

Rapport

Sluttrapport: Hurtig metode for å estimere buksprenging i pelagisk fisk ombord

Forfattere

Rasa Slizyte, Revilija Mozuraityte og Iciar Martinez



Rapport

Sluttrapport: Hurtig metode for å estimere buksprenging i pelagisk fisk ombord

EMNEORD:

Åte

Buksprenging

Måleteknikk

VERSJON

2

DATO

2013-10-07

FORFATTER(E)

Rasa Slizyte, Revilija Mozuraityte og Iciar Martinez

OPPDRAGSGIVER(E)

FHF

OPPDRAGSGIVERS REF.

Rita Maråk

PROSJEKTNR

6020293

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:

22+ vedlegg

SAMMENDRAG

Overskrift sammendrag

Buksprenging er en kvalitetsforringende prosess hvor bukområdet hos fisken brytes ned post mortem. Denne rapporten oppsummerer arbeidet med utviklingen av en anvendelig hurtigstest for å estimere enzymlekkasje som forårsaker buksprenging i pelagiske fiskearter. Måleutstyret er kommersielt tilgjengelig og krever lite opplæring før bruk. Metoden er brukervennlig og gir en objektiv vurdering av protein-nedbrytende aktiviteter i fisken. Metoder for prøveuttak, reaksjonstemperatur og inkubasjonstid samt tidspunkt for prøveuttak under ombordtaking av fangsten ble testet og optimalisert i prosjektet. Det er foreslått en ny skala som graderer enzymatiskaktiviteten i fiskebukken. Denne skalaen er tenkt integrert med dagens skala. Det mangler imidlertid noen resultater for at denne skalaen kan ferdigstilles. Det er nødvendig å teste metoden med sterk åte for å kunne definere skalaen for ulike grader av buktæring og sannsynligheten for buksprenging. Disse måledataene trengs for å ha basis for implementering av målemetodikken. Det neste steget i arbeidet er å implementere den nye objektive metoden og koble resultater fra målinger med kvalitetsendringer i tidsrommet fra fangst til levering mottaksanlegget.

UTARBEIDET AV

Rasa Slizyte

SIGNATUR



KONTROLLERT AV

Ida Grong Aursand

SIGNATUR



GODKJENT AV

Marit Aursand

SIGNATUR



RAPPORTNR

A24739

ISBN

978-82-14-05645-7

GRADERING

Åpen

GRADERING DENNE SIDE

Åpen

Innholdsfortegnelse

1	Sammendrag	3
2	Innledning	3
2.1	Bakgrunn for prosjektet	3
2.2	Prosjektets omfang	5
2.3	Prosjektorganisering	5
3	Problemstilling og formål	5
4	Prosjektgjennomføring	6
4.1	Valg av forskningsmetode	6
4.2	Gjennomføring av prosjektet	7
4.3	Aktiviteter i prosjektet	8
4.4	Avvik i prosjektplan: milepæler	9
5	Materialer og metoder	10
5.1	Metodeutvikling	10
5.2	Materialer	10
5.3	Måleprotokoll	11
6	Resultater	13
6.1	Reaksjonstemperatur	13
6.2	Inkubasjonstid i målerøret	13
6.2.1	NVG sild	13
6.2.2	Nordsjøsilid med raudåte	15
6.3	Tidspunkt for prøveuttak fra fangst	17
6.4	Mengde åte og enzymatisk aktivitet	18
6.5	Fisk levert til land (laget fisk)	18
7	Konklusjoner og forslag til implementering av metoden	20
7.1	Konklusjoner	20
7.2	Forslag til implementering av metoden	21
8	Leveranser	22
9	Kvalitetssikring av prosjektgjennomføring og resultater	22

BILAG/VEDLEGG

I Prosedyre for prøveuttak

II Kort prosedyre for prøveuttak

1 Sammendrag

Buksprenging er en kvalitetsforringende prosess hvor bukområdet hos fisken brytes ned post mortem. Denne rapporten oppsummerer arbeidet med utviklingen av en anvendelig hurtigtest for å estimere enzymlekkasje som forårsaker buksprenging i pelagiske fiskearter. Måleutstyret er kommersielt tilgjengelig og krever lite opplæring før bruk. Metoden er brukervennlig og gir en objektiv vurdering av protein-nedbrytende aktiviteter i fisken. Metoder for prøveuttak, reaksjonstemperatur og inkubasjonstid samt tidspunkt for prøveuttak under ombordtaking av fangsten ble testet og optimalisert i prosjektet. Det er foreslått en ny skala som graderer enzymatiskaktiviteten i fiskebuken. Denne skalaen er tenkt integrert med dagens skala. Det mangler imidlertid noen resultater for at denne skalaen kan ferdigstilles. Det er nødvendig å teste metoden med sterk åte for å kunne definere skalaen for ulike grader av buktæring og sannsynligheten for buksprenging. Disse måledataene trengs for å ha basis for implementering av målemetodikken. Det neste steget i arbeidet er å implementere den nye objektive metoden og koble resultater fra målinger med kvalitetsendringer i tidsrommet fra fangst til levering mottaksanlegget.

Summary. Belly bursting is a type of spoilage by which the belly of the fish bursts some time after death. This report summarizes the work carried out to develop a user-friendly fast test to estimate the enzyme leakage that causes belly bursting in pelagic fish. The equipment used is commercially available and demands that the users receive some training prior to its use. The method is user-friendly and provides an objective evaluation of proteolytic activities in the fish. The following parameters were tested and optimized during the project: time elapsed after beginning of on-board pumping of the catch and the procedure for fish sampling; the method for sample treatment, and temperature and time of the incubation (when the reaction takes place). Also a new scale has been suggested to grade the enzymatic activity in the fish abdominal cavity. This new scale is intended to be used together with the current scale that grades the amount of prey in the intestine. However, some additional results are needed to complete the new enzymatic activity-based scale. It is still necessary to test the method with "strong" prey to be able to define the scale for different degrees of abdominal disintegration and the probability for bursting. These data are necessary to have a suitable basis to implement the proposed method. The next step in this work is to implement the new objective method and to link the results of the measurement of enzymatic leakage with the quality changes that take place during the time elapsed from capture at sea to delivery on land.

