

Verkefnaskýrsla Rf
21 - 06



Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins

Október 2006

**Notkun fiskpróteina í flakavinnslu -
Merkingarskylda**

Þóra Valsdóttir





Titill / Title	Notkun fiskpróteina í flakavinnslu. Merkingarskylda		
Höfundar / Authors	Þóra Valsdóttir		
Skýrsla Rf / IFL report	21 - 06	Útgáfudagur / Date:	Október 2006
Verknr. / project no.	1624		
Styrktaraðilar / funding:	AVS, Tækniþróunarsjóður Rannís		
Ágríp á íslensku:	<p>Skýrslan er samantekt um lög og reglugerðir sem lúta að breytingum á efnainnihaldi fiskafurða, þar sem megináhersla er lögð á að svara því hvort viðbætt fiskprótein í fiskafurðir séu merkingarskyld.</p> <p>Almenna reglan er sú að hver sú meðhöndlun á fiskafurðum, umfram hefðbundna vinnslu þeirra, sé merkingarskyld ef hún leiðir til breytinga á vörinni, svo sem m.t.t. samsetningar, efna- og eðliseiginleika.</p> <p>Ennfremur var leitað upplýsinga um aðferðir sem nota má til að mæla viðbætt efni, s.s. fosfat, vatn og fiskprótein, í fiskafurðum.</p>		
Lykilorð á íslensku:	<i>Merkingar, fiskur, vatn, prótein, fosfat, reglugerð, mæliaðferðir</i>		
Summary in English:	<p>This report contains a compilation of laws and regulations regarding changes in composition of fish products with the focus on the question “is labelling of added fish proteins in fish products required?”</p> <p>The basic rule is that every processing of fish products, which is additional to general processing procedures, needs to be labelled if it results in product changes, such as regarding composition, chemical- and physical properties.</p>		
English keywords:	<i>Labelling, fish, water, protein, phosphate, regulation, methods</i>		

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	1
2. MERKINGARSKYLDA VIÐBÆTTRA EFNA Í FISKAFURÐIR.....	2
3. AÐFERÐIR TIL GREININGAR.....	7
Viðbætt vatn.....	7
Viðbætt prótein.....	8
Viðbætt aukefni – fosfat.....	11
4. ÁLYKTANIR	13
5. ÞAKKARORÐ	14
6. HEIMILDIR.....	15
7. VIÐAUKI.....	18

1. INNGANGUR

Á undanförunum árum hefur það fæst í vöxt að bæta próteinum og aukefnum í sjávarafurðir í þeim tilgangi að auka nýtingu þeirra. Nokkuð hefur verið á reiki hvaða lög og reglur gilda um breytingar á efnainnihaldi fiskafurða sem og hver merkingarskylda viðbættra fiskpróteina sé.

Í þessari skýrslu er gerð grein fyrir 4. verkþætti í verkefninu “Notkun fiskpróteina í flakavinnslu”. Markmið verkþáttarins er að svara eftirfarandi spurningum: (1) hver er merkingarskylda viðbættra próteina í fiskafurðir (m.t.t. uppruna/tegundar, vinnsluferils próteina og hvernig þeim sé bætt í fiskafurðir) hér á landi og á öðrum markaðssvæðum, (2) hvaða reglur gilda um próteinafurðir sem hafa farið í gegnum efna- eða lífefnafræðilega ferla og (3) hvaða aðferðir eru notaðar til að greina og mæla viðbætt prótein, fosföt og vatn í sjávarafurðum.

2. MERKINGARSKYLDA VIÐBÆTTRA EFNA Í FISKAFURÐIR

Ekki er til sérstök reglugerð um fisk og fiskafurðir á Íslandi eða á evrópska efnahagssvæðinu. Líta verður því til almennrar reglugerðar um merkingar matvæla sem byggð er á reglum Evópusambandsins (ESB).

Í 7. grein reglugerðar um merkingu matvæla (503/2005)¹ kemur meðal annars fram: “Í vöruheiti eða í tengslum við það, skulu koma fram upplýsingar um ástand eða hvaða meðhöndlun matvæli hafa fengið, svo sem möluð, frostþurrkuð, hraðfryst, þykkt, reykt, í öllum þeim tilvikum þar sem skortur er á slíkum upplýsingum gæti villt um fyrir kaupandanum.” Samkvæmt þessari grein þarf að koma fram í vörulýsingu hvaða meðhöndlun varan hefur fengið og þó svo að t.d. sprautun efna í hold sé ekki tiltekin sérstaklega hér þá má túlka hana sem sérstaka meðhöndlun o.þ.l. merkingarskylda.

Ein þeirra spurninga sem komið hafa fram er hvort að merkja þurfi fisk sem t.d. smækkaður vöðvi/afskurður úr sama afla hefur verið sprautað í. Í 10 gr. sömu reglugerðar segir að “efnisþættir innihaldsefnis sem tímabundið hafa verið skildir frá framleiðsluferlinu og síðar bætt í aftur en ekki umfram upphafleg hlutföll” teljist ekki til innihaldsefna. Bendir þetta til þess að túlka megi smækkaðan afskurð sem “efnisþátt innihaldsefnis” (sem þá er flakið) og sé þ.a.l. ekki merkingarskyldur? Verður þetta að teljast grátt svæði því að þó svo að vissulega megi telja afskurð sem “efnisþátt” flaks, þá er búið að umbreyta honum (smækka) og hafa þannig áhrif á eiginleika hans.

Samkvæmt 9. grein reglugerðarinnar er innihaldslýsing óþörf þegar um er að ræða vörur úr einu hráefni þar sem vöruheitið er það sama og heitið á hráefninu eða er lýsandi fyrir hráefnið. Þá segir í 8. grein að “Öll innihaldsefni skal tilgreina eftir minnkandi magni eins og þau eru notuð við framleiðslu vörunnar”. Undantekning frá þessu er “Ef vatn reynist undir 5% af nettóþyngd vörunnar er ekki skylt að tilgreina það í

¹ Sömu upplýsingar er að finna í Codex Alimentarius Food Labelling

*innihaldslýsingu*² og ekki þarf að tilgreina samsett innihaldsefni sem eru skilgreind skv. sérreglugerðum og eru minni en 2% af lokaafurð eða blöndur af kryddjurtum án aukefna sem eru minna en 2% af lokaafurð.

