

**SINTEF Fiskeri og havbruk AS**

Postadresse: 7465 Trondheim  
Besøksadresse:  
SINTEF Sealab  
Brattørkaia 17B

Telefon: 4000 5350  
Telefaks: 932 70 701

E-post: fish@sintef.no  
Internet: www.sintef.no

Foretaksregisteret: NO 980 478 270 MVA

# SINTEF RAPPORT

TITTEL

## Fastere laksefilet

FORFATTER(E)

Ulf Erikson, Iciar Martinez, Emil Veliyulin og Gudmund Bye\*  
*\*Marine Harvest*

OPPDRAUGSGIVER(E)

FHS/FHF

RAPPORTNR. <b>SFH80 A095037</b>	GRADERING <b>Åpen</b>	OPPDRAUGSGIVERS REF. <b>Kristian Prytz</b>	
GRADER. DENNE SIDE <b>Åpen</b>	ISBN <b>978-82-14-04912-1</b>	PROSJEKTNR. <b>850266</b>	ANTALL SIDER OG BILAG <b>48 + Bilag</b>
ELEKTRONISK ARKIVKODE <b>Fastere_filet_rapport_SFH_2009b.doc</b>		PROSJEKTLEDER (NAVN, SIGN.) <b>Ulf Erikson</b>	VERIFISERT AV (NAVN, SIGN.) <b>Inger Beate Standal</b>
ARKIVKODE	DATO <b>2009-06-03</b>	GODKJENT AV (NAVN, STILLING, SIGN.) <b>Marit Aursand (Forskningsjef)</b>	

**SAMMENDRAG**

Rapporten sammenfatter SINTEF Fiskeri og havbruk sine tre aktivitetsområder innen prosjektet 'Fastere laksefilet' finansiert av FHF. Aktivitetsområdene har vært: (1) Generasjonsuttak fra ulike lokaliteter (Marine Harvest) der industistesten har blitt benyttet, (2) Billeddannende kjernemagnetisk resonans (1H MRI) og 1H MAS NMR spektroskopi, og (3) Zymografi og immunologisk deteksjon av proteaser. Problemstillingen rundt 'bløt fisk' har vist seg å være kompleks. En rekke forskjellige typer analyser av ulik fisk er gjennomført i perioden 2008-2009. Ulike sider av fenomenet 'bløt laks' er diskutert i denne rapporten og det er blant annet forslått at enzymatisk bløtgjøring av fisken *in vivo* kan være en faktor som er av avgjørende betydning for muskelens teksturegenskaper i perioder av oppdrettsfasen. Samtidig er det viktig å ha klart for seg at etter dette prosjektet startet i 2008, har den undersøkte laksen fått bedre teksturegenskaper (bedre konsistens, mindre bløt) enn tilfellet var i 2007. Generelt bør analyseresultatene sees i lys av dette. I 2007 (før dette prosjektet startet) ble det utført en rekke studier og analyser av ekstremt bløt fisk. Vi har funnet det hensiktsmessig å inkludere et sammendrag av en del av disse analysene her. Det er viktig at så mye informasjon som mulig blir samlet for totalvurdering og for planlegging av videre framdrift i prosessen mot bedre teksturegenskaper hos fileter fra oppdrettslaks. Av samme grunn er det også rapportert resultater fra ulike industrietater som har blitt finansiert av andre kilder enn dette prosjektet.

STIKKORD	NORSK	ENGELSK
GRUPPE 1	Havbruk	Aquaculture
GRUPPE 2	Laks	Atlantic salmon
EGENVALGTE	Konsistens av filet	Soft flesh
	Muskelspaltning	Gaping

## INNHALDSFORTEGNELSE

<b>1. Innledning .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Et kort resymè av tidligere resultater (2007).....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Tidligere observasjoner av fenomenet 'bløt fisk' .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Analyser av ekstremt 'bløt' fisk.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.1 Vanninnhold .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.2 Vannmobilitet .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.3 Fettinnhold og fettsyresammensetning .....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.4 Filetenes konsistens - Instrumentelle teksturmålinger .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.4 Histologi (Veterinærinstituttet) .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.5 Diverse resultater .....</b>	<b>10</b>
<b>3. Bruk av industritest .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 Generasjonsuttak fra ulike lokaliteter (Marine Harvest) .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.1 Generasjonsuttak 26/27 mai 2008 (13 lokaliteter).....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.2 Generasjonsuttak 8 og 9 september 2008 (12 lokaliteter) .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1.3 Generasjonsuttak 24/25 november og 5 desember 2008 (12 lokaliteter) .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1.4 Generasjonsuttak 30 mars 2009 (8 lokaliteter).....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.5 Generasjonsuttak 25 mai og 2 juni 2009 (7 lokaliteter) .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Analyse av data fra generasjonsuttakene .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3 LMB, Bolougne Frankrike 25 september 2008 .....</b>	<b>20</b>
<b>3.4 Industritest 6 oktober 2008 med laks fra et slakteri i Nord-Norge .....</b>	<b>22</b>
<b>3.5 Industritest utført pre-rigor etter elektrobedøving av laks ved et slakteri i Sør-Norge 9. desember 2008 .....</b>	<b>24</b>
<b>4. Billeddannende kjernemagnetisk resonans (1H MRI) og 1H MAS NMR spektroskopi..</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Anatomi og fettfordeling ved 1H MRI .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 1H MAS spektroskopi.....</b>	<b>28</b>
<b>5. Zymografi og immunologisk deteksjon av proteaser.....</b>	<b>31</b>
<b>5.1 Sammendrag på norsk.....</b>	<b>31</b>
<b>5.2 Protein and protease analyses.....</b>	<b>32</b>
<b>Bilag 1 – En oversikt over alle undersøkelser i 2008-2009 hvor industritesten er benyttet .</b>	<b>49</b>

## 1. Innledning

I 2007 hadde Marine Harvest store kvalitetsproblemer med oppdrettet laks. Filetene var 'bløte' og spaltet i stor grad. Spesielt problematisk var det å filetere slik fisk for videreforedling. Det ble hevdet at problemet med bløt fisk var størst i Nord-Norge. Sommeren 2007 ble SINTEF Fiskeri og havbruk (SFH) kontaktet for å finne ut hvor i verdikjeden problemet oppstod og for eventuelt å finne årsaken til problemet. Det ble satt i gang et relativt omfattende arbeid, der det ble tatt ut slaktelaks fra forskjellige lokaliteter, etter brønnbåttransport, i ventemerd, like etter prosessering, etter noen dagers islagring og etter filetering ved to prosesseringsanlegg i Frankrike.

Det ble ganske fort klart at fenomenet *bløt fisk* definitivt kunne relateres til oppdrettsfasen. Etter hvert ble det også klart at fenomenet var mer utbredt enn først antatt, hos andre selskap, og fenomenet kunne også påvises i Sør-Norge. Det ble også klart at det fantes ingen enkel, umiddelbar løsning på problemet.

Etter hvert ble derfor flere relevante forskningsinstitutter trukket inn i problemstillingen og det ble gjennomført flere små prosjekter finansiert av FHF. I 2008 og fram til juli 2009 har FHF støttet to prosjekter relatert til bløt fisk og filetspalting. Disse er: '*Fastere fileten: Industrietest og opplæring i bruk av industrietest*' og '*Fastere laksefilet*'. Sistnevnte prosjekt er et samarbeidsprosjekt der ulike forskningsmiljøer til dels har analysert prøver fra samme individer eller fra fisk fra samme merd. Denne delrapporten fra SFH beskriver kun eget arbeid, mens Nofima sin rapport tar for seg resultatene fra de øvrige forskningsmiljøene.

SFH sitt delprosjekt omfattet tre deler:

- *Generasjonsuttak fra ulike lokaliteter (Marine Harvest)*
- *Zymografi og immunologisk deteksjon av proteaser*
- *Billeddannende kjernemagnetisk resonans (1H MRI) og 1H MAS NMR spektroskopi*

## 2. Et kort resymè av tidligere resultater (2007)

### 2.1 Tidligere observasjoner av fenomenet 'bløt fisk'

I februar 2000 ble det utført et 'bløt fisk'-prosjekt (SINTEF-rapport STF83-00020) for Hydro Seafood ved Osen Fiskeindustri. Laksen ble fulgt fra oppdretter (Vingan), etter brønnbåttransport, samt etter slakting. Fisken (0-åring, NLA stamme) var satt ut i september 1998. Biomar Lavenergifôr ble benyttet åtte ganger per dag (ikke lysstyring). Fisken ble føret restriktivt i en periode før slakting. Sultetiden var 11 og 13 dager ved 6 °C. Konklusjonen den gang var at siden fenomenet bløt fisk kunne påvises på merdkanten, var dette et resultat av oppdrett (evt. genetiske egenskaper), og ikke transport, prosessering og lagring på is. Det ble påvist en *bløt stripe* lokalisert inn mot ryggbeinet (på begge filetsider). Den bløte stripen hadde lavere fettinnhold og høyere vanninnhold enn i prøver tatt like over og under den bløte stripen.

I tillegg kan nevnes et tilfelle i 1994 hvor laks (vektklasse: 4-6 kg) ble filetert ved produksjonsmerden. Fisken så meget fin ut (høy K-faktor, blank, ubetydelig med skjelltap og sår), men filetene viste seg å være de mest ekstreme vi har sett. Muskelen var *posteiliknende*, og var dessuten 'oljeaktig', det virket som om muskelen inneholdt fri olje. Lokaliteten var på vestlandet og prøveuttaket ble gjort i mai måned. Fôret inneholdt 40 % protein og 30 % fett (energiinnhold 23 MJ/kg). Totalt fettinnhold i NQC var  $19 \pm 2$  %.

## 2.2 Analyser av ekstremt 'bløt' fisk

I dette avsnittet gir vi et kort sammendrag av noen av resultatene fra 2007 (finansiert av Marine Harvest). Det er viktig å merke seg at 2007 var et spesielt vanskelig år når det gjelder bløt fisk (omhandles senere). Analysene fra 2007 i dette avsnittet representerer *ekstremfisk*, noe vi ikke har sett i samme grad i påfølgende prosjekter i 2008 og 2009. Følgelig er det av spesiell interesse å rapportere observasjonene fra 2007 i denne rapporten.

Som i 2000 (se ovenfor) kunne en også her påvise en tydelig bløt stripe i all fisk. Oftest dekket stripen et område (3-5 cm i bredde) fra halen fram til ryggfinneren. I denne 'ekstremfisken' hadde stripen en nærmest gelaktig konsistens (Fig. 1).



*Fig. 1 – Typisk bløt stripe i laksefilet. Uttak av fisk ble gjort fra en lokalitet i Nord-Norge den 18 juli 2007. Bildet er tatt etter 4 dagers islagring.*

Hele filetene hadde en posteiliknende konsistens og selv ved ett lett trykk med en finger gikk denne lett gjennom hele fileten. Dessuten spaltet filetene lett ved moderat håndtering.

Det ble etter hvert klart at *bløt fisk* kan karakteriseres ved to, eller muligens tre, fenomener: **(1)** betydelig grad av *filetspalting* (gaping) langs myo-kommata. Spesielt framtrepende var spaltingen i ryggregionen. Spaltingen kom først til syne i betydelig grad etter håndtering av filetene; **(2)** Hele fileten var *generelt bløt* ('slapp') med liten grad av elastisitet. Nedtrykk med finger eller stempel (instrumentell teksturmåling) ga varig avtrykk som lett penetrerte hele filettykkelsen. Fisken hadde en posteiliknende konsistens; **(3)** en *bløt stripe* (siden mot ryggbeinet) som mest typisk strakk seg fra halen langs halve fileten (Fig. 1). Den bløte stripen hadde en tydelig avgrenset struktur. Muskelen så imidlertid normal ut mot skinnsiden. Ut i fra senere observasjoner (2008-2009) er vi imidlertid usikre på om den bløte stripen nødvendigvis har noe med 'bløt fisk' å gjøre.

Resultater fra en filetfabrikk og et røykeri i Frankrike (september 2007) viste at sekundærprosessering, ved bruk av maskinell filetering, pinnebeinfjerning og avskinning ga et betydelig dårligere resultat (skader på filet og dårlig utbytte) enn etter håndfiletering som vi inntil da hadde gjort selv i prosjektsammenheng. I noen tilfeller ble denne 'posteifisken' moset i stykker i maskinene.

Det ble foretatt en del analyser av fileten (vanninnhold, vannmobilitet, fettinnhold, fettsyreprofil og histologi). Prøveuttaket ble utført etter et mønster som vist i Fig. 2.

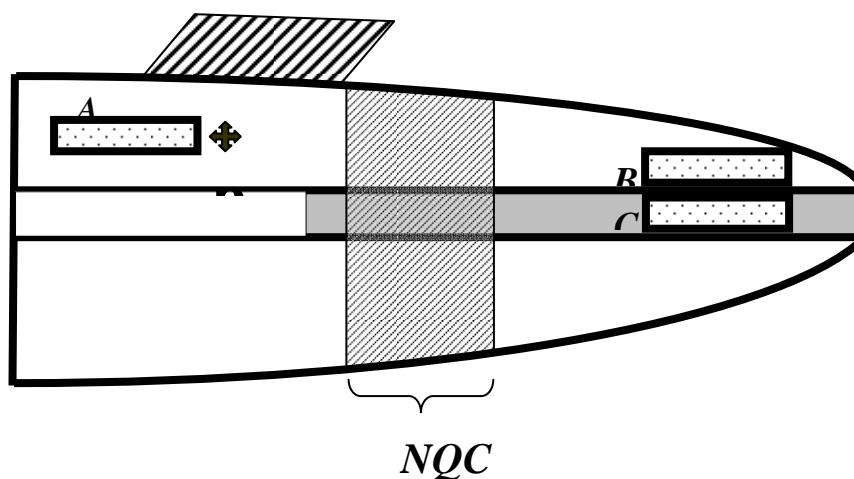


Fig. 2 - Tre prøveuttak (A, B og C) fra fileten. Analyser: Vanninnhold, vannmobilitet, fettinnhold, fettsyreprofil og histologi. Skravert del av stripen langs fileten markerer området hvor den bløte stripen er spesielt utpreget.

Bakgrunnen for å velge posisjonene A, B og C var:

- A- Tilsynelatende normal muskel (urørt filet)
- B- Tilsynelatende normal muskel (urørt filet), kontroll for punkt C på bakgrunn av at det er kjent at både fett- og vanninnhold varierer langs muskelen
- C- Bløt stripe (sammenliknes med punkt B)

### **2.2.1 Vanninnhold**

Siden det ikke var forskjeller mellom lokalitetene, er tallverdiene fra de ulike analysene slått sammen (n = 56). Sammensetningen av vev tatt fra den bløte stripen var forskjellig i det vanninnholdet var høyest i den bløte stripen (75-78 % i posisjon C, mot 67 % foran i posisjon A, og 71-74 % bak i halen, posisjon B).

### **2.2.2 Vannmobilitet**

Fra lavfelt 1H NMR som bestemmer relaksasjonstidene T21 ('intracellulært' vann) og T22 ('ekstracellulært' vann) fant vi at de var høyere i haleregionen og i høyest i den bløte stripen (n=7). Dette tyder på at vannet var løsere bundet (mer mobilt) i den bløte stripen. Dog var det kun T22 for posisjon B og C som var signifikant høyere enn i posisjon A (p<0.05). Videre var intracellulær vannfraksjon signifikant høyere for posisjon B og C sammenliknet med posisjon A (p<0.05).

### **2.2.3 Fettinnhold og fettsyresammensetning**

Totalt fettinnhold i filetene var forskjellig i posisjon A, B og C (Fig. 3). I den bløte stripen var dette lavt, 2,1-3,2 %, mens det varierte mellom 6,6-17,2 % i de andre to posisjonene. Fettsyresammensetningen var også forskjellig. Spesielt var innholdet av C22:6n3 høyt i den bløte stripen (posisjon C). Dessuten var forholdet n-3/n-6 forskjellig: 1,81 – 2,30 i posisjon C mot 1,23-1,43 i posisjon A og B. Forholdet DHA/EPA var 2,35-3,10 (posisjon C) mot 1,40-1,68 (posisjon A og B). Summen av mettede og polyumettede fettsyrer var høyere i bløt del, mens andel monoumettede fettsyrer var lavere. På grunn av det lave fettinnholdet i den bløte stripen kan det tenkes at membranfettet får en relativt større innvirkning på fettsyreprofilen.

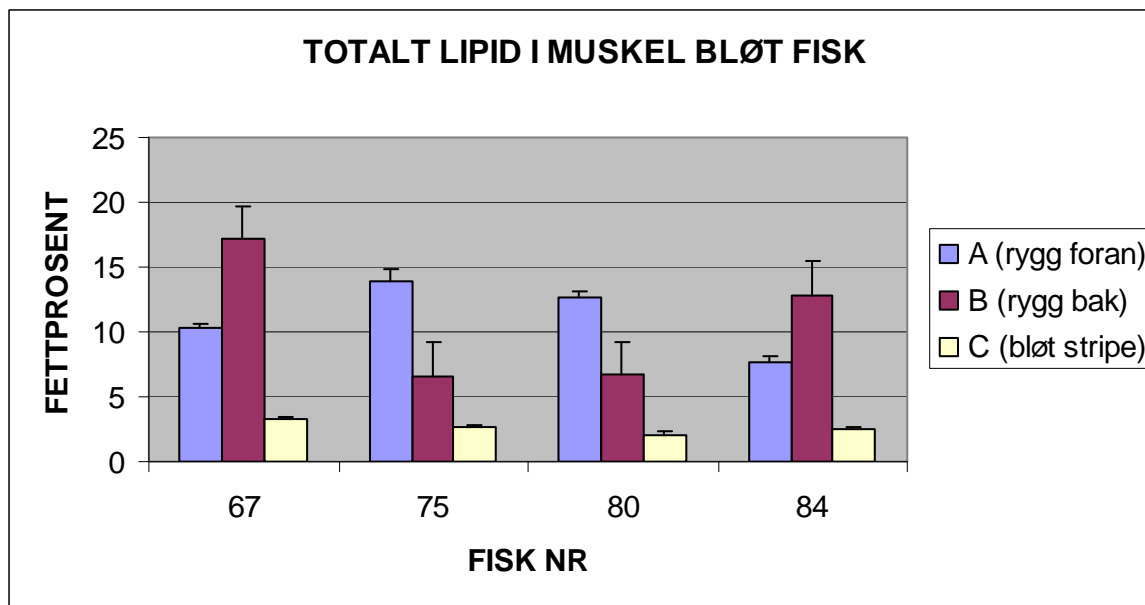


Fig. 3 – Totalt fettinnhold i tre ulike posisjoner på fileten. Slaktelaks tatt ut den 18 juni 2007 fra to ulike lokaliteter i Nord-Norge. Fisk nr. 67 & 75 var fra samme lokalitet, mens fisk nr. 80 & 84 var fra en annen lokalitet.

#### 2.2.4 Filetenes konsistens - Instrumentelle teksturmålinger

Instrumentelle teksturmålinger (TA.XT2 Texture Analyser, Micro Systems; England) ble gjort ved at et stempel (sylinder 12 mm Ø) ble presset ned i fileten to ganger etter hverandre (40 % kompresjon av fileten). Teksturen ble målt i 5 ulike posisjoner langs filetene i 12 grupper slaktelaks. Det mest typiske for alle grupper fisk var at kraften ved 2. nedtrykk var meget større enn ved første nedtrykk. Dette motsatt av det som er vanlig for 'normal' laks. Årsaken var at filetene manglet spenst slik at første nedtrykk presset sammen fileten så å si fullstendig uten at filetoverflaten gikk tilbake til utgangsposisjonen. Stemplet laget derfor et varig nedtrykk ('brønn') i fileten. Andre nedtrykk presset da sammen den allerede sammenpressede muskelen slik at større kraft trengtes til å presse dette ytterligere sammen 40 %.

Fig. 4 viser nødvendig kraft (F1, første nedtrykk) som skulle til for å presse filetene sammen 40 % i fem ulike posisjoner (1-5). Som vi ser, var variasjonen innen hver gruppe betydelig (store SD). Ved å sammenlikne posisjon 1-5 i en gruppe mot tilsvarende posisjoner i andre grupper fant vi ingen signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ). Første nedtrykk penetrerte konsekvent muskelen og laget et meget utpreget varig avtrykk, dette var meget spesielt. Dette bekreftet at konsistensen på filetene var spesiell (2007), filetene hadde en posteiliknende konsistens.

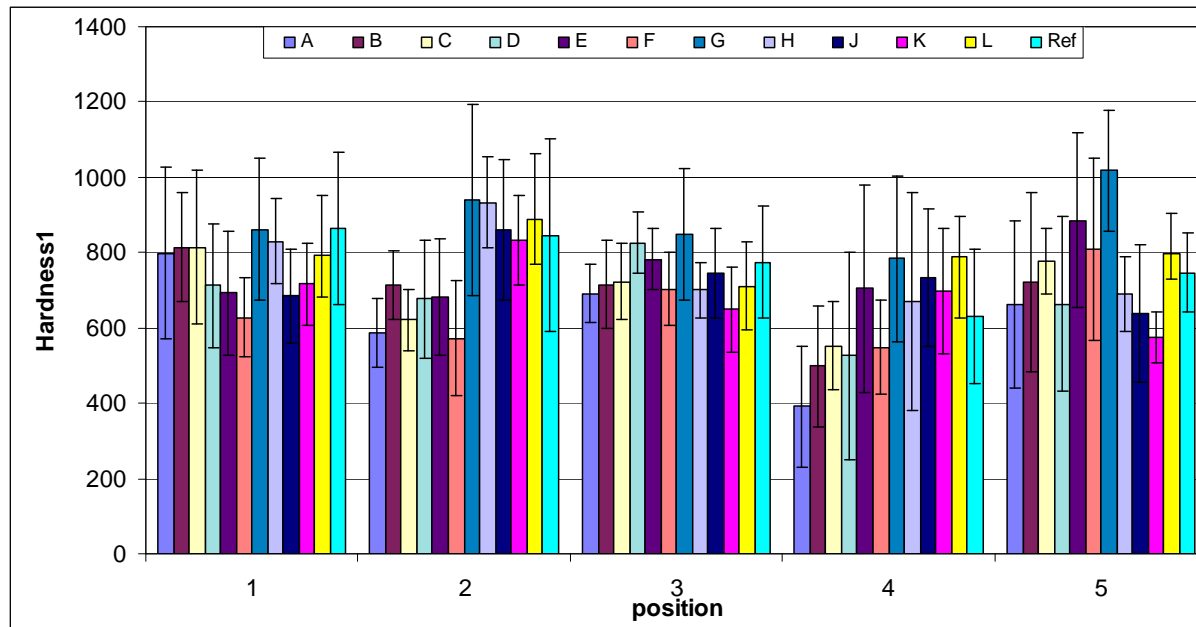


Fig. 4 – Teksturmåling av laksefileter skåret fra fisk fra ulike lokaliteter og prosesstrinn. Kraft (gram) i første nedtrykk er vist. Første nedtrykk satte et varig, meget utpreget avtrykk ('en sylindrisk brønn ble laget etter stemplet'). Dette viser at filetene ikke var elastiske. Posisjon 1: ryggmuskel foran, Posisjon 2 og 4: rygg i haleregionen og Posisjon 3 og 5: to områder i den bløte stripen. Middelerdi  $\pm$  SD (n=8). Ulike lokaliteter og prosesstrinn: A–produksjonsmerd; B–ventemerd; C–etter elektrobedøving på prosesslinje; D–produksjonsmerd; E–ventemerd; F–etter elektobedøving 2X på prosesslinje; G–produksjonsmerd; H–elektrobedøving på prosesslinje; J–etter elektrobedøving på prosesslinje; K–etter elektrobedøving 2x på prosesslinje; L–produksjonsmerd; Ref–etter prosessering av fisk fra en lokalitet i Midt-Norge, prosesseringen skjedde i dette tilfellet ved at annet slakteri der fisken ble sedatert med bruk av RSW levendekjøling og karbon dioksid. NB! Betegnelsen på lokalitetene, A – L, er ikke de samme som ble brukt senere i forbindelse med generasjonsuttakene i 2008-2009.