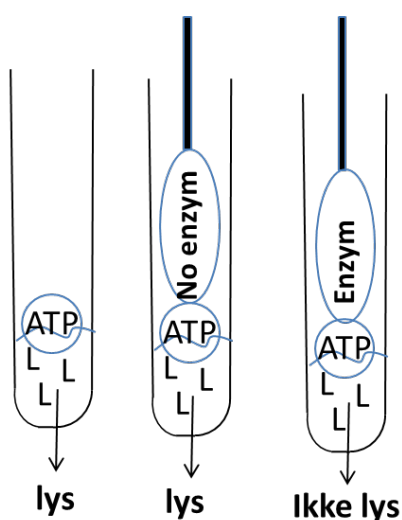
2 Innledning

2.1 Bakgrunn for prosjektet

Prosjektet som er beskrevet i denne rapporten var en videreføring av prosjektene "Pelagisk kvalitet fra hav til fat" (FHL/Forskningsrådet) og "Kvalitet og mattrygghet i den pelagiske verdikjeden" (Forskningsrådet) hvor flere fartøy (M/S Zeta, M/S Bøen, M/S Libas og M/S Traal),

Sildelaget og landindustrien (Egersund SeaFood) var involvert. I tillegg har også andre aktører fra flåteleddet vist sin interesse.

I dag har flåten krav på seg om å rapportere inn mengden åte i fangsten på en subjektiv skala (1-4). Dette tallet gir imidlertid ikke et riktig bilde av faren for buksprenging. På grunn av dette ønsker den pelagiske flåten å finne en objektiv metode for å predikere buksprenging. SINTEF Fiskeri og havbruk har jobbet med åte- og buksprengingsproblematikken i flere prosjekter samt i et doktorgrads arbeid. I dette arbeidet ble det identifisert at lekkasje av enzymer fra fiskens fordøyelsessystem er hoved årsaken til buksprenging. Som mulig hurtigmetode ble det testet en måleteknikk basert på ATP-luminometer, som skulle identifisere tilstedeværelse av proteolytisk aktivitet i buken av fisk. Prinsippet for måleteknikken (se Figur 1) er at mengde ATP (adenosintrifosfat) i prøven måles ved hjelp av luciferase (enzym), som produserer 1 foton (1 lysenhet) per ATP molekyl. Hvis det er enzymer fra fiskens fordøyelsessystem i prøven (proteaser) vil disse kunne bryte ned luciferasen og derfor hemme lysproduksjon. Lysintensitet vil derfor være et indirekte mål for enzymaktiviteten i muskelprøven.



Figur 1. Prinsippet for hurtig metode for å estimere buksprenging, hvor L=luciferasen, ATP = adenosintrifosfat. Er det enzymer tilstede dannes det ikke lys. Prøver uten enzymer gir dannelse av lys som måles.

Utstyret er kommersielt tilgjengelig (brukes til hygieneformål i industrien) og enkelt å bruke ved svært liten opplæring (Bilde 1). Resultatene er objektive og målingen tar ca 10 sekunder per prøve og kan registreres automatisk på PC, hvilket gjør det mulig at resultater lagres som sporbarhetsdata.

2.2 Prosjektets omfang

I 2011 søkte SINTEF Fiskeri og havbruk finansiering hos Fiskeri- og havbruksnæringsfond (FHF) for å videreutvikle metoden gjennom optimalisering av metodikken sammen uttesting under fiskerier om bord på båten. Det ble bevilget 1 800 000 kroner til prosjektet *Hurtig metode for å estimere buksprenging i pelagisk fisk ombord* med oppstart i september 2011 og avsluttet 2. kvartal 2013.

2.3 Prosjektorganisering

SINTEF Fiskeri og havbruk har vært ansvarlig for gjennomføring av prosjektet med Rasa Slizyte som prosjektleder. Revilija Mozuraityte, Ida Grong Aursand, Marte Schei og kommunikasjonsrådgiver Karoline Ski har vært prosjektmedarbeidere. SINTEF har samarbeidet med Universitetet i Baskerland ved/Iciar Martinez i prosjektet. Det er blitt gjennomført flere tokt med deltagelse fra SINTEF ved/Revilija Mozuraityte og Marte Schei (se Tabell 2). Metoden ble flere ganger testet sammen med landindustri (Egersund Seafood) ved levering av ulike arter av fisk. I tillegg ble det utført en rekke lab forsøk for å finne hvordan forskjellige faktorer påvirker målemetodikk og resultater.

Referansegruppen i prosjektet bestod av de følgende:

1. Rederi

- Bjørn Sævik, (skipper) M/S Kings Bay, Tlf: 90075641, Email: bjorn.savik@tussa.com
- Einar Bøen, (skipper) M/S Bøen, Tlf: 97692336, Email: einarboen@msn.com
- Per Magne Eggesbø, M/S Eros, Tlf: 70 08 82 32, Email: p-m-e@online.no

2. Landindustri

- Ragnhild Skåra (Kvalitetssjef, Egersund Seafood)

3. Organisasjon

- Kenneth Garvik (Salgsleder, Norges sildsalgslag)

4. FHF

- Rita Naustvik Maråk

3 Problemstilling og formål

I dag rapporterer flåten inn mengde åte i fangsten på en subjektiv skala (1-4) i henhold til kvalitetsforskrift for fisk og fiskevarer (Tabell 1). Mengden åte alene gir ikke en direkte indikasjon på sannsynligheten for buksprenging, da det er fiskens fordøyelsesenzymmer som lekker ut i buken, og ikke åten selv, som forårsaker buksprengingen. Disse tradisjonelle målingene som gjennomføres i dag vil gi grunnlag for usikkerheter i vurderingen av kvalitet og kvalitetsendringer ved RSW-lagring av fisken. En objektiv målemetode vil være nødvendig for å kunne estimere enzymlekkasje i buken og derigjennom gi et bedre grunnlag for å foreta en god kvalitets gradering som et godt verktøy for både selger og kjøper av fisken. En subjektiv skala som beskriver mengden åte sammen med en objektiv målemetode for å estimere enzymlekkasje i buken vil gi mer nøyaktig informasjon om fare for buksprenging i pelagisk fisk.