Notkun próteina af öðrum fisktegundum í flök er merkingarskyld skv. 9. grein sem og Viðauka 1. í reglugerð um merkingu matvæla. Þar kemur fram að heimilt sé að merkja innihaldsefni með flokksheiti (í þessu tilviki Fiskur) í stað sérheita “*Allar fisktegundir, þar sem fiskurinn er hluti af innihaldi í öðrum matvælum, að því tilskildu að hvorki vöruheiti né merking matvælnanna gefi til kynna sérstaka fisktegund*”. Þar sem fiskur með viðbættum próteinum er almennt seldur undir sérheiti fisksins er augljóst að prótein úr öðrum fisktegundum eru merkingarskyld.

Þó svo að í Reglugerð um aukefni (285/2002) sé gefið til kynna að aukefni séu “efni sem aukið er í matvæli til þess að hafa áhrif á geymsluþol, lit, lykt, bragð eða aðra eiginleika matvæla... og að í fullunninni vöru séu “*aukefni til staðar að öllu leyti eða að hluta, í breyttri eða óbreyttri mynd,*” hafa fiskprótein (jafnvel unnin) ekki verið skilgreind sem aukefni (Codex Stan 107, 1981).

Eins og fram hefur komið er ekki til sérreglugerð um fisk og fiskafurðir. Nýlega tók gildi sérreglugerð um kjöt og kjötvörur (331/2005) sem hafa má til tilsjónar³. Í kjötreglugerðinni má sjá að kjöti og kjötvörum er skipt í flokka (4.grein) eftir því hvort um er að ræða “hreinar kjötvörur” (ekkert aukið í), “kjöt og kjötvörur með viðbættu vatni” (viðbætt vatn yfir 10% í hrárrí afurð eða 5% í soðinni afurð, einungis vatni og aukefnum bætt í), “blandaðar kjötvörur” (vörur unnar úr kjöti með því að hluta það, brytja í bita eða hakka og blanda það eða hjúpa með öðrum hráefnum og/eða aukefnum), þurrkryddað og kryddlegið kjöt, sláturmatur, saltaðar vörur, farsvörur, hrápylsur og kjötsultur. Sérstök grein (9gr.) fjallar um viðbætt vatn. Þar kemur fram að “*Vatn, sem aukið er í kjöt í heilum stykkjum (eða í endurmótaðar vörur sem líta út eins og heilir vöðvar), skal tilgreina í tengslum við vöruheiti ef magn þess fer yfir 5% í soðnum vörum*

² Vatnsinnihald skal reiknað með því að draga þyngd annarra innihaldsefna frá heildarþyngd lokaafurðar.

eða 10% í hráum vörum. *Jafnframt skal tilgreina magn kjöts í innihaldslýsingu*” [og í tengslum við heiti] ef merking gefur til kynna magn eða undirstrikar mikilvægi eins eða fleiri kjöttegunda (eða annarra innihaldsefna), eða ef ákveðnar kjöttegundir (eða önnur innihaldsefni) eru venjulega tengd heiti matvæla. Ekki eru sérstaklega teknar fyrir merkingar á kjöti sem hefur fengið aðra meðhöndlun en minnst er á í 4. grein í reglugerð um kjöt og kjötvörur (s.s. sprautaðar með próteinum) og því gilda ákvæði í almennri merkingarreglugerð (503/2005) í þeim tilvikum.

Ef litið er til landanna í kringum okkur sést að svipuð ákvæði er að finna í almennum reglugerðum, en það er nokkuð misjafnt hversu langt á veg yfirvöld eru komin með sérákvæði hvað varðar viðbætt efni í sjávarafurðum.⁴ Hér að neðan eru dæmi um hvernig litið er á þessi mál í Bretlandi, Kanada og Bandaríkunum.

Í **Bretlandi** eru þær kröfur gerðar til þeirra sem selja ferskan, kældan eða frosinn fisk, í lausu eða í neytendaumbúðum, að hann sé m.a. merktur með réttu heiti (“true name of the food”), framleiðsluaðferð, veiðisvæði, aukefnum og *hverri þeirri meðhöndlun eða vinnslu sem fiskurinn hefur farið í gegnum* (CEDRIC, 2005). Í raun gilda sömu reglur héraendis, að því undanskildu að ekki er tiltekið ákvæðið um merkingu veiðisvæðis í íslenskum reglum um merkingar.

Samkvæmt upplýsingum frá Maríu Andruczyk (2005) hjá Sjávarafurðadeild **kanadísku** matvælaeftirlitsstofnunarinnar (Canadian Food Inspection Agency) er þar í vinnslu stefnumótun varðandi merkingu á sprautuðum dýraafurðum. Þangað til þarf að gefa skýrt til kynna ef flök hafa verið sprautuð s.s. “*X flök sprautuð með*” eða “*X flök – innihalda allt að Y% lausnar af (nefna öll hráefni)*”. Ekki skiptir máli hvaða lausn er um að ræða eða í hvaða magni hún var sprautuð, öll hráefni lausnarinnar þurfa að koma fram í

³ Ath. þó: kjötreglugerðin þarf ekki endilega að gefa vísbendingu um það sem vænta má í reglugerð um fisk. Sérstaklega ekki ef fiskreglur koma frá ESB, kjötreglugerðin hér á Íslandi er séríslensk þar sem kjötið er ekki inn í ESB samningnum.