#### 2.2.4 Histologi (Veterinærinstituttet)

Det ble også tatt ut 18 prøver til histologi av denne ekstremfisken. Prøvene A, B og C ble tatt ut etter samme mønster som vist i Fig 2. Muskelprøvene ble enten tatt ut umiddelbart etter avlving ved merd eller etter 4 dager på is. Umiddelbart etter utskjæring ble prøvene fiksert og lagret inntil analyse i 4 % formalinbuffer. Prøvene ble analysert og vurdert av Torkjell Bruheim ved Veterinærinstituttet i Trondheim (juli 2007). Noen typiske bilder og kommentarer er gjengitt her:

*Anamnese: Bløt stripe i muskulatur*

*Metode: Histopatologi*

*Resultat: Prøver fra uttaksted A og B viste gjennomgående rikelig avleiring av fettvev (Bilde 1, her: Fig. 5) i myosepta (bindevevsskillet mellom muskelsegmentene). En kunne også se en del fettinfiltrasjon mellom muskelfibrene i områder av enkelte av disse prøvene. Prøver fra uttakssted C viste imidlertid lite eller intet fettvev i myosepta. Myosepta bestod her stor sett kun av et tynt bindevevslag (Bilde 2, her: Fig. 6).*



Det ble påvist stedvis forekomst av det som trolig er proteinholdig væske (Bilde 3 og 4, her: Fig. 7 og Fig. 8). Mest uttalt var det i tilknytning til myosepta i enkelte prøver fra uttakssted C, men dette var ikke et gjennomgående funn. Hvorvidt produksjonen av denne væske er knyttet til degenerative prosesser i muskulaturen er uvisst. Funnt av enkelte cellekjerner (mest av muskelcelletype) i områder med slik væske kan indikere at så er tilfelle. Sikre degenerative forandringer forelå ikke i spesielt omfang, verken i A, B eller C.

#### **Kommentar**

Undersøkelsen har ikke gitt funn som isolert forklarer de makroskopiske forandringer. Fravær av fettvev i myosepta er ikke å anse som unormalt, store mengder fettvev i muskulaturen er et "oppdrettsfenomen", og sees i langt mindre grad hos villaks. Det er imidlertid påfallende at fett ikke er jevnt lagret i muskulaturen.

Det var ikke mindre bindevev i prøve C mot A og B og bindevevet fremstod som normalt ved histologi. Forekomst av store mengder proteinholdig væske er et funn som bør følges opp i et større materiale og med et standardisert prøveuttak. Det er imidlertid ikke uvanlig å finne mindre områder med slike forandringer i muskulatur av oppdrettsfisk, og betydningen av slike forandringer er ikke klarlagt.

Torkjel Bruheim  
veterinær  
Veterinærinstituttet

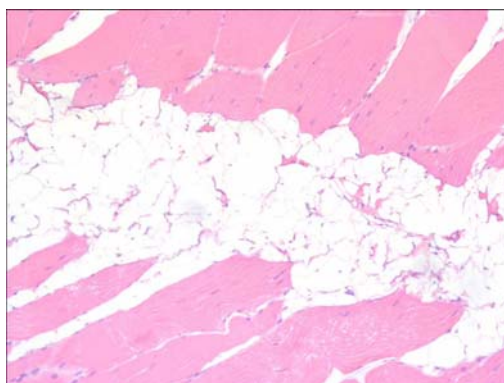


Fig. 5 (Bilde 1) - Rikelig fettvev i myoseptum. Normal muskel, Posisjon A (Fig. 2). Forstørrelse 100X. (T. Bruheim, Veterinærinstituttet)

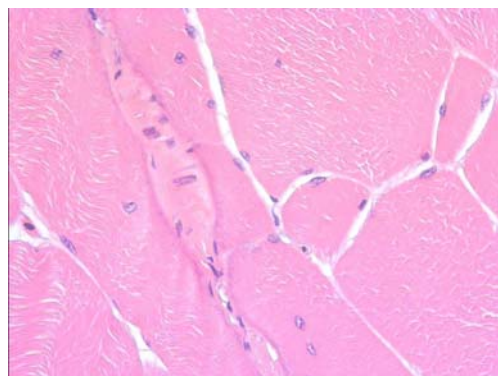
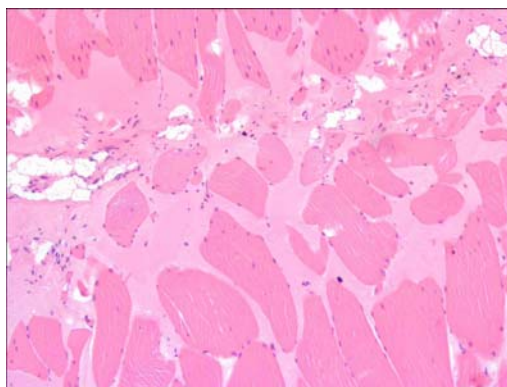
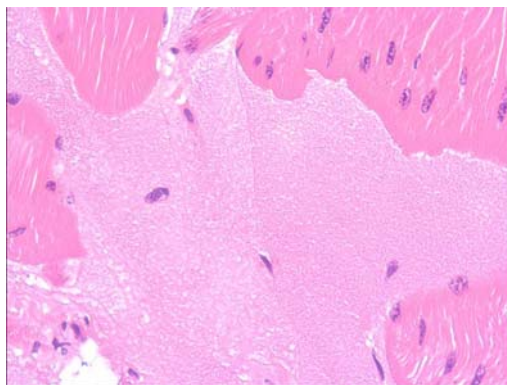


Fig.6 (Bilde 2) - Myoseptum uten fettavleiring. Bløt stripe, posisjon C (Fig. 2). Forstørrelse: 450X. (T. Bruheim, Veterinærinstituttet)



*Fig. 7 (Bilde 3) - Myoseptum med rikelig væskeutsvedning (ødem). Bløt stripe, posisjon C (Fig. 2). Forstørrelse 100X. (T. Bruheim, Veterinærinstituttet)*



*Fig. 8 (Bilde 4) - Nærbilde av Bilde 3 (Posisjon C, Fig. 2). Forstørrelse 450X. (T. Bruheim, Veterinærinstituttet)*

### **2.2.5 Diverse resultater**

Av resultater for øvrig kan nevnes:

- All fisk tatt ut fra de ulike lokalitene ble vurdert som 'bløte'
- Bløt slaktefisk både fra 0- og 1-års smolt
- Sultetid syntes ikke å påvirke oppfatningen av bløthet (variasjon i sultetid 0 – 10 dager)
- Håndteringsstress ved uttak fisk fra produksjonsmerd påvirket ikke oppfatningen av 'bløthet'. På grunn av ulike forhold ved de enkelte lokalitetene varierte muskel-pH mellom pH 7,5 (hvile) og pH 6,7 (utmattet) når fisk til analyse ble håvet ut fra de forskjellige produksjonsmerdene.
- Slutt-pH i filetene var typisk for oppdrettslaks (pH 6,3-6,4)
- Roche fargescore syntes ikke å være påvirket av filetenes 'bløthet'
- Det er kjent at infeksjon av parasitten *Kudoa* sp i muskelvev kan føre til bløt filet. Dette er blant annet påvist hos Atlantisk laks i Canada. Tre bløte fileter ble sendt til NIFES for

nærmere undersøkelse med hensyn på dette. Det ble ikke påvist *Kudoa*-infeksjon, ei heller *Kudoa* cyster. I tillegg må nevnes at bløt muskel ved *Kudoa*-infeksjon er et post mortem-fenomen, dvs fileten blir gradvis bløtere ved islagring, noe vi ikke i utpreget grad har observert her.

### 3. Bruk av industritest

Parallelt med gjennomføringen av dette prosjektet har det blitt utviklet en *industritest* som er en enkel metode for å evaluere teksturegenskapene hos fileter fra laksefisk. Metoden er rapportert separat i forbindelse med FHF-prosjektet 'Fastere filet: Industritest og opplæring i bruk av industritest' (SINTEF-rapport SFH80 A095028, juni 2009).

Industritesten har blitt brukt i flere sammenhenger for å evaluere effekt av ulike parametre på filetenes teksturegenskaper. En oversikt over de ulike testene er gitt i Bilag 1. Industritestene utført i tilknytning til FHF-prosjektet 'Fastere laksefilet' er rapportert her.

#### 3.1 Generasjonsuttak fra ulike lokaliteter (Marine Harvest)

Fra mai 2008 til mai 2009 er det utført 5 uttak med fisk med ulik bakgrunn fra til sammen 20 ulike lokaliteter (generasjonsuttak). Formålet var å studere utviklingen av muskelens konsistens og styrke (gaping) ved gjentatte uttak. Dessuten har industritesten blitt benyttet i flere andre sammenhenger. For eksempel er effekten av ulike fôrleverandører, genetiske grupper og fôrtyper sammenliknet. En kronologisk oversikt over alle undersøkelsene er gitt i Bilag 1. Noen hovedkonklusjoner er også gitt i dette bilaget. I tillegg har Marine Harvest benyttet industritesten internt på et stort antall fisk (ikke vist i denne rapporten).

Følgende variable er studert:

- Vekst, fisk er tatt ut fra samme lokalitet over en periode på opptil ett år
- Vår- og høstmolt (V07, H07 og V08)
- Sammenlikning av ulike lokaliteter i Nord- og Sør-Norge
- Ulike stammer (Aqua Gen, Mowi og Salmobreed)
- Ulike smoltleverandører (9 stk)
- Ulike fôrleverandører (BioMar, Skretting og EWOS)

De ulike lokalitetene er kodet fra A til T (20 lokaliteter). I figurene nedenfor er disse lokalitetene nummerert fra 1-13. Resultatene fra de ulike generasjonsuttakene er gjengitt i kronologisk rekkefølge nedenfor.

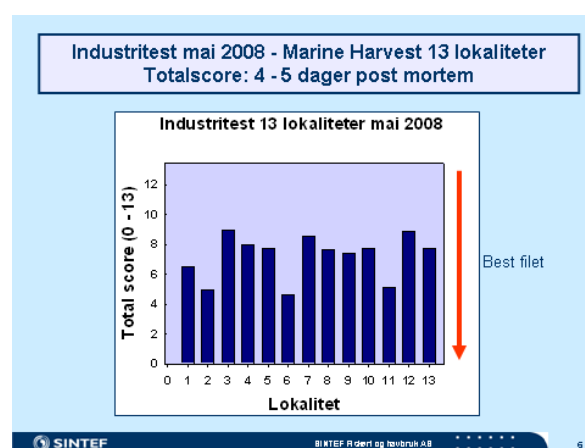
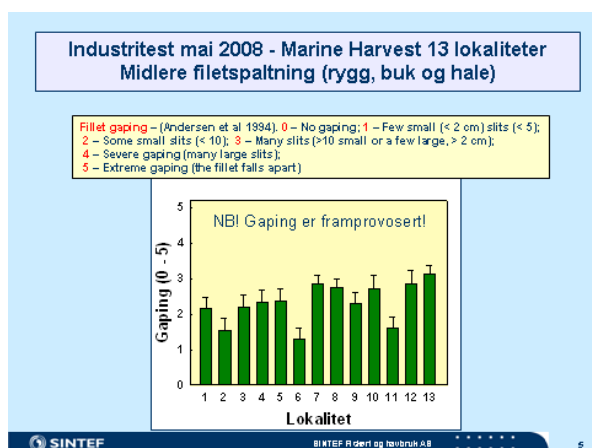
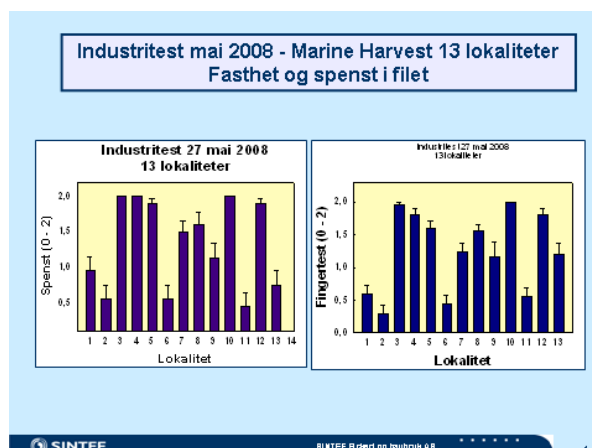
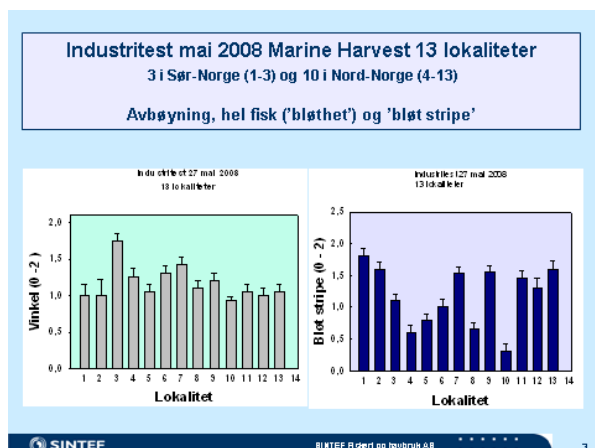
I generasjonsuttakene ble filetenes kvalitet (konsistens og spaltning) vurdert ved bruk av den såkalte *Industritesten* som ble utviklet parallelt med gjennomføringen av dette prosjektet. Her gjengis kort hvilke parametre som har blitt benyttet og betydningen av score som brukes for hver parameter. Fisken må evalueres post rigor og en har valgt å filetere og utføre testen 4 dager post mortem. Kjernetemperatur sjekkes for å verifisere at fisken har blitt lagret forskriftsmessig (islagring). De ulike parametrene som ble brukt var:

1. *Avbøyning av hel fisk (vinkel)* – her er den såkalte Rigor Index-metoden brukt, der en måler antall grader halen bøyer av når halve fiskens lengde (halen) ligger utenfor bordkanten. Ideen har var å se om post-rigor avbøyning var relatert til fiskens grad av 'bløthet'. Score: 0 (<30°); 1 (mellom 30° til 60°) og 2 (>60°).

2. **Bløt stripe** – Lengden av den bløte stripen bestemmes. Score: 0 (ingen, eller meget svak antydning til bløt stripe); 1 (den bløte stripen dekker ca 1/3 av fileten lengde) og 2 (den bløte stripen dekker ca 1/2 av fileten lengde)
3. **Spent/elasticitet** – Fileten brettes dobbel kant mot kant, muskelside mot muskelside med spordenden øverst. Slipp og registrer. Score: 0 (elastisk, fileten retter seg raskt ut); 1 (noe elastisk, fileten retter seg langsomt ut) og 2 (ikke elastisk, fileten forblir sammenbrettet)
4. **Fingertest (konsistens)** – En finger presses ned i muskelen mellom sidelinjen og ryggfinnen (anslagsvis 1 kg trykk i 2 sek). Score: 0 (fast og elastisk, overflaten gjenopprettes); 1 (noe myk, varig avtrykk) og 2 bløt (fingeren går rett gjennom fileten)
5. **Gaping** - Fileten brettes/håndteres forholdvis kraftig. Gaping blir framprovsert for å simulere filetmaskin. Gaping bestemmes i rygg, buk og hale. Score: 0-5.
6. **Total score** – Total score = summen av Test 1-5. Test 1-4 har score 0-2, men Test 5 (gaping score) beregnes slik: (rygg + buk + hale)/3. dermed får gaping noe høyere vektning. Jo lavere Total score er, jo bedre er fileten teksturegenskaper.

### 3.1.1 Generasjonsuttak 26/27 mai 2008 (13 lokaliteter)

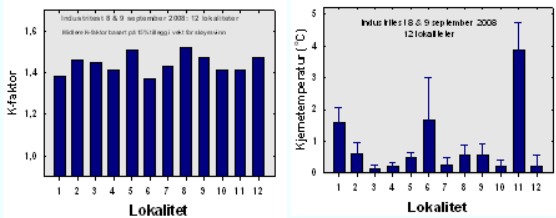
Laks fra 13 forskjellige lokaliteter (Marine Harvest) – Mai 2008							
Nummer i figurer	Lokalitet	Generasjon	Vekt (kg)	Stamme	Fôrleverandør	Smoltleverandør	
S	1	S	H06	4 - 7	Aqua Gen	Biomar/Skretting	Eidane
	2	Q	V07	2 - 5	Aqua Gen	Skretting	Fister smolt
	3	P	H07	0,4-0,6	Aqua Gen	Biomar/Skretting	Kvingo
	4	O	H07	0,3 - 0,9	Salmo breed	Skretting	Glomfjord/ Nordheim
	5	N	H07	0,4 - 0,7	Aqua Gen	Skretting	Salsbruket
	6	F	H06	4 - 7	Aqua Gen	Biomar	Salsbruket
	7	C	V07	1 - 3	Aqua Gen	Skretting	Flatanger/ Salsbruket
N	8	G	H07	0,3 - 0,7	Aqua Gen Mowi	Skretting	Tosbotn Salsbruket
	9	J	V07	2	Salmo breed	Ewos	Sagafisk
	10	K	H07	0,1 - 0,2	Salmo breed	Ewos	Sagafisk
	11	B	H06	4 - 9	Aqua Gen	Skretting	Tosbotn
	12	E	H07	0,4-0,7	Aqua Gen	Skretting	Tosbotn
	13	A	V07	1 - 3	Aqua Gen	Skretting	Tosbotn



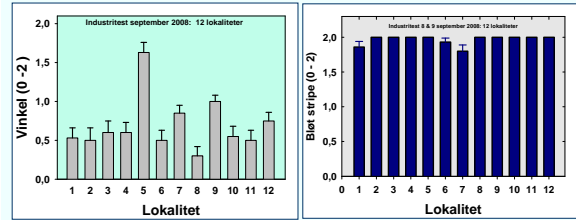
### 3.1.2 Generasjonsuttak 8 og 9 september 2008 (12 lokaliteter)

Laks fra 12 forskjellige lokaliteter (Marine Harvest) – September 2008						
Nummer i figurene	Lokalitet	Generasjon	Vekt (kg)	Stamme	Fôrleverandør	Smolt-leverandør
1	Q	V07	2,9 ± 0,8	Aqua Gen	Skretting	Fister smolt
2	P	H07	1,3 ± 0,3	Aqua Gen	Biomar/Skretting	Kvingo
3	O	H07	1,5 ± 0,3	Salmo breed	Skretting	Glomfjord/Nordheim
4	L (flyttet fra N i mai)	H07	1,5 ± 0,3	Aqua Gen	Skretting	Salsbruket
5	M (flyttet fra N i mai)	H07	1,8 ± 0,3	Aqua Gen	Skretting	Salsbruket
6	C	V07	4,0 ± 0,6	Aqua Gen	Skretting	Flatanger/Salsbruket
7	G	H07	1,4 ± 0,3	Aqua Gen Mowi	Skretting	Tosbotn Salsbruket
8	J	V07	3,3 ± 0,5	Salmo breed	Ewos	Sagafisk
9	K	H07	0,8 ± 0,3	Salmo breed	Ewos	Sagafisk
10	D (flyttet fra E i mai)	H07	1,5 ± 0,2	Aqua Gen	Biomar	Tosbotn
11	A	V07	4,4 ± 0,3	Aqua Gen	Skretting	Tosbotn
12	H (Ny)	V08	1,1 ± 0,3	Mowi	Skretting	Slørdal/Glomfjord

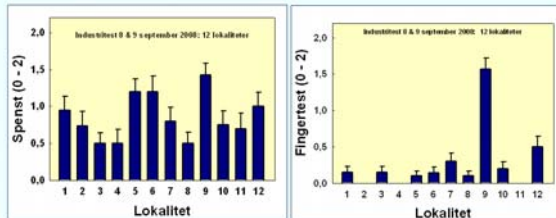
### Midlere K-faktor og kjernetemperatur ved analyse (Industritest)



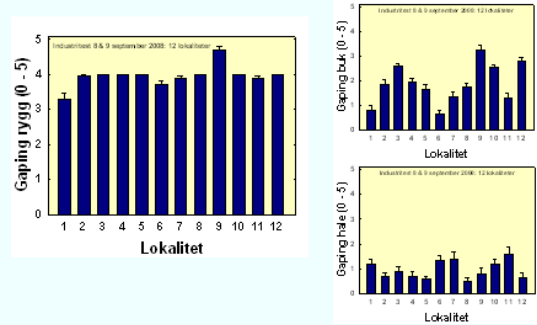
### Industritest Avbøying av hel fisk (vinkel) og lengde av bløt stripe



