, R. (2009). Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. *Frontiers in Neuroenergetics* **1**, 1-10.
- Scopes, R. K. (1974a). Studies with a reconstituted muscle glycolytic system. The anaerobic glycolytic response to stimulated tetanic contraction. *Biochemical Journal* **138**, 119-123.
- Scopes, R. K. (1974b). Studies with a reconstituted muscle glycolytic system. The rate and extent of glycolysis in stimulated post-mortem conditions. *Biochemical Journal* **142**, 79-86.
- Sato, K., Ando, M., Kubota, S., Origasa, K., Kawase, H., Toyohara, H., Sakaguchi, M., Nagawa, T., Makinidan, Y., Ohtsuki, K. & Kawabata, M. (1997). Involvement of type V collagen in softening of fish muscle during short-term chilled storage of chub macerel (*Scomber japonicus*). *Journal of Food Biochemistry* **26**, 415-429.
- Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Jogansen, S., Nordtvedt, T. S. & Seland, A. (1997). Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science* **62**, 898-905.

- Skjervold, P. O., Fjæra, S. O., Østby, P. B. & Einen, O. (2001). Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **192**, 265-280.
- St-Pierre, J., Brand, M. D. & Boutilier, R. G. (2000). Mitochondria as ATP consumers: Cellular treason in anoxia. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **97**, 8670-8674.
- Stryer, L. (1988). *Biochemistry*, 3. Utgave, W.H. Freeman and Company, New York.
- Varga, A., Palmai, Z., Gugolya, Z., Graczer, E., Vonderviszt, F., Zavodszky, P., Balog, E. & Vas, M. (2012). Importance of aspartate residues in balancing the flexibility and fine-tuning the catalysis of human 3-phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* **51**, 10197-10207.
- Weiseth, E., Fjæra, S. O., Bjerkeng, B. & Skjervold, P. O. (2006). Accelerated recovery of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) from effects of crowding by swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology, part-B* **144**, 351-358.
- Verma, R. P. & Hansch, C. (2007). Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**, 2223-2268.
- Wang, P. A., Vang, B., Pedersen, A. M., Martinez, I. & Olsen, R. L. (2011). *Post-mortem* degradation of myosin heavy chain in intact fish muscle: Effects of pH and enzyme inhibitors. *Food Chemistry* **124**, 1090-1095.
- Widmaier, E. P., Raff, H., Strang, K. T. & Vander, A. J. (2011). *Vander's Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*. McGraw-Hill, New York, USA.
- Wilkinson, R. J., Paton, N. & Porter, M. J. R. (2008). The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* **282**, 26-32.
- Yamashita, M. & Konagaya, S. (1990). Participation of cathepsin L into extensive softening of the muscle of Chum salmon caught during spawning migration. *Nippon Suisan Gakkaishi* **56**, 1271-1277.