Tabell 1. Dagens skala basert på åtemengde.

Gradering åtemengde	Åtemengde	Beskrivelse
1	Åtefri	Ikke annet tarminnhold enn blodvann
2	Ubetydelig med åte	Åteinnholdet renner bort med blodvann
3	Bra med åte	Mer konsentrert åte, renner ikke bort med blodvann. NB: Ikke buktært!
4	Full av åte	Magesekk eller tarmkanal er full av åte

Prosjektet hadde følgende hovedmål:

Teste og tilpasse en hurtig og enkel målemetode for å estimere buksprengingen av pelagisk fangst til bruk i båter og i industrien.

Delmål:

- 1: Ferdigutvikle en måle-protokoll for bruk ombord i båt og industrien.
- 2: Uttesting av måleprotokoll på nyfanget fisk med og uten åte (toktaktivitet).
- 3: Optimalisering av målemetoden samt opplæring av fiskere og forslag til implementering hos bruker.

4 Prosjektgjennomføring

4.1 Valg av forskningsmetode

Utstyret og måleprotokollen (med annet anvendelsesområde) er kommersielt tilgjengelig (Bilde 1), men det er ikke utviklet brukermanual/protokoll for anvendelse på pelagisk fisk. For å utvikle protokollen var det viktig å teste metodikk på både nyfanget åtefisk og nylevert (lagret) åtefisk. For å optimalisere teknikken på pelagisk råstoff var det nødvendig å kjøre en rekke laboratorieforsøk for å teste ulike faktorerers innvirkning på målingene. Fiskernes og industriens mening og kommentarer var også viktig for optimalisering av protokollen, for å få den best mulig tilpasset de praktiske forholdene både om bord i båten og ute på landanleggene.



Bilde 1. Kommersielt tilgjengelig ATP-luminometer og svaber for prøvetaking.

4.2 Gjennomføring av prosjektet

Arbeidet i prosjektet ble fordelt på tre(AP) som beskrevet under;

AP1: In situ testing og optimalisering av testprotokollen

- 1) Toktaktivitet: Testing av metoden på nyfanget fisk og åtefisk for å definere;:
 - a. Optimal tid for prøvetaking etter fangsten.
 - b. Optimal tid for avlesning av resultatet etter prøveuttak (dette for å unngå både falske positive og falske negative resultater).
- 2) Testing av protokollen i landindustrien
- 3) Ferdigutvikling av protokollen for måling av enzymlekkasje.

AP2: Opplæring av brukere og modifisering etter deres ønsker

- 1) Organisereworkshop/møte for presentasjon av målprotokollen samt få en tilbakemelding mht gjennomførbarhet fra brukere næringen samt gjennomføre opplæring av brukerne både i fiskeriene og i landanleggene.
- 2) Optimalisering av metoden etter brukerens anbefalinger og ønsker med påfølgende uttesting på tokt

AP3: Presentasjon av ferdigutviklet protokoll til brukere

- 1) Organisering av opplæringskurs med informasjon og presentasjon av optimalisert bruksprotokoll til brukere.
- 2) Publisere resultater (populærvitenskapelig artikler) i fagtidsskrift og som SINTEF-nyheter.
- 3) Levere sluttrapport til FHF og brukere med anbefalinger om implementering.

4.3 Aktiviteter i prosjektet

Følgende aktiviteter ble gjennomført i løpet av prosjektperioden:

1. Utvikling og testing av måleprotokoll:
 - a. På tokt (Tabell 2),
 - b. Hos landindustri (Tabell 2),
 - c. Labforsøk.
2. Kommunikasjon i prosjektet:
 - a. Referansegruppemøte (Tabell 3)
 - b. Presentasjon av resultater (Tabell 3)

Tabell 2. Aktiviteter (tokt og besøk av landindustri) som har blitt gjennomført med deltagelse fra SINTEF.

Aktivitet	dato	Varighet, døgn	Fisk type	Kast, t	Område
Tokt	23.11.2011	5	NVG sild	100t	7054.174N017:13:05
	16.06.2012	3	Nordsjøsil	140t	60.14.420N 002.09.850
	21.06.2012	3	Nordsjøsil	65t/205t	
	15.09.2012	4	makrell	280t	N59° 36Ø 0°12
Industri besøk	19.09.2011	1	makrell		
	07.06.2012	1	Nordsjøsil		

Tabell 3. Kommunikasjon i prosjektet og presentasjon av resultater.