⁴ Það eiga að vera sömu reglur í öllum ESB löndum, löndin hafa þó heimild til að búa til eigin reglur (eins og sérreglugerðir) ef þær eru ekki til hjá ESB en verða að tilkynna það til ESB.

innihaldslýsingu. Fiskflök sprautuð með fiskpróteinum eru skilgreind sem nýfæði⁵ í Kanada og því þarf að hafa Heilbrigðisstofnun Kanada (Health Canada) með í ráðum vegna notkunar þeirra.

Í **Bandaríkjunum** teljast fiskprótein, sem sprautað er í fiskvöðva sem hráefni en ekki aukefni og þau verður að tiltaka á merkimiða eða í vörulýsingu. Þá telst hvert það matvæli sem hefur farið í gegnum sprautunarferli sem “unnin vara” og getur því ekki verið kynnt/merkt sem “ferskt” eða “ferskt frosið” matvæli (Brunetti, 2005). Samkvæmt Brunetti hjá Food and Drug Administration (FDA), Center of Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), þarf sérhvert hráefni sem sett er í matvæli að vera annað hvort aukefni eða litarefni sem er notað samkvæmt sértækri reglugerð (21 Code of Federal Regulations (CFR)) eða hráefni sem er almennt talið öruggt (GRAS) (21CFR:182/184). Tvö fiskprótein falla undir reglugerðarluta 172 (21CFR:172.340/172.385).

Í 21CFR hluta 172.385 er tekið fyrir próteinþykkni (protein concentrate) úr heilum fiski, sem ýmist má nota sem próteinbætiefni til neyslu eða í matvælaframleiðslu. Þar kemur m.a. fram að það samanstandi í meginatriðum úr þurrkuðu próteindufti, unnu úr heilum fiski án þess að fjarlægja haus, ugga, sporð, innnyfli eða innihald þarma. Það er útbúið með því að fjarlægja fitu og vatn/raka með útdrætti og þurrkun (hluti beina er fjarlægður). Sérstaklega er tiltekið í reglugerðinni að þær vörur sem innihalda próteinþykknið þurfa að hafa í innihaldslýsingu sinni “próteinþykkni úr heilum fiski” (sjá nánar viðauka 1).

Í öðrum hluta, 172.340, er tekið fyrir fiskpróteinisolat (Fish protein isolate). Þar kemur fram að það eigi að samstanda af þurrkuðu próteini úr ætum hluta fisks eftir að búið er að fjarlægja haus, ugga, sporð, bein, innnyfli og innihald þarma. Það skal vera fengið úr einni tegund af fisk og vera fengið með því að fjarlægja fitu og vatn/raka með útdrætti og þurrkun. Ekki er sérstaklega tekið fram hvernig merkja skuli vörur sem innihalda fiskpróteinisolatið (sjá nánar viðauka 1).

⁵ Er ný vinnsluaðferð á fiski og getur valdið breytingum á sprautuðu próteinunum og/eða í lokaafurðinni.

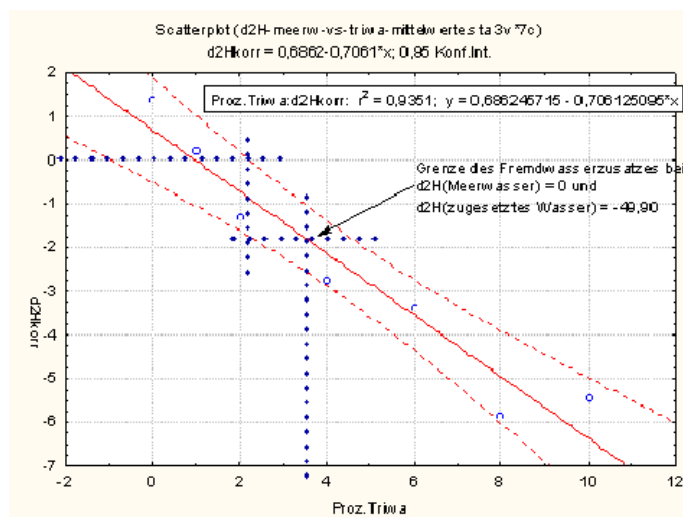
Þó svo að ekki séu til bandarískar reglugerðir sem sérstaklega taka fyrir sprautun á próteinum í fisk, hefur FDA nýlega gefið ummæli um GRAS stöðu á ákveðnum fiskpróteinum ætlaðum til innsprautunar í fiskflök (Agency Response Letter - GRAS Notice No. GRN 000147 (26 ágúst, 2004)). Ummæli FDA eiga við útdregin fiskprótein frá Proteus Industries Inc. Þar viðurkennir FDA GRAS stöðu útdreginna fiskpróteina (sýruleysniaðferð) frá Proteus til notkunar sem próteingjafa í tilbúna sjávarafurðir (ferskar eða frosnar) af sömu tegund og útdregnu fiskpróteinin. Próteinunum er bætt við með sprautun í flök, þæklun eða tromlun undir þrýstingi í þeim tilgangi að draga úr rúmmálsminnkun og auka vatnsinnihald meðan próteininnihald helst stöðugt í matreiddri vöru. Salti getur verið bætt aftur í próteinlausnina, þó ekki meira en sem nemur upprunalegu saltinnihaldi vöðvans (sjá nánar viðauka 1).

Af framangreindu má álykta að viðbætt prótein í fiskafurðir séu almennt merkingarskyld. Ekki er gerður greinamunur, m.t.t. merkingarskyldu, á því hvernig próteinin hafa verið unnin, þ.e. hvort þau hafa farið í gegnum efnaferla eða ekki. Í Bandaríkjunum og Kanada er krafist leyfis til notkunar próteina í fiskafurðir og ný vara þarf því að fara í gegnum “vottunarferli”. Reglugerðir í Evrópu eru ekki jafn skýrar hvað þetta varðar en gera má ráð fyrir að sama gildi þar.

