

Bred kartlegging av faktorer som påvirker teksturegenskaper i oppdrettslaks ved multivariat tilnærming

Turid Mørkøre, Marit Espe, Eva Veiseth-Kent, Bendik Fyhn Terjesen, Ulf Erikson Erling Olaf Koppang og Kjell-Arne Rørvik





Nofima er et næringsrettet forskningskonsern som sammen med akvakultur-, fiskeri- og matnæringen bygger kunnskap og løsninger som gir merverdi. Virksomheten er organisert i fire forretningsområder; Marin, Mat, Ingrediens og Marked, og har om lag 470 ansatte. Konsernet har hovedkontor i Tromsø og virksomhet i Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Averøy.

Hovedkontor Tromsø
Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø
Tlf.: 77 62 90 00
Faks: 77 62 91 00
E-post: nofima@nofima.no

Internett: www.nofima.no



Vi driver forskning, utvikling, nyskaping og kunnskapsoverføring for den nasjonale og internasjonale fiskeri- og havbruksnæringa. Kjerneområdene er avl og genetikk, fôr og ernæring, fiskehelse, bærekraftig og effektiv produksjon samt fangst, slakting og primærprosessering.

Nofima Marin AS
Nofima Marin
Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø
Tlf.: 77 62 90 00
Faks: 77 62 91 00
E-post: marin@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Rapport

ISBN: 978-82-7251-725-9 (trykt)
 ISBN: 978-82-7251-726-6(pdf)

Rapportnr.:
 41/2009

Tilgjengelighet:
Åpen

<p><i>Tittel:</i> Bred kartlegging av faktorer som påvirker teksturegenskaper i oppdrettslaks ved multivariat tilnærming</p>	<p><i>Dato:</i> 22. desember 2009</p>
<p><i>Forfatter(e):</i> Turid Mørkøre, Marit Espe, Eva Veiseth-Kent, Bendik Fyhn Terjesen, Erling Olaf Koppang og Kjell-Arne Rørvik</p>	<p><i>Prosjektnr.:</i> 20569</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i> Kristian Prytz / 900086</p>
<p><i>Tre stikkord:</i> Oppdrettslaks, Tekstur, aminosyrer</p>	
<p><i>Sammendrag: (maks 200 ord)</i> Formålet med studien var å øke kunnskapen om forhold som påvirker tekturen i laksemuskel og å definere faktorer som kan bidra til bedre fasthet i filet. Fisken i forsøket var oppdrettslaks fra en omfattende fôringsstudie som ble gjennomført ved sjønlegget til Nofima Marin på Averøy. Laksen ble analysert hver 3.-6. uke fra mai til september 2008 for teksturegenskaper, som ble relatert opp mot ulike slakteparametere. Ved uttaket i september ble muskelen analysert i dybden histologisk samt for sammensetning og genuttrykk for laks som hadde fått fôr tilsatt aminosyrene arginin og glutamat (Boost-fôr) sammenlignet med laks som hadde fått Kontrollfôr. Resultatene viste at laksen som fikk Boost-fôr hadde generelt fastere filet. Denne forskjellen var statistisk signifikant ved uttakene i mai, juni og september. Dette er interessante resultater som viser at det er mulig å forbedre tekturen gjennom optimalisering av aminosyreprofilen, via frie aminosyrer i fôret. Generelt økte fastheten med økende fiskestørrelse, men variasjonen var stor innen samme størrelseskategori. Leverstørrelsen viste en overraskende konsistent og omvendt proporsjonal sammenheng til fastheten i muskelen. Tekturen i laksefilet synes derfor å ha sammenheng med fiskens metabolske status der optimalisering av laksens ernæringsstatus synes å kunne bidra til fastere filet. Derfor må vi ha en helhetlig tilnærming for å forstå årsakssammenhenger for teksturvariasjoner, der også sentrale organer som lever og hjerte er i fokus. Verken histologiske-, bindevevs- eller mineralanalyser viste entydige forskjeller mellom fôrgruppene og det var heller ingen generelle forskjeller mellom bløt vs. fast muskel for disse parameterne. Derimot var det en generell økning av frie aminosyrer i muskel med avtakende fasthet. Genanalyser (Microarray) viste tydelige forskjeller mellom bløt vs. fast muskel; bl.a. en oppregulering av immun-/inflammasjons gener, gener relatert til celledød, tilsvarende respons som ved leverinfeksjon, muskelnedbrytende enzymer og gener relatert til fettomsetning. Catepsin, som er et muskelnedbrytende enzym, var oppregulert i laks som fikk Kontrollfôr, men ikke i laks som fikk Boost-fôr.</p>	

Innhold

1	Innledning	1
1.1	Betydning av muskelfibre og bindevev for filettekstur	2
1.2	Aminosyrer	3
1.3	Mineraler	3
2	Målsetting	5
3	Gjennomføring og metode	7
3.1	Fiskemateriale og fôr.....	7
3.2	Fôringsforsøket og analyser.....	7
3.3	Analysemetoder	8
4	Resultater og diskusjon	13
4.1	Vektutvikling	13
4.2	Kondisjonsfaktor, lever og hjertestørrelse	13
4.3	Fettinnhold i filet	16
4.4	Tekstur	17
4.5	Sammenheng mellom tekstur og leverindeks	21
4.6	Histologi	23
4.7	Frie aminosyrer i muskel og bindevev	24
4.8	Bindevev	25
4.9	Mineraler	25
4.10	Industritest.....	26
4.11	Anatomi og fettfordeling (NMR).....	26
4.12	Genekspressjon	27
5	Sammendrag	29
6	Referanser	31

1 Innledning

Oppdrettere og produsenter har opplevd økt innslag av bløt tekstur i oppdrettslaks. Tilbakemeldinger tyder på at innslaget av bløt fisk varierer geografisk og at utbredelsen er større i vinterhalvåret. Problemet synes å øke etter perioder med rask vekst, og noen oppdrettere har god erfaring med forlenget sultetid i perioder der teksturproblemene er utbredt. Fenomenet har en tendens til å forsvinne og komme tilbake.

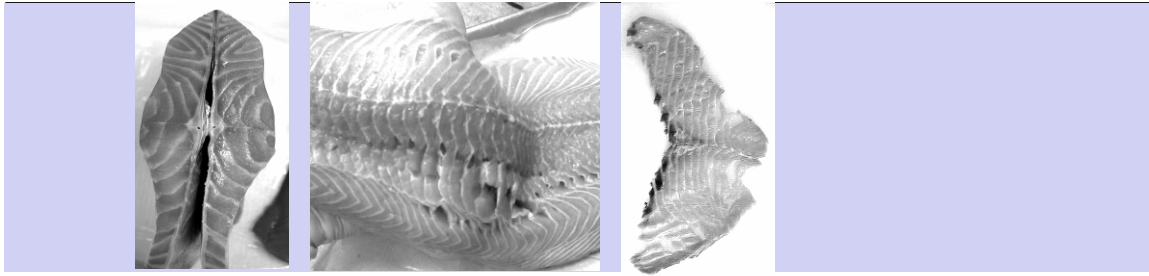
For å være i stand til å begrense problemet med bløt tekstur, er det avgjørende å skaffe kunnskap om biokjemiske og morfologiske faktorer som påvirker teksturen. Kunnskap om bakenforliggende årsaker til teksturvariasjoner, vil i større grad gi oppdretterne mulighet til å målrette produksjonsbetingelsene slik at filetkvalitet tilfredsstillende krav i ulike markeder for oppdrettslaks.

Tekstur er en fellesbetegnelse for de egenskaper som kan fornemmes med fingrene og i munnen. Et eksempel er hardhet som oppfattes både med fingrene og i munnen. Et annet eksempel er saftighet som kun oppleves i munnen. Begrepene tekstur og konsistens brukes ofte om hverandre. I denne rapporten er det i hovedsak lagt vekt på karakterisering av faktorer som påvirker fasthet, men også spenst og elastisitet er omtalt.

Laksefileter er bygget opp av muskelsegmenter som er festet til hverandre med bindevev. Filetspalting oppstår når bindevevet mellom muskelsegmentene revner (Figur 1). Begrepene filetspalting og gaping brukes ofte om hverandre. Kvalitetslaks har kjøtt med god fasthet og spenst, mens bløt tekstur og filetspalting fører til redusert utbytte og nedklassing – i noen tilfeller også reklamasjoner fra markedet. Ofte er det en sammenheng mellom bløt tekstur og filetspalting, men det trenger nødvendigvis ikke å være det.

Tabell 1 Noen uttrykk som beskriver teksturegenskaper i fiskekjøtt

Hardhet	Bløthet	Tørrhet
Fasthet	Mykhet	Saltighet
Mørhet	Klebrighet	Fethet
Elastisitet	Fibrighet	Tyggbarhet
Seighet	Tråhet	Smørbarhet

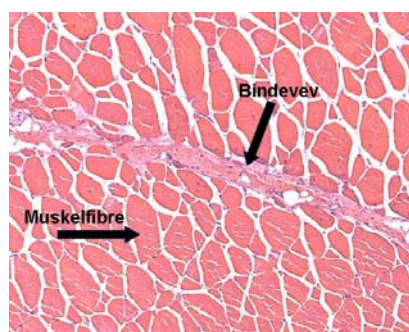


Figur 1 Laksekotelett med god spenst og fast tekstur (Birkeland & Akse), fersk laksefilet med spalting og skive av røkt laksefilet med spalting (Mørkøre)

1.1 Betydning av muskelfibre og bindevev for filettekstur

En laksefilet er i hovedsak bygget opp av bestanddelene: muskelfibre og bindevev. Muskelfibrene består av ulike strukturelle muskelproteiner som er organisert i et fast mønster, og disse gjør det mulig for en muskel å kontrahere. Denne rigide oppbygningen gjør at muskelfibrene i utgangspunktet er relativt faste i tekturen. Bindevevet består hovedsakelig av kollagen og fett som er omsluttet av en matriks, og bindevevet fungerer som lim mellom muskelfibrene i laksefileten. Bindevevet må derfor være både sterkt og fleksibelt for å holde muskelen sammen ved svømming og under slakting og prosessering.