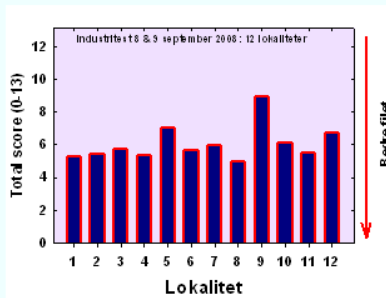
### Industritest september 2008 – 12 Marine Harvest lokaliteter Spenst (elastisitet) og fingertest (konsistens) i filet



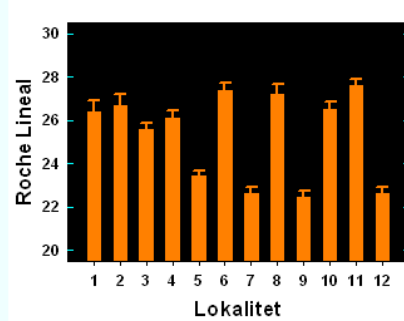
### Industritest – Gaping i rygg, buk og hale NB! Gaping blir framprovosert



### Industritest – Total score



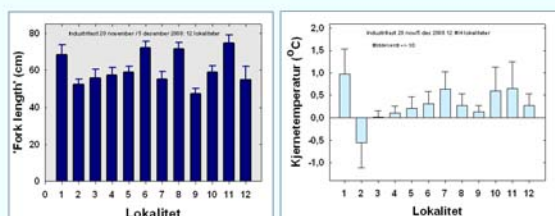
### Farge i filet



### 3.1.3 Generasjonsuttak 24/25 november og 5 desember 2008 (12 lokaliteter)

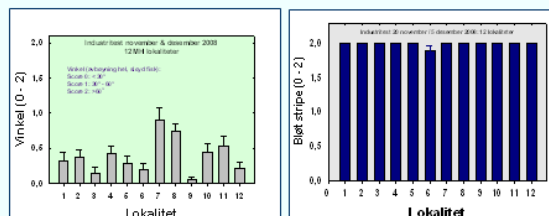
Laks fra 12 forskjellige lokaliteter (Marine Harvest) – November/desember 2008						
Nr i figurene	Lokalitet	Generasjon	Vekt ± SD (kg)	Stamme	Førleverandør	Smolt-leverandør
1	Q	V07	4,1 ± 1,6	Aqua Gen	Skretting	Fister smolt
2	P	H07	2,0 ± 0,5	Aqua Gen	Biomar/Skretting	Kvingo
3	O	H07	2,6 ± 0,7	Salmo breed	Skretting	Glomfjord/Nordheim
4	L (flyttet fra N i mai)	H07	2,6 ± 0,5	Aqua Gen	Skretting	Salsbruket
5	M (flyttet fra N i mai)	H07	2,6 ± 0,4	Aqua Gen	Skretting	Salsbruket
6	C	V07	4,6 ± 0,7	Aqua Gen	Skretting	Flatanger/Salsbruket
7	G	H07	2,3 ± 0,6	Aqua Gen Mowi	Biomar (endring siden sist)	Tosbotn Salsbruket
8	J	V07	4,8 ± 0,7	Salmo breed	Biomar (endring siden sist)	Sagafisk
9	K	H07	1,2 ± 0,2	Salmo breed	Biomar (endring siden sist)	Sagafisk
10	D (flyttet fra E i mai)	H07	2,8 ± 0,6	Aqua Gen	Biomar	Tosbotn
11	A	V07	5,2 ± 0,8	Aqua Gen	Skretting	Tosbotn
12	H	V08	2,8 ± 0,6	Mowi	Skretting	Slørdal/Glomfjord

#### Lengde og kjernetemperatur ved analyse (Industriest)



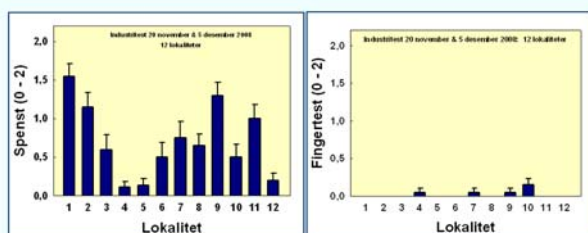
Middelverdi ± SD (n = 20)

#### Industriest Avbøying av hel fisk (vinkel) og lengde av bløt stripe

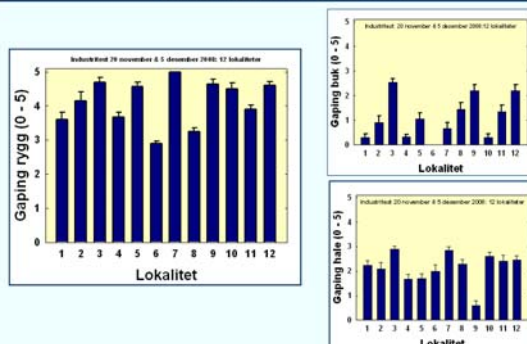


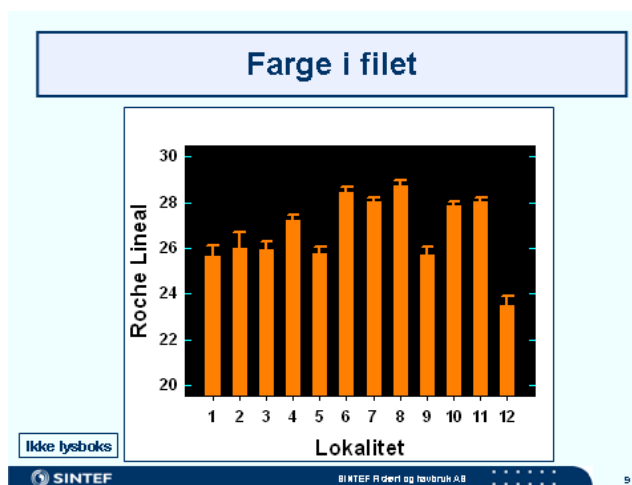
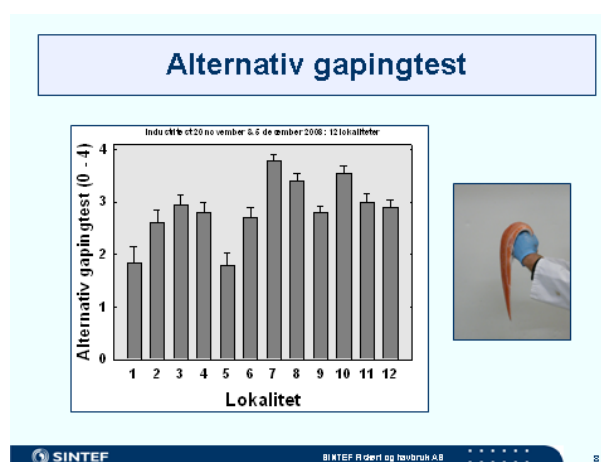
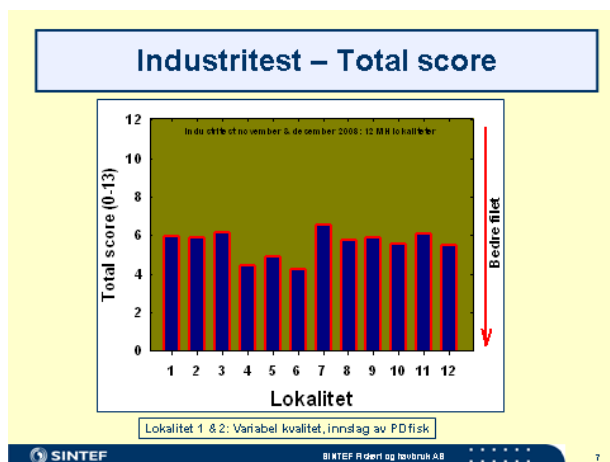
Industriest: Middelverdi ± SEM (n=20)

#### Industriest november & desember 2008 12 lokaliteter Marine Harvest Spenst (elastisitet) og fingertest (konsistens)



#### Industriest – Gaping i rygg, buk og hale NB! Gaping blir framprovosert





### 3.1.4 Generasjonsuttak 30 mars 2009 (8 lokaliteter)

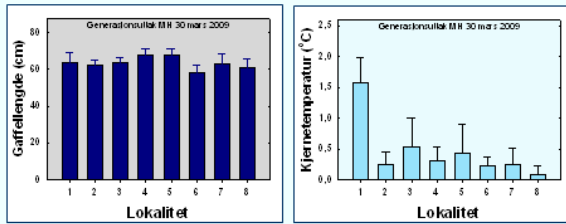
### Laks fra 8 forskjellige lokaliteter (Marine Harvest) – Mars 2009

Nummer i figurene	Lokalitet	Generasjon	Sløydvekt ± SD (kg)	Stamme	Førleverandør	Smolt-leverandør
1	P	H07	3,6 ± 1,0	Aqua Gen	Biomar/Skretting	Kvingo
2	O	H07	3,3 ± 0,6	Salmo breed	Skretting	Glomfjord/Nordheim
3	L (flyttet fra N i mai 2008)	H07	3,7 ± 0,6	Aqua Gen	Skretting	Salsbruket
4	M (flyttet fra N i mai 2008)	H07	4,2 ± 0,8	Aqua Gen	Skretting	Salsbruket
5	G	H07	4,3 ± 1,0	Aqua Gen Mowi	Biomar	Tosbotn Salsbruket
6	K	H07	2,6 ± 0,6	Salmo breed	Biomar	Sagafisk
7	D (flyttet fra E i mai 2008)	H07	3,1 ± 1,0	Aqua Gen	Biomar	Tosbotn
8	I (flyttet fra H i 2009)	V08	3,3 ± 0,9	Mowi	Skretting	Slørdal/Glomfjord

Fisk fra lokalitet 2 - 8 evaluert 4 dager post mortem  
 Fisk fra lokalitet 1 evaluert 6 dager post mortem



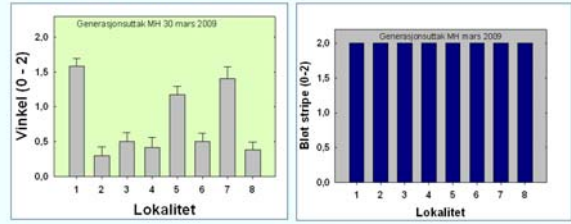
### Lengde og kjernetemperatur ved analyse (Industritest)



Middelverdi ± SD (n = 16 - 24)

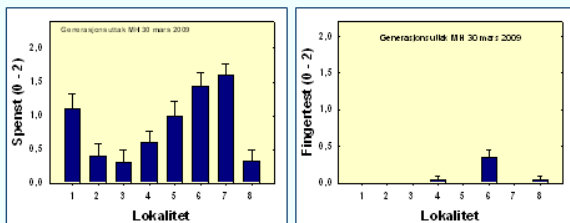
### Industritest Avbøyning av hel fisk (vinkel) og lengde av bløt stripe

Avbøyning (vinkel)  
Score 0 < 30°; Score 1 30-60°; Score 2 > 60°

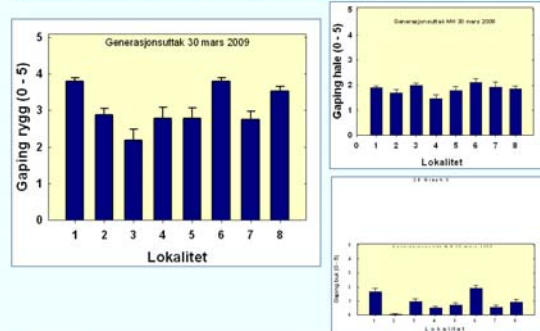


Industritest: Middelverdi ± SEM (n=16-24)

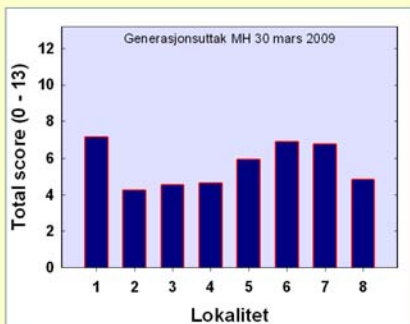
### Industritest mars 2009 8 lokaliteter Marine Harvest Spenst (elastisitet) og fingertest (konsistens)



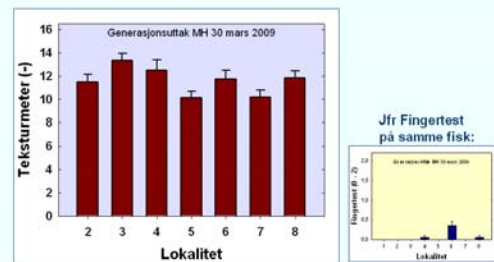
### Industritest – Gaping i rygg, buk og hale NB! Gaping blir framprovosert



### Industritest – Total score



### Håndholdt teksturmeter Ett målepunkt i ryggregionen



Middelverdi ± SEM (n=16-24); Fisk fra lokalitet 1 ble ikke målt

## Konklusjoner

- Som i 2008, har fisken akseptabel konsistens (fingertest)
- Spalting i rygg er fortsatt (etter 2007) hovedproblemet
- Forskjeller i spenst (elastisitet) mellom lokalitetene
- Fisken fra Lokalitet K (nr.6) blir stadig bedre og er utseendemessig betydelig bedre (mer normal) enn tidligere. Dog får fisk fra denne lokaliteten dårligst score mht konsistens, spenst og gaping. Dermed har fisk fra alle lokalitetene satt ut H07 etter hvert blitt akseptable mht filetkvalitet.
- Flere lokaliteter i Region nord kommer noe bedre ut enn den i sør

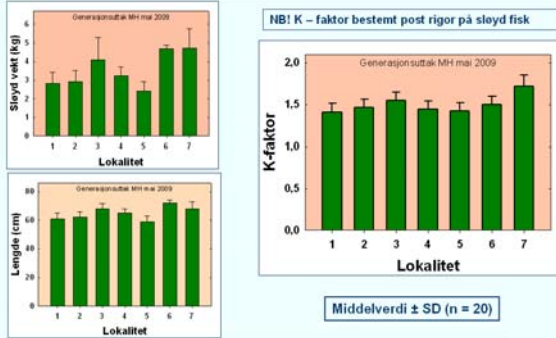
### 3.1.5 Generasjonsuttak 25 mai og 2 juni 2009 (7 lokaliteter)

#### Laks fra 7 forskjellige lokaliteter (Marine Harvest) – 25 mai og 2 juni (Skarvøy) 2009

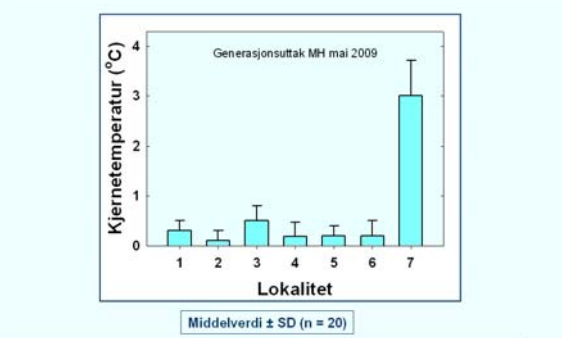
Nummer i figurene	Lokalitet	Generasjon	Sløydvækt ± SD (kg)	Stamme	Fôrleverandør	Smoltleverandør
1	P	H07	2,8 ± 0,6	Aqua Gen	Blomar/Skretting	Kvingo
2	O	H07	2,9 ± 0,6	Salmobreed	Skretting	Glomfjord/Nordheim
3	L (flyttet fra Ni i mai 2008)	H07	4,1 ± 1,2	Aqua Gen	Skretting	Saibruket
4	G	H07	3,2 ± 0,5	Aqua Gen Mowl	Blomar	Toisbotn Saibruket
5	K	H07	2,4 ± 0,5	Salmobreed	Blomar	Sagafløk
6	D (flyttet fra E i mai 2008)	H07	4,7 ± 0,2	Aqua Gen	Blomar	Toisbotn
7	I (flyttet fra Hi 2009)	V08	4,7 ± 1,1	Mowl	Skretting	Slørdal/Glomfjord

Fisk fra alle lokalitetene ble evaluert 5 dager post mortem

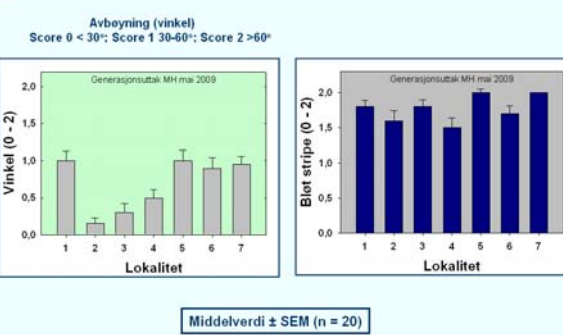
### Vekt, lengde og K-faktor ved analyse Industritest mai 2009



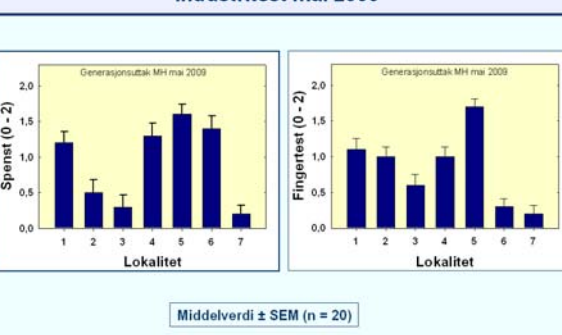
### Kjernetemperatur ved analyse Industritest mai 2009



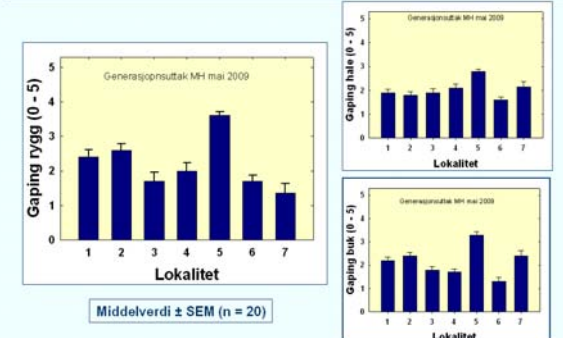
### Avbøyning av hel fisk (vinkel) og lengde av bløt stripe Industritest mai 2009



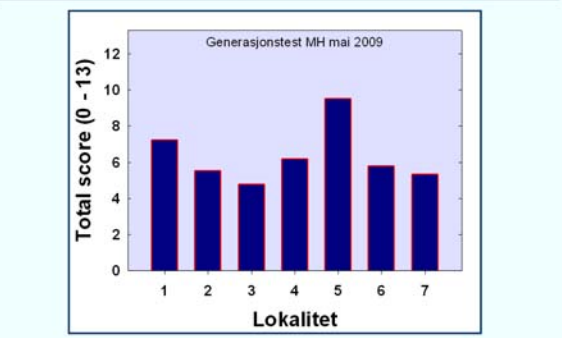
### Spenst (elastisitet) og fingertest (konsistens) Industritest mai 2009

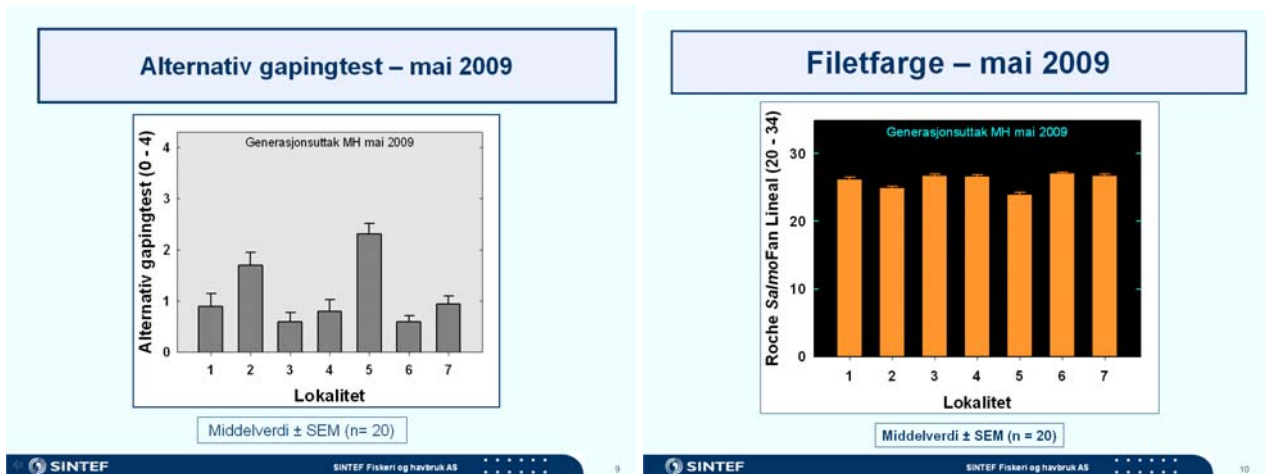


### Gaping i rygg, buk og hale Industritest mai 2009; NB! Gaping blir framprovosert



### Total score Industritest mai 2009





## Konklusjoner – mai 2009

- Variasjon i avbøyning av hel fisk, lite til moderat. God overensstemmelse med spenstmålingene (unntatt for lokalitet nr. 7, men denne fisken hadde høyere kjernetemperatur)
- Tendens til kortere bløt stripe sammenliknet med i mars 2009
- God til middels(-) spenst. **Tre lokaliteter skiller seg ut mht bedre spenst. Disse var også de tre beste i mars 2009**
- Fingertest: I fisk fra 5 av 7 lokaliteter kunne en observere varig avtrykk. **Generelt har filetene blitt noe bløtere enn i desember 2008 og i mars 2009**
- Moderat gaping, rundt score 2 for rygg, hale og buk. **Mindre gaping i ryggen enn tidligere, men noe mer i buken**
- Stor forskjell mellom lokalitetene mht filetkvalitet, ytterpunktene i Total score var på ca 4 og 9
- Relativt god overensstemmelse mellom gapigscore i rygg og alternativ gapingtest
- Fisken fra lokalitet K (nr.5) scorer fortsatt dårligst på alle parametre
- Flere lokaliteter i Region nord kommer bedre ut enn den i sør

### 3.2 Analyse av data fra generasjonsuttakene

Resultatene fra industritestene i forbindelse med generasjonsuttakene er behandlet ved hjelp av multivariat analyse der det er tatt hensyn til blant annet geografisk beliggenhet og miljøforhold ved lokalitetene, fôringsregime, tilvekst, samt andre variabler nevnt ovenfor. Analysene er foretatt av Marine Harvest og er ikke rapportert her.