Hendelse	Dato	Hvor	Info
Referansegruppemøte	05.10.2011	SINTEF SeaLab, Trondheim	
Referansegruppemøte	16.08.2012	Trondheim spektrum	
Referansegruppemøte	29.04.2013 og 30.04.2013	SINTEF SeaLab, Trondheim	
Presentasjon av resultater ved Pelagiske dager i september 2012	5-6 September, 2012	Bergen	Presentasjon, faktaark
Presentasjon av resultater på Fiskebåts pelagiske medlemsmøte på Gardermoen i mai 2013	2013.05.07	Gardermoen	Presentasjon, faktaark
Et nyhetssak: "Enkel og brukervennlig metode for å estimere sannsynlighet for buksprenging i pelagisk fisk"	2013 Mai		Send til Fiskebåt, FHF og Sildelaget for å publisere på websider av de nevnte foreninger
Populærvitenskapelig artikkel "Enkel og brukervennlig metode for å estimere sannsynlighet for buksprenging i pelagisk fisk".	2013 Mai		

Prosjektnettside	2012		http://www.sintef.no/Fiskeri-og-Havbruk-AS/Prosjekter/2011/Hurtig-metode-for-a-estimere-buksprenging-i-pelagisk-fisk-ombord
------------------	------	--	---

I tillegg ble følgende aktiviteter gjennomført i løpet av prosjektperioden:

- 1) Innkjøp av måleutstyr (3 maskiner).
- 2) Basert på test resultater og tilbakemeldinger fra industrien ble en optimalisert måleprotokoll utviklet.

4.4 Avvik i prosjektplan: milepæler

Alle delleveranser i prosjektet er gjennomført etter planen, men det har vært noen forsinkelse angående det å få presentert resultatene til brukerne samt tilbakemelding både fra brukerne og referansegruppen (vanskeligheter med samlet ref. gruppen). Enda bedre implementering hos brukerne bør gjennomføres.

5 Materialer og metoder

5.1 Metodeutvikling

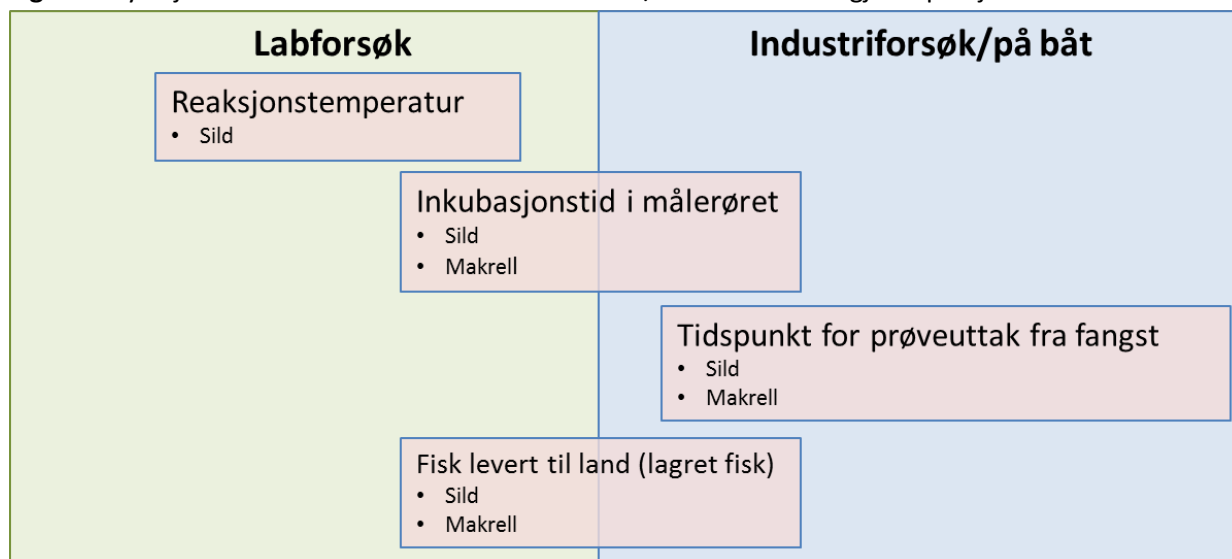
Prinsippet for målingen og utstyret som kan benyttes er ferdig utviklet og kommersielt tilgjengelig (Bilde 1). Det mangler protokoll for målingene som er tilpasset måling av enzymlekkasje i fiskebuken. For å utvikle protokollen var det viktig å teste metodikk på både nyfanget åtefisk og nylevert (lagret fisk om bord) åtefisk. En rekke faktorer måtte sjekkes og optimaliseres for bruk av metodikk på fisk.

Estimering av enzymatisk aktivitet i fisk deles i følgende steg:

- uttak av nyfanget fisk, prøveuttak fra buken av fisk
- og måling av enzymatisk aktivitet.

For å optimalisere metoden, ble to målemuligheter testet hvor en er basert på prøveuttak fra overflaten av fiskebuken og den andre at det lages et ekstrakt av prøve fra buken. Med utgangspunkt i de to ulike ble uttaksmetodene testet reaksjonstemperaturens og inkubasjonstidens (holdetiden før avlesning) innvirkning på måleresultatene. Effekten av tidspunkt for uttak av prøve under ombordtakingsprosessen på måleresultatet ble også testet (Figur 2). Fiskeres og industriens mening og kommentarer var viktig for å velge flere av de overnevnte faktorene.