3. AÐFERÐIR TIL GREININGAR

Viðbætt vatn

Það virðast ekki vera margar aðferðir til staðar til að greina viðbætt vatn í fiski. Líklega er algengast að kanna hlutfallið milli vatns og próteins og bera það saman við náttúrulegt hlutfall í fiskinum. Þegar próteinum er einnig bætt í fiskinn verður hinsvegar erfiðara að greina viðbættu vatnið. Dr. Klaus Meylahn hjá Matvælastofnunni í Oldenburg er um þessar mundir að vinna að aðferð/kenningu sem hugsanlega er hægt að nota til að greina viðbætt vatn í fiskholdi. Hún byggist á því að greina stöðug frumefni í fiski. Hlutfallið á milli stöðugra ísótópa af vetni og/eða súrefni breytist þegar vatn, annað en sjórinn sem fiskurinn lifir í, er bætt í holdið. Eðlileg delta-gildi fyrir d2H og d18O í líkamsvökva fiska er nálægt núlli. Með því að bæta vatni (drykkjarvatn) við, t.d. í formi fosfatslausnar, breytast þessi gildi. Því meiri munur sem er á milli ísótópa (delta-gildi) sjávar og viðbættu vatnsins (drykkjarvatn er almennt með mun lægri gildi), því meiri breyting ætti að verða á delta-gildum þeirra fiska sem hafa fengið fosfatmeðhöndlun. Dr. Meylahn og félagar hafa prófað að mæla missterkar blöndur af drykkjarvatni í sjó og fundu út að unnt væri að mæla áhrif drykkjarvatns þegar það er meira en 4% fyrir d2H eða meira en 7% fyrir d18O (mynd 1). Enn sem komið er hafa þau ekki borið saman fisksýni með viðbættu vatni og án, því er ekki ljóst hversu vel gengur nota þessa aðferð til að greina viðbætt vatn frá öðru vatni í holdi fiska.



Mynd 1. Graf er sýnir gildi d2H sjós sem fall af magni drykkjarvatns (%), meðaltalsgildi (95% öryggismörk). Örin bendir á greiningarmörk framandi, viðbætt, vatns í blöndu af d2H(sjór) =0 og d2H(viðbætt vatn)=-49,90 (Meylahn, 2005).

Viðbætt prótein

Viðbættu próteini í fiskvöðva má skipta í tvo flokka. Annars vegar viðbætt prótein af sömu tegund og hinsvegar prótein af annarri tegund. Að mörgu leyti er auðveldara að greina viðbætt prótein af annarri tegund í fiskflökum og eru til fjölmargar aðferðir til tegundargreiningar á fiski/fiskpróteinum. Í dag ber mest á þeim sem eru byggðar á rafdrætti eða á DNA aðferðum.

Isoelectric Focusing (IEF) er líklega útbreiddasta rafdráttaraðferðin til tegundargreiningar. Hún hefur verið mjög vinsæl, bæði í Evrópu og Bandaríkjunum, til að koma í veg fyrir vörusvik, þ.e. að ódýrari fisktegund sé blandað við dýrari eða beinlínis seld sem slík. FDA notar t.a.m. IEF til greiningar á fersku, frosnu og hráu sjávarfangi í The Regulatory Fish Encyclopedia (RFE) (AOAC 980.16). Isoelectric focusing (IEF) er rafdráttaraðferð (electrophoretic method) sem aðskilur vatnsleysanleg prótein eftir jafngildispunktum þeirra (pI).⁶ Af öðrum viðurkenndum rafdráttaraðferðum má nefna AOAC⁷ aðferðirnar Starch Gel-Zone Electrophoresis Method (AOAC 962.15), Acrylamide Disc Electrophoresis Method (AOAC 967.14) og Cellulose Acetate Strip Method (AOAC 970.32) (sjá nánar viðauka).

Rafdráttaraðferðir til tegundagreininga hafa sínar takmarkanir. Er það einkum í þeim tilfellum sem matvælin hafa verið unnin mikið (s.s. hitameðferð, marinerung eða þrýstingur) og þar af leiðandi valdið afmyndun próteinanna (Etienne, 2001; Woolfe, 2004), og til aðgreiningar á sumum mjög náskyldum tegundum (s.s. laxi og silungi) (Woolfe, 2004).

Ef mælingarnar eru skoðaðar út frá einfaldleika og hraða, væru aðferðir sem byggðust á mótefnum hentugastar. Ókosturinn við þær er hinsvegar að aðeins takmarkaður fjöldi af

⁶ Prótein eru amphoteric sameindir; þau bera ýmist jákvæða, neikvæða eða núll nettó hleðslu, háð amínusýrusamsetningu þeirra og sýrustigi umhverfisins. Nettóhleðsla próteins er summa allra jákvæðra og neikvæðra hleðsla amínó- og karboxylenda auk amínósýruhliðarkeðja þeirra. Jafngildispunkturinn er það sýrustig sem nettóhleðsla próteinsins er núll. Prótein eru jákvætt hlaðin við sýrustig lægra en pI þeirra og neikvætt hlaðin við sýrustig hærra en pI þeirra.

⁷ Association of analytical communities.

ónæmisprófum hefur verið þróaður og ekkert er fáanlegt á almennum markaði. Af þessum sökum hafa DNA aðferðir orðið sífellt vinsælli til aðgreiningar og greiningar á tegundum þar sem unnt er að greina DNA í nánast öllum unnum sýnum.