I en normal laksefilet vil muskelfibrene være pakket tett sammen og omgitt av bindevev (Figur 2). I oppdrettsfasen, ved slakting og under prosessering, kan muskelfibrene og bindevevet endres slik at filetteksturen påvirkes. Den rigide oppbygningen av muskelfibrene kan bli svekket pga nedbryting av de strukturelle proteinene, og muskelfibrenes størrelse og størrelsesfordeling vil også kunne forandres. Styrken på bindevevet kan påvirkes av endringer i sammensetningen av bindevevet, samt nedbryting av ulike komponenter under lagring. Slike endringer i muskelfibrene og bindevevet vil hver for seg og sammen kunne påvirke filetteksturen.



Figur 2 Normalt utseende av laksemuskel, med runde muskelfibre pakket tett sammen og bindevev som ligger mellom to områder med muskelfibre

1.2 Aminosyrer

De senere årene har flere forsøk vært gjennomført for å undersøke betydningen av å blande alternative oljekilder i fôret, blant annet er sammenheng mellom fettsyreprofil i fôret og sluttkvaliteten av laksefilet undersøkt i flere forsøk, mens relativt færre studier har hatt fokus på å undersøke betydningen av ulike typer proteinkilder og effekt av ulike typer og nivå av aminosyrer for filetkvaliteten.

Fisk må ha tilført 10 aminosyrer i fôret: threonin, valin, isoleucin, leucine, lysin, arginin, metionin, phenylalanin, tryptofan og histidin. Disse aminosyrene betegnes essensielle ettersom fisken ikke er i stand til å syntetisere de selv (fisk har lav ureasyklus, bortsett fra på larvestadiet og har derfor et behov også for arginin) (Terjesen 2008). Ulike animalske proteinkilder er tilnærmet like når det gjelder aminosyresammensetning. Dette skyldes at muskelen som er depotorganet for protein består av acto-myosin. Det er de frie aminosyrene som kan benyttes til nysyntese av proteiner og disse utgjør ca 1% av de proteinbundne aminosyrene. I tillegg til den tradisjonelle funksjonen av aminosyrer som byggestener i proteiner, er det i den senere tid blitt mer klart at aminosyrer også er viktige metabolske regulatorer. Dette har lenge vært kjent i pattedyrnæring, men også i den senere tid hos fisk (f.eks. Mejer, 2003; Dabrowski et al. 2005; Li et al., 2009).

Når fiskemel benyttes som den dominerende proteinkilden er aminosyresammensetningen som regel tilstrekkelig til å til å dekke fiskens behov for essensielle aminosyrer, selv om det ennå foreligger visse uklarheter med hensyn til behov gjennom livssyklus hos oppdrettslaks som kan ha et annet vekstmønster enn villaks. I de senere år har en erstattet en økende andel av fiskemelet med planteproteiner som kan være ubalansert med hensyn på aminosyreprofil. Soya er for eksempel lav i metionin, mens gluten inneholder lite lysin. Denne ubalansen fører til at forholdet mellom ulike aminosyrer endres og dette kan påvirke både utnyttelsen, veksten og kvaliteten av den produserte fisken. Videre inneholder ulike proteinkilder varierende mengder av nitrogen som ikke er bundet til aminosyrer (ikke-aminosyre- nitrogen, NonAA-N), som for eksempel taurine. Taurin fungerer blant annet som en osmolytt i muskelen og mangel kan bidra til endret osmolyttstatus og dermed ustabilitet i vevet.

Fiskemuskelen inneholder mindre bindevev enn muskelen fra andre husdyr (ca 3% vs 10% i husdyr). Videre har ikke fisk sener. Bindevevet i fiskemuskelen inneholder også langt færre kryssbindinger enn bindevevet i for eksempel storfe. Endringer i bindevevets karakteristika har vært knyttet opp mot bløthet (Sato et al., 1991), men i dette prosjektet ble bare total mengde bindevev analysert for å undersøke om den totale mengden av bindevev var ulik i bløt og fast laksefilet.

1.3 Mineraler

Sink, selen og kobber er mineraler som inngår i enzymer i muskelen så vel som i andre vev. Da det tidligere er funnet endringer i noen mineraler ved bløt fisk, ble disse analysert. Blant annet er det vist en sammenheng mellom avtakende kobberinnhold og avtakende fasthet og økning i filetspalting (Mørkøre og Austreng, 2004), men også innholdet av sink har i enkelte tilfeller vist seg å være lavere i laksefileter med gaping og med bløt tekstur (Mørkøre,

upubliserte resultater). I dette prosjektet ønsket vi å undersøke om det var forskjeller i mineralstatus i bløt og fast fiskemuskel.

2 Målsetting

Tekstur er en sammensatt egenskap og kunnskap om bakenforliggende årsaker til variasjon i tekstur er mangelfull og fragmentert. Derfor vil en multivariat tilnærming for å avdekke årsaksforhold være hensiktsmessig. En screeningsstudie der en samtidig undersøker teksturegenskaper og morfologiske/strukturelle, biokjemiske, fysiologiske og helserelevante faktorer vil gi en kunnskapsplattform som kan danne grunnlag for målretta fokus på de egenskaper som peker seg ut som mest betydningsfulle for fastheten i fileten.

En slik studie kan enten kjøres separat eller en kan koble seg til pågående forsøk. Ved å utnytte fiskematerialet i allerede planlagte/pågående studier vil en kunne få en bedre utnyttelse av fiskematerialet med en veldokumentert bakgrunn og det vil gis mulighet for å få en kostnadseffektiv utnyttelse av forsøksmaterialet og analyseresultater

Den overordnede målsettingen i denne studien var å utføre en bred kartlegging for å identifisere faktorer som har betydning for tekturen i oppdrettslaks.

Tilnærmingen var som følger:

1. Laks i et pågående fôringsforsøk i Nofima Marins sjøanlegg på Aveøya ble tatt ut regelmessig til teksturundersøkelse gjennom en periode på fire måneder, og det ble også sikret prøvemateriale for videre undersøkelser. Det omfattende fôringsforsøket (18 merder) hadde fokus på tilvekst og helse (hjerte og tarmhelse) og var finansiert av Norges forskningsråd med flere forskningspartnere og industri involvert.
2. I fôringsforsøket ble det benyttet et kommersielt tørrfôr som ble coatet med ulike bioaktive komponenter. Av de seks ulike fôrene som ble benyttet, fokuserte vi på ett fôr som var coatet med aminosyrene arginin og glutamat. Aminosyrene som ble tilsatt fôret har tidligere vist seg bl.a. å ha følgende effekter hos dyr generelt (lite informasjon om fisk):
 - Arginin (Arg): Stimulerer vekst og muskeloppbygging, og virker inn på hormon-nivå og syntese av vekstfaktorer
 - Glutamat (Glu)/glutamin(Gln): brukes bl.a. til energi og utvikling av tarmceller, neurotransmitter, fremmer immunitet, og Glu er substrat for Gln som har viktige funksjoner for å regulere plasma ammoniakk. Fremme sirkulasjon, omsetning av fett, osmoregulering mm. Tapes ved ulike typer stress, fremmer proteinsyntese (myosin)/hemmer nedbrytning.

Hele forsøksmaterialet ble benyttet for å finne generelle sammenhenger mellom produksjonsdata og teksturegenskaper (multivariat dataprosessering).

3. I det siste uttaket i september ble utvalgte fisk undersøkt i dybden ved biokjemiske, molekylære og morfologiske metoder.

3 Gjennomføring og metode

3.1 Fiskemateriale og fôr

Fisken som ble benyttet var 2007-høstsmolt fra oppdrettsselskapet Salmar. Forsøket hadde oppstart i mars 2008 da snittvekten var 480 gram og forsøket ble avsluttet i september et halvt år senere. Fisken var fordelt i 18 merder (125 m³) på forsøksstasjonen til Nofima Marin på Averøya. All fisken fikk det samme grunnfôret (se Tabell 2). Forsøksfôret som har spesiell fokus i denne studien var coatet med hhv. 1.1% arginin og 0.75% glutamat (*Boost fôr*). Fôrene hadde likt innhold av nitrogen, balansert ved tilsetning av aminosyren glysin i kontroll fôret (2,7%).

Tabell 2 Fôrsammensetning

	Laks opp til 1 kg	Laks større enn 1 kg
Pelletstørrelse, mm	7	10
Tørrstoff, %	93,5	94,5
Fett, %	27	31
Protein, %	42	41
Stivelse, %	6	7
Aske, %	8	7
Astaxanthin, mg/kg	40	40
Fiskemel (SuperPrime)	39,5	37
Hi Pro Soya (48%)	5	3,5
Soyaprotein konsentrat (Imcopa SPC)	10	10
Solsikke Expeller	3,5	1,6
Bønner	17	17
Standard fiskeolje	13	15,5
Rapsolje	10	14
Vitamin mineral premiks	0,38	0,32

Laks ble tatt ut til kvalitetsundersøkelser ved følgende tidspunkt:

- 14. mai 2008
- 3. juni 2008
- 18. juni 2008
- 8. juli 2008
- 28. juli 2008
- 19. august 2008
- 9. september 2008

3.2 Fôringsforsøket og analyser

Forsøket som våre aktiviteter ble knyttet opp til hadde som hovedmål å undersøke betydningen av fôrtilsetninger (bioaktive komponenter i fôr) på tilvekst og immunrespons (3

nøter per fôrbehandling/ 6 ulike fôr). Fôringsforsøket var en delaktivitet av et SIP prosjekt: 179481/I30 og et BIP prosjekt: 174215/S40 (Prof. K-A. Rørvik var prosjektleder for begge prosjektene). Kjerneteamet i fôringsforsøket bestod i tillegg til prosjektleder Rørvik også av dr. Bendik Fyhn Terjesen og dr. Ståle Refstie

I forsøket var det mindre prøveuttak hver 3. uke og større prøveuttak hver 6. uke. Fisken ble fordelt i 18 forsøksnøter à 125m³ ved Nofimas sjøanlegg på Averøy i april 2008 (480 grams høstsmolt fra SalMar). Fisken ble fôret til metning én gang per dag og det ble benyttet fôrspilloppsamling. Ved å koble oss til uttakene som var planlagt gjennomført, kunne vi analysere teksturen instrumentelt ved samtlige uttak og sikre relevant prøvemateriale. Ved å benytte de samme fiskene kunne vi dessuten sammenstille teksturresultatene mot de ulike produksjons- og slakteparametre som ble registrert i fôringsforsøket.