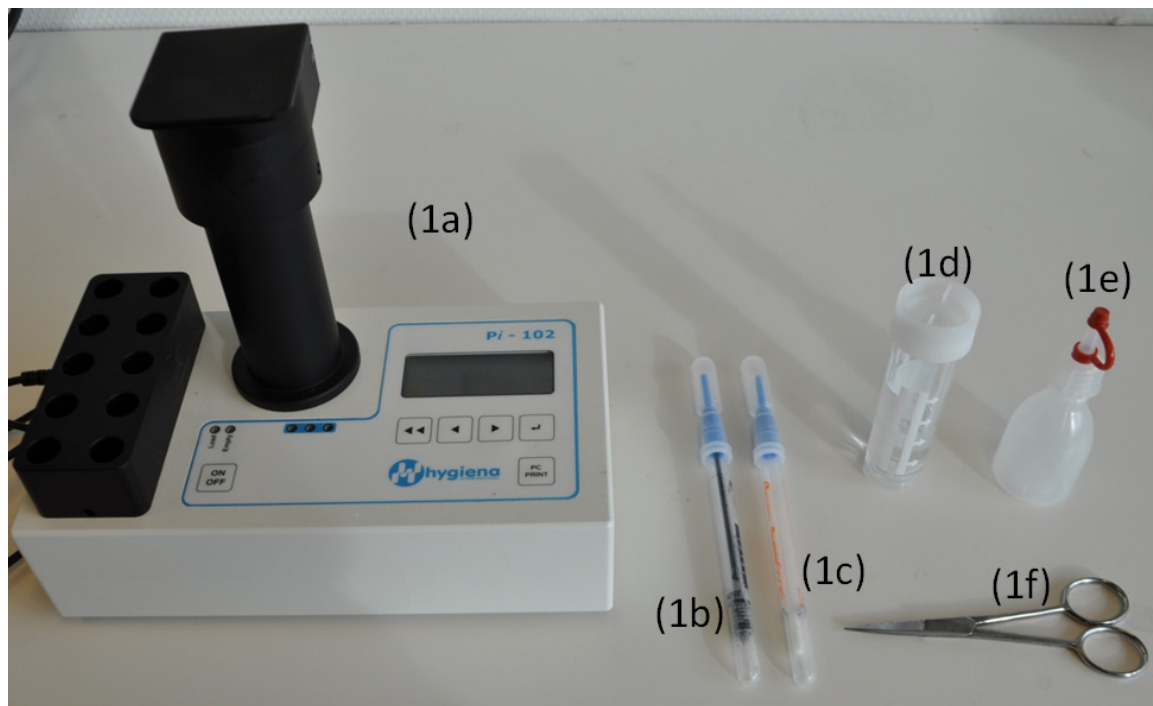
Figur 2. Flytskjema som viser oversikt over aktiviteter/forsøk som blitt gjort i prosjektet.



5.2 Materialer

De materialene som trengs for å kjøre bukspregningstest er vist i Bilde 2: Luminometer -1a, buffer ekstraktpinne (1b), overflatepinne (1c), ekstraksjonsrør med 10ml ekstraksjons buffer (1d)

adenosintrifosfat (ATP) løsning Hygiena Pi-102 (1e) og saks (1f). I tillegg trengs klargjorte klistrelapper som er merket med fiskenummer.



Bilde 2. Materialer som trengs å kjøre bukspregningstest.

5.3 Måleprotokoll

Målingen av enzymlekkasje deles i to trinn:

1. prøveuttak
2. måling av enzymaktivitet.

De hoved prinsippene for disse to trinnene er beskrevet under. Detaljert prosedyre for å måle enzymatiskaktivitet i pelagiskfisk er gitt i vedlegget.

Prøveuttak

To prøveuttak for måleprosedyre ble testet:

1. Ekstraktmetoden: Ekstrakt lages ved å kutte av en bit av buken fra silda og blande med ekstraksjonsbuffer. Svaber dyppes i ekstrakt for å ta ut prøve fra ekstraktet.
2. Overflatemetoden: Fisk åpnes med saks og prøve tas ved å stryke med svaber på innsiden av fiskebukken (svarthinne).

Måling av enzymaktivitet

Etter prøvene er tatt med pinnene fra testrøret, bør enzymaktivitet måles for å estimere enzymlekkasje. For *måling av enzymaktivitet* knekkes først hodet av testrøret med prøve (prøveuttak er beskrevet over) for å få ut reaktant (der befinner luciferasen seg). Enzymet luciferase reagerer med prøve i testrøret. Etter en bestemt reaksjonstid tilsettes ATP-løsning i testrøret og måles utvikling lys i RLU (relative light units) i luminometeret. Målingen gir en verdi som representerer prøve: $RLU_{prøve}$.

Det må også kjøres kontroll prøve ($RLU_{kontroll}$). Det er et rør uten enzymer fra fisk og kjøres på samme måte. Utvikling av lys beregnes på følgende måte:

Utvikling av lys = $RLU_{prøve} * 100 / RLU_{kontroll}$, %

I noen av prøvene er det mye endogent ATP som kommer med fisken, og derfor måler vi høyere $RLU_{prøve}$ enn $RLU_{kontroll}$ (utvikling av lys er høyere enn 100%). I disse tilfellene er det ingen enzymlekkasje i prøven, utvikling av lys tilpasses til 100%.

6 Resultater

For å optimalisere metoden, ble det reaksjonstemperaturens, inkubasjonstidens (holdetiden før avlesning) og to ulike prøveuttakmetodes innvirkning på måleresultatene testet (Figur 2). Både sild og makrell ble brukt i prosjektet. Måleprotokoll ble også testet på fisk levert til land (laget fisk).

6.1 Reaksjonstemperatur

For å teste om reaksjonstemperaturen påvirker enzymatisk aktivitet ble det kjørt forsøk ved to ulike temperaturer. Reaksjonen mellom luciferase og prøve (fra bukveggen og fordøyelsessystemet fra sild) ble kjørt ved romtemperatur og i kjølerom (4°C). Resultatene (Tabell 4) viser at det ikke var noen stor påvirkning av reaksjonstemperatur på utvikling av lys. Derfor kan enzymatiskaktivitet måles ombord uten å ta hensyn til temperaturforholdene.

Tabell 4. Utvikling av lys som resultat av måling av enzymatisk aktivitet i romtemperatur (20°C) og i kjølerom (4°C). Prøver fra bukveggen av sild representerer enzymløsløst fra fordøyelsessystemet mens prøver fra pyrolic caeca (del av fordøyelsessystemet med høy enzymatisk aktivitet) ble brukt som kontrollmålinger på metoden. Ekstrakt og overflata indikerer prøveuttaksmetode (henvis til hvor det er beskrevet).