### 3.3 LMB, Bolougne Frankrike 25 september 2008

Det ble utført en industritest i forbindelse med det parallelle FHF-prosjektet 'Fastere filet: Industritest og opplæring i bruk av industritest'. Testen ble utført i forbindelse med opplæring av personell ved bedriften i Frankrike. Bedriften ble også besøkt i 2007 på et tidspunkt de hadde betydelige problemer med prosessering av 'bløt fisk' (se ovenfor). Som det framgår av testen vist her, hadde laksens teksturegenskaper bedret seg betraktelig siden forrige besøk ett år tidligere.

### Industry Test – Fillet Texture Atlantic salmon from 4 Marine Harvest processing plants in Norway

Evaluated at LMB, Bolougne - France  
25 September 2008

**Fish from:**

- R 110 (Ryfisk, Hjelmeland)
- M 384 (Eggesbønes)
- ST 400 (Ulvan)
- N 1115 (Herøy)

S

↓

N

SINTEF Fisheries and Aquaculture

### Some comments from LMB

- Fillets from N 1115 (and particularly from another processing company) have softness and gaping problems → some downgrading
- Atlantic salmon from Faroe Islands and Iceland are very 'soft' for the time being
- Typical soft-flesh period: May-September, but also winter can be a soft-flesh period
- Generally better fillet quality 10 years ago

SINTEF Fisheries and Aquaculture

### Industry test – Background data

- Fish weight and quality: 3 – 4 kg, Superior grade
- Fillets evaluated 6 days post mortem, except from ST 400 evaluated 3 days post mortem
- Fillets (n = 10) sampled after Baader 988 trimming machine (D-trim)
- Sufficient ice supply in all boxes

SINTEF Fisheries and Aquaculture

### Visual observations during processing 25 September 2008

- Fish from all four plants could be processed without causing major fillet damages (evaluated after both trimming and pinbone removal)
- Fillets considerably better (less soft) at LMB compared with our previous visit in September 2007 (during the severe soft-flesh period)
- Closer inspection revealed that fillets from N-1115 were more susceptible to gaping compared with the fillets from the other 3 plants located in Southern Norway

SINTEF Fisheries and Aquaculture

### Industry Test Deflection of whole fish (angle) and fillet soft stripe

LMB France 25 September 2008

Processing plant	Angle (0 - 2)
R 110	0.5
M 384	0.6
ST 400	0.2
N 1115	0.8

LMB France 25 September 2008

Processing plant	Soft stripe (0 - 2)
R 110	1.2
M 384	1.8
ST 400	1.3
N 1115	2.0

SINTEF Fisheries and Aquaculture

### Industry Test Elasticity and Finger Texture

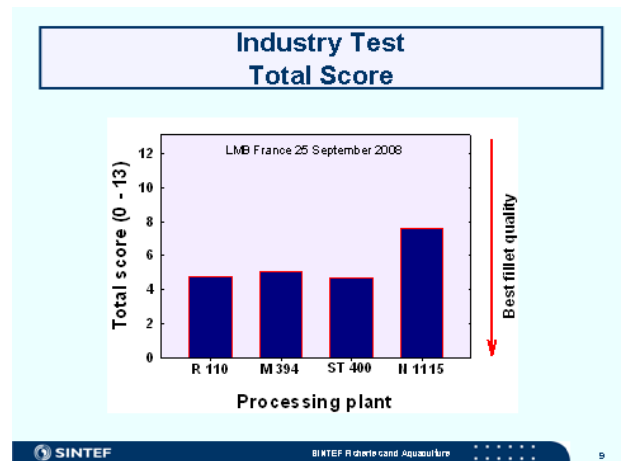
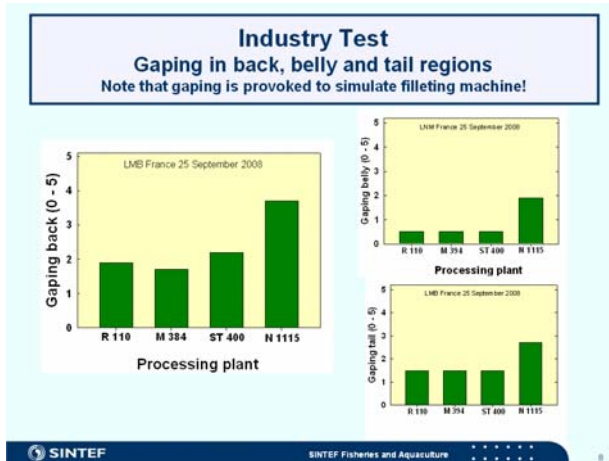
LMB France 25 September 2008

Processing plant	Elasticity (0 - 2)
R 110	1.7
M 384	1.4
ST 400	1.7
N 1115	1.5

LMB France 25 September 2008

Processing plant	Finger texture (0 - 2)
R 110	0.1
M 384	0.1
ST 400	0.1
N 1115	0.5

SINTEF Fisheries and Aquaculture



## Industry Test – 25 September 2008 at LMB

### Conclusions

- Global fillet quality (visual impression): **Medium (-)** (see next page)
- Whole fish deflection (angle): < 30° (all groups), indicated firm muscle
- Soft stripe: Between 1/3 to 1/2 of fillet length (Score 1 - 2). Longer stripe in fillets from M 394 and N 1115.
- Elasticity: About Score 1.5, i.e. only some tendency of fillets to stretch out, i.e. modest elasticity
- Finger texture: Score 0 – 0.5, i.e. very firm fillets. Fillets from N-1115 possibly a little less firm (but still good)
- Gaping: Some gaping in back region (Score 2) of fillets from R 110, M 394 and ST 400. Clearly more gaping (Score 3.5) in fillets from N-1115. In belly region, little gaping (Score < 0.5) except from N-1115 exhibiting a higher score at 1.9. Some gaping in tail region (Score 1.5) and also here fillets from N-1115 had a higher mean score at 2.7.
- Total score: At scores of 4.7-5.1, the quality of fillets from R 110, M394 and ST 400 were practically similar. At a score of 7.6, fillets from N-1115 were of comparatively inferior quality.
- Even though fish from ST 400 were evaluated at Day 3 post mortem (as opposed to Day 6 with the other groups), this did not seem to improve texture-related scores (with a possible exception of whole fish angle?)
- Even though the gaping scores (back region) of fillets from N-1115 were high after our manipulation during our evaluation (Industry Test), the fillets were still largely able to mechanically withstand the strains of filleting, trimming and pin bone machines

### Alternative tests & modifications

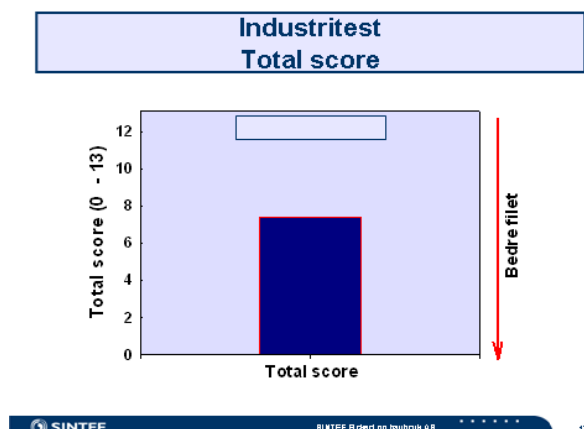
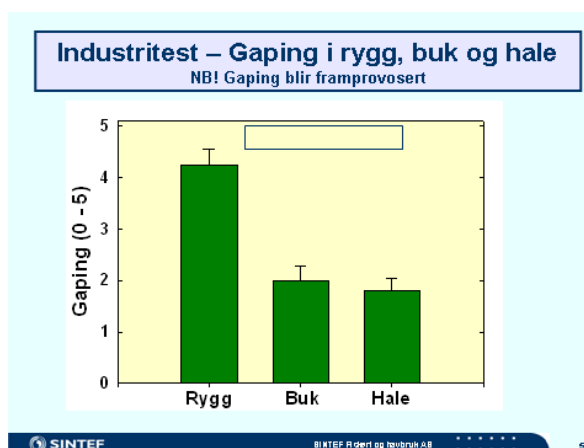
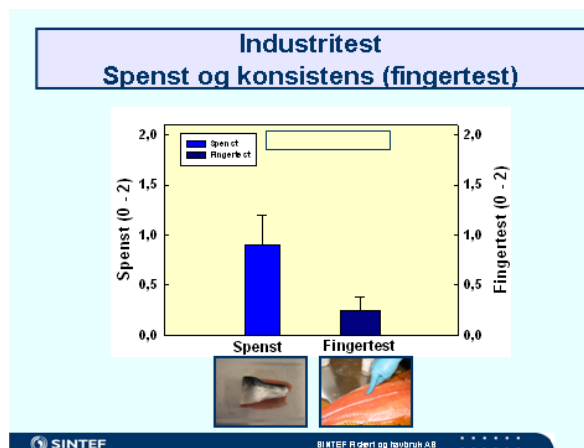
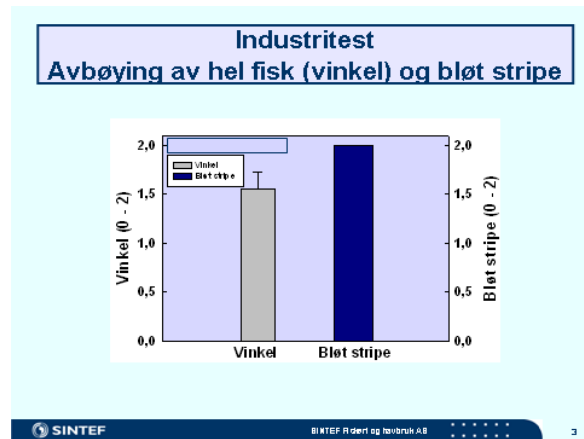
- An alternative, simpler gaping method was introduced by LMB. This method will be evaluated against the present gaping method in upcoming Industry tests (one fillet side for each test)
- A global fillet quality assessment should be included in the Industry test. Suggested scores are:
  - 0 – **Superior**
  - 0.5 – **Medium (+)**
  - 1.0 – **Medium**
  - 1.5 – **Medium (-)**
  - 2.0 – **Production**

### 3.4 Industritest 6 oktober 2008 med laks fra et slakteri i Nord-Norge

Utenfor rammen av FHF-prosjektet rapportert her, ble det utført en industritest med fisk fra et slakteri i Nord-Norge. Hensikten var å sammenlikne fisk fra dette selskapet med fisk fra Marine Harvest (generasjonsuttakene).

#### Noen data for laks fra slakteri X

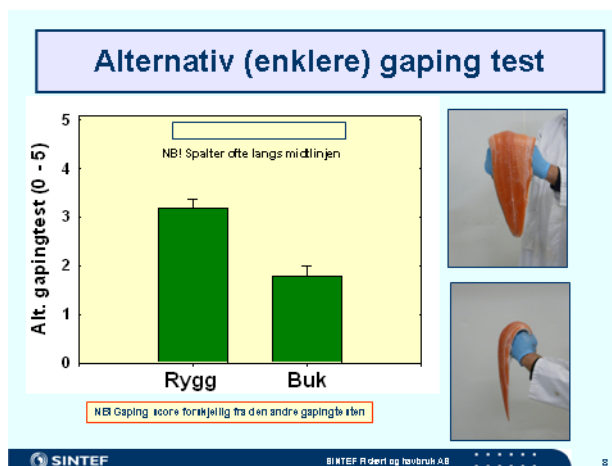
- 10 laks (sløyd) til analyse
- Stamme: Mowi (smolt fra Y)
- Lokalitet: Z merd 11
- Fôr: Ewos (Opal 110 2500-20A 10 mm)
- Sløyd vekt:  $4,6 \pm 0,3$  kg; 'Fork length':  $72 \pm 2$  cm; K-faktor 1,43 (basert på +15% for innvoller)
- Analysert: 4 dager post mortem
- Kjemetemperatur ved ankomst:  $1,5 \pm 0,5$  °C
- Roche Lineal farge:  $26 \pm 1$
- Ekstremt godt gjellekutt på alle fisk! Alle gjellebuene var skåret fullstendig over, samt meget god rengjøring



#### Industritest – Oppsummering

##### Slakteri X - Analysert 6 oktober 2008

- Avbøying av hel fisk: Score 1,5, dvs vinkel mellom 30 - 60°
- Bløt stripe: Score 2, dvs den bløte stripen dekket halve filetenes lengde (hale). Ingen antydning til at stripen hadde geleaktig konsistens slik som ekstremt bløt fisk hadde i 2007.
- Spenst: Score 0,9 som tilsvarer 'noe elastisk', dvs filetene rettet seg langsomt ut
- Konsistens (fingertest): Score 0,3 som viser fast muskel med elastisk overflate
- Gaping: Meget høy gapingscore i rygg (Score 4,3) samt en del i buk (Score 2) og i hale (Score 1,8)
- Total score: 7,4
- Konklusjon: Filetene var faste (god konsistens) og hadde akseptabel spenst. Problemet var at filetene spaltet svært mye, spesielt i ryggen. Betegnelsen 'bløt fisk' er derfor ikke et dekkende begrep her. Fisken hadde på ingen måte en slik konsistens vi så i 'problemet' 2007.

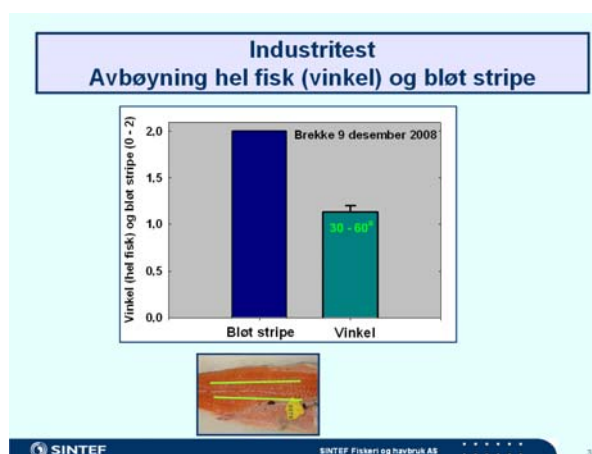


### 3.5 Industritest utført pre-rigor etter elektrobedøving av laks ved et slakteri i Sør-Norge 9. desember 2008

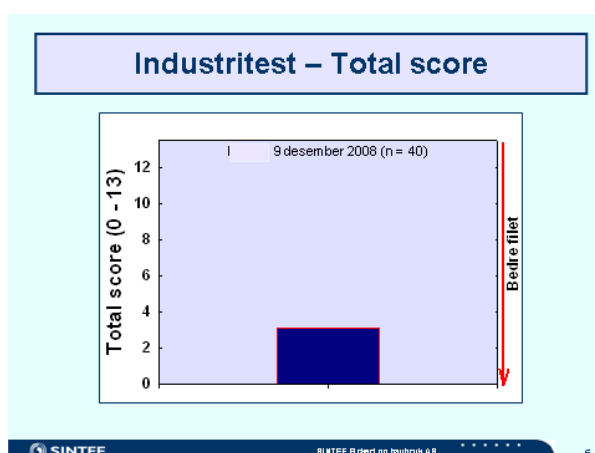
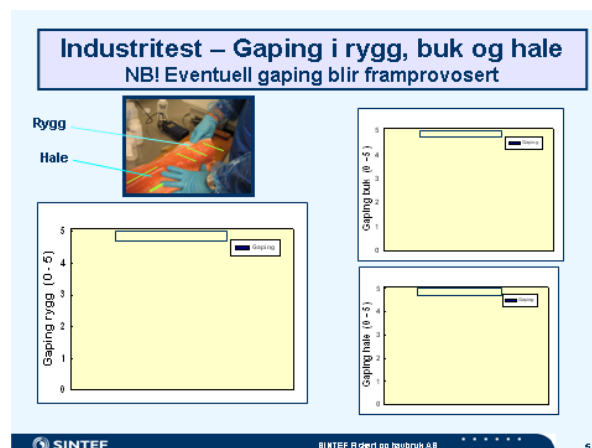
Denne testen ble også utført utenfor rammen av FHF-prosjektet rapportert her. Under vurdering av fileter (mht eventuelle blodflekker og brudd på ryggrad) skåret pre-rigor fra laks like etter elektrobedøving ble det samtidig utført en industritest på denne fisken. Hensikten var å dokumentere resultatet når industritesten ble utført pre-rigor (i motsetning til post rigor som anbefalt). Filetene virket å være av meget god kvalitet (pre-rigor tilstand tatt i betraktning) og så ut til å ha et relativt lavt fettinnhold (vurdert ut fra at 'fettstripene' var tynne). I ettertid viste det seg at fisken var fra en lokalitet med meget høy strømningshastighet. Dermed kan vi anta at fisken var godt mosjonert. En kan tenke seg at dette er gunstig for dannelse av bindevev og at filetenes konsistens kan påvirkes.

### Bakgrunnsdata

- Slakteri YY 9 desember 2009 (kun eksterne fisk slaktes, maks 50 tonn per dag)
- Laks ( $3,5 \pm 0,3$  kg; n = 40) pumpet fra ventemerd til STANSAS elektrobedøver etter ca 4 dager i ventemerd (8°C)
- Fisken var - som ved de fleste anlegg - **utmattet (muskel pH ~6,7)** ved ankomst elektrobedøver. Deretter **elektrobedøvd** ved 75 - 45 Volt i 13 sek (oppholdstid på båndet)
- Industritest på slakteri, uttak av fisk ved sortering, dvs **Dag 0**







### Industritest

9 desember 2008

- Global kvalitet: **'Superior'**  
\* Tre klasser: Superior, Medium +/- og Produksjon
- (Avbøyning av hel fisk: Score 1, dvs. vinkel 30 – 60 grader. NB! Tidlig rigor pga utmattet, elektro-bedøvd fisk)
- Bløt stripe:** Score 2, dvs. stripen dekket ½ filets lengde. Stripen var ikke utpreget og hadde ikke geléaktig konsistens.
- Farge:** Roche Lineal™  $27,6 \pm 0,2$  (ikke lysboks)

SINTEF BIITEF R dert og havbruk AB

## Oppdrett

- Lokalitet:** ZZ (årstidsvariasjon SW: 4 – 16 °C), relativt stor strømningshastighet, **god mosjonering**. Meget god vannutskifting.
- Strømningshastighet:**  $V_{max} = 33 \text{ cm s}^{-1}$  (ekstremverdi);  $V_{midlere} = 8 \text{ cm s}^{-1}$  (3 m dyp)
- Stamme:** AG
- Settefisk:** XX. God smolt viktig. 1 års-smolt
- Fôr:** Ewos (standard); tidligere Biomar
- Farge:** mg astaxanthin  $\text{kg}^{-1}$  fôr: 20 → 0,5 kg (størrelse); 50 → 1kg; 30 → >1,5 kg
- Lavt **fettinnhold** i filet
- Noe lenger **produksjonstid** sml. med andre oppdrettere i regionen, holder igjen litt på vekst

SINTEF BIITEF R dert og havbruk AB

## 4. Billeddannende kjernemagnetisk resonans (1H MRI) og 1H MAS NMR spektroskopi

Resultatene som presenteres i dette kapittelet er delfinansiert av FHF.

### 4.1 Anatomi og fettfordeling ved 1H MRI

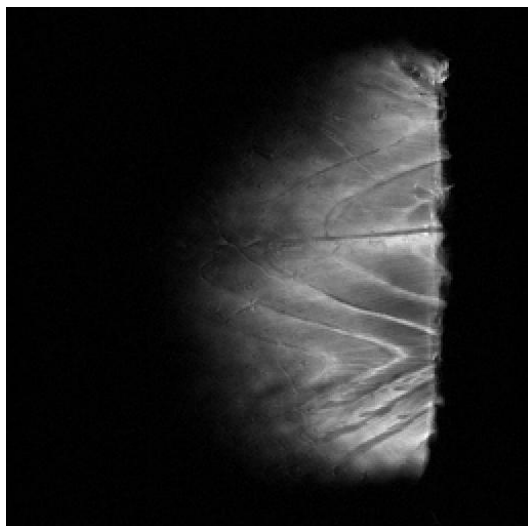
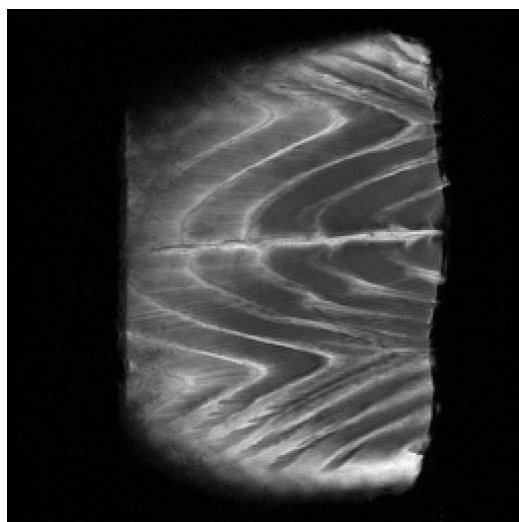
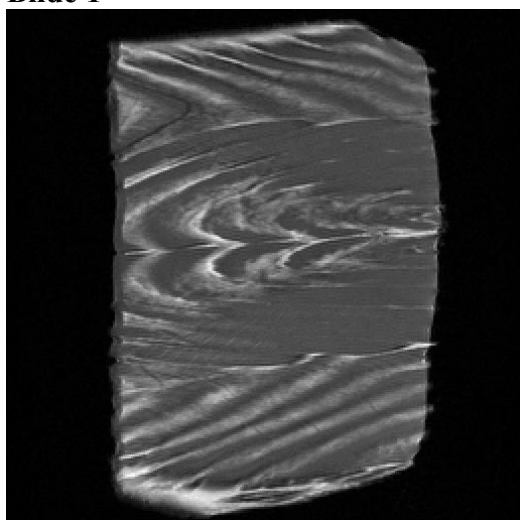
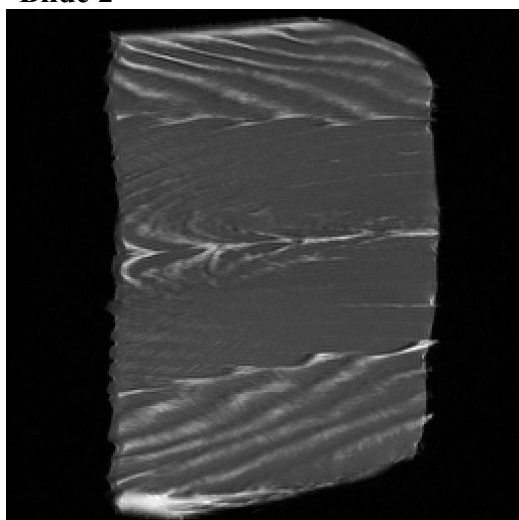
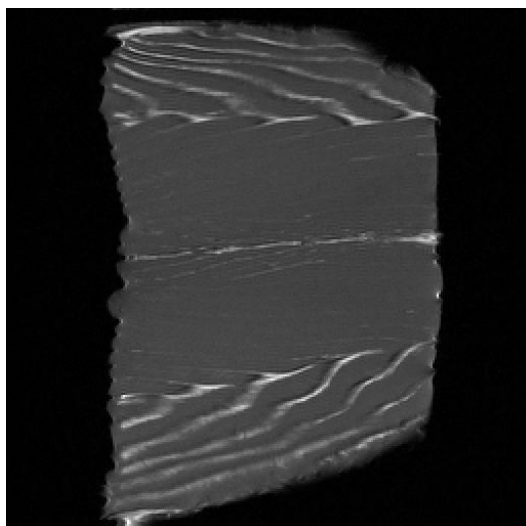
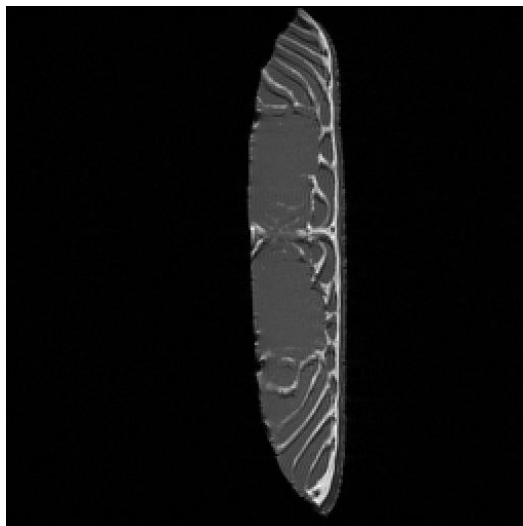
MR-bilder (billeddannende kjernemagnetisk resonans) finnes av følgende grupper fisk:

- Bløt filet (3 fisk) – juli 2007
- Fast filet, meget god konsistens (2 fisk) – Oppdretter i Hordaland, 21 desember 2007
- Tre genetisk forskjellige grupper (AquaGen, Mowi og Mix: 3 fisk fra hver gruppe) – Marine Harvest Region Sør, 15 januar 2008
- Fisk som hadde gått på fire ulike fôrtyper – BioMar (2 typer: marin og vegetabilsk fôr), EWOS og Skretting (3 fisk fra hver fôrtype analysert) – Fjord Forsøksstasjon, Dønna 15-19 mai 2008
- Fisk med godt resultat fra Industritest (9 fisk fra Lokalitet B, Marine Harvest), 26-27 mai 2008
- Referansefisk, villaks (1 fisk) – 10 juli 2008
- Nofima's fôringsforsøk på Averøya (24 fisk i ulike grupper) – 15 september 2008

Det er verd å merke seg at det er tatt opp MR-bilder av ekstremt bløte fileter i 2007 og fileter som har blitt vurdert til å ha god og fast konsistens. Bildene gir informasjon om hvordan fett er fordelt i muskelen (hvite striper) samtidig som vi får et bilde av makroskopisk struktur av filetprøven.