Nokkrar mismunandi DNA aðferðir hafa verið notaðar til greiningar á fisktegundum. Byggjast þær á því að nota PCR (polymerase chain reaction) á mismunandi svæði DNA s.s. SSCP (single strand conformation polymorphism) (Cespedes et al., 1999), PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Cespedes et al., 1998; Hold et al., 2001; Russel et al., 2000; Sanjuan & Comesana, 2002; Sotelo et al., 2001) og RAPD (random amplified polymorphic DNA) fingraför (Asensio et al., 2002; Bielawsk & Pumo, 1997). SSCP mynstur geta verið notuð í þeim tilfellum sem tegundir eru mjög náskyldar (Dooley, 2005). RAPD er auðvelt að mynda og þarfnast engrar fyrri vitneskju um DNA raðir þeirra tegunda sem eru til skoðunar. Breytileiki á milli sýna af sömu tegund er hinsvegar hár og því er aðferðin ekki mikið notuð (Dooley, 2005). PCR-RFLP aðferðin hefur aftur á móti komið vel út, t.d. í samanburði á milli tólf rannsóknarstofnanna í Evrópu þar sem greindar voru m.a. laxategundir í sýnum sem innihéldu ýmist DNA eða vöðva (hráa og soðna) úr einni fisktegund eða blöndu af tveimur eða þremur (Hold et al., 2001). Þá hefur hún einnig sýnt notagildi sitt til aðgreiningar á milli níu mismunandi flatfisktegunda (kæld og frosin sýni) (Sanjuan, 2002).

Það hefur verið bent á (Dooley, 2005; Asensio, 2002) að þrátt fyrir að þessar DNA aðferðir henti vel til að bera kennsl á tegundir, þá séu þær ekki eins áreiðanlegar fyrir sýni sem innihalda blöndu af mismunandi tegundum og geta ekki magngreint fisktegundir sem eru til staðar í vörunni. Þær byggjast á rafdrætti á geljum og litun til lokagreiningar sem gefi ekki alltaf sömu niðurstöðu. Í stað gelja, notuðu Dooley et al (2005) Ailent 2100 Bioanalyser til PCR-RFLP lokagreiningar á sýnum af laxi og silungi. Tókst þeim að greina allt niður í 5% af laxDNA í blöndu við silungsDNA, en ekki nema niður í 25% af silungsDNA í blöndu við laxDNA. Agilent 2100 Bioanalyser sameinar hefðbundna hárpípu rafdráttartækni (capillary electrophoresis (CE)) (aðskilnað efna og greining) á bita/flísa form sem auðvelt er í notkun (LabChip®). Samkvæmt þeim er þessi aðferð líkleg til að vera aðgengilegri fyrir hinar ýmsu rannsóknarstofur þar sem tæki og efni eru mun ódýrari en í hefðbundinni DNA greiningu.

Mun minna er fjallað um aðferðir til greiningar á viðbættum próteinum af sömu fisktegund og flökin eru. Algeng aðferð til að meta hvort að fiskur innihaldi viðbætt prótein (óháð hvaðan þau koma) er að skoða hlutfallið á milli vatns og próteins í fiskvöðvanum. Hafi vatni hinsvegar einnig verið bætt við vandast málið. Þar sem mismunandi prótein eru tjáð í ólíkum líffærum og vefjum, geta próteinmynstur verið mismunandi fyrir sama einstaklinginn. Það hafa þó ekki verið þróaðar aðferðir til greiningar á viðbættum próteinum (svo vitað sé) sem byggjast á þessu. Woolfe (2004) greinir frá því að þróaðar hafi verið DNA aðferðir sem byggjast á því að metýlunarástand genaprómótera í vöðvavefjum er frábrugðið því sem er í öðrum vefjum. Hefur “mengun” vöðvavefjar með m.a. taugavef, heilavef, lifrarvef, mænuvef, nýrnavef og hjartavef verið greind, allt niður í 0,01% (mænuvefur).

Viðbætt aukefni – fosfat

Virkni fosfata í vöðvum felst í bindingu við málmjónir og sundrun aktomýosíns⁸ sem veldur aukningu á vatnsheldni. Auk þess hækka þau sýrustig vöðva. Nokkrar tegundir polyfosfata eru notaðar í kjöt- og fiskiðnaðinum og hafa þau mismunandi eiginleika. Þau sem hafa lága fjölliðun (mono og difosföt) auka vatnsheldni vöðva en notkun þeirra er takmörkuð af lágri og hægri leysni þeirra, sérstaklega í köldum pækli. Hinsvegar eru þrifosföt leysanlegri og leysast hratt upp en áhrif þeirra á vatnsheldni eru hæg þar sem þau þurfa að umbreytast (ensímatískt og sýrurof (enzymic and acid hydrolysis)) í pyrofosföt. Af þessum sökum fæst mest virknin með blöndu af polyfosfötum með mismunandi keðjulengdir (Dusek et al., 2002).

Í dag er notkun fosfats í bæði kjöt og fiskafurðir mjög útbreidd. Tilraunir til að fylgjast með þessari notkun með því að mæla magn heildarfosfats (s.s. AOAC, 1990) í matvælum hafa verið takmarkaðar af því að magn viðbættis fosfats er almennt minna en náttúrulegur breytileiki á magni fosfats í fiski. Tilraunir til að ákvarða viðbætt fosfat frá því sem náttúrulega er til staðar, hafa einkum tengst þáttbundnum (qualitative) aðskilnaði með þunnlagsskiljun (TLC) eða magnbundnum aðskilnaði og greiningu á fosfatfjölliðum með HPLC. Reece og Russel (1994) notuðu t.a.m. HPLC til greininga á leysanlegum fosfötum í ýsu og rækju sem hafði verið dýft í fosfatlausn (5% natrium tetra polyfosfatlausn). Var unnt að magngreina fosfatfjölliður allt upp í P₁₀ lengd, hinsvegar var greiningarkerfið ekki nægjanlega nákvæmt fyrir lengri fosfatsfjölliðurnar (breikkun toppa og óstöðugari grunnlína vegna lengri mælitíma) m.t.t. magns- og tegundargreiningar. Við geymslu í ís brotnuðu styttri fosfatsfjölliðurnar (P₂-P₄) mun hraðar niður en þær lengri, sem bendir til þess að unnt sé að nota lengri fjölliðurnar sem vísbendingu um viðbætt fosfat í fiski. Greining með HPLC virðist því vera vænleg leið, einkum er greiningarkerfið verður nákvæmara.