	Ekstrakt, 20°C	Ekstrakt, 4°C	Overflate, 20°C	Overflate, 4°C
Bukvegg	33	32	29	20
Pyrolic caeca	3,6	1,6	0,2	0,1

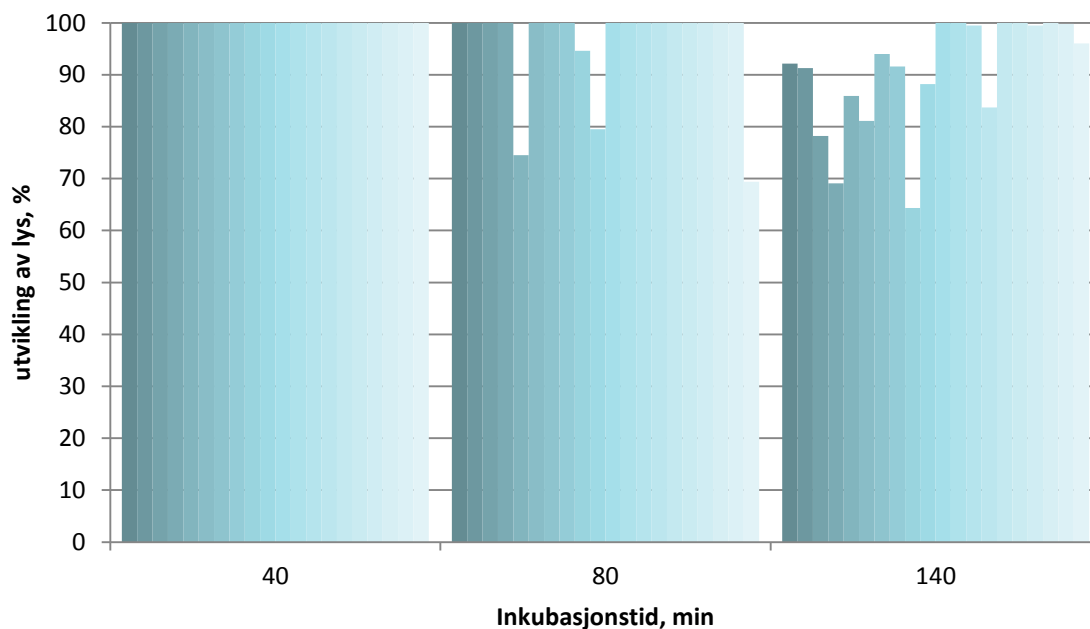
6.2 Inkubasjonstid i målerøret

For å ferdigutvikle hurtigmetoden var det viktig å finne optimal inkubasjonstid (tiden luciferase var blandet med prøve) i målerøret. Effekten av inkubasjonstid på utvikling av lys ble testet på både NVG og Nordsjø-sild og prøvene ble tatt ut ved hjelp av både overflate- og ekstraktmetoden. Fiskerne ønsker svar så raskt som mulig på om det er enzymløsløst og fare for buksprengning så fort som mulig etter fangst. Det er derfor viktig å kunne få informasjon om hvor raskt man kan få et pålitelig svar.

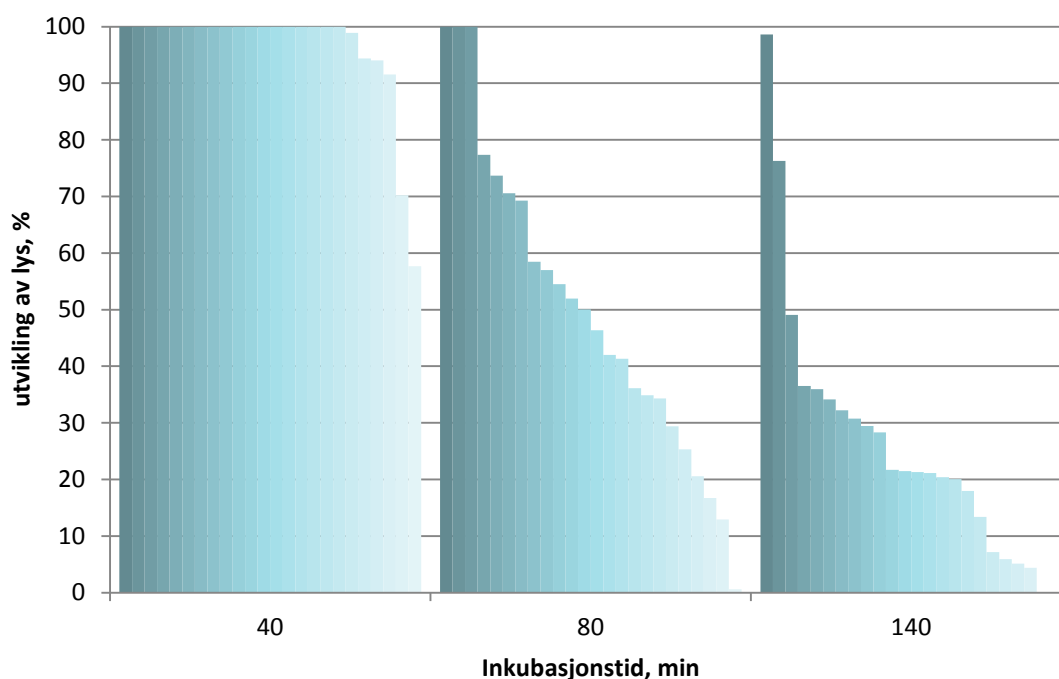
6.2.1 NVG sild

Effekten av inkubasjonstid (tiden luciferase er blandet med prøve) på utvikling av lys ble testet ombord (Figur 2A og 2B). 20 tilfeldig valgte nyfanget NVG sild (fisket nov 2012) ble testet. All fisk var uten åte. Ved inkubasjonstid 40 min viste både ekstrakt- og overflatemetoden 100 % utvikling av lys (ingen enzymaktivitet) (Figur 2A og 2B). 100 % utvikling av lys betydde at det var ingen aktive enzymer til stede. På grunn av at fisken var uten åte, var dette resultatet som forventet. Inkubasjonstid på 80 min og lengre viste nedgang i utvikling av lys. Mulig mikrobiologisk vekst i rørene kan være en av årsak til nedgang i utvikling av lys, denne teorien ble ikke testet videre

siden det er ønskelig med kortest mulig inkubasjonstid for at fiskerne skal få raskest mulig svar på analysene.