Vi har sammenliknet ca 2 mm tykke snitt gjennom tre seksjoner (bredde ca 4 cm) av fileten. Om lag midt på fileten (tilsynelatende normal del, foran den bløte stripen), bak i haleregionen og i et stykke mellom disse to posisjonene. Det ble laget bilder av ulike snitt både på tvers og på langs av filetene. Anatomien i den bløte stripen var tydelig forskjellig fra normal muskel. Fett i de typiske V-formede bindevevshinnene framstår som hvite striper i MR-bildene.

Bilde 1-5 viser et typisk proton MRI-scan fra skinnsiden inn mot ryggbeinet (Fig. 9). Vi ser at like under skinnet har muskelen et normalt utseende (Bilde 1 og 2). Litt lenger inn begynner de hvite stripene 'å flyte ut', de blir mindre markerte (Bilde 3). Går vi videre innover, kan normal struktur kun skimtes (Bilde 4). Tilslutt ender vi opp med en markert stripe tilsynelatende uten fett i myokommata. Fra MR-bildene kan vi konkludere med at vi har lite, eller intet fett i den bløte stripen. Dog vet vi ikke om manglende fettavleiring skyldes fravær av bindevev (kollagen) i myokommata. I tverrsnittet vist i Bilde 6, ser vi tydelig at den bløte delen utgjør et skarpt avgrenset område inn mot ryggbeinet. Vi ser også her at muskelen ser normal ut mot skinnsiden.

**Bilde 1****Bilde 2****Bilde 3****Bilde 4****Bilde 5****Bilde 6**

*Fig. 9 – 1H MR-bilder av et scan fra skinnsiden av fileten (Bilde 1) inn mot ryggbeinet (Bilde 5). Avstanden mellom hvert snitt er noen få mm. Vi ser tydelig overgang fra normal muskel til bløt stripe uten fettavleiring. Bilde 6 viser et tverrsnitt av fileten som viser et tydelig avgrenset område som er den bløte stripen. Fileten vist i denne bildeserien er fra 2007 og representerer meget 'bløt fisk'.*

Etter analysen av meget bløt fisk i 2007 (Fig. 9) viste senere MR-analyser av mindre bløt fisk at den bløte stripen alltid er til stede, også i vill laks. Dette kan tyde på at stripen er naturlig forekommende i laks (vekstsone?). Imidlertid må det sies at i fastere laks var den bløte stripen mindre utpreget. Fastere laks syntes å ha mer strukturelle trekk enn den meget bløte fisken (Fig. 10).

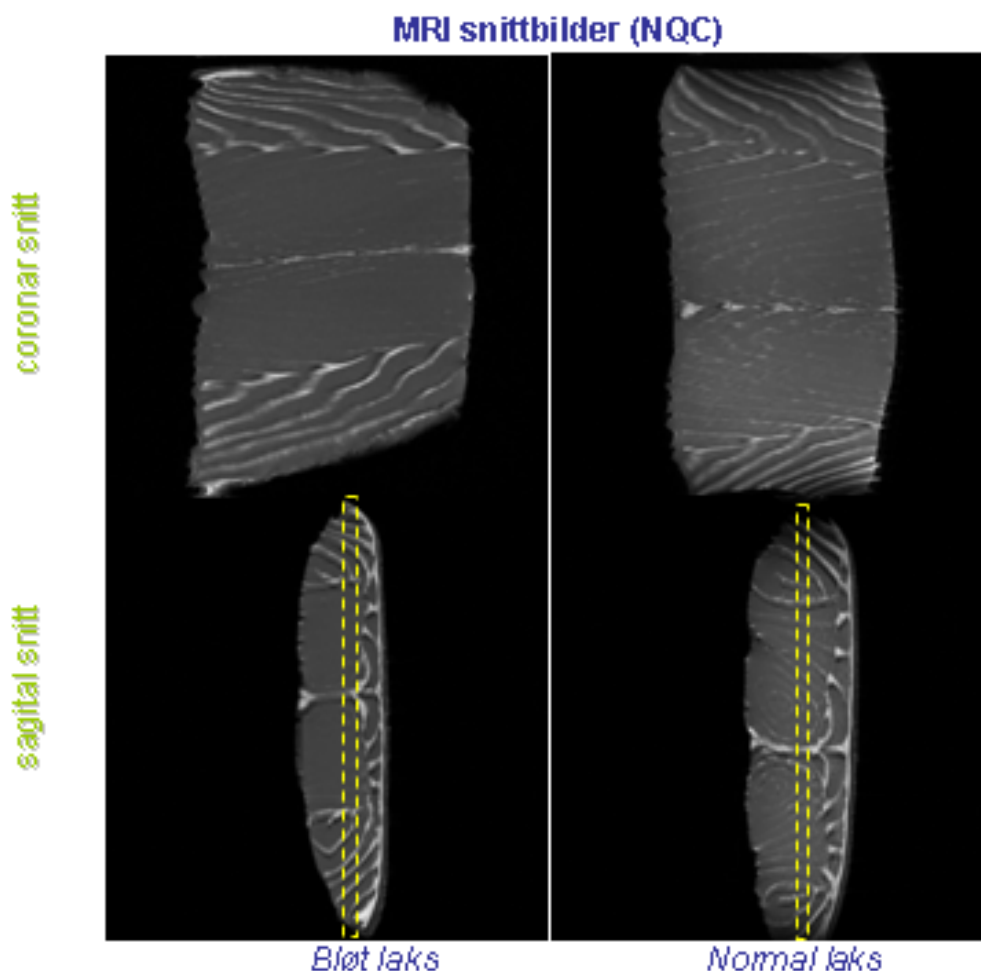


Fig. 10 – 1H MRI: Sammenlikning mellom en typiske laksefileter vurdert som henholdsvis bløt og fast. De gule stiplede linjene viser planet valgt for coronar-snittene (de øverste bildene). Legg merke til at fast laks (til høyre) har antydning til 'fettstriper' i den bløte stripen.

#### 4.2 1H MAS spektroskopi

MAS (Magic Angle Spinning) NMR spektroskopi, er en form for NMR spektroskopi som gjør det mulig å analysere intakt prøve (her muskelvev). I MAS NMR roteres prøven (her: ca 10-15 mg muskel tilsatt 5  $\mu$ L bufferløsning) ved en bestemt 'magisk vinkel' for å få god oppløsning av spekterene. Det ble brukt en protonfrekvens på 600 MHz med en opptakstid ca 7 min per spekter. Spektrene gir informasjon om ulike metabolitter i muskelen. Vi ønsket å sjekke om det var umiddelbare forskjeller i spektrene av fileter som ble vurdert som bløte og faste.

Det ble tatt ut tre prøver (A, B og C) fra to grupper laks som vist i Fig. 2. Prøvene ble tatt ut fra fisk i forbindelse med generasjonsuttaket til Marine Harvest i mai 2008. Vi valgte å analysere på meget bløt fisk fra Lokalitet K (vekt 0,1 - 0,2 kg), og fast fisk fra Lokalitet B (vekt 4 – 9 kg). Typiske spektere fra de to gruppene er vist i Fig. 11 og 12. Som vi ser, inneholder spektrene mange forskjellige resonanstopper (vanntoppen er undertrykket) som representerer signaler fra ulike

metabolitter. I det undersøkte frekvensområdet, fra 0 til 15 ppm, er det ikke umiddelbart lett å se forskjell på spektrene fra de ulike posisjonene 1-3 (Fig.1) på samme filet. Det samme gjelder når en sammenlikner spektrene av bløt og fast filet. Flere av resonanstoppene representerer kjente forbindelser. I område 1 (se Fig. 11) ser vi signaler fra alle fettsyrer ( $-CH_3$ ) inklusive omega-3 (n-3) fettsyrer (0,8 - 0,9 ppm), og i område 2 har vi også signal fra fettsyrer, nemlig bindingen  $-(CH_2)_n-$  ved ca 1.3 ppm. Område 3 (ca 3,0 til 4,5 ppm) har signaler fra ulike molekyler som fosfolipider, glyceryl/glycerol, kreatin, anserin og laktat. Signal fra eventuelt residualvann kan forventes i området 4,8 -5,0 ppm.

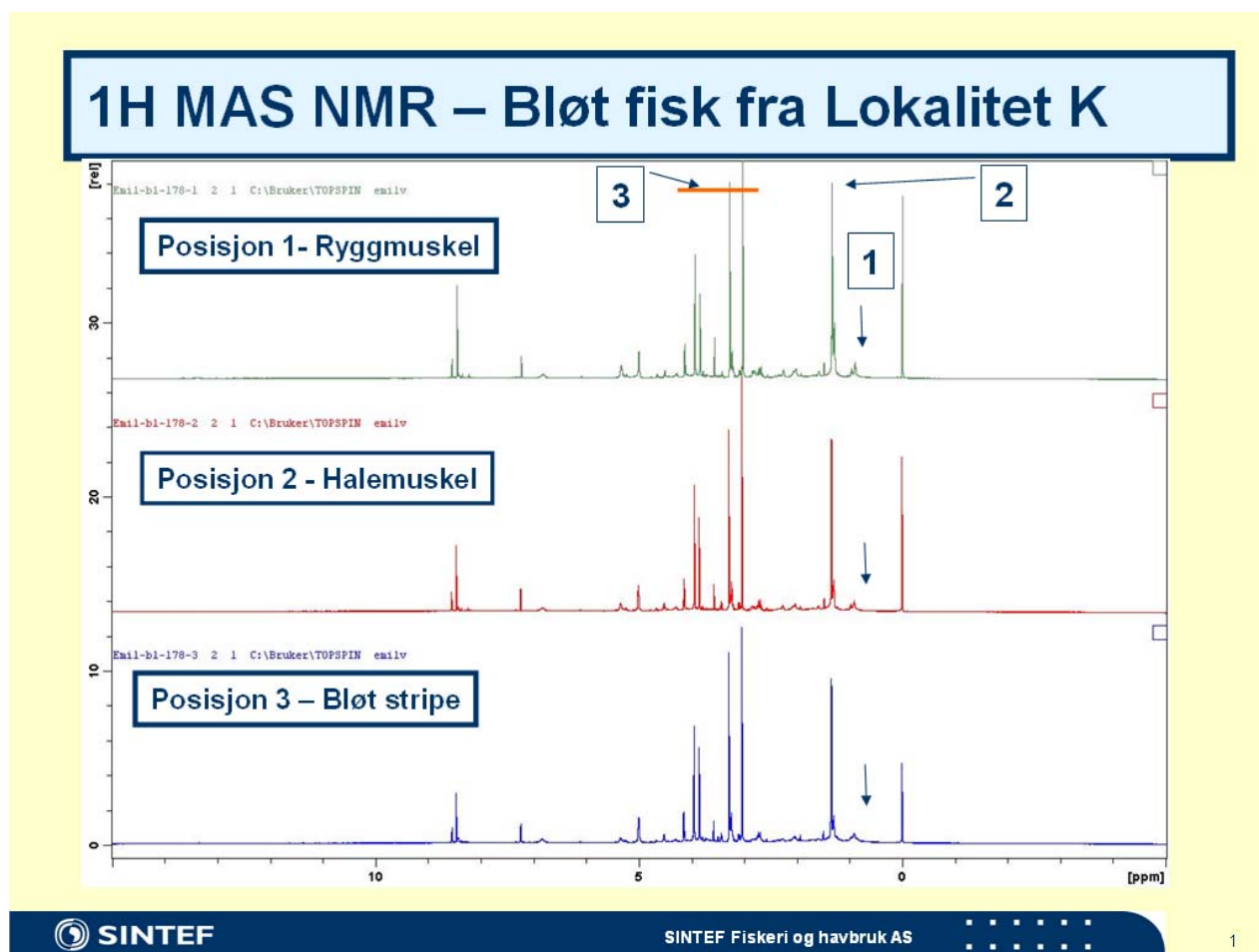


Fig. 11 –  $^1H$  MAS NMR spektra av meget bløt laksefilet (fiskestørrelse 0,1 – 0,2 kg fra lokalitet K i mai 2008). I denne oppløsningen (skiftverdier i området 0 - 15 ppm) synes ingen umiddelbare forskjeller mellom de ulike stedene på fileten (Posisjon 1, 2 og 3, se Fig. 2). Område 1: signaler fra alle fettsyrer ( $-CH_3$ ) inklusive omega-3 (n-3) fettsyrer (0,8 - 0,9 ppm); Område 2: signaler fra fettsyrer, bindingen  $-(CH_2)_n-$  ved ca 1.3 ppm; Område 3: signaler fra ulike molekyler som fosfolipider, glyceryl/glycerol, kreatin, anserin og laktat (ca 3,0 til 4,5 ppm).

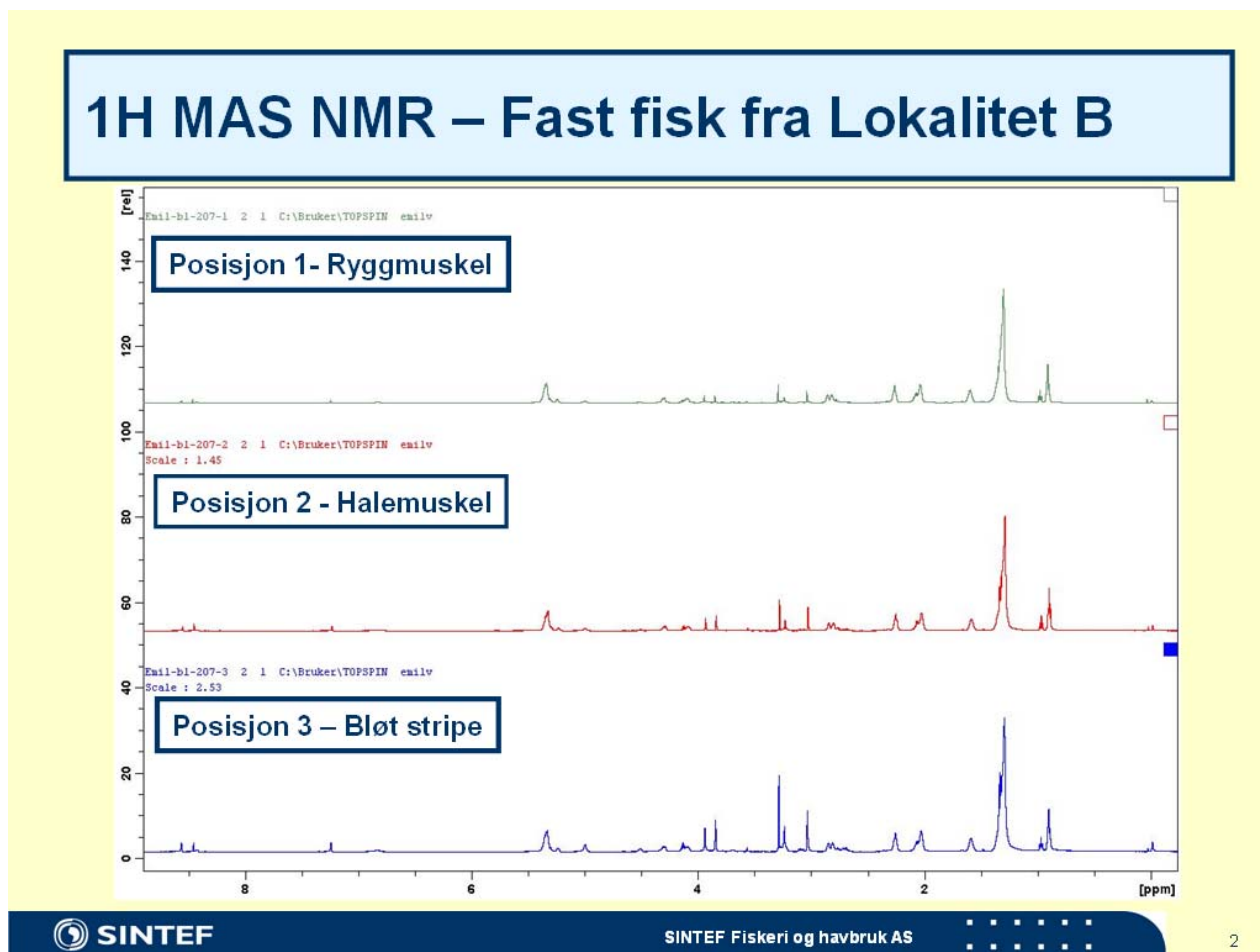


Fig. 12 –  $^1\text{H}$  MAS NMR spektra av fast laksefilet (fiskestørrelse 4-9 kg fra lokalitet B i mai 2008). I denne oppløsningen (skiftverdier i området 0 - 9 ppm) synes ingen umiddelbare forskjeller mellom de ulike stedene på fileten (Posisjon 1, 2 og 3, se Fig. 2). Merk at skalaen for kjemisk skift ( $x$ -aksen) er forskjelling fra den vist i Fig. 11. Når dette tas i betraktning, er de samme kjente resonanstoppe fra bløt filet også tilstede i filet fra fast fisk, se Fig. 11.

Ved å oppskalere deler av disse spektrene kan en studere og sammenlikne resonanstoppe fra ulike prøver i mer detalj. Ved å gjøre dette kunne vi se noen ulikheter, spesielt med hensyn til forskjeller i intensitet (konsentrasjonsforskjeller). For å finne ut mer om hvilke molekyler dette er, og for eventuelt å kunne påvise om det er forskjeller mellom bløte og faste fileter, kreves et møysommelig og stort arbeide. Innenfor rammen av dette prosjektet var ikke det mulig. For øvrig henvises til kaptittel 2.2.3 ovenfor der det er vist ved andre analysemetoder at det var et lavere totalt fettinnhold i den bløte stripen og at fettsyresammensetningen i den bløte stripen var forskjellig fra 'normal' muskel.

## 5. Zymografi og immunologisk deteksjon av proteaser

Denne aktiviteten var delfinansiert av FHF. Andre prosjekter og miljøer (se nedenfor) har bidratt i vesentlig grad.