Analyser som ble gjennomført i fôringsforsøket og som vi kunne sammenligne våre resultater opp mot var tilvekst og fôrutnyttelse (FCR, TGC, SFR, SGR), ulike helseparametere, fett, pigment og fargeanalyser, hjertet og lever morfologi/utseende. Analyser som vi utførte i tillegg til planlagte analyser i fôringsforsøket var teksturanalyser, muskel pH, utvidede analyser av fett og farge, genekspressjon (Nofima Marin), enzymaktivitet i muskel (IHA), histologi (lysmikroskopi, Nofima Mat og elektronmikroskopi, NVH), betennelsestilstander i muskel (NVH), NMR for å kartlegge makroskopisk struktur (Sintef), mineral- og bindevevsanalyser, og frie aminosyrer (Nifes). Ved sluttuttaket i september ble laksen slaktet ved bruk av skånsom metode og ved å trenge fisken i forkant av slaktingen (16 timers trenging ved å line opp nota).

En slik tilnærming sikret en kostnadseffektiv utnyttelse av forsøksmateriale og analyseresultater.

3.3 Analysemetoder

Tekstur

Teksturanalysene ble utført ved bruk av instrumentet Texture Analyzer (TA-XT2) ved at en 12.5mm sylinder ble presset ned i muskelen over sidelinjen i Norsk kvalitetssnitt (NKS) ved en konstant hastighet (1mm/s). Kraften som skulle til for å bryte gjennom overflaten av fileten ble registrert (bruddstyrken). Denne teksturegenskapen har vist god sammenheng til sensorisk vurdert fasthet i rå og røkt laks (Mørkøre og Einen 2003).

Fettinnhold

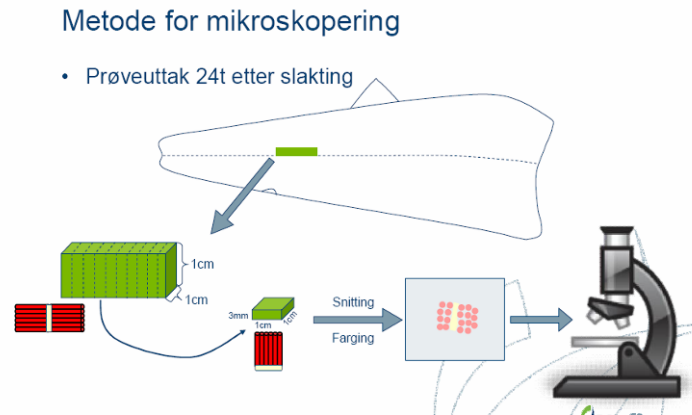
Fettinnhold i fileten (NKS) ble analysert ved foto i henhold til metode beskrevet av Folkestad m.fl. (2008).

Histologiske undersøkelser

Det ble tatt ut prøver fra utvalgte fisk i forhold til dokumentert tilvekst og tekstur.

Alle muskelprøvene ble tatt ut ca 24 t etter avlivning, og prøvene ble tatt fra området bak ryggfinner slik det er vist i Figur 3. Fra hver av fiskene ble det skjært ut et rektangel, som videre ble finsnittet til riktig størrelse for fiksering i formalin (4% formalin, 0.08M

natriumfosfat, pH 7.0) og glutaraldehyde (2.5% glutaraldehyd, 0.1M PIPES, pH 7.2). Disse prøvene ble støpt inn i henholdsvis parafin og plast, og brukt til lys- og/eller elektronmikroskopi.



Figur 3 Illustrasjon av prøvetaking til histologiske undersøkelser i Forsøk 1 og 2

På parafininnstøpte prøver ble det kjørt følgende fargemetoder og analyser:

- Hematoxylin-Eosin: Oversiktsfarge for å gjøre en generell evaluering av muskelstrukturen. Disse ble vurdert og klassifisert basert på hvilke type endringer som ble observert i muskelstrukturen.
- Alcian blue: Farger sulfaterte glykosaminoglykaner i bindevevet. Disse ble brukt til å gi en vurdering av bindevevets generelle sammensetning; tykkelse, forholdet mellom fett og proteiner/proteoglykaner.

På plastinnstøpte prøver ble det kjørt følgende fargemetoder og analyser:

- Toluidine blue: Oversiktsfarge som ble brukt til å kvantifisere oppsplittinger mellom individuelle muskelfibre, oppsplittinger mellom muskelfibre og bindevevet, og kvantifisering av antall oppløste muskelfibre.

Bestemmelse av frie aminosyrer og metabolitter i hvit muskel

Muskel ble homogenisert i 10% sulfosalicylsyre for å felle proteinene. Frie aminosyrer ble bestemt i supernatanten etter separasjon på Biochrom Amino Acid Analyzer med lithium buffer. Postkolonne derivatisering med ninhydrin og deteksjon på 570 og 440nm (prolin & OH-prolin). Standarder for aminosyrene var fra Sigma. Norleucine ble benyttet som intern standard.

Bestemmelse av Mn, Zn, Se og Cu i hvit muskel

Muskelen ble oppsluttet i konsentrert salpetersyre + hydrogenperoksid i mikrobølgeovn.

Mineralene ble bestemt ved ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry) og konsentrasjonen ble beregnet ut fra standardkurver for de respektive mineralene. Rodium ble brukt som intern standard.

Bestemmelse av total mengde collagen i hvit muskel.

Total mengde bindevev i hvit muskel, ble bestemt som proteinbundet OH-pro da det aller meste av OH-pro foreligger i bindevevet og nedbrutt OH-prolin ikke kan brukes ved nysyntese av bindevev siden det ikke er noe codon for OH-pro. Nysyntese bruker derfor Pro som hydroxyleres etter syntesen av proteinet.

Muskelprøve ble hydrolysert i 6N HCL 110 °C i 22 timer. Total mengde OH-pro i hydrolysatet ble bestemt etter derivatisering med phenylisothiocyanat (PITCH) og separert på C18 revers fase kolonne som beskrevet i Cohen & Strydom (1988). Standard kurve for OH-pro var fra Sigma. Norleucin ble benyttet som intern standard.

Fritt OH-pro ble bestemt i muskel etter at proteinet var felt ut vha sulfosalicylsyre (10%). Fri OH-pro ble bestemt i supernatanten etter separasjon på Biochrom Amino Acid Analyzer med post kolonne derivatisering med ninhydrin og deteksjon på 440nm. Standarder for OH-pro var fra Sigma. Bindevev ble deretter beregnet. Total OH-pro-fri OH-pro= proteinbundet OH-pro. Hydroxyprolin ble omregnet til collagen ved å multiplisere med en faktor på 11,42 (Sato et al., 1991).

Genuttrykk

Microarray analyser ble utført ved bruk av en nyutviklet (oligo) kvalitetschip ved bruk av muskel fra laks fra uttaket i september. Prøvematerialet ble selektert i hht teksturegenskaper, der det ble benyttet muskel med hhv fast og bløt tekstur fra laks som hadde fått hhv. kontrollfôr og forsøksfôr. Metoden som ble benyttet til analysene er fortsatt under utvikling.

Industritest

Ti fisker fra hver av de merdene som fikk fôrene Boost (n=30) og Kontroll (n=30) ble analysert i forhold til den såkalte industritesten. Graderingen som ble benyttet i industritesten er vist i Tabell 3.

Tabell 3 Industriell teksturtest (ITT) karakteristikk og skårer

ITT karakteristikk	Skåre	Forklaring
Halebøy (postrigor)	0	$x < 30^\circ$
	1	$30^\circ \leq x < 60^\circ$
	2	$x \geq 60^\circ$
Lengde bløt stripe	0	ingen eller svak antydning
	1	dekker ca 1/3 av filets lengde
	2	dekker ca 1/2 av filets lengde
Filetspalting (jfr. foto)	0	ingen filetspalting
	1	få spalter (< 5, lengde <2 cm)
	2	noen små spalter (<10)
	3	mange spalter (>10 små eller få store >2 cm)
	4	mange store spalter
Bløthet (fingertest, 1 Kg)	0	intet varig avtrykk etter 2 sekunders trykk
	1	varig avtrykk
	2	finger går gjennom filet
Uelastisitet	0	filet retter seg raskt ut etter bøyning på midten
	1	filet retter seg langsomt ut
	2	slapp, forblir sammenbøyd

Statistikk

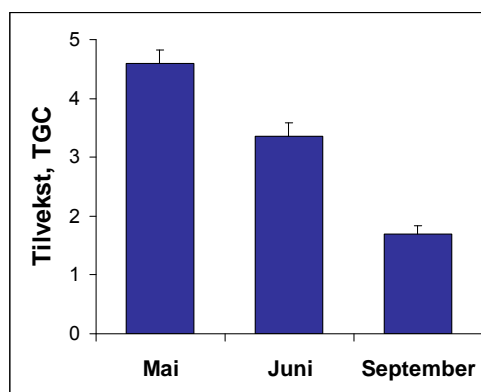
Det ble benyttet ulike statistiske verktøy/programpakker:

SAS software versjon 8.2 (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA), The Unscrambler (versjon 9.8, Camo, Norway), Excel, Unistat5Statistical Package. Versjon 5.5 (Megalon S.A. og Unistat Ltd).