⁸ Aktomýosín er próteinsamstæða úr aktíni og myosíni, þ.e. vöðvaþráðunum sem sjá um samdrátt vöðva. Orkan sem þarf til þessara vöðvahreyfinga kemur frá vatnsrofi ATP. Í lífvana vöðva er actomýosín samstæðan aðalform aktíns og mýosíns því ATP hefur verið eytt með efnaskiptum sem eiga sér stað eftir dauða og nær því ekki að losa myosín frá aktíni.

Dusek et al. (2002) reiknuðu út frá magni fosfats og próteina í kjöti nýtt hlutfall af fríu (án próteins) fosfati/prótein (16 ± 2 mg/g). Magn viðbætts fosfats var síðan reiknað út frá magni leysanlegs fosfats (ákvarðað með capillary isotachophoresisi (CITP)), próteinmagni (ákvarðað með Kjeldahl aðferð) og framangreindu hlutfalli. Aðferðinni bar vel saman við staðalaðferð við ákvörðun á fosfati, litrófsljósmælinga-þurrkunaraðferð (spectrophotometric dry-ashing) (AOAC, 1990; AOAC, 1984; Cattaneo & Balzaretti, 1997, Pulliainen & Wallin, 1994).

Á 34. WEFTA fundinum 2004 kynnti Kruse nýja aðferð er felur í sér magnbundna greiningu á fosfati í ferskum og frosnum fiski og kallast Thermo Differential Photometry. Aðferðin er háð mismunandi hvarfhraða monofosfatanóða (monophosphate anodes) annars vegar og hinsvegar polyfosfata (tví-og þríanóða), sem er umbreytt í gula fosfóvanadic-molybdicsýru (er algengt skref í fosfatgreiningum sem byggjast á ljósmælingum). Mismunurinn í hreyfihegðun býður upp á auðveldla og áreiðanlega leið til að mægnreina polyfosföt í viðbót við venjulega greiningu á mónofosfati. Greiningarmörk eru á bilinu 0,1-0,2 mg/g (Kruse, 2004).

4. ÁLYKTANIR

Samanburður á milli landa (Ísland, UK, USA, Kanada) leiddi í ljós að þrátt fyrir mismunandi leiðbeiningar og reglugerðir þá er útkoman í meginatriðum sú sama, þ.e. viðbætt prótein sem og önnur viðbætt efni í fiskafurðir sem eru til staðar í lokaafurð eru merkingarskyld, nema það komi beint fram í nafni vörunnar (sbr. saltfiskur eða léttsaltaður, þá er t.d. augljóst að varan inniheldur viðbætt salt). Hvernig viðbætt prótein eru unnin virðist ekki skipta máli, einungis að vara sem áður var “óunnin” verður “unnin” og getur því ekki verið seld sem fersk eða fersk frosin þar sem orðið ferskt felur í sér að fiskurinn sé ekki meðhöndlaður umfram hefðbundna vinnslu. Sprautun flokkast t.d. ekki sem hefðbundin vinnsla.

Fljótvirkar, sértækar mælingar sem geta mælt viðbætt vatn, prótein og fosföt á áreiðanlegan máta, hafa ekki verið aðgengilegar. Á undanförunum árum hefur hinsvegar mikil framþróun átt sér stað hvað þetta varðar og eru aðferðir að verða sífellt sértækari og nákvæmari. Aðferðir til greiningar á viðbættum efnum eru orðnar misaðgengilegar eftir því um hvaða efni er að ræða. Það má þó gera ráð fyrir að úr því rætist frekar á næstu árum vegna síaukins þrýstings á yfirvöld til mótunar reglugerða sem taka á þessum málum, aukinni neytendavernd og samkeppni milli framleiðenda.

5. ÞAKKARORÐ

Höfundur þakkar AVS-sjóði og Tækniþróunarsjóði fyrir veittan styrk til verkefnisins „Fiskprótein í flakavinnslu“. Sesselíu Maríu Sveinsdóttur hjá Umhverfisstofnun, Maríu Andruczyk hjá Canadian Food Inspection Agency og Antonio Brunetti hjá Food and Drug Administration er þökkuð ráðgjöf.

6. HEIMILDIR

Amersham Biosciences (2005)

http://www1.amershambiosciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/elpho_applications%5Celpho_applications_1d_protein_analysis%5Celpho_ief_separation (lesið á netinu 27/09/06).

Andruczyk M. (2005). Tölvusamskipti.

AOAC (1984). Phosphorus (total) in meat. 24.015. In Official methods of analysis (14th ed.) Arlington: AOAC Inc.

AOAC (1990). Acrylamide Disc Electrophoresis Method. 967.14. In Official Methods of Analysis (15th ed.). Arlington: AOAC Inc.

AOAC (1990). Cellulose Acetate Strip Method. 970.32. In Official Methods of Analysis (15th ed.). Arlington: AOAC Inc.

AOAC (1990). Phosphorus in meat. Automated method. 972.22. In Official methods of analysis (15th ed.) Arlington: AOAC Inc

AOAC (1990). Thin Layer Polyacrilamide Gel, Isoelectric Focusing Method. 980.16. In Official Methods of Analysis (15th ed.). Arlington: AOAC Inc.

AOAC (1990). Starch Gel-Zone Electrophoresis Method. 962.15. In Official Methods of Analysis (15th ed.). Arlington: AOAC Inc.

Asensio L., Gonsalez I., Fernandez A., Rodriques M.A., Lobo E., Hernandez P.E., Garcia T., Martin R. (2002). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for identification of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*) and Nile perch (*Lates niloticus*) filets. Journal of Food protection, 65(2), 432-435.

Ask CEDRIC – 10. Selling Fish (2005). Cambridgeshire CC Trading Standards Service UK.

<http://www.askcedric.org.uk/businesses.php?busid=229&listid=100&sec=10#anchor3> (lesið á netinu 27/09/06).

Bielawsk J.P., Pumo D.E. (1997). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic Coast striped bass. Heredity, 78(1), 32-40.