### 5.1 Sammendrag på norsk

Målet med denne studien var å undersøke om det var forskjeller mellom normale og bløte laksefileter når det gjelder:

- 1) gelatinase- og matrix metalloprotease (MMP) aktivitet ved zymografi
- 2) tilstedeværelse av serinprotease, cathepsin L, HSP70 proteiner, ubiquitinerte proteiner,  $\alpha$ -aktinin, aktin og myosin (tung-kjede) (myosin heavy chains, MHC) ved immunoblotting
- 3) proteinsammensetning av muskelestrakter (ved lav- og høy ionestyrke) ved bruk av natrium dodecylsulfat - polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE)
- 4) uttrykte tungkjedede isoformer av myosin ved bruk av endimensjonal  $\alpha$ -chymotryptisk peptidkartlegging (mapping) av "myosin tungkjeder" (MHC'er) isolert ved gelelektroforese

Disse delmålene ble valgt på grunnlag av at:

- 1) MMP'er har den egenskapen at de kan degradere kollagen *in vivo* og remodelle skjelettmuskulatur og kan dermed forårsake en bløtgjøring av muskelen
- 2) serin protease, cathepsin L, og ubiquitinerte proteiner er relaterte til proteaser som kan være tilstede i laksemuskelen, og som kan forårsake proteolyse av myofibrillære proteiner med en påfølgende bløtgjøring av muskelen
- 3) HSP70 proteiner kan være indikatorer på stress
- 4)  $\alpha$ -aktinin- og MHC-fragmenter er indikatorer på post-mortem degradering og den karakteristiske bløtgjøringen av muskelen som skjer post mortem
- 5) forskjeller i uttrykte MHC-isoformer i skjelettmuskulatur indikerer forskjeller i muskelvekst, aktivitetsmønster og utviklingsstadium
- 6) aktin ble brukt for å sammenligne ulike ekstrakter

Basert på resultatene kan følgende konklusjoner trekkes:

1. **Bløtheten registrert i laks i denne studien kan muligens tilskrives en periode med muskel-remodellering (degenerering, regenerering og vekst) slik som beskrevet av Christiansen et al., (1992) for ishavsørøye** (i deres studie forårsaket av økt veksthastighet på grunn av trening). Denne konklusjonen er basert på aktivering av MMP'er, høyere innhold av ubiquitinerte proteiner, karakteristiske MHC isoformmønster, histologiske undersøkelser utført av våre kolleger i andre aktiviteter av dette prosjektet, og på observasjonen gjort av Ulf Erikson om at den bløte stripen og generell "normal" bløthet kan være et forbigående fenomen som fisk kan restituere seg fra.
2. **Prøvene analysert her er trolig ikke fullt ut representative for "ekstremt" bløt fisk som forårsaket betydelige tap for oppdrettsindustrien i 2007.** Resultatene av analysene utført i dette prosjektet kan likevel bli benyttet for å forbedre oppdrettsbetingelsene og for å identifisere fisk med dårlige teksturegenskaper *'in vivo'*.

3. **En potensielt viktig praktisk applikasjon av dette arbeidet kan være å identifisere fisk med bløt tekstur før slakting ved å analysere enkle muskelbiopsier fra haleregionen.** Dette vil klarlegge om fisken har aktiverte MMP'er og om aktiviteten deres er høy. Dersom dette er tilfelle, kan en vurdere om det er mer lønnsomt å vente med å slakte fisken til perioden med remodellering er over, nemlig når fisken har skiftet over fra degenerering til vekst.

## 5.2 Protein and protease analyses

### SUMMARY

The aim of this part of the work was to examine whether there were differences between normal and soft salmon muscle regarding:

4. gelatinase and matrix metallo protease (MMPs) activity by zymography
5. the presence of a serine protease, cathepsin L, HSP70 proteins, ubiquitinated proteins,  $\alpha$ -actinin, actin and myosin heavy chain by immunoblotting
6. the protein composition of low- and high-ionic strength muscle extracts by sodium dodecyl sulphate by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and
7. the expressed myosin heavy chain isoforms by one-dimensional  $\alpha$ -chymotryptic peptide mapping of electrophoretically isolated myosin heavy chains (MHC)

These targets were selected because:

1. MMPs have the ability to degrade collagen *in vivo* and remodelate skeletal muscle and can therefore cause softening of the muscle.
2. serine protease, cathepsin L, and ubiquitinated proteins are related to proteases that may be present in the muscle of salmon and that can cause proteolysis of myofibrillar protein with the subsequent softening of the muscle.
3. HSP70 may be indicators of stress
4.  $\alpha$ -actinin and MHC fragments are indicators of post-mortem degradation and the corresponding characteristic post-mortem softening
5. differences in the MHC isoforms expressed in skeletal muscle indicate differences in muscle growth, activity pattern and developmental stage
6. actin was used to compare different extracts

Based on the results obtained, the following conclusions can be drawn:

- 1) **The softness registered in fish used in this work may be attributed to a period of muscle remodeling (degeneration, regeneration and growth) similar to that described by Christiansen et al., in 1992 in the Arctic charr** caused, in their study by the exercise-induced boosting of growth. This conclusion is based on the activation of MMPs, higher level of ubiquitination of proteins, characteristic MHC isoform pattern, MRI analysis, the histological examinations made from our colleagues in other activities of this project, and the observation by Ulf Erikson that the soft band and general "normal" softness may be a transient phenomenon from which the fish recuperates.
- 2) **We do not believe that any of the samples analyzed are representative of the truly soft phenomenon** that has caused significant losses to the farming industry. The results of the analysis carried out in this project may however be used to improve the farming conditions and to identify *in vivo* fish with lower textural quality.
- 3) **An important potential practical application of this work may be the identification of fish with softer textures, prior to slaughter by analyzing a simple muscle biopsy from the tail region.** This will permit to identify whether the fish have the MMPs activated and their level of activity. If the MMPs are activated and/or their level of



activity is high, it may be more profitable not to slaughter the fish at the time, but rather wait until the remodeling period has gone over from degeneration to growth and slaughter them then.

### **Participants in the task**

In addition to SINTEF Fisheries and Aquaculture, stipendiat Pål Wang Anders and Professor Ragnar L. Olsen, from Norges fiskerihøgskole, University of Tromsø, have contributed with their antibodies and analyses to the results presented here and Professor Michiaki Yamashita, from the Food Biotechnology Section, National Research Institute of Fisheries Science, 2-12-4 Fukuura Yokohama 236-8648, Japan, kindly gifted us the antibodies anti-seabream serine protease.

### **Aim of the work**

The aim of this part of the work was to examine whether there were differences between normal and soft salmon muscle regarding:

1. gelatinase and matrix metallo protease (MMPs) activity by zymography
2. the presence of a serine protease, cathepsin L, HSP70 proteins, ubiquitinated proteins,  $\alpha$ -actinin, actin and myosin heavy chain by immunoblotting
3. the protein composition of low- and high-ionic strength muscle extracts by sodium dodecyl sulphate by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and
4. the expressed myosin heavy chain isoforms by one-dimensional  $\alpha$ -chymotryptic peptide mapping of electrophoretically isolated myosin heavy chains (MHC)

These targets were selected because:

1. MMPs have the ability to degrade collagen in vivo and remodelate skeletal muscle and can therefore cause softening of the muscle.
2. serine protease, cathepsin L, and ubiquitinated proteins are related to proteases that may be present in the muscle of salmon and that can cause proteolysis of myofibrillar protein with the subsequent softening of the muscle.
3. HSP70 may be indicators of stress
4.  $\alpha$ -actinin and MHC fragments are indicators of post-mortem degradation and the corresponding characteristic post-mortem softening
5. differences in the MHC isoforms expressed in skeletal muscle indicate differences in muscle growth, activity pattern and developmental stage
6. actin was used to compare different extracts

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Fish samples***

The data on the samples analyzed are listed in Table 1. Fig. 2 shows the place in the fillet (A, B and C) where the samples were excised. The fish had been slaughtered, bled and gutted, packed in ice and sent to our laboratory on the 22<sup>nd</sup> of May 2008. They arrived, post-rigor, on the 26<sup>th</sup> of May. From all fish from each group, cubes of about 1 cm<sup>3</sup> from fillet location B and C were excised, cut and frozen stored at -80°C until analyzed. For only one fish from each group (fish no 5 and 10) an additional sample was taken from location A: Fish from group Q were sampled on the 26<sup>th</sup> and from the fish from group C the day after.

**Table 1.** Data on the fish used for protein and protease analyses.

<i>Fisk nr</i>	<i>Opprinnelse</i>	<i>Gaping score</i>	<i>Industri-test (Total score)</i>	<i>kg ± std</i>	<i>cm ± std</i>	<i>Generasjon</i>	<i>Stamme</i>	<i>Førleve- randør</i>	<i>Smolt- leverandør</i>
1-5	Sør: Lokalitet Q	1.6- Fast	5	3.3 ± 0.9	63.2 ± 5.2	V 07	Aqua Gen	Skretting	Fister smolt
6-10	Nord: Lokalitet C	2.8 – Bløt	9	2.8 ± 0.6	56.6 ± 3.5	V 07	Aqua Gen	Skretting	Flatanger /Salsbruket

### Protein extractions

Five different extraction methods were used: (1) Matrix metalloproteinase (MMP) extraction. (2) cathepsin extraction, (3) extraction of heat shock proteins and (4) low- and high-ionic strength extractions of myofibrillar proteins. All the extractions were performed in ice on partially thawed, but still frozen, samples as described below.

#### *Extraction of matrix metalloproteinase*

It was carried out as described by Lødemel and Olsen [2003] and Felberg et al. [2009]. 0.1 g of muscle were extracted with 1.0 ml of extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % Brij 35, 0.02 % NaN<sub>3</sub>), homogenized with a mixer and agitated for 1 hour in a cold room. Samples were then centrifuged for 30 minutes (6,000 x g, 4 °C) and the supernatants collected. 0.5 ml extraction buffer was added and centrifugation repeated for 20 minutes (16,000 x g, 4 °C). The supernatants were collected pooled with the previously collected supernatants. The gelatin-binding proteins were separated as described by Felberg et al., [2009] using gelatin Sepharose 4B (GE Healthcare): about 1 ml of the crude extract was added to 0.5 ml of gelatin- Sepharose that had been preequilibrated in washing buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % Brij 35 and 0.02 % NaN<sub>3</sub>). The binding step was performed for 1 hour (4 °C) with gentle agitation. The samples were subsequently centrifuged (100 x g, 1 min, 4 °C) and the supernatant was removed (unbound proteins). The Sepharose beads were washed with 1 ml washing buffer and bound proteins were subsequently eluted with 0.5-1 ml washing buffer containing 10 % DMSO. The eluted fractions were concentrated using Microcon YM-10 centrifugal filter units (10 kDa, Millipore). The affinity chromatography was performed in tubes instead of in microcolumns, due to its simplicity.

#### *Cathepsin extraction*

Extraction of cathepsins was carried out as described by Cheret et al., [2007]. 0.5 g of muscle were homogenized with 1.5 ml of extraction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 10mM DTT), vortexed and centrifuged for 40 minutes (16,000 x g, 10 °C). The supernatants were collected and frozen stored at -80°C in small aliquots.

#### *Extraction of heat shock proteins*

It was carried out according to the method of Yamashita et al., [2004]. 0.5 g of muscle were homogenized with 1.5 ml extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA and 2 mM cocktail of inhibitors) vortexed and centrifuged for 15 minutes (10,000 x g, 4°C). The supernatants were collected and frozen stored at -80°C in small aliquots.

### ***Low- and high-ionic strength extractions of myofibrillar proteins***

It was performed as described by Martinez *et al.*, [1991]: 0.2 g of muscle were homogenized in ice with 1 ml of low-ionic strength buffer (0.1 M NaCl, 3.4 mM PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na, 1.6 mM PO<sub>4</sub>HNa, 10mM EGTA, 2.3 M DTT, 0.2 mM PMFS, pH 6.8) in Eppendorf tubes. The tubes were then centrifuged for 10 minutes at 4 °C (16,000 x g) and the supernatants (the low ionic strength extracts) were frozen stored at -80°C in small aliquots. The pellet was resuspended in 0.6 ml of high ionic strength buffer (100 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 15 mM EGTA, 2.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF), homogenized, the contents vortexed and then centrifuged for 10 minutes at 4 °C (16,000 x g). The supernatants (the high ionic strength extracts) were collected and frozen stored at -80°C in small aliquots.

### **Determination of the protein concentration in the extracts**

Protein concentration in the extracts were determined as described by Harris [1989] and; Piñeiro *et al.*, [1999] by measuring the OD<sub>280</sub> and assuming that a solution containing 1mg protein per ml has a OD<sub>280</sub> = 1 .

### **Gelatinase and matrix metalloprotease (MMPs) activity analyses by gelatine zymography**

Substrate gel electrophoresis was performed according to the method of Lødemel and Olsen [2003] as described by Felberg *et al.* [2009]. Samples were diluted in loading buffer containing 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 25 % glycerol and some bromophenol blue. Non-heated, non-reduced samples were loaded into wells of 8 cm x 10 cm, 0.5 mm thick home-made slab gels which consisted of a 9 % acrylamide and 0.24 % bisacrylamide separating gel and a 5 % acrylamide and 0.13 % bisacrylamide stacking gel. The separating gel contained 0.1 % gelatin. Electrophoresis took place for 30 min at 100 V followed by 75 min at 150 V in a MiniProtean III electrophoresis cell (Bio-Rad) placed in an ice bath. After electrophoresis, the gels were washed twice in 2.5 % Triton X-100 for 15 min prior to incubation overnight in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.02 % NaN<sub>3</sub> at 38 °C. The gels were subsequently stained with 0.1 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 45 % ethanol and 10 % acetic acid. To maximise the contrast between clear bands and the background, gels were destained in 40 % ethanol and 10 % glycerol. The gelatinolytic activities were identified as clear zones against a blue background. The molecular weight markers used were the Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare), and they were treated as the samples: dissolved in the same sample buffer described above with no reductants or heat denaturation. These standards were used as internal standards to monitor run-to-run differences between the zymograms. Gels were dried between two sheets of cellophane, scanned and examined by visual inspection.

### **Examination of the protein composition of all the extracts by sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE of all the extracts was carried out according to Laemmli [1970]. The extracts were diluted to approximately 1mg/ml with Laemmli sample buffer (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% SDS, 1 mM EDTA, 5% β-mercaptoethanol, 20% glycerol and bromophenol blue), immediately boiled for 5 min and centrifuged at 14,000 rpm for 5 min. The supernatants were collected in a new tube and either immediately frozen at -20°C or processed as described below. About 5 ug of protein were loaded into the wells of 10.5 x 7 cm mini gels, 0.5 mm wide, whose composition was as follows. Separating gel: 15% acrylamide, 0.13% piperazine diacrylamide [Anderson *et al.*, 1973; Hochstrasser *et al.*, 1988], 375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 37.5% glycerol, 0.03% ammonium persulfate and 0.067% TEMED. Stacking gel: 5% acrylamide, 0.08% piperazine diacrylamide, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.1% ammonium persulfate and 0.1% TEMED. Running buffer was 25 mM Tris, 0.1% SDS and 192 mM glycine, pH ~ 8.3 [Laemmli, 1970]. The gels were run in a BioRad MiniProtein III electrophoresis chamber at 200 V for about 1h. After electrophoresis, the gels were stained for at least 1 h in 0.2% Coomassie Blue R-250,

50% ethanol and 10% acetic acid, and destained with frequent changes of 30% ethanol and 10% acetic acid until a clear background was obtained. All the gels were scanned and visually examined.

### **Immunoblotting**

The proteins resolved in SDS-PAGE gels according to the Laemmli system (as described above, for probing with anti-50kDa seabream serine protease and anti-HSP70) or with the XCell SureLock Mini Cell from Invitrogen with NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris gels also from Invitrogen (for probing with anti-cathepsin L, -ubiquitin, -MHC, - $\alpha$ -actinin, and -actin) were transferred to nitrocellulose or PVDF according to Towbin et al., [1979] for 1 h at 200 mA in cold buffer for nitrocellulose membranes in the Mini Protean III BioRad system or using the XCell II Blot Module at 400 mV for 90 min at room temperature using Power PAC 1000 electroblot apparatus (Bio-Rad) for PVDF membranes. Immediately after the blotting, the membranes were stained with Ponceau S red to visualize the transferred proteins and photographed. Then they were washed 2 $\times$ 5 min at room temperature in TBS buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 500 mM NaCl) and blocked with 25 ml TBS containing 0.05% Tween 20 and 5% fat-free milk for 30 min (blocking buffer). The membrane was then incubated with primary antibody in blocking buffer at 4 °C over night. Dilutions for the primary antibodies were: for 1:1,000 for polyclonal anti-seabream serine protease (gift from Dr Michiaki Yamashita); 1:1,000 for monoclonal anti-cathepsin L (gift from Dr Ragnar Olsen); 1:10,000 for monoclonal anti-HSP70 (Sigma H5147), 1:200 for antiserum anti-ubiquitin (Sigma U5379); 1:800 for monoclonal anti-  $\alpha$ -actinin from skeletal muscle (Sigma A5044); 1:1,000 for anti-actin and 1:40,000 for antiserum anti-MHC antibody [Martinez & Pettersen, 1992]. Secondary antibodies (1:10,000) were peroxidase labelled goat anti-rabbit IgG (Sigma A-6154) and rabbit anti-mouse IgG (Sigma A-9044) for polyclonal (and antisera) and monoclonal primary antibodies respectively. After probing with the secondary antibodies, the membranes were washed 3 $\times$ 5 min in TBS followed by 5 min in MilliQ water. Subsequently, the membranes were incubated with 750 ml Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) followed by exposure to film (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN USA) and developing.

### **One-dimensional $\alpha$ -chymotryptic peptide mapping of electrophoretically isolated myosin heavy chain (MHC)**

It was carried out as described by Martinez et al., (1993) following the protocols of Carraro and Catani [1983]. After SDS-PAGE analysis of the high ionic strength myofibrillar extracts, the gels were stained for 2 min in Coomassie blue staining solution and destained with several changes of H<sub>2</sub>O until it was possible to see clearly the MHC bands. The slices of gel containing the myosin heavy chain bands to be digested were excised from the gels and equilibrated for 10 min in 30% glycerol, 4% SDS, 1 mM EDTA, 0.1% 2-mercaptoethanol, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8) and bromophenol blue. After equilibration, half a slice was loaded in the wells of 0.5 mm thick gels, covered with the same equilibration buffer, and overlaid with 2  $\mu$ l of 10% glycerol, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8) and bromophenol blue, containing 80 ng of  $\alpha$ -chymotrypsin. The stacking gels used for peptide mapping contained 3% acrylamide and 0.08% piperazine diacrylamide and the separating gels 12.5% acrylamide and 0.1% piperazine diacrylamide [Anderson et al., 1973; Hochstrasser et al., 1988]. Once the samples were stacked, by running the gels at 75 V for about 20 min, the run was then interrupted for 20 min and afterwards resumed at 150 V. The gels were silver stained [Ansorge, 1983] and scanned. Comparisons were carried out visually.

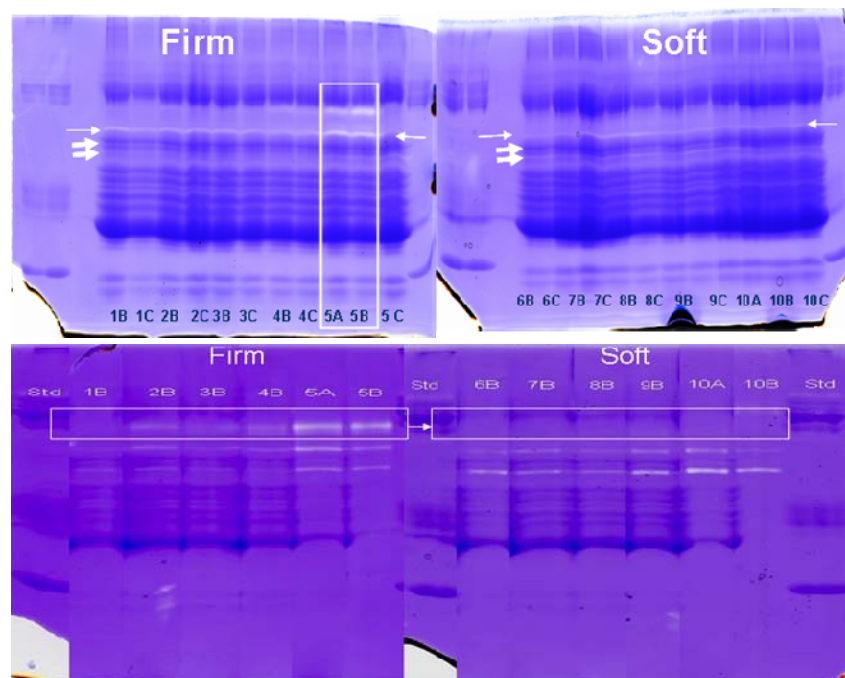
## **RESULTS AND DISCUSSION**

It must be noted that none of the samples displayed extreme texture: they were neither very firm, not truly soft. We could have chosen more extreme samples regarding the texture, but then the fish would also have differed in their size. Since it is known that there is a relationship between size and firmness of the flesh in salmon, we decided to select fish of similar size.

The results presented here may thus be useful to explain differences in texture between relatively softer or firmer fish in order to improve their quality in the future. It is also our impression that none of these fish can be considered representative of the extremely soft textures recorded in 2007. Thus, the protein composition and protease analysis for those truly soft cases remain to be examined, if and when, the cases reappear again. The present results may be used to decide which analyses may be selected and whether the two phenomena (extremely soft-fish and the present, more normal, suboptimal firmness) are related.

### **Matrix metallo proteases**

Fig. 13 shows the results of gelatinase activities in raw extracts (Fig. 13 top) and of matrix metallo proteases in the gelatine affinity purified fraction (Fig. 13 bottom). The most notable feature was that the extracts from the firm muscles displayed three bands of activity, while those from softer muscles showed only two: the slower migrating band was missing. Comparison of these results with those of Lødemel and Olsen [2003], showed that the pattern of 3 bands correspond to that of a normal extract, while that of only 2 bands correspond to an extract in which the MMPs had been activated. MMPs are secreted from cells as proenzymes and require an activation by hydrolysis. The proenzyme may also be made more susceptible to hydrolysis by the action of substances that may interfere with its structure making the pro-peptide more accessible to hydrolysis. It was interesting and striking to uncover that the MMPs in the softer muscles seemed to be in an activated state: either an inhibitor was missing or something was taking place in those samples that had activated the MMPs.



*Fig. 13 - Gelatinase activity of crude muscle extracts (gels on top) and of gelatine-affinity purified fraction (matrix metallo proteases, MMPs) from the crude extracts (gels below). White bands, labelled with arrows and boxes, indicate gelatinase activities. Note the absence of the slower migrating band of activity in the gelatine purified bands of the soft muscle samples). The samples are indicated in the lanes: the number indicates the number of the fish and the letter the location of the samples in the fillet as shown in Fig. 2. Fish 1 to 5 had firm and 6 to 10 softer fillets.*

As discussed by Lødemel and Olsen [2003], it remains to be investigated whether the activities vary with age, maturity and feeding pattern, and we wish to add in this report, with muscle growth. It has been shown that fast muscle growth may induce a type of distinct muscle damage within the white swimming muscle of the salmonid Arctic charr, and it seemed that this type of muscle damage was associated only with healthy and rapidly growing fish [Christiansen et al., 1992]. Although no MMPs analyses were carried by Christiansen and his colleagues, one would expect them to have been activated in order to digest the extracellular matrix embedding the satellite cells and so allow their growth and differentiation into adult differentiated muscle cells.