4 Resultater og diskusjon

4.1 Vektutvikling

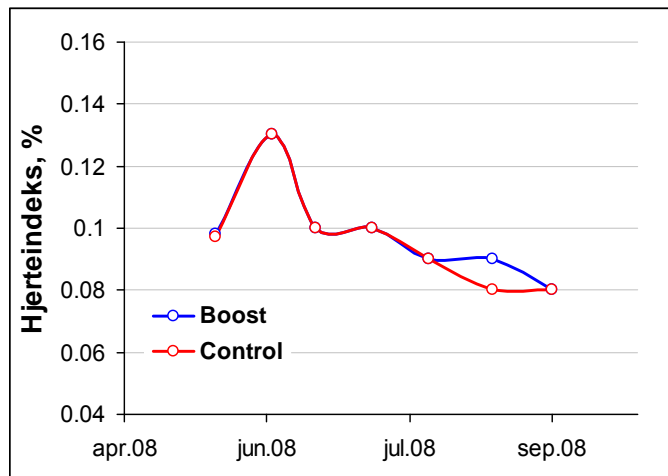
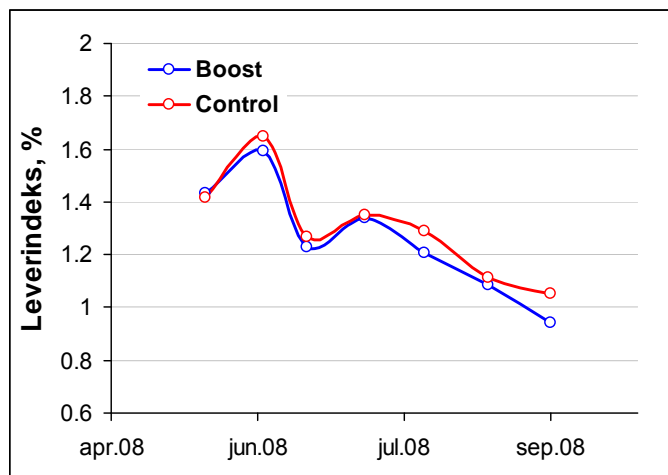
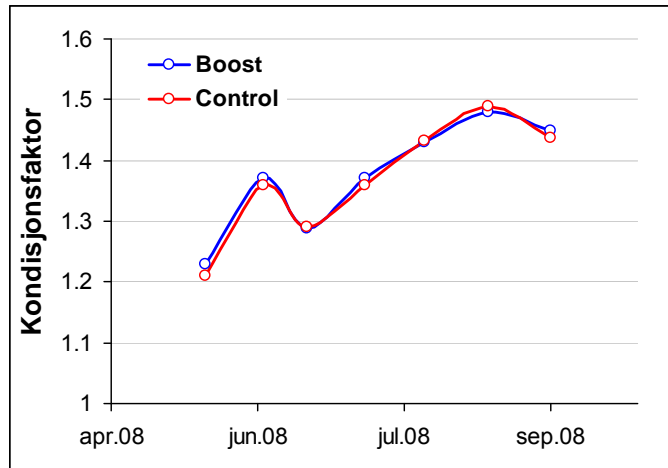
Fiskevekten økte fra 0.64 kg til 2.62 kg gjennom forsøket. Det var ikke signifikant forskjell mellom fiskegruppene. Vekstfaktoren ble beregnet som TGC: $1000 * ((\text{Sluttvekt}^{1/3} - \text{startvekt}^{1/3}) / (\text{dager} * \text{snittemperatur}))$. TGC var høyest i perioden fra mai til juni og lavest i perioden fra juni september (Figur 4). TGC for den første perioden må anses som særdeles høy og sammenlignbar med det beste en klarer å få til i kommersiell skala. For enkelte merder var TGC over 5 i perioder. Årsaken til den lave vekstfaktoren de siste ukene før avslutning av forsøket kan mest sannsynlig tilskrives håndtering av fisken ved høy sjøtemperatur. Temperaturen i vannet var over gjennomsnittet for årstiden, og ideelt sett burde fisken ikke vært tatt ut til analyser i august da temperaturen var over 16°C.



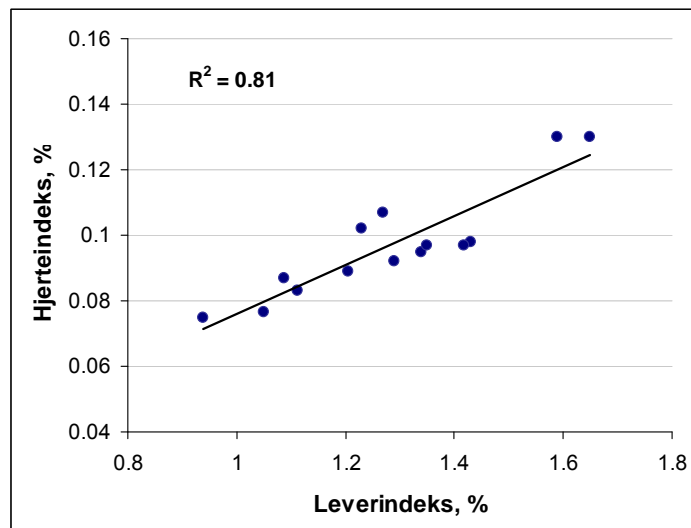
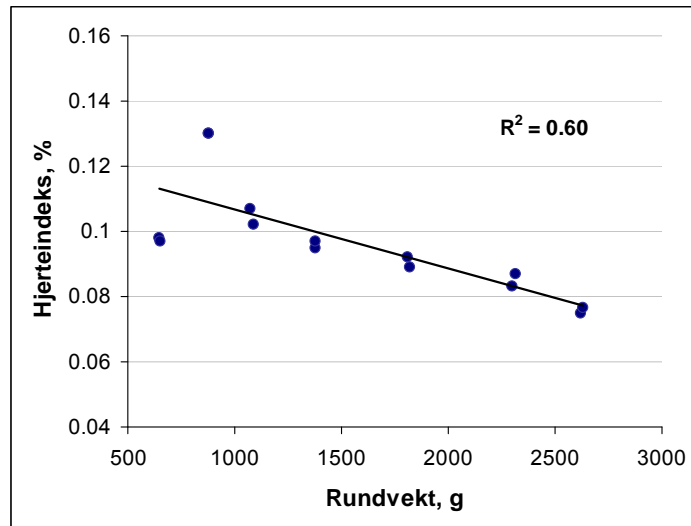
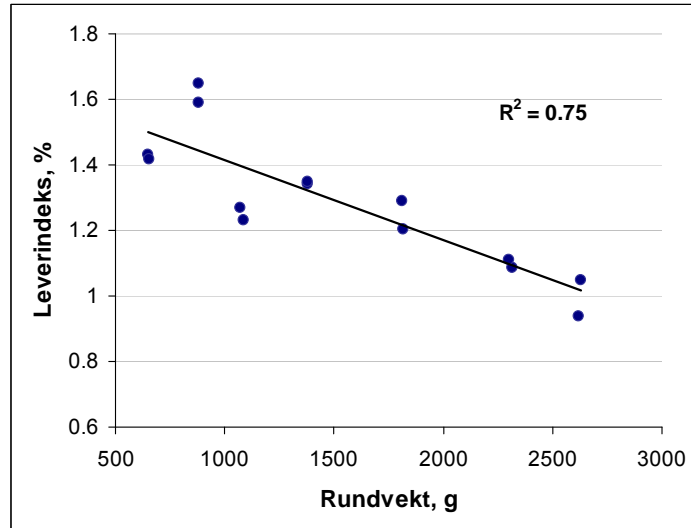
Figur 4 Tilvekst (TGC) siste 14 dagene før uttak

4.2 Kondisjonsfaktor, lever og hjertestørrelse

Kondisjonsfaktoren beregnet for rund, usultet fisk varierte fra 1,2 til 1,5 (Figur 5). Kondisjonsfaktoren økte gjennom forsøket, bortsett fra en nedgang i juni måned. Det var ikke forskjell mellom fiskegruppene. Indeksen av lever og hjerte ble beregnet som prosentandel av kroppsvekten. Lever og hjerteindeksen viste relativt lik utvikling gjennom forsøket, men mønsteret var omvendt proporsjonal med utviklingen for kondisjonsfaktoren. For hjerteindeksen var det ingen forskjell mellom fôrgruppene. Den ene observasjonen i august som viser en høyere hjerteindeks for laksen som fikk Boost fôret kan være tilfeldig. Ettersom hjertet utgjør en liten andel av kroppsvekten (<0,14%), vil det være en risiko for å få feil verdier ved bare små avvik ved vektregistreringene, grad av utblødning osv. Resultatene tyder på at leverindeksen var noe lavere for Boost gruppen enn for Kontrollgruppen. Den relative størrelsen av leveren og hjerte avtok med rundvekten (Figur 6). Avvikende hjerteform ble registrert (pose/pæreformet) i september. Av 30 laks som ble tatt ut til analyse fra hver fôrgruppe, ble 1 hjerte karakterisert som avvikende i formen for Boost gruppen, mens 3 laks hadde avvikende hjerteform i kontrollgruppen.



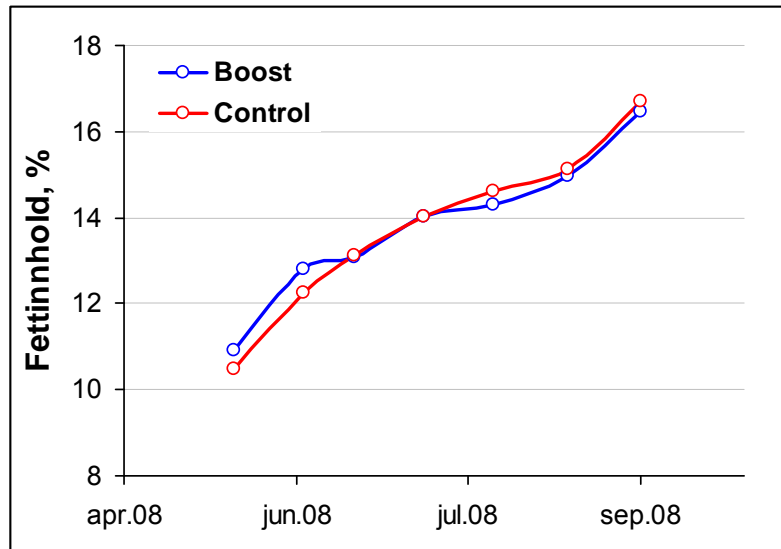
Figur 5 Utvikling i kondisjonsfaktor, leverindeks og hjerteindeks gjennom forsøket



Figur 6 Sammenheng mellom rundvekt og relativ størrelse av hhv lever og hjerte, samt sammenheng mellom hjerte og leverindeks