Brunetti A. (2005). Tölvusamskipti.

Cattaneo P., Balzaretto C. (1997). Fosforo totale nei prodotti canei e metodi per la determinazione. Ingegneria Alimentare, 1, 7-13.

Cespedes A., Garcia T., Carrera E., Gonzales I., Sanz B., Hernandez P.E., Martin R. (1998) Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction analysis of the cytochrome b gene. *Journal of Food Science*, 63, 206-209.

Cespedes A., Garcia T., Carrera E., Gonzales I., Fernandez A., Hernandez P.E., Martin R. (1999). Application of polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) to identification of flatfish species. *Journal of AOAC International*, 82, 903-907.

Codex Alimentarius - Food Labelling - Complete text (2001). Codex Alimentarius Commission, Róm.
http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/DOCREP/005/Y2770E/Y2770E00.HTM (lesið á netinu 27/09/06).

Dooley J., Sage H.D, Brown H.M., Garrett S.D. (2005). Improved fish species identification by use of lab-on-chip technology. *Food Control* 16 (2005) 601-607.

Dušek M., Kvasniča F., Lukášková L., Krátká J. (2003). Isotachophoretic determination of added phosphate in meat products. *Meat Science* 65 (2003) 765-769.

Hold G.L., Russell V.J., Pryde S.E., Rehbein H., Quinteiro J., Vidal R., Rey-Mendez M., Sotelo C.G., Perez-Martin R.I., Santos A.T., Rosa C. (2001). Development of a DNA-based method aimed at identifying the fish species present in food products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(3), 1175-1179.

Kruse R. (2004). 5.13 Quantitative determination of polyphosphates added to fresh and deep frozen fish by means of thermo differential photometry. 34th WEFTA meeting, Lübeck, Germany.

Meylahn K. (2005), Tölvusamskipti.

Pulliainen T.K., Wallin H.C. (1996). Determination of phosphorus in food by colorimetry: summary of NMKL Collaborative Study. *Journal AOAC International*, 79(6), 1408-1411.

Reece P., Russel V. (1994). Separation and identification of added polyphosphates in fish. 24th WEFTA meeting, Nantes, France.

Reglugerð nr. 503/2005 um merkingu matvæla, Umhverfísráðuneytið.
http://www.ust.is/media/ljosmyndir/matvaeli/503-2005_merkingar.pdf (lesið á netinu 27/09/06).

Reglugerð um aukefni nr. 285/2002, Umhverfísráðuneytið.
<http://www.reglugerd.is/interpro/dkm/WebGuard.nsf/58b439f05a7f412f00256a07003476bc/82fdb1e58a7e5c200256ba0003532b0?OpenDocument> (lesið á netinu 27/09/06).

Regulatory Fish Encyclopedia (RFE) (2001), Center of Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), U.S. Food and Drug Administration.
<http://www.cfsan.fda.gov/~frf/rfe0.html> (lesid̃ á netinu 27/09/06).

Rehbein H., Kündiger R., Yman I.M., Ferm M., Etienne M., Jerome M., Craig A., Mackie I., Jessen F., Martinez I., Mendes R., Smelt A., Luten J., Pineiro C., Perez-Martin R. (1999). Species identification of cooked fish by urea isoelectric focusing and sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis: a collaborative study. *Food Chemistry* 67, 333-339.

Russel V.J., Hold G.L., Pryde S.E., Rehbein H., Quinteiro J., Rey-Mendez M., Sotelo C.G., Perez-Martin R.I., Santos A.T., Rosa C. (2000). Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48(6), 2184-2188.

Sanjuan A., Comesana A.S. (2002). Molecular identification of nine commercial flatfish species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a segment of the cytochrome b Region. *Journal of Food Protection*, 65(6), 1016-1023.

Sotelo C.G., Calo-Mata P., Capela M.J., Perez-Martin R.I., Rehbein H., Hold G.L., Russel V.J., Pryde S.E., Quinteiro J., Izquierdo M., Rey-Mendez, M., Rosa C., Santos A.T. (2001). Identification of flatfish (*Pleuronectiforme*) species using DNA-based techniques. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49(10), 4562-4569.

Tarantino L.M.(2004), Agency Response Letter - GRAS Notice No. GRN 000147, CSFAN/ Office of Food Safety, U.S. Food and Drug Administration, USA.
<http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g147.html> (lesid̃ á netinu 27/09/06).

Title 21 Food and Drugs. The Code of Federal Regulations (2005). National Archives and Records Administration. United States Government Printing Office.
<http://www.access.gpo.gov/cgi-bin/cfrassemble.cgi?title=200521> (lesid̃ á netinu 27/09/06).

Woolfe M., Primrose S. (2004). Food forensics: using DNA technology to combat misdescription and fraud. *Trends in biotechnology* Vol.22 no.5 May 2004 pp.222-226.

7. VIÐAUKI

V.1 Reglur um fiskprótein í Bandaríkjunum.

Hér að neðan eru tekin tvö dæmi um fiskpróteinreglugerðir í Bandaríkjunum til glöggvunar. Þá er sýnt bréf vegna samþykkrar GRAS stöðu útdreginna fiskpróteina frá Proteus.

Title 21. Food and drugs

Chapter I. Food and Drugs Administration, department of health and human services

Part 172_ Food additives permitted for direct addition to food for human consumption

Subpart D. Special Dietary and Nutritional Additives

Sec. 172.340 Fish protein isolate.

A. The food additive fish protein isolate may be safely used as a food supplement in accordance with the following prescribed conditions: (1) The additive shall consist principally of dried fish protein prepared from the edible portions of fish after removal of the heads, fins, tails, bones, scales, viscera, and intestinal contents. (2) The additive shall be derived only from species of bony fish that are generally recognized by qualified scientists as safe for human consumption and that can be processed as prescribed to meet the required specifications. (3) Only wholesome fresh fish otherwise suitable for human consumption may be used. The fish shall be handled expeditiously under sanitary conditions. These conditions shall be in accordance with recognized good manufacturing practice for fish to be used as human food. (4) The additive shall be prepared by extraction with hexane and food-grade ethanol to remove fat and moisture. Solvent residues shall be reduced by drying.