Figur 2A. Utvikling av lys ved tre ulike inkubasjonstider i målerøret (40,80 og 140 min). Prøvene ble tatt på NVG sild med ekstraktmetoden. Hver søyle representerer en enkelt fisk.

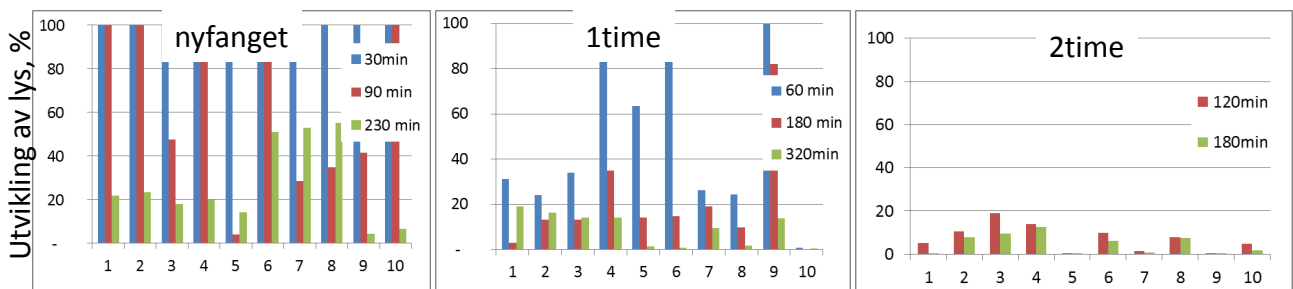


Figur 2B. Utvikling av lys ved tre ulike inkubasjonstider i målerøret (40,80 og 140 min). Prøvene var tatt på NVG sild med overflatemetoden. Hver søyle representerer en enkelt fisk.

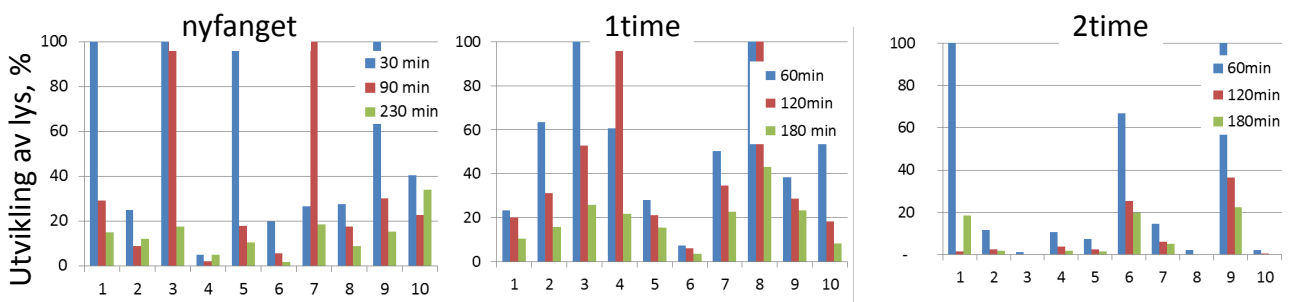
6.2.2 Nordsjøsil med raudåte

For å måle enzymaktivitet i nordsjøsil, fisk ble tatt ut tilfeldig i starten (Figur 3A) og på slutten (Figur 3B) av ombordpumpingen. Fisk ble lagret i kasser på dekk før prøvene ble tatt ut. Det ble tatt ut prøver ved tre uttakstider: Straks etter ombordtaling, en time etter ombordtaling og to timer etter ombordtaling. Prøver var tatt ved hjelp av overflatemetoden på Nordsjøsil med raudåte. Effekten av inkubasjonstid på utvikling av lys ble testet på alle de seks fiskegruppene.

På nyfanget fisk ble første prøveuttak gjennomført med 30 min inkubasjonstid (Figur 3A og 3B).



Figur 3A. Sil med raudåte, utvikling av lys som funksjon av inkubasjonstid og prøvetakingstid etter fangst (nyfanget, 1 og 2 timers lagring ombord). Fisken ble tatt ut idet ombordpumpingen startet. Prøver ble tatt ut ved hjelp av overflatemetoden. 1 til 10 representerer 10 forskjellige fisk.

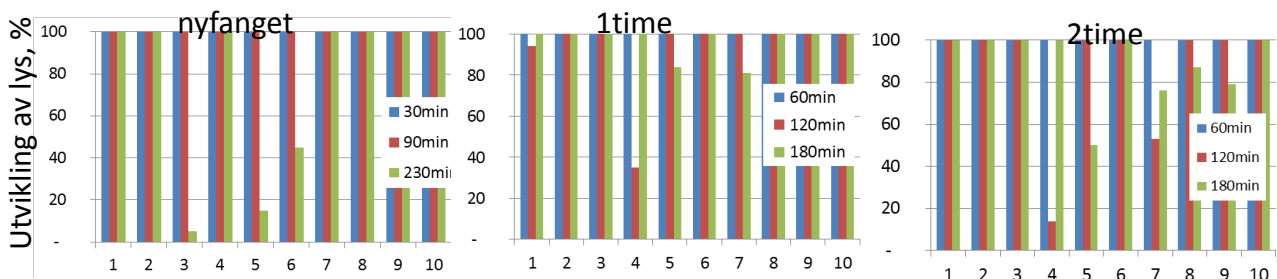


Figur 3B. Sil med raudåte, utvikling av lys som funksjon av inkubasjonstid og prøvetakingstid etter fangst (nyfanget, 1 og 2 timers lagring ombord). Fisken ble tatt ut idet ombordpumpingen startet. Prøver ble tatt ut ved hjelp av overflatemetoden. 1 til 10 representerer 10 forskjellige fisk.