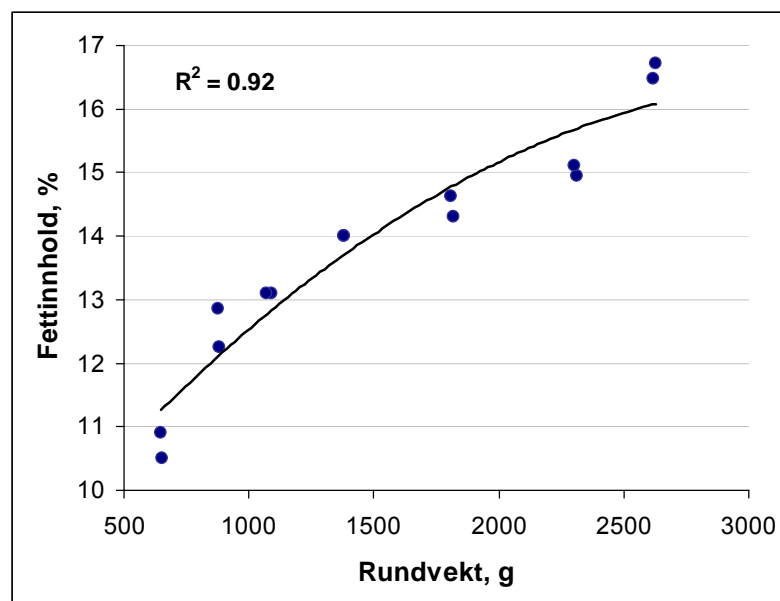
4.3 Fettinnhold i filet

Fettinnholdet i filet (NKS) økte gjennom forsøket for begge fôrgruppene, fra 11% til 17% i gjennomsnitt. Det var ikke signifikant forskjell mellom fiskegruppene. Fettinnholdet ligger innenfor forventet område.



Figur 7 Utvikling i fettinnhold i filet gjennom forsøket

Fettinnholdet i filet økte med fiskestørrelsen, selv om denne sammenhengen var mest tydelig for fisk opp til 1,5kg. Fettinnholdet hadde ingen betydelig effekt på teksturen innenfor samme størrelsesklasse.



Figur 8 Sammenheng mellom rundvekt og fettinnhold

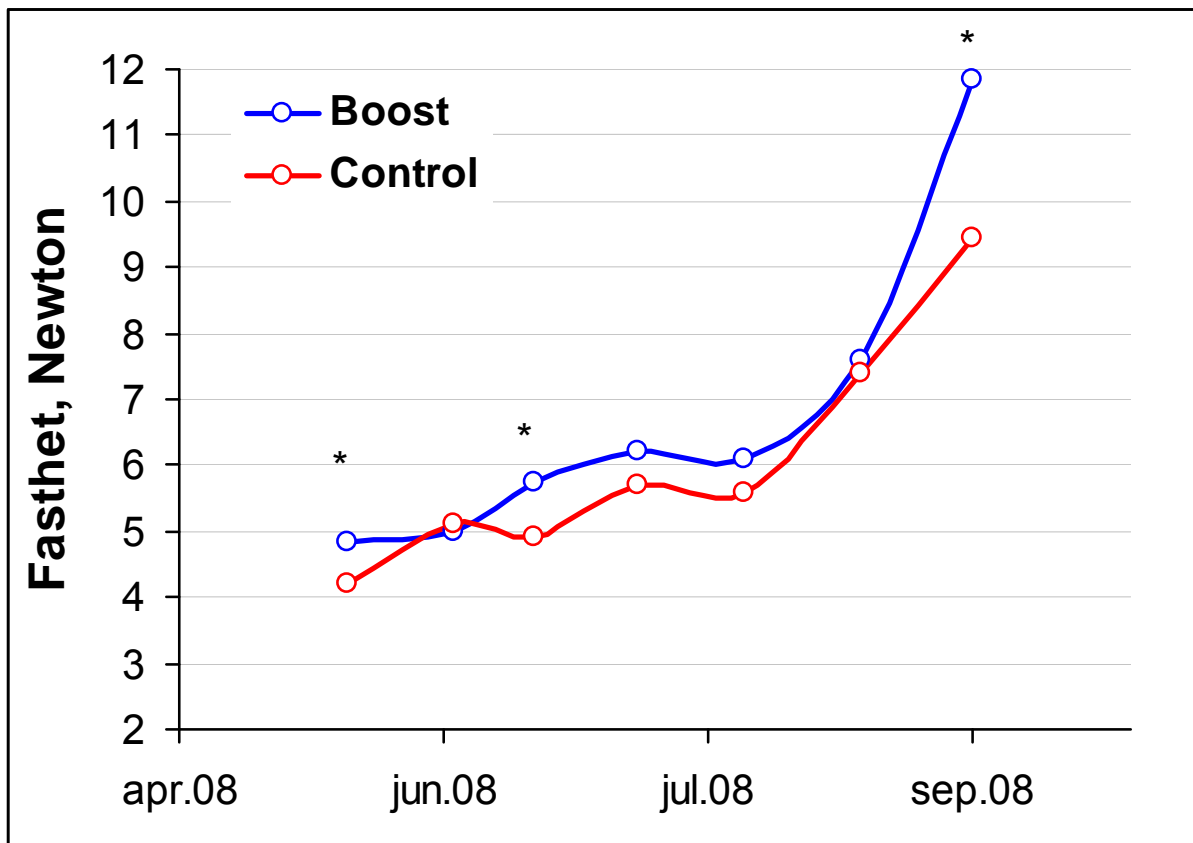
4.4 Tekstur

Fôr tilsatt aminosyrene arginin og glutamat ga fastere tekstur enn kontrollfôret (Figur 9). Forskjellene mellom fôrgruppene var signifikant forskjellige ved uttaket i mai, juni og september (Figur 10). Fastheten i fileten var betydelig lavere i laksen som hadde gått trangt i merden i 16 timer før avliving, og den positive fôreffekten ble nærmest borte. Resultatene viser at trenging av fisken over tid før slakting kan ha svært negative følger for tekturen og at eventuelle positive fôreffekter viskes ut dersom fisken utsettes for betydelig trenging/stress før slakting.

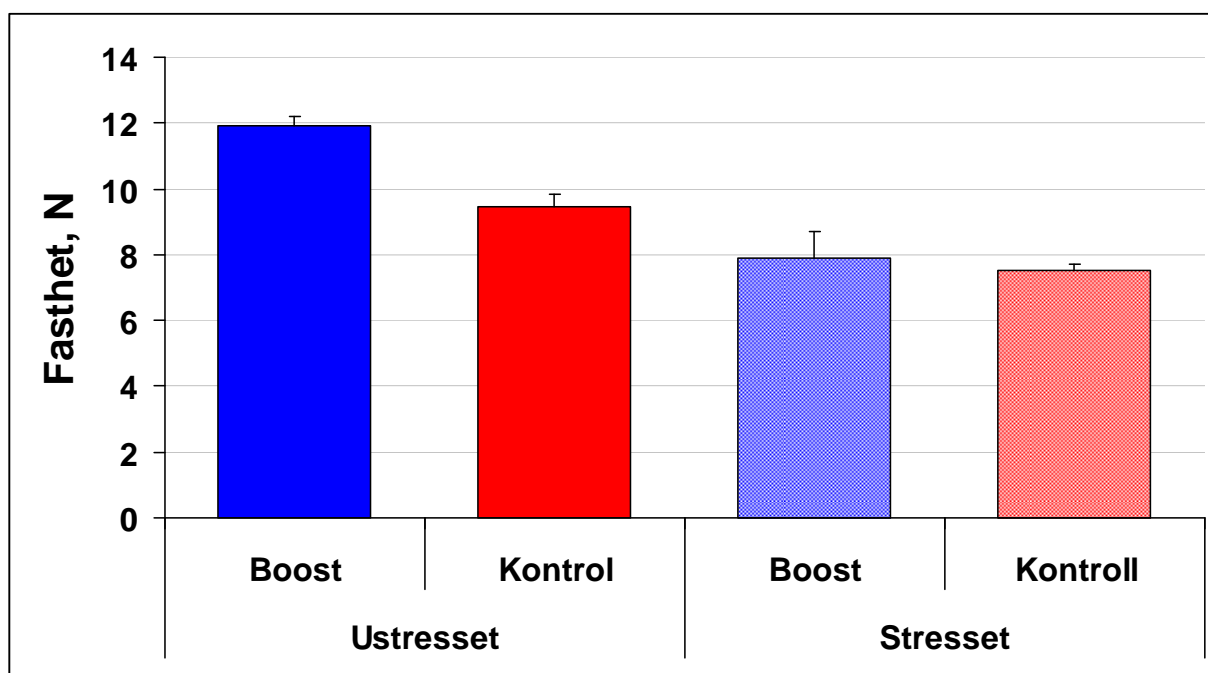
Resultatene som viser en positiv effekt på tekturen ved å blande inn spesifikke aminosyrer i fôret (arginin og glutamat) er svært interessante. Det er første gang at en slik fôreffekt er vist og resultatene åpner opp for nye muligheter med hensyn til å skreddersy tekturen i henhold til markedets ønske om en fastere filet.

Fastheten økte med økende fiskevekt (Figur 11). Gjennomsnittresultatene for fisken som ble analysert med hensyn til fôrbehandling viser en klar kurvelineær sammenheng mellom fasthet og rundvekt. Det er imidlertid stor variasjon i fasthet mellom fisk av samme størrelse, slik det fremgår av Figur 11B som viser sammenhengen mellom fasthet og rundvekt for hele forsøksmaterialet (n= 1260 laks).