If this was the case, the results presented by Ulf Erikson regarding the disappearance of soft textured fish from a given cage given “sufficient time”, would agree with Christiansen et al.’s [1992] work, i.e. “sufficient time” being time enough to go through the degenerative and regenerative phases and reach the restitutive phase, as shown in Fig. 14, taken from Christiansen et al., [1992]. It should be noted that this distinct morphology was present only in fast growing fish (where the growth had been stimulated by forcing them to swim against water current speeds corresponding to 1-2 body length per second). Normal, not stimulated fish, presented normal muscle histology without the apparent lesions.

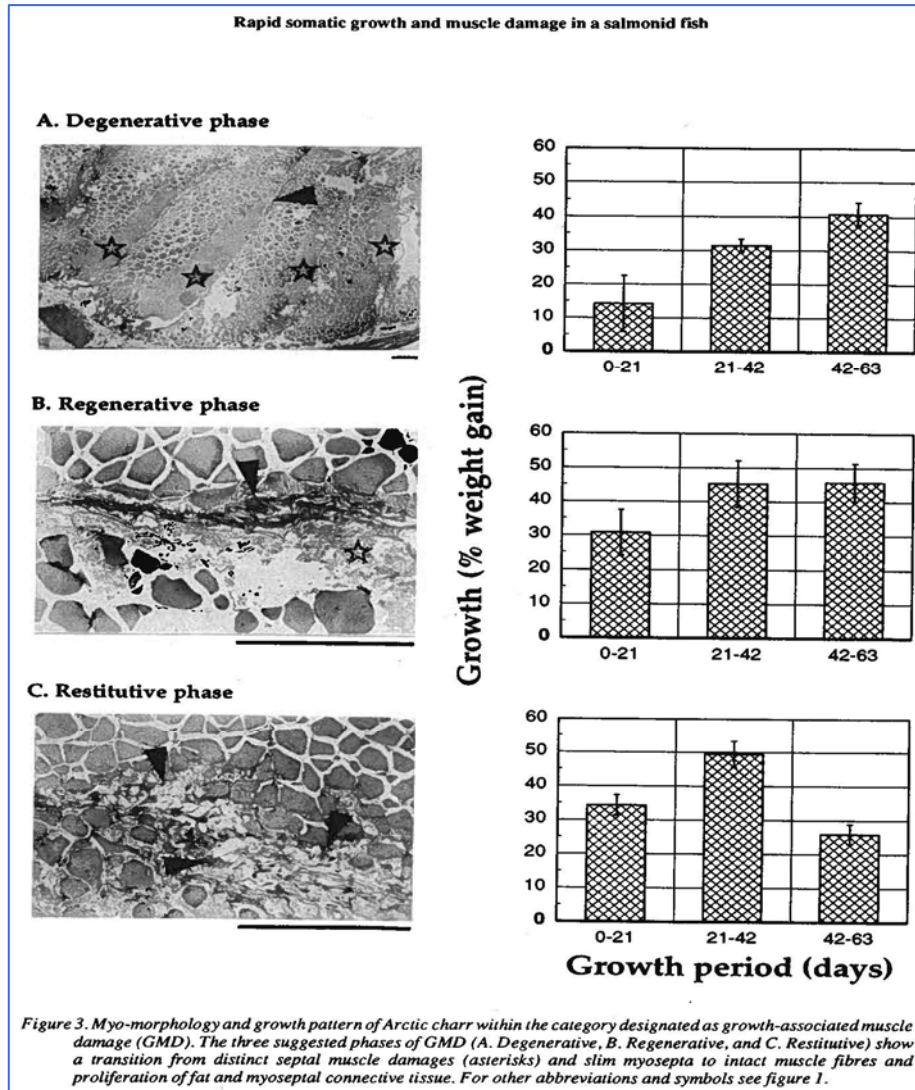
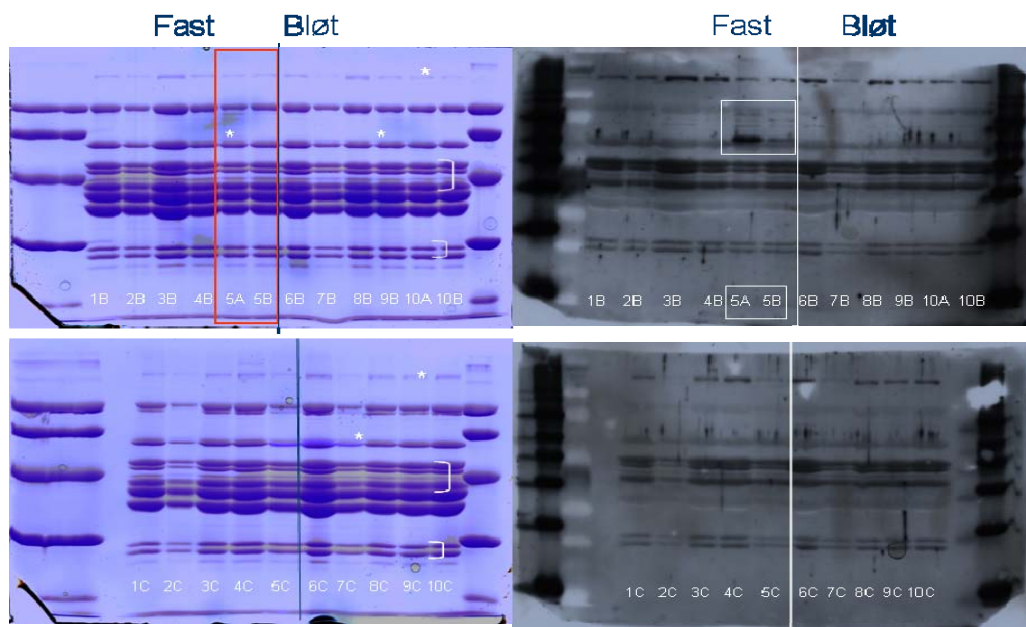


Fig. 14 - Figure taken from Christiansen, et al., (1992) showing areas of muscle damage, regeneration and growth in Arctic charr.

**50kDa serine protease from red seabream muscle**

The immunodetection of the 50kDa serine protease from red seabream muscle did not reveal differences between the firm and soft samples. There seemed to be a notable amount of crossreacting bands and only samples from fish no 5 seemed to have an extra, stronger crossreacting band, that is boxed in Fig. 15.

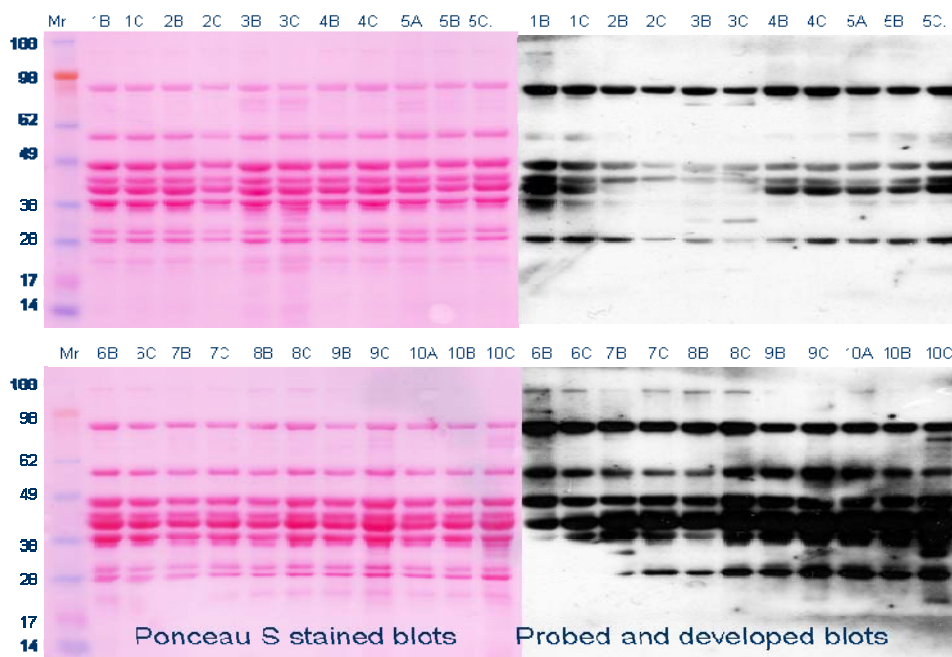


*Fig. 15 - Immunodetection of the 50kDa serine protease from red seabream muscle crossreacting material. Gels to the left show the Coomassie blue stained proteins and to the right are the crossreactive bands. The samples are indicated in the lanes: the number indicates the number of the fish and the letter the location of the samples in the fillet as shown in Fig. 2. Fish 1 to 5 had firm and 6 to 10 softer fillets.*



### Cathepsin L

The results of anti-cathepsin L crossreacting material are shown in Fig. 16. This antibody was raised against a peptide characteristic for cathepsin L, and it should detect bands that might correspond to procathepsin L, with a molecular mass of approximately 40kDa and cathepsin L of approximately 30 kDa. The large number of bands detected seems to indicate additional unspecific binding. However, it is interesting to note the more intense reactivity of the softer muscle samples.



*Fig. 16 - Immunodetection of cathepsin L crossreacting material. Gels to the left show the Ponceau red stained proteins in the blots (the lane to the left contains molecular mass standards whose size in kDa is indicated to the left) and to the right are the crossreactive bands. Gels on top correspond to firm muscles and on the bottom to softer samples. The samples are indicated in the lanes: the number indicates the number of the fish and the letter the location of the samples in the fillet as shown in Fig. 2. Fish 1 to 5 had firm and 6 to 10 softer fillets.*

### Immunodetection of heat shock proteins HSP70

Fig. 17 shows the immunoreactivity of the extracts to the anti bovine-heat shock protein 70 HSC70. Yamashita et al., [2004] showed that these antibodies recognized both constitutively expressed and stress induced members of the HSP70 family in platyfish cultured cells. Given that the antibodies have been shown to recognized constitutive and induced forms of HSP70, HSP72 and HSP73 forms in a variety of species, including bovine, human, rat, chicken guinea pig and platyfish, we expected that they would also recognized members of this stress proteins family in the Atlantic salmon, as was indeed the case. In the platyfish, the antibodies crossreacted equally with constitutive and induced forms, but some induced forms had a different molecular mass, and the signal was weaker with the induced than with the constitutive forms. Our results do not show qualitative differences (different crossreacting bands) between firm and soft muscles and only some slight quantitative differences seem to be present. However, the technique is not quantitative and differences in the efficiency of transfer of the proteins to the blot may account for some of the differences in the intensity of the crossreactivity.

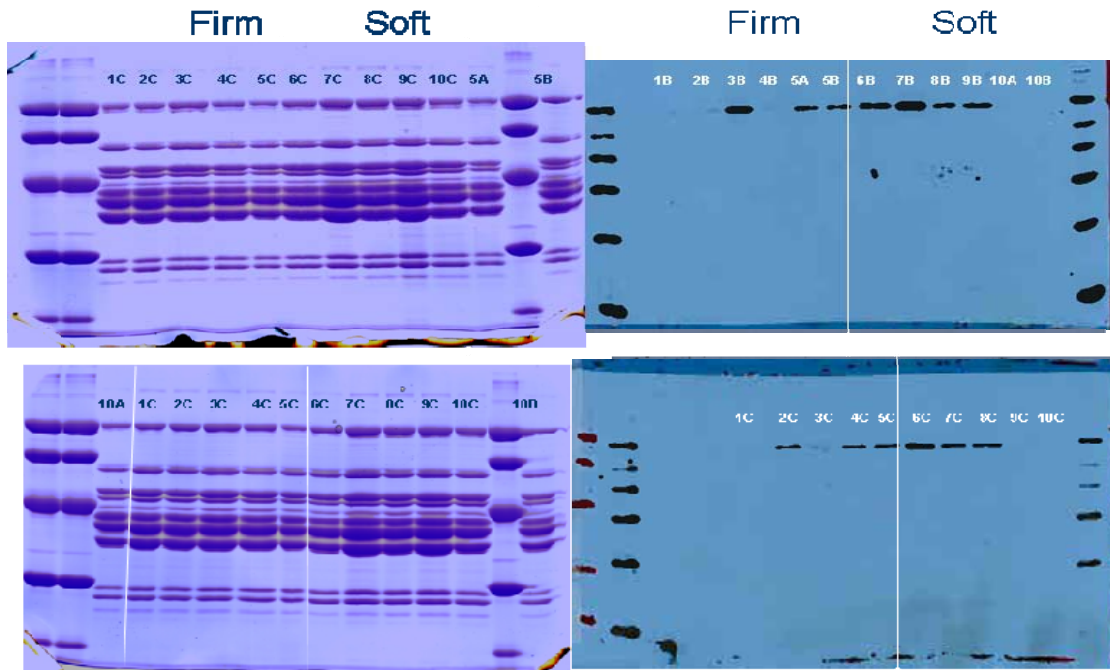
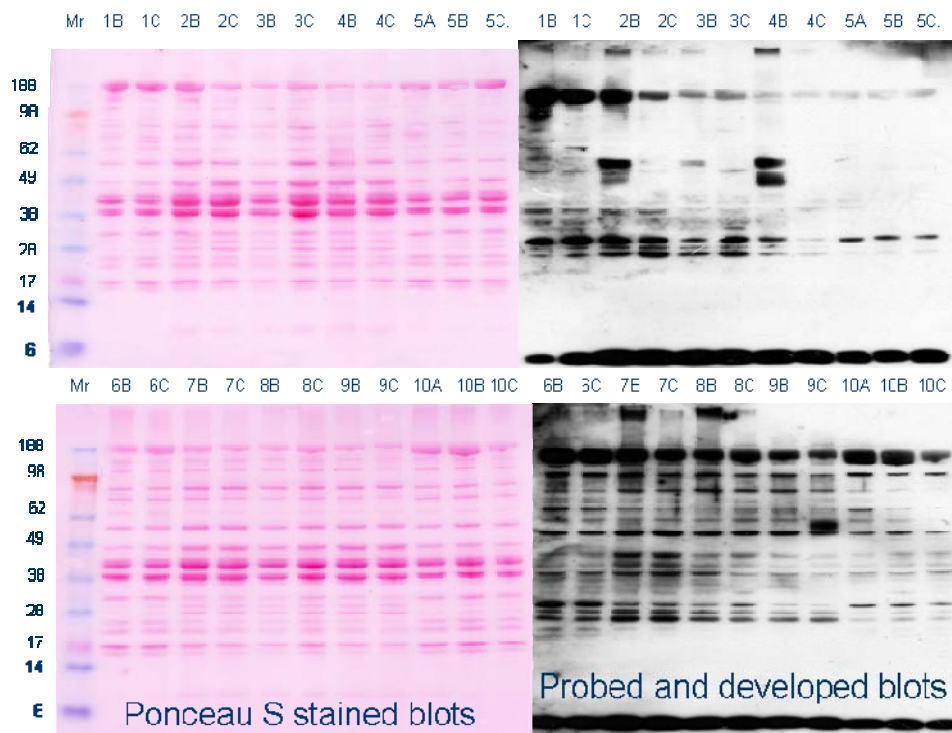


Fig. 17 - Immunodetection HSP70 crossreacting bands. Gels to the left show the Coomassie blue stained proteins and to the right are the crossreactive bands. The samples are indicated in the lanes: the number indicates the number of the fish and the letter the location of the samples in the fillet as shown in Fig. 2. Fish 1 to 5 had firm and 6 to 10 softer fillets.

### Immunodetection of ubiquitin and ubiquitinated proteins

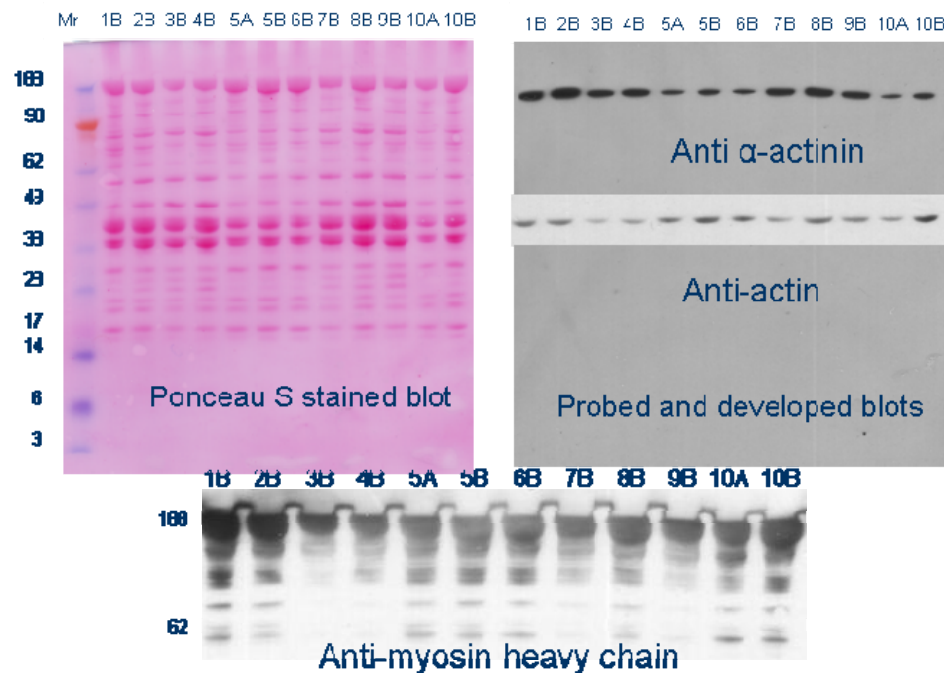
Ubiquitin is a small, highly-conserved regulatory protein that is ubiquitously expressed in eukaryotes. Ubiquitination (or ubiquitylation) refers to the post-translational modification of a protein by the covalent attachment of one or more ubiquitin monomers. Ubiquitin has several biological functions, the most prominent of which is the labelling of proteins for proteasomal degradation (<http://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin>). Thus, the amount of ubiquitin crossreacting material can give an idea of the amount of proteins labelled for proteasomal degradation and proteins of all sizes may be labelled for digestion. Fig. 18 shows that the number and intensity of ubiquitin-labelled bands in softer muscles is much higher than in firmer samples, further corroborating the previous observations regarding higher proteolytic activities in the soft samples. The ubiquitin protein itself consists of 76 amino acids and has a molecular mass of about 8.5 kDa and it may be the very strong crossreactive band migrating with the front clearly visible in the probed blots of all the samples but undetectable by Ponceau red protein staining (Fig. 18).



*Fig. 18 - Immunodetection of ubiquitin and ubiquitinated proteins. Gels to the left show the Ponceau red stained proteins in the blots (the lane to the left contains molecular mass standards whose size in kDa is indicated to the left) and to the right are the crossreactive bands. Gels on top correspond to firm muscles and on the bottom to softer samples. The samples are indicated in the lanes: the number indicates the number of the fish and the letter the location of the samples in the fillet as shown in Fig. 2. Fish 1 to 5 had firm and 6 to 10 softer fillets.*

### **Immunodetection of $\alpha$ -actinin, actin and myosin heavy chain (MHC) fragments**

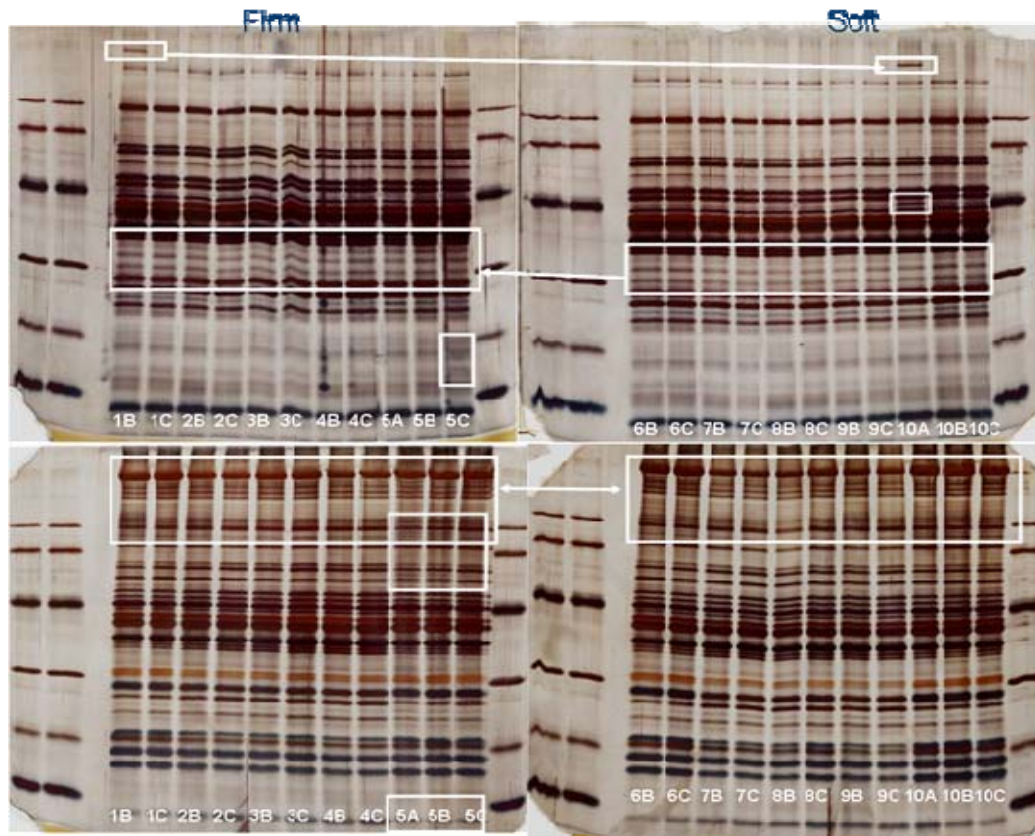
As shown in Fig. 19, there were no apparent differences in these proteins between firm and softer muscles. Appearance of degradation fragments of  $\alpha$ -actinin (a lower proteolyzed band in addition to the normal band) and of myosin heavy chain (MHC), as well as an increase in the intensity of the lower molecular mass fragments are indications that the normal of post mortem degradation (autolysis related to the lack of freshness) is proceeding until finally the band corresponding to the intact protein disappears [Martinez et al., 2001; Wang et al., 2009]. In the present case, there did not seem to be differences in the extent of post-mortem deterioration, and therefore there is no reason to assume that the above detected differences in crossreactivity with other enzymes, ubiquitinated proteins and MMPs activities should be attribute to freshness (softer samples were extracted one day later than firmer muscles). Rather, they may reflect differences in the physiological status of the muscle tissue.