B. The food additive meets the following specifications: (Where methods of determination are specified, they are Association of Official Analytical Chemists Methods, 13th ed., 1980, which are incorporated by reference). (1) Protein content, as N x 6.25, shall not be less than 90 percent by weight of the final product, as determined by the method described in section 2.057, Improved Kjeldahl Method for Nitrate-Free Samples (20)--Official Final Action. (2) Moisture content shall not be more than 10 percent by weight of the final product, as determined by the method described in section

24.003, Air Drying (1)--Official First Action. (3) Fat content shall not be more than 0.5 percent by weight of the final product, as determined by the method described in section 24.005, Crude Fat or Ether Extract--Official Final Action. (4) Solvent residues in the final product shall not be more than 5 parts per million of hexane and 3.5 percent ethanol by weight.

Sec. 172.385 Whole fish protein concentrate.

The food additive whole fish protein concentrate may be safely used as a food supplement in accordance with the following prescribed conditions:

A. The additive is derived from whole, wholesome hake and hake-like fish, herring of the genera *Clupea*, menhaden, and anchovy of the species *Engraulis mordax*, handled expeditiously and under sanitary conditions in accordance with good manufacturing practices recognized as proper for fish that are used in other forms for human food.

B. The additive consists essentially of a dried fish protein processed from the whole fish without removal of heads, fins, tails, viscera, or intestinal contents. It is prepared by solvent extraction of fat and moisture with isopropyl alcohol or with ethylene dichloride followed by isopropyl alcohol, except that the additive derived from herring, menhaden and anchovy is prepared by solvent extraction with isopropyl alcohol alone. Solvent residues are reduced by conventional heat drying and/or microwave radiation and there is a partial removal of bone.

C. The food additive meets the following specifications: (1) Protein content ($N \times 6.25$) shall not be less than 75 percent by weight of the final product, as determined by the method described in section 2.057 in "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists" (AOAC), 13th Ed. (1980). Protein quality shall not be less than 100, as determined by the method described in sections 43.212-43.216 of the AOAC. (2) Moisture content shall not exceed 10 percent by weight of the final product, as determined by the method described in section 24.003 of the AOAC. (3) Fat content shall not exceed 0.5 percent by weight of the final product, as determined by the method described in section 24.005 of the

AOAC. (4) The additive may contain residues of isopropyl alcohol and ethylene dichloride not in excess of 250 parts per million and 5 parts per million, respectively, when used as solvents in the extraction process. (5) Microwave radiation meeting the requirements of Sec. 179.30 of this chapter may be used to reduce residues of the solvents used in the extraction process. (6) The additive shall contain not in excess of 100 parts per million fluorides (expressed as F). (7) The additive shall be free of Escherichia coli and pathogenic organisms, including Salmonella, and shall have a total bacterial plate count of not more than 10,000 per gram. (8) The additive shall have no more than a faint characteristic fish odor and taste.

D. When the additive is used or intended for use in the household as a protein supplement in food for regular consumption by children up to 8 years of age, the amount of the additive from this source shall not exceed 20 grams per day (about one heaping tablespoon).

E. When the additive is used as a protein supplement in manufactured food, the total fluoride content (expressed as F) of the finished food shall not exceed 8 ppm based on the dry weight of the food product.

F. To assure safe use of the additive, in addition to the other information required by the Act:

(1) The label of consumer-sized or bulk containers of the additive shall bear the name "whole fish protein concentrate". (2) The label or labeling of containers of the additive shall bear adequate directions for use to comply with the limitations prescribed by paragraphs (D) and (E) of this section. (3) Labels of manufactured foods containing the additive shall bear, in the ingredient statement, the name of the additive, "whole fish protein concentrate" in the proper order of decreasing predominance in the finished food.

Agency Response Letter - GRAS Notice No. GRN 000147 (August 26, 2004)⁹

The subject of the notice is extracted fish protein. The notice informs FDA of the view of Proteus that extracted fish protein is GRAS, through scientific procedures, for use as a protein source in finished seafood products of the same species as the extracted fish protein.

The extracted fish protein is intended for use as a binding agent, to decrease volume shrinkage and to increase water content while maintaining protein content in the final cooked product. The extract derived from a particular fish species would be added to fresh or frozen seafood of the same species by needle injection into fillets, static soaking, or vacuum tumbling. According to the notifier, the intended use is self-limiting because extracts with protein concentrations greater than 18% (w/w, at pH 3.2 using citric acid) may impart a sour taste to the finished product. The notifier states that a typical use would be 10% addition by weight to the seafood product of an 8% protein solution.

The extracted fish protein consists of myofibrillar and sarcoplasmic proteins from fish muscle tissue. According to Proteus, the protein and amino acid profile of the extract is similar to that of the original muscle tissue. The extract is derived from fish muscle through an acid solubilization process. The starting material is homogenized with cold water to form a slurry that is acidified using citric acid or some other food-grade acidulant. Many of the muscle proteins are insoluble at neutral pH but soluble at acid pH. Centrifugation and pre-filtration are used to remove lipid and other contaminants. The resulting solution is subjected to ultrafiltration to concentrate the protein and remove citric acid. The final extract is a thin syrup-like product expected to have a protein content between 5 and 12% and a moisture content range between 88-95%. Citric acid in the final product would be present at approximately 0.1% to 0.14%. Salt may be added back to the protein solution at a level not to exceed the original tissue salt level...

Based on the information provided by Proteus, as well as other information available to FDA, the agency has no questions at this time regarding Proteus' conclusion that fish protein extract is GRAS under the intended conditions of use. The agency has not, however, made its own determination regarding the GRAS status of the subject use of fish protein.

⁹ <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g147.html>