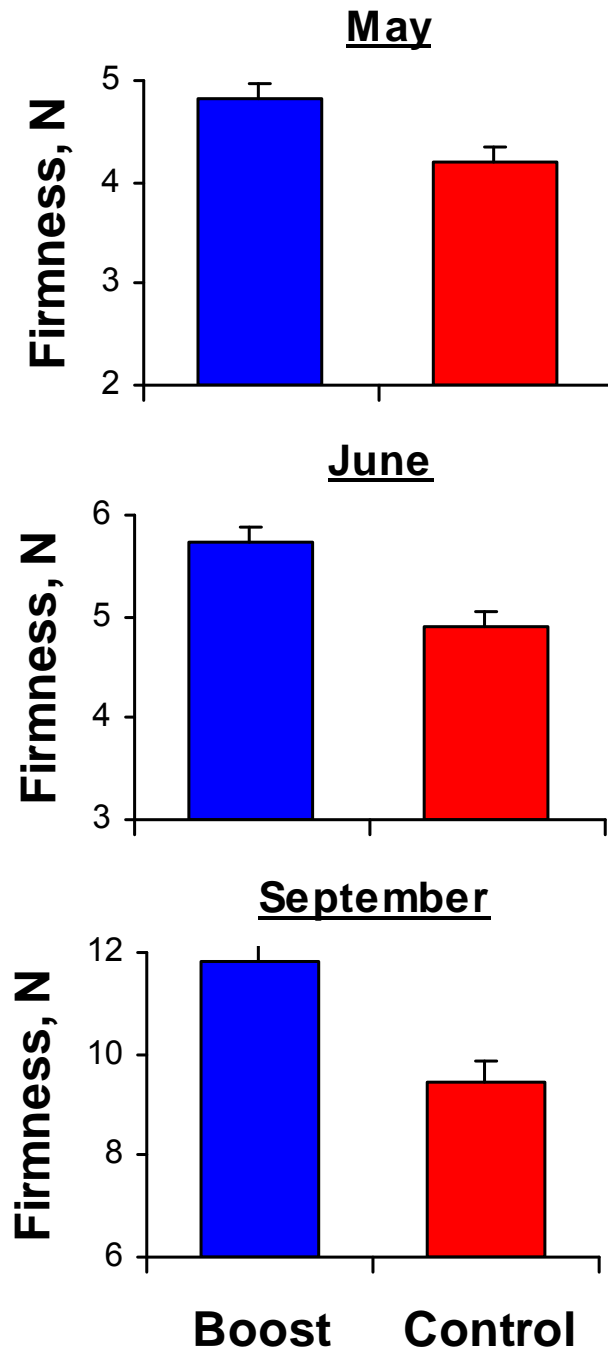
A)



B)

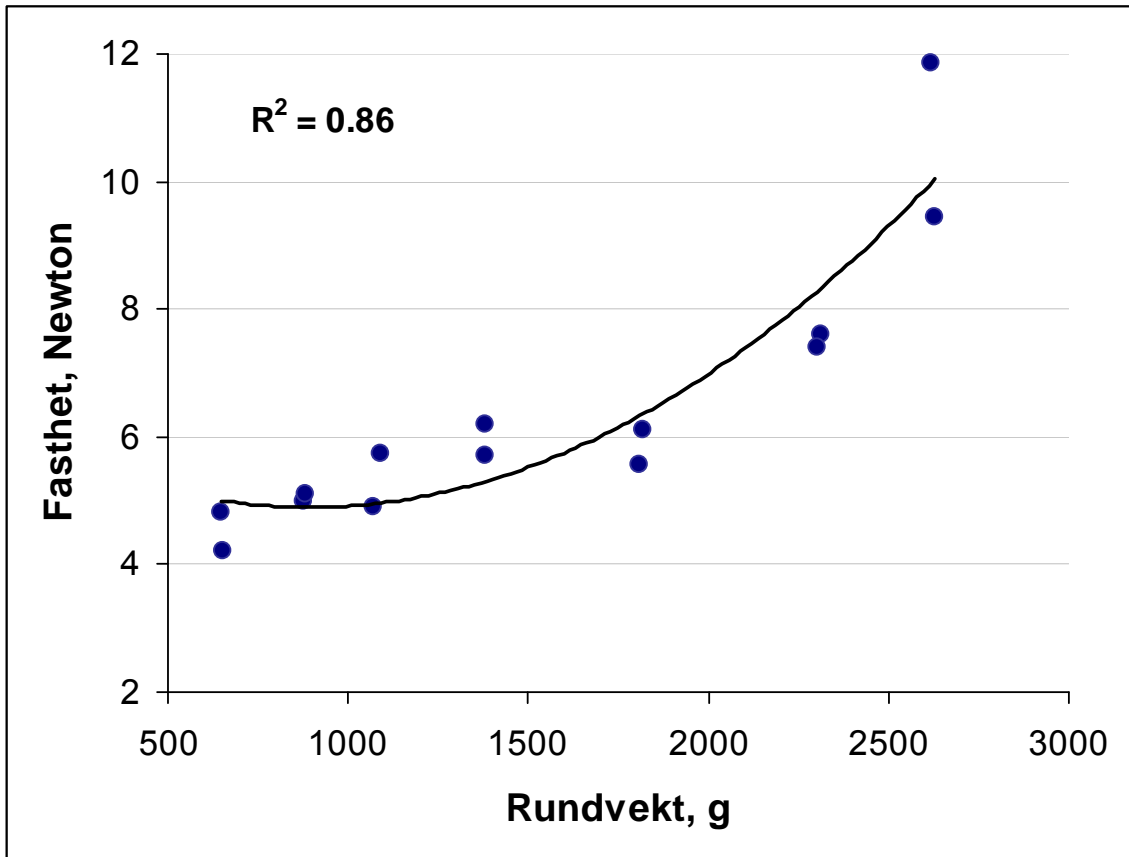


Figur 9 Utvikling i fasthet (bruddstyrke, N) gjennom forsøket A) og fasthet i filet ved forsøkets avslutning i september for laks slaktet på en skånsom måte (Ustresset) og laks som var trent i not i 16 timer før avliving (Stresset)

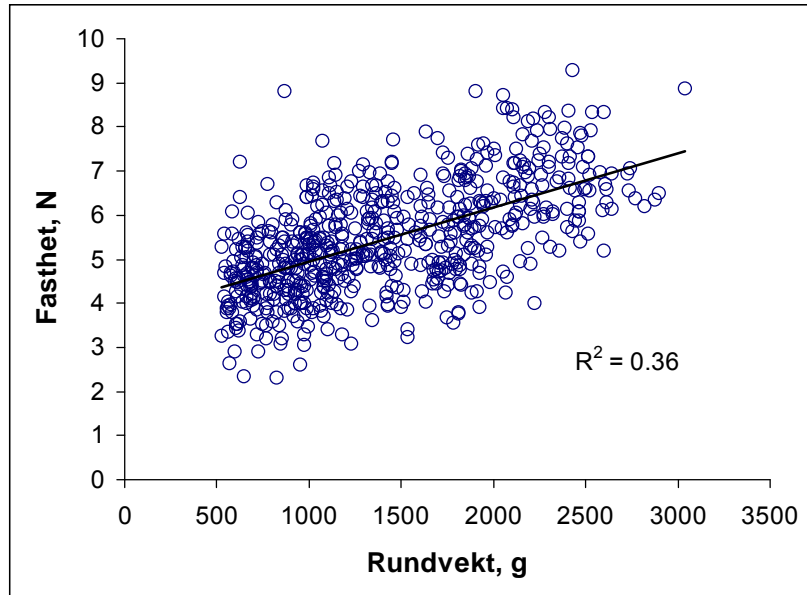


Figur 10 Fasthet målt instrumentelt i laks gitt kontrollfôr (Control) eller fôr tilsatt en aminosyreblanding (Boost). Resultatene er vist for uttakene der forskjellene mellom fôrgruppene var statistisk signifikante ($p < 0.05$)

A)



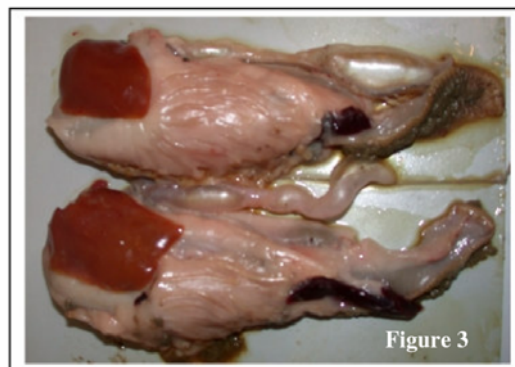
B)



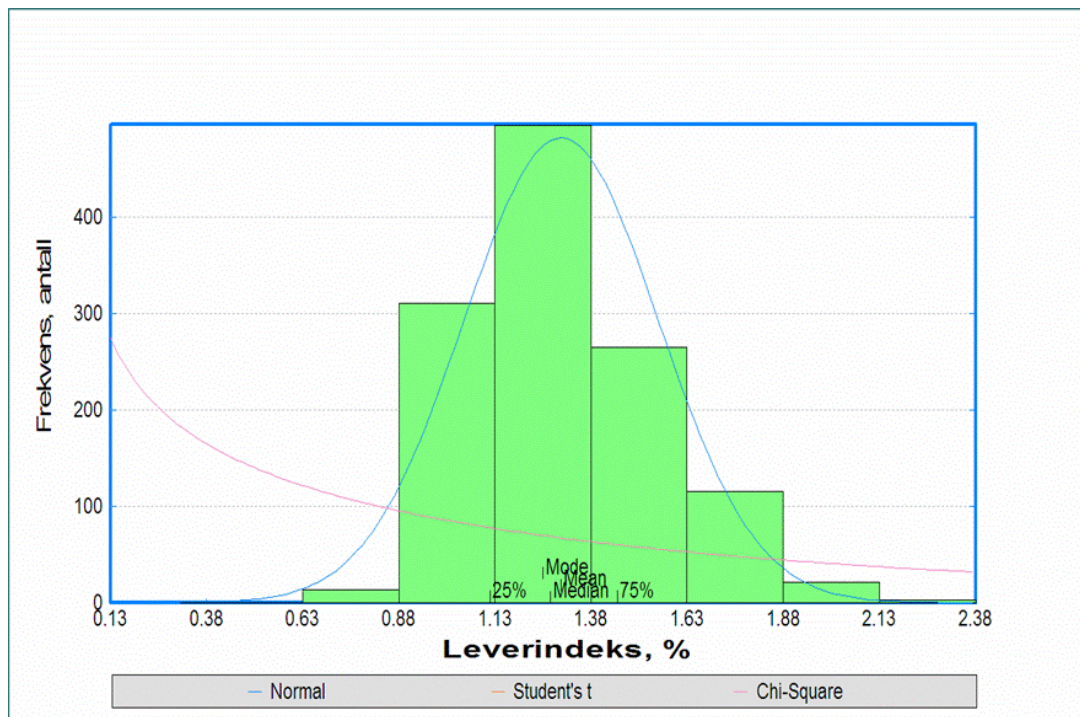
Figur 11 Sammenheng mellom rundvekt og fasthet. A) viser gjennomsnittresultater for fôrgruppene som ble fulgt i forsøket (Boost og Kontrollfôr). B) viser samtlige resultater gjennom hele forsøket, inklusivt alle seks fôrene ($n = 1260$ fisk)