*Fig. 19 - Immunodetection of α-actinin, actin and myosin heavy chain (MHC) fragments. Upper gel to the left shows the Ponceau red stained proteins in the blots (the lane to the left contains molecular mass standards whose size in kDa is indicated to the left) and to the right and below are the crossreactive bands targeting the proteins indicated in the panel. The samples are indicated in the lanes: the number indicates the number of the fish and the letter the location of sampling in the fillet as shown in Fig 2. Fish 1 to 5 had firm and 6 to 10 softer fillets.*

**Protein composition of the low and high ionic strength muscle extracts**

Not unexpectedly, there were individual differences in the protein make up of the myofibrillar protein extracts shown in Fig. 20. There seemed to be also more systematic differences between firm and softer muscles (bands enclosed in white boxes in Fig. 20), but these differences were not very striking.



*Fig. 20 - SDS-15% PAGE analysis of the protein composition of the low- (upper gels) and high (lower gels) ionic strength protein extracts from firm (gels to the left) and soft (gels to the right) muscles. The boxes indicate differences between samples and between types of muscle. The samples are indicated in the lanes: the number indicates the number of the fish and the letter the location of the samples in the fillet as shown in Fig 2. Fish 1 to 5 had firm and 6 to 10 softer fillets.*

### **One-dimensional $\alpha$ -chymotryptic peptide mapping of electrophoretically isolated myosin heavy chain (MHC)**

This technique is used to examine the presence of different isoforms of the myofibrillar protein called myosin. Different isoforms are expressed in different types of muscle fibres, during muscle growth and regeneration resulting from the activation of satellite cells and in muscles with different functions or submitted to different patterns of activity [Martinez et al., 1991; Weiss, 1996].

We could detect some individual differences (Fig. 21: fish no 5 and 10 seem to differ from the others) but also there seemed to be some systematic differences between firm and softer muscles (indicated by the larger blue boxes). It must be noted that skeletal muscle from salmonid fish presents a mosaic appearance, with different types of myosins, different ATPase activities and also different MHC make up [Martinez et al., 1991, 1993; Martinez & Christiansen, 1994]. All these MHC isoforms will comigrate in the same band in the SDS-PAGE gels. When that band is excised from the gel and the mixture of MHCs it contains is cut by  $\alpha$ -chymotrypsin, the resulting peptides will indicate whether there were differences in the mixture of MHC isoforms in the excised band. This seemed to be case, and possible causes for the differences that would agree

with the previously presented results, would be, again, activation of satellite cells and/or differences in the pattern of activity of the muscles.

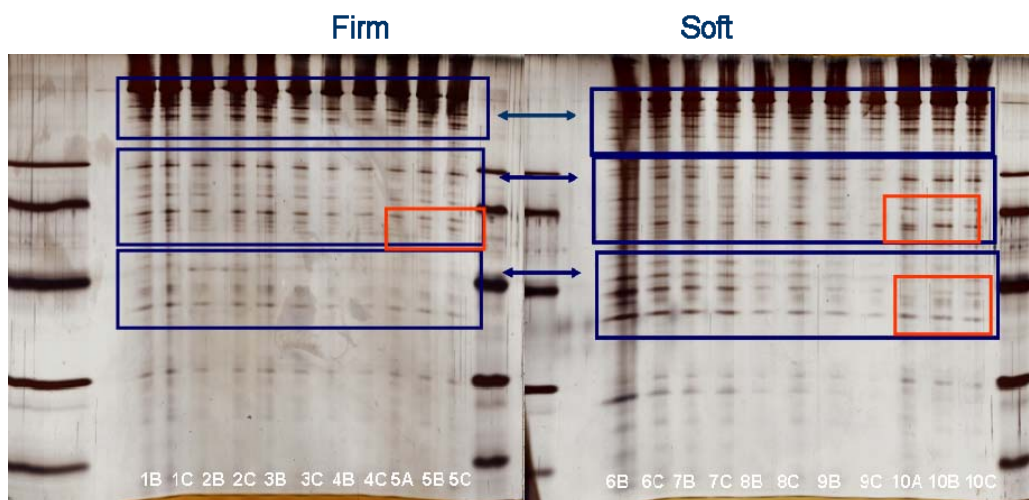


Fig. 21 - One-dimensional  $\alpha$ -chymotryptic peptide mapping of electrophoretically isolated myosin heavy chain (MHC). The boxes indicate regions of the gels containing bands that differed in the firm (gel to the left) and soft (gel to the right) extracts. The samples are indicated in the lanes: the number indicates the number of the fish and the letter the location of the samples in the fillet as shown in Fig. 2. Fish 1 to 5 had firm and 6 to 10 softer fillets

## CONCLUSIONS AND PRACTICAL APPLICATION OF THE PRESENT WORK

Based on the above results, the following conclusions can be drawn:

- a. **The softness registered in fish used in this work may be attributed to a period of muscle remodeling (degeneration, regeneration and growth) similar to that described by Christiansen et al., in 1992 in the Arctic charr** caused, in their study by the exercise-induced boosting of growth. This conclusion is based on the activation of MMPs, higher level of ubiquitination of proteins, characteristic MHC isoform pattern, MRI analysis, the histological examination made from our colleagues and the observation by Ulf Erikson that the soft band and general “normal” softness may be a transient phenomenon from which the fish recuperates.
- b. **We do not believe that any of the samples analyzed are representative of the truly soft phenomenon** that has caused significant losses to the farming industry. The results of the analysis carried out in this project may however be used to improve the farming conditions and to select fish with lower textural quality.
- c. **An important potential practical application of this work may be the identification of fish with softer textures, prior to slaughter by analyzing a simple muscle biopsy from the tail region (B).** This will permit to identify whether the fish have the MMPs activated and their level of activity. If the MMPs are activated and/or their level of activity is high, it may be more profitable not to slaughter the fish at the time, wait until the remodeling period has gone over from degeneration to growth and slaughter them then.

## REFERENCE LIST

- Anderson, C.W., Baum, P.R. and Gesteland, R.F. (1973) Processing of adenovirus 2-induced proteins. *J. Virol.* 12, 412-423.
- Ansorge, W. (1983) Fast visualization of protein bands by impregnation in potassium permanganate and silver nitrate. In *Electrophoresis'82* (Edited by Stathakos, D.), pp. 235-242. Walter de Gruyter & Co. Berlin, New-York.
- Carraro, U. and Catani, C. (1983) A sensitive SDS-PAGE method separating myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscles reveals the heterogeneous nature of the embryonic myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 793-802.
- Cheret, R., Delbarre-Ladrat, C., de Lamballerie-Anton, M. and Verrez-Bagnis, V. (2007) Calpain and caathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chem.*, 101: 1474-1479.
- Christiansen, J.S., Martinez, I., Jobling, M. and Amin, A.B. (1992) Rapid somatic growth and muscle damage in a salmonid fish. *BAM*, 2: 235-239.
- Felberg, H.S., Hagen, L., Slupphaug, G., Batista, I., Nunes, M.L., Olsen, R.L. and Martinez, I. (2009) Partial characterization of gelatinolytic activities in herring (*Clupea harengus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) possibly involved in post-mortem autolysis of ventral muscle. *Food Chem.*, In press.
- Harris, E. L. V. (1989); in: Harris, E. L. V., Angal, S. (Eds) *Protein Purification Methods: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford 1989, pp. 10-18.
- Hochstrasser, D., Patchornik, A. and Merril, C. (1988) Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Anal. Biochem.* 173, 412-423.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lødemel J. B., and Olsen R. L. (2003). Gelatinolytic activities in muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*), spotted wolffish (*Anarhichas minor*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Sci. Food Agric.*, 83, 1031-1036.
- Martinez, I., Bang, B., Hatlen, B. and Blix, P. (1993) Myofibrillar proteins in skeletal muscles of parr, smolt and adult Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). Comparison with another salmonid, the Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 1021-1028.
- Martinez, I. and Christiansen, J.S. (1994) Myofibrillar proteins in developing white muscle of the Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **107B**: 11-20.
- Martinez, I., Christiansen, J.S., Ofstad, R. and Olsen, R.L. (1991) Comparison of myosin isoenzymes present in skeletal and cardiac muscles of the Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.). Sequential expression of different myosin heavy chains during development of the fast white skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.*, 195: 743-753.
- Martinez, I., Jakobsen Friis, T. and Careche, M. (2001) *Post mortem* muscle protein degradation during ice-storage of arctic (*Pandalus borealis*) and tropical (*Penaeus japonicus* and *P. monodon*) shrimps: A comparative electrophoretic and immunological study. *J. Sci. Food Agric.* 81: 1199-1208.
- Martinez, I. and Pettersen, G.W. (1992) Temperature-induced precocious transitions of myosin heavy chain isoforms in the white muscle of the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *BAM*, 2: 89-95.
- Piñeiro, C., Barros-Velazquez, J., Perez-Martin, R.I., Martinez, I., Jakobsen, T., Rehbein, H., Kündiger, R., Mendes, R., Etienne, M., Jerome, M., Craig, A., Mackie, I.M. and Jessen, F. (1999) Development of a SDS-PAGE reference method for the analysis and identification of fish species in raw and heat-processed samples. A collaborative study. *Electrophoresis*, **20**: 1425-1432.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350-4354.

Wang, P.A., Martinez, I. and Olsen, R.L. (2009) Myosin heavy chain degradation during post mortem storage of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Food Chem*, 115: 1228-1233.

Weiss, A. (1996) The mammalian myosin heavy chain gene family. *Ann. Rev. cell Develop. Biol.*, 12: 417-439.

Yamashita, M., Hirayoshi, K. and Nagata, K. (2004) Characterization of multiple members of the HSP70 family in platyfish culture cells: molecular evolution of stress proteins HSP70 in vertebrates. *Gene*, 336: 207-218.



## Bilag 1 – En oversikt over alle undersøkelser i 2008-2009 hvor industritesten er benyttet

Følgende oversikt viser alle tilfeller hvor industritesten er benyttet i 2008-2009. Dette inkluderer testene finansiert av FHF-prosjektet '*Fastere filet*' rapportert her (nr. 2, 5, 8, 9, 11 og 13). I ett tilfelle (nr. 10) ble industritesten utført på pre-rigor fisk ved et besøk på et slakteri. Dette er rapportert her. Industritestene nr. 7 og 12 er gjort i sammenheng med demonstrasjon og opplæring av personell i industrien i forbindelse med det parallelle FHF-prosjektet '*Fastere filet: Industritest og opplæring i bruk av industritest*'. Siden test nr. 7 omfatter fisk fra Marine Harvest i samme periode som generasjonsuttakene ble gjennomført, er resultatene fra denne undersøkelsen tatt med i denne rapporten. Dessuten er det utført industritester (nr. 1, 3, 4 og 6) finansiert av andre prosjekter/kilder (ikke vist i denne rapporten).

### 1. Fôrtest: Fjord Forsøksstasjon, Dønna 15-19 mai 2008

- 4 fôrtyper – BioMar (2 typer: marin og vegetabilsk fôr), EWOS og Skretting
- 72 laks (6 laks per merd, 3 parallelle merder per fôrtype)
- **Industritest:** Ingen vesentlig forskjell mellom gruppene (gaping score 2; spenst score 1,5; fingertest 1,0)
- MRI (12 laks, 3 fisk fra hver fôrtype), vanninnhold og pH i filet

### 2. Fisk fra 13 lokaliteter Marine Harvest – 26-27 mai 2008

- Analyse av 260 fisk totalt, 20 fisk fra 13 lokaliteter (10 i Nord-Norge og 3 i Sør-Norge)
- Hensikt: Studere teksturegenskaper før vekst gjennom sommeren
- Ulike smoltleverandører
- Fôr fra Biomar, EWOS og Skretting
- Stammer: AG, Mowi og Salmo breed
- Generasjon: H06 (3 lokaliteter); V07 (4 lokaliteter); H07 (6 lokaliteter)
- Vektclasser: 0,1 – 9 kg
- **Industritest:** Enkelte grupper hadde meget god spenst og elastisitet. Gaping score: 1,5 – 3. Hovedsakelig var fisk < 1 kg meget bløte ('postei'- liknende).
- **Best fisk:** Den største fisken (2-9 kg), generasjoner: **H06** (3 lokaliteter, 2 i nord og 1 i sør) og **V07** (1 lokalitet i sør)
- **Dårlig fisk:** < 1 kg, alle **H07** (1 lokalitet i sør og 4 i nord), vanskelig å evaluere små fisk med industritest (100-200 g fisk). Fisk fra ulike smoltleverandører. Stammer: AG og Salmo breed.
- MRI (9 fisk fra Lokalitet B, 3 fisk fra hver fôrtype) og MAS NMR

### 3. Marine Harvest Region Sør: 4 grupper stamfisk - 27 august 2008

- Stammer: AG, Fanad, Mowi og Mix (Mowi + AG).
- 15 laks fra hver stamme
- Mange fisk med lav K-faktor og store kvalitetsforskjeller mellom individer i samme gruppe (ikke relatert til den aktuelle problemstillingen).
- **Industritest:** Dårlig spenst, score 1,5 – 2. Konsistens score: <0.5 (fast filet). Gaping: rygg (score 2), buk (score 0) og hale (0,5 – 1,5).
- Dvs, relativt lite gaping og fisken var ikke bløt
- Små forskjeller mellom stamfiskgruppene.

- Roche farge og pH i filet
- 4. BioMar – Forsøk ved GIFAS – 4 september og 10 oktober 2008**
- Mager og fet laks og restriktiv fôring, dvs sammenlikne rask og langsom tilvekst. Start juni 2008, 2,5 kg fisk til oktober ca 4 kg fisk.
  - BioMar fikk utført følgende analyser ved høgskolen i Bodø: Tekstur, gaping, WHC, pH, vitamin C og E, astaxanthin, 'mature collagen', antioxidant status (TBARS), fett og farge.
  - 40 fisk totalt, 10 fisk i 4 grupper
  - **Industritest:** God spenst, fast filet men *spalter mye i rygg* (gaping score 3-4)
- 5. Fisk fra 12 lokaliteter Marine Harvest – 9 september 2008**
- 240 fisk totalt, 20 fisk fra 12 lokaliteter (11 av disse fra samme lokalitet som ved uttaket i mai 2008)
  - Stammer: AG, AG + Mowi, Mowi og Salmo breed
  - Flere smoltleverandører
  - Vektklasser: 0,4 – 4,7 kg
  - Generasjon: V07 (4 lokaliteter); H07 (7 lokaliteter); V08 (1 lokalitet)
  - **Industritest:** God spenst (score 0-1) og konsistens (score 0) med ett unntak, *mye gaping i rygg* (gaping score 4). Forholdsvis *mye gaping i buk* (score 2-3)
  - Lokalitet Q (V07; 2-3 kg) : minst gaping? (score: 3-4 rygg, 0-1 i buk)
  - Lokalitet K (H07; 0,5-1,4 kg): **Bløt** (konsistens og spenst score 2), *mest gaping* (score: 4-5 i rygg og 3-4 buk)
  - **NB!** Kun fisk fra Lokalitet K var fortsatt bløte sammenliknet med de ekstremt bløte fiskene vurdert i mai 2008!
- 6. Nofima-forsøk ved Averøy - 15 september 2008**
- 20 fisk i 4 grupper fra fôringsforsøk (1. kontroll; 2. AA-boost; 3. AA-boost + balansert N-nivå; 4. økt beta-oksidasjon)
  - Fiskestørrelse ca 2 kg
  - **Industritest:** God konsistens og spenst (score ca 0); *Mye gaping i rygg* (score 4), i buk score 0-3 og i hale score 1-3
  - MRI (24 fisk) og fett
  - Diverse analyser er utført av Nofima
- 7. Fisk fra fire Marine Harvest pakkerier vurdert hos LMB, Bolougne, Frankrike – 25 september 2008**
- 10 fisk fra hvert pakkeri
  - **Pakkeriene:** Herøy, Ulvan, Eggesbønes og Hjelmeland
  - Fisken ble vurdert 6 dager post mortem, bortsett fra fisk fra Ulvan som ble vurdert 3 dager post mortem
  - **Industritest:** Fisken fra Herøy hadde mest gaping (score: 3,7 i rygg). De andre gruppene hadde 1-2 poeng lavere score. Videre hadde Herøy-fisken også mest gaping i buk og hale. Konsistensen var god for alle gruppene (score: < 0,5), mens spensten var noe lav for alle gruppene (score: rundt 1,5).
  - **NB!** Selv om filetene viste betydelig gaping (score: 2-4) ut i fra vår destruktive test, var fisken fullt ut prosesserbar (vurdert etter porsjonskutter og etter fjerning av pinnebein)

- I snitt ble filetene vurdert av LMB som middels gode
- Betydelig bedre kvalitet nå enn ved vårt besøk i september 2007, nå er fisken prosesserbar (tåler maskinfiletering)
- En alternativ metode for gaping score ble introdusert av LMB

#### 8. Fisk fra et slakteri i Nord-Norge - 6 oktober 2008

- 10 fisk fra slakteri
- Størrelse: 4-5 kg
- **Industrirest:** God konsistens (score:  $0,3 \pm 0,1$ ) og relativt god spenst (score:  $0,9 \pm 0,3$ ). **Ekstrem gaping** i rygg (score:  $4,3 \pm 0,3$ ) og i en del i buk (score:  $2,0 \pm 0,3$ )
- Sammenlikner vår gaping test med gaping test foreslått av LMB, Frankrike (score:  $3,2 \pm 0,2$ )
- Roche farge

#### 9. Fisk fra 12 lokaliteter Marine Harvest – 24/25 november og 5 desember 2008

- 240 fisk totalt, 20 fisk fra 12 lokaliteter (10 fra Region Nord og 2 fra Region Sør)
- Fôrleverandører: Skretting og BioMar (flere over på fôr fra BioMar siden sist)
- Stammer: AG, AG + Mowi, Mowi og Salmo breed
- Flere smoltleverandører
- Vektklasser: 1,2 – 5,2 kg
- Generasjon: V07 (4 lokaliteter); H07 (7 lokaliteter); V08 (1 lokalitet)
- **Industrirest:** God til relativt dårlig spenst (score 0,1 – 1,6). Meget god konsistens (score 0,0 – 0,1). **Mye gaping i rygg** (gaping score 3- 5). Variabel gaping i buk (score 0-2,5). Relativt mye gaping i hale (score 1,8 - 3,0 for de fleste gruppene)

#### 10. Elektrobredøvd fisk fra et slakteri i Sør-Norge – 9 desember 2008

- Industrirest utført like etter elektrobredøving i luft
- Evaluert pre-rigor
- Fisken (3,5 kg; n = 50) hadde godt i en oppdrettsmerd som var hadde meget høy strømningshastighet (godt mosjonert, lavt fettinnhold)
- Stamme: AG
- Fôr: EWOS
- Holder igjen noe på veksthastigheten
- Spenst, fingertest og gaping score: alle 0.
- Praktisk talt uansett hvor hardhendt filetene ble behandlet, var det ikke mulig å framprovosere dårligere teksturegenskaper (score 0)

#### 11. Fisk fra 8 lokaliteter Marine Harvest – 30 mars 2009

- 20 fisk fra 8 lokaliteter (7 fra Region Nord og 1 fra Region Sør)
- Fôrleverandører: Skretting og BioMar
- Stammer: AG, AG + Mowi, Mowi og Salmo breed
- Flere smoltleverandører
- Vektklasser: 2,6 – 4,3 kg
- Generasjon: H07 (7 lokaliteter); V08 (1 lokalitet)

- **Industritest:** God til relativt dårlig spenst (score 0,3 – 1,7). Meget god konsistens (score 0,0 – 0,3). **Mye gaping i rygg** (gaping score 2,2- 3,9). Variabel gaping i buk (score 0,1-2). Relativt mye gaping i hale (score rundt 2)

## 12. Industritest i forbindelse med opplæring i bruk av metoden – 11 mai 2009

- Fisk (størrelse 4-5 kg) fra Marine Harvest og Lerøy (Hitra)
- Fisk med ulik alder post mortem (3, 4, 5, 6, 14, 17 og 20 dager) ble evaluert.
- Fileter skåret pre-rigor ble evaluert samtidig med motsatt filet skåret umiddelbart før evaluering ved bruk av industritesten.
- Generelt hadde fisken middels god spenst, god konsistens og moderat til lite gaping
- Det var ingen signifikant forskjell mht score i industritesten og fiskens alder post mortem.
- Det var heller ingen tydelig forskjell i score for fileter skåret pre- eller postrigor
- Konklusjon: Industritesten evaluerer (primært) filetens teksturegenskaper gitt av oppdrettsfasen, dvs overskygges ikke av endringer post mortem under 3 - 20 dagers lagring på is

## 13. Fisk fra 7 lokaliteter Marine Harvest – 25 mai & 2 juni 2009

- 20 fisk fra 7 lokaliteter (1 i Sør-Norge og 6 i Nord-Norge)
- Generasjon: H07 (6 stk) og V08 (1 stk)
- Fôrleverandører: Skretting og BioMar
- Størrelse: 2,4 – 4,7 kg
- Flere smoltleverandører
- Stamme: Aqua Gen, Salmo breed og Mowi
- Industritest: God til middels spenst. Tre lokaliteter har best spenst (som i mars 2009). Filetene har blitt litt bløtere enn i desember 2008 og i mars 2009. Moderat gaping, noe bedre enn tidligere. Stor forskjell i filet kvalitet (tekstur) mellom beste og dårligste lokalitet. Flere lokaliteter i nord kommer bedre ut enn den i sør.

En annen relevant undersøkelse:

### Marine Harvest Region Sør, Hjelmeland - 15 januar 2008: Fisk fra tre ulike stammer i samme merd

- 45 fisk fra samme merd, 15 fisk fra hhv AG, MOWI og Mix
- Størrelse: ca 5,5 kg, K-faktor = 1,24 - 1,37, V06
- Analyser: vann, pH, MRI (snitt foran og bak), farge (Roche og CIE L\*a\*b\*)
- **'Uferdig' industritest:** Bløt stripe langs halve fileten; lite spenst; relativt god konsistens; moderat gaping
- Fisken ble ikke vurdert som spesielt bløt slik som ble observert sommeren og høsten 2007 i Nord Norge
- Ingen tydelige forskjeller mellom stammene
- MRI analyser ble utført