4.5 Sammenheng mellom tekstur og leverindeks

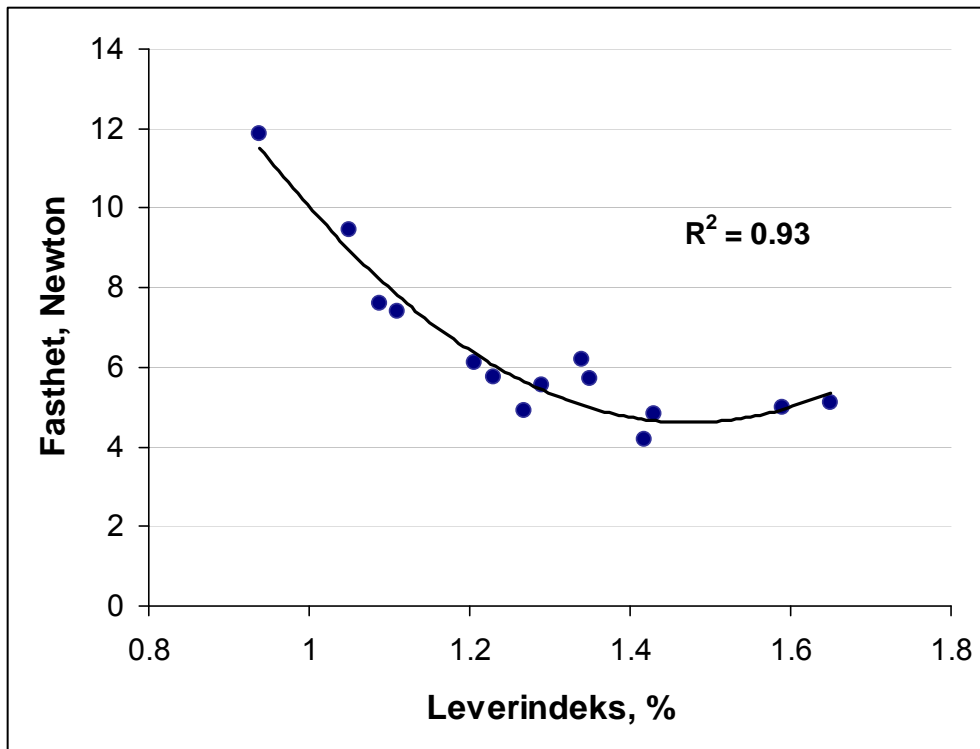
Fastheten i filet viste sammenheng med leverstørrelsen – jo større lever, desto bløtere tekstur (Figur 12-15). Vi er ikke i stand til å peke på årsakssammenhengene ut fra denne studien. Dette er imidlertid en interessant observasjon, og understreker at vi må ha en helhetlig tilnærming til fisken for å være i stand til forstå årsaker til bløtfisk problematikken. Det vil si at vi bør holde et våkent øye med sentrale organer (bl.a. lever og hjerte) heller enn ensidig å fokusere på muskelen separat. Slik vil vi få en bedre helhetlig forståelse og bedre grunnlag for å finne årsakssammenhenger – og derved bedre grunnlag for å foreslå kvalitetsforbedrende tiltak.



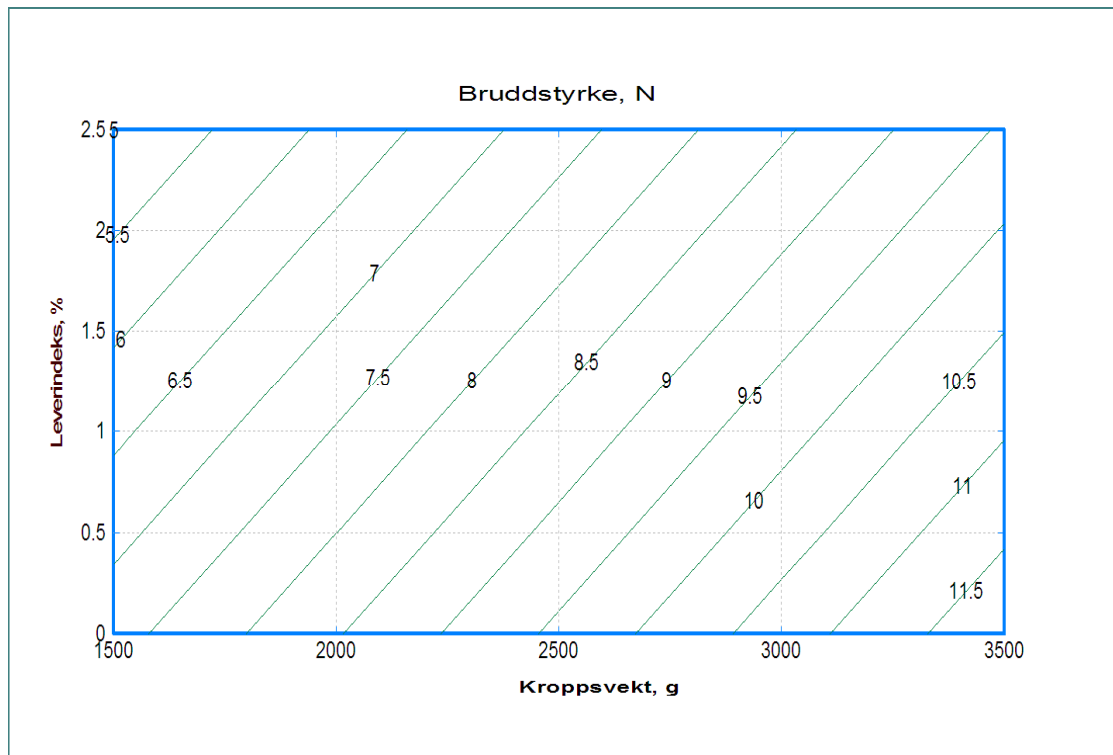
Figur 12 Lever av oppdrettslaks – et metabolsk aktivt organ som muligens står sentralt for forståelsen av teksturvariasjoner



Figur 13 Variasjon i leverstørrelse for samtlige fisk i forsøket (n=1260 laks)



Figur 14 Sammenheng mellom leverindeks og fasthet i filet for laksen som fikk Boost fôr og Kontrollfôr



Figur 15 Scatterplot ($R^2=48\%$) som viser bruddstyrke i forhold til kroppsvekt og leverstørrelse for all fisken som ble slaktet i september (Alle seks fôrene, $n=180$)

4.6 Histologi

I dette forsøket ble histologiske analyser utført for å undersøke om variasjon i filettekstur, som følge av fôr og trenging av fisken før slakting, kan knyttes til endringer i histologiske karakteristika i laksemuskelen. Det ble utført en evaluering av snitt fra 24 fisk, med 6 fisk i hver behandlingsgruppe for å undersøke muskelfibrenes tilstand, bindevevets sammensetning, og nydannelse av muskelfibre.

Det ble observert varierende mengder oppløste muskelfibre, tilstedeværelse av væske i bindevevet, og tildels ulik sammensetning av bindevevet i musklene til disse fiskene. Evalueringen syntes ikke å avsløre noen histologisk gruppering av fiskene basert på verken fôr eller stress før slakting, tross for at disse gruppene hadde ulik filettekstur. Den mest markante forskjellen mellom gruppene økt mengde oppløste celler etter trenging av Boost-gruppen og mindre væske i bindevevet etter trenging i Kontrollgruppen.

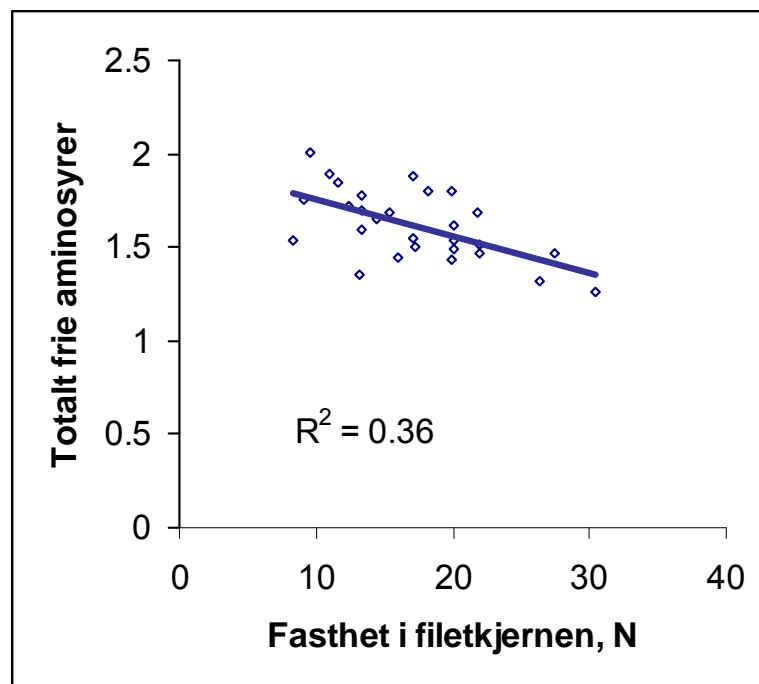
Resultatene fra elektronmikroskopering tyder på at det ikke var infeksjon som var grunnen til bløt tekstur, men dette kan ikke helt utelukkes da det krever en grundig undersøkelse av andre organer fra fisken.

Tabell 4 Resultater fra de histologiske undersøkelsene. Tallverdiene i tabellen representerer antall fisk av totalt 6 per fôr og slaktebehandling

	Ustresset		Stresset	
	Boost	Kontroll	Boost	Kontroll
Oppløste celler	2	3	5	3
Oppløst ved bindevev	3	4	3	4
Væske i vev	3	4	5	5
Væske v bindevev	3	4	3	1
Nye, små fibre	5	5	5	6
Kollagen i bindevev				
- Tynt	0	1	1	3
- Medium	4	2	3	2
- Tykt	2	3	2	1
Fett i bindevev	5	6	5	4

4.7 Frie aminosyrer i muskel og bindevev

Mengde frie aminosyrer i muskel ble analysert ved sluttuttaket i september av 5 fisk per merd (Boost n = 15; Kontrollfôr n = 15). Profilen av frie aminosyrer forskjellig i muskel fra fisk fôret boost-dietten, sammenlignet med kontrollfôret (september uttaket). Det var høyere nivå av arginin, ornitin og urea i muskel fra boost-gruppen, noe som klart viser at arginin ble tatt opp i tarm, sirkulert, og derfor kan føre til effekter i muskel. Ornitin og urea er produkter av arginase-katalysert nedbrytning av arginin. Glutamat og glutamin derimot, var ikke forskjellig i muskel fra de to gruppene, noe som kan tyde på at disse forbindelsene ble brutt ned eller konvertert i tarm-vev. Videre hadde muskel fra boost-gruppen en signifikant høyere konsentrasjon av histidin og dipeptidet karnosin (β -alanin-histidin), en forbindelse som har antioksidant-egenskaper. For datamaterialet sett under ett, var det en signifikant sammenheng mellom totalt mengde frie aminosyrer (mg/g) i muskel og fasthet målt instrumentelt; både for filetoverflaten og for tekturen i kjernen av fileten. Figur 16 viser sammenhengen mellom fastheten i kjernen av fileten og total mengde frie aminosyrer i muskel ($p = 0.0007$).



Figur 16 Sammenheng mellom fasthet i laksefilet og nivå av fri aminosyrer i muskel

Tabell 5 Korrelasjon (r) mellom fasthet i filet og mengde frie aminosyrer i muskel

Aminosyre	Korrelasjon*
Val	-0,75
B ala	-0.69
Ile	-0.66
Asp	-0.62
Leu	-0.61
M his	-0.61
Met	-0.53
Phe	-0.5
Gln	-0.46
Glu	-0.43
Tau	-0.4
Pea	-0.38
Tyr	-0.32
Thr	-0.36
Arg	0
Urea	0

4.8 Bindevev

Det var ingen forskjell mellom kontroll og testdietten når det gjaldt total mengde bindevev. Total mengde fritt hydroksyprolin var 0,04mg/g og bundet hydroksyprolin var i gjennomsnitt 2,9mg/g.

4.9 Mineraler

Mineralinnholdet (mg/kg) viste ingen signifikante forskjeller mellom Kontroll og Boost fôret. Innholdet av molybden, kadmium og bly var under deteksjonsgrensen i samtlige muskelprøver.

Tabell 6 Innhold av mineraler i muskel

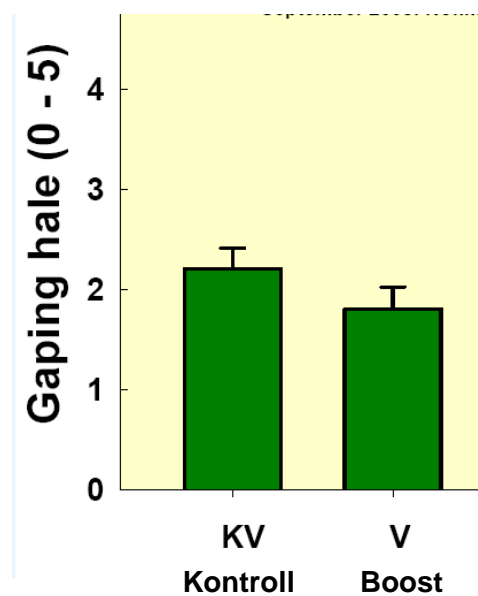
	Mn	Cu	Zn	As	Se
Kontroll	0.13	0.34	4.08	0.30	0.22
Boost	0.12	0.36	4.24	0.30	0.22

4.10 Industritest

Filetene ble bedømt til å ha meget god spenst og fasthet for begge fôrgruppene (ingen forskjell) (Figur 17). Graden av filetspalting var den samme for begge fôrgrupper i ryggpartiet, men en tendens til lavere filetspalting i haleregionen for Boost gruppen (Figur 18).



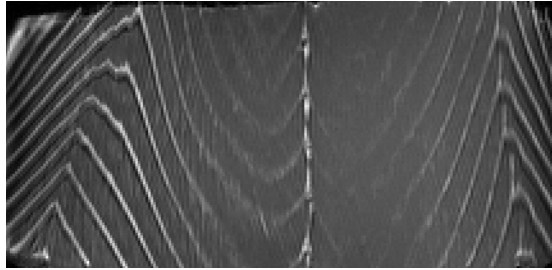
Figur 17 Illustrasjon som viser hvordan fastheten ble bedømt



Figur 18 Gaping i haleregionen hos laks gitt Kontrollfôr eller Boost fôr

4.11 Anatomi og fettfordeling (NMR)

Makroskopisk var det ingen tydelig forskjell mellom fôrgruppene og fettfordelingen var tilsvarende for laksen som var føret med Kontrollfôr og Boost føret.



Figur 19 Illustrerer et bilde fra NMR som ble brukt som grunnlag for å undersøke anatomi/ fettfordeling i muskel

4.12 Genekspressjon

Genekspressjonsanalysene (Microarray) viste markante forskjeller mellom bløt og fast laks. Nedenfor er det gitt en opplisting av noen av responsene/ variasjonene mellom bløt vs fast laksemuskel:

- Oksygentransport
 - Gener relatert til celledød
 - Proteiner som binder sink
 - Immun-/ inflammasjons relaterte gener
 - Tilsvarende type respons som ved levervirus
 - Muskelnedbrytende enzymer
 - Gener relatert til fettomsetning
-
- Cathepsin var oppregulert i laks gitt kontroll fôr, ikke i laks gitt Boost fôret.

5 Sammendrag

Studien viste at en aminosyreblending av arginin og glutamat ga fastere tekstur sammenlignet med laks som fikk kontrollfôr. Resultatene viser dermed at teksturen kan forbedres gjennom fôret. Denne kunnskapen åpner opp for nytenkning mht kvalitetsforbedrende tiltak. Generelt var det en tendens til økende fasthet med fiskestørrelsen, men variasjonen innen samme størrelsesklasse var betydelig. Vi fant ingen klar sammenheng mellom mineralinnhold og fasthet i filet og de histologiske undersøkelsene avslørte ingen tydelige strukturelle forskjeller mellom fôrgruppene.

Det var tydelige biokjemiske spor i muskel av arginin-, men ikke glutamat-tilsetningen, hos laks fra boost-gruppen. Likevel er det usikkert om kun én eller begge av disse aminosyrene førte til den økte fastheten hos fisk fra boost-gruppen. Leveren hos laks i Boost gruppen var mindre (lavere HSI), hvilket styrker hypotesen om at tilsetning av spesifikke næringsstoffer kan rette opp i en ernæringsmessig/metabolsk ubalanse i fisken som kan være knyttet til utvikling av bløt tekstur. Resultatene understreker at teksturen er komplisert å forstå i sin helhet, og at vi i det videre arbeid med å sikre god tekstur i norsk oppdrettslaks må ha en helhetlig tilnærming i arbeidet med å sikre god tekstur, heller enn kun å fokusere på muskelen separat. Spesielt er det viktig å overvåke sentrale organer og utvalgte blodparametere ettersom teksturen synes å være nært koblet til laksens metabolske tilstand og helsestatus.

Nedenfor er det gitt en opplisting av hovedfunnene i studien

Forsøksfôr (Boost) vs Kontrollfôr

- Fastere tekstur
- Mindre lever
- Ikke oppregulering av muskelnedbrytende enzymer (catepsiner) i motsetning til laks gitt Kontrollfôr
- Industritest; Tendens til lavere grad av gaping i haleregionen
- Mikrostruktur 0
- Makrostruktur 0
- Mineraler 0
- Bindevev 0

Bløt tekstur var sammenfallende med

- Større lever
- Endret fettomsetning
- Økt mengde av visse frie aminosyrer i muskel
- Endret proteinuttrykk
- For lavt nivå av visse komponenter i fôret/ "ernæringsmangel" ?

Fast tekstur

- Kan oppnås ved styrt fôrsammensetning
- Bedre forståelse av laksens energiomsetning
- Bedre forståelse av sammenhengen av lever
- Tilpasse produksjonen (fôr/fôring/sulting mm) til årstid/temperatur?
- Redusere aktiviteten av muskelnedbrytende enzymer

6 Referanser

- Cohen SA & Strydom DJ (1988). Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatisation. *Anal. Biochem.*, 174, 1-16
- Dabrowski, K., Terjesen, B. F., Zhang, Y., Phang, J. and Lee, K.-J. (2005). A concept of dietary dipeptides: a step to resolve the problem of amino acid availability in early life of vertebrates. *Journal of Experimental Biology* 208, 2885-2894.
- Folkestad, A., Wold, J.P., Rørvik, K-A., Tschudi, J., Haugholt, K.H., Kolstad, K., Mørkøre, T., (2008). Rapid and non-invasive measurements of fat and pigment concentrations in live and slaughtered Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 280, 129-135
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J. and Wu, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37, 43-53.
- Meijer, A. J. (2003). Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways. *Journal of Nutrition* 133, 2057S–2062S.
- Mørkøre, T., Austreng, E. (2004). Temporal changes in fillet texture, gaping, composition and copper status of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L) fed moist feed or extruded dry feed. *Aquaculture* 230, 439-455.
- Mørkøre, T., T., Mazo, P.I., Tahirovic, V., Einen, O. (2008). Impact of starvation and handling stress on rigor development and quality of Atlantic salmon (*Salmon salar* L). *Aquaculture* 277, 231-238.
- Sato K, Ohashi C, Ohtsuki K, Kawabata M. (1991). Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. *J. agric. Food Chem.*, 39, 1222-1225
- Terjesen, B. F. (2008). Nitrogen excretion. In *Fish Larval Physiology*, eds. R. Finn and B. Kapoor), pp. 263-302. New York: Science Publishers.
- Erikson, U., Bye, G. og Oppedal, K. (2009). Fastere filet – industritest og opplæring. Sintef rapport SFH80 A095028, 19 sider.