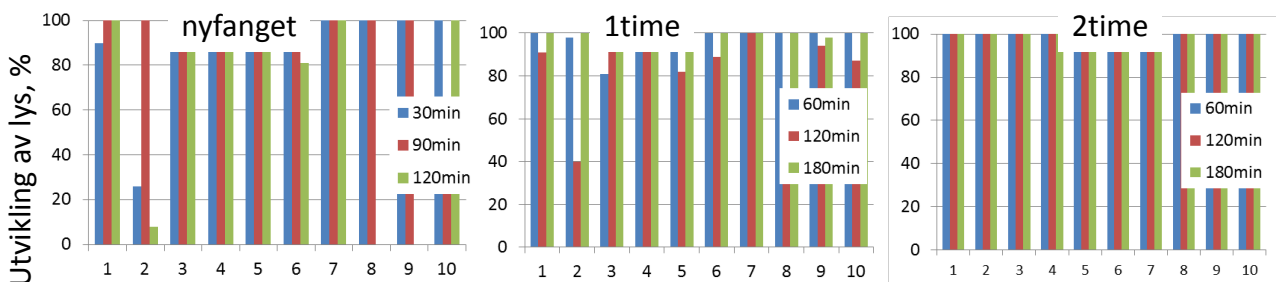
Flere av de nyfangete fiskeprøvene viste ingen nedgang i utvikling av lys (enzym lekkasje). Lengre inkubasjonstid (90 og 230 min) viste nedgang i lysutvikling.

I fisk som ble analysert 1 eller 2 timer etter ombordtaling, og med inkubasjonstid på 60 minutt eller mer ble det observert en nedgang i utvikling av lys for de fleste prøvene. Dette indikerer enzyml lekkasje, som er forventet i fisk med raudåte. På grunn av at lengre inkubasjonstid kan gi en nedgang i utvikling av lys på fisk som er uten åte, anbefales det 60-90 min inkubasjonstid med overflatemetoden.

Ekstraktmetoden ble også brukt for å teste effekt av inkubasjonstid på Nordsjøsil med raudåte (Figur 4A og 4B).



Figur 4A. Nordsjøsil med raudåte, utvikling av lys som funksjon av inkubasjonstid og tidspunkt for prøveuttak etter fangst (nyfanget, 1 og 2 timer om bord). Fisken ble tatt ut ved start ombordpumping. Prøver ble tatt ut ved hjelp av ekstraktmetoden.



Figur 4A. Nordsjøsil med raudåte, utvikling av lys som funksjon av inkubasjonstid og og tidspunkt for prøveuttak etter fangst (nyfanget, 1 og 2 timer om bord). Fisken ble tatt ut ved slutt ombordpumping. Prøver ble tatt ut ved hjelp av ekstraktmetoden.

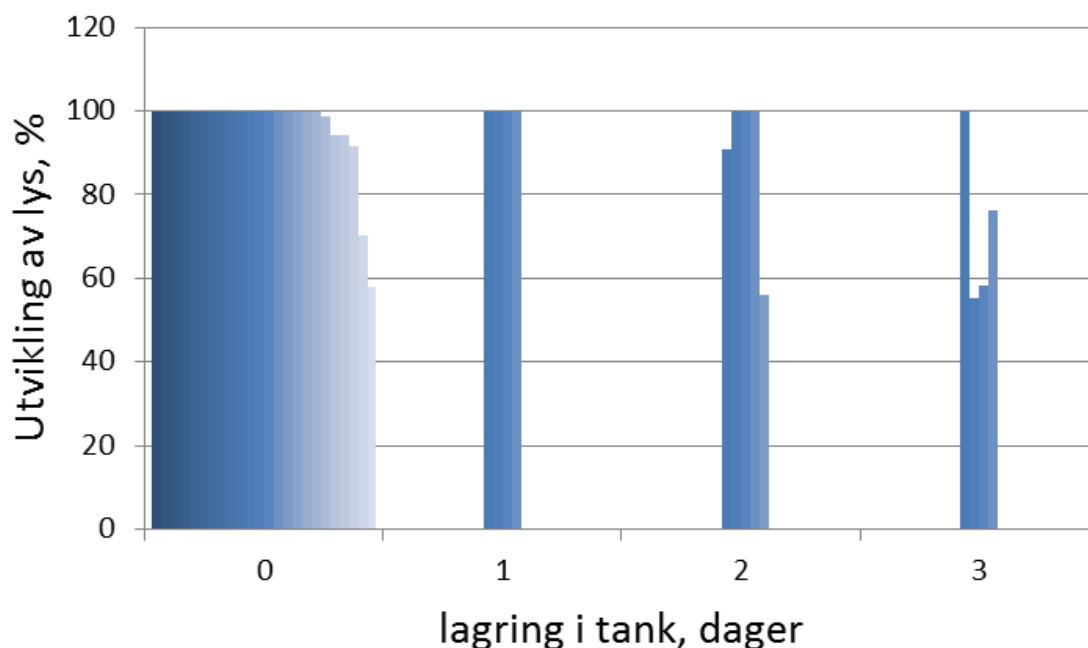
Resultatene viser at i løpet av 180 min ble det ikke observert noen nedgang i lysutvikling med ekstraktmetoden ved de testede inkubasjonstidene (30, 60, 90, 120 og 180 min) (Figur 4A og 4B). Dette betyr at det ikke ble detektert noen enzymlekkasje i fisken med ved hjelp av ekstraktmetoden. På grunn av at fiskerne trenger en indikasjon på faren for buksprenging så fort som mulig er inkubasjonstid på over 180 min ikke aktuell å teste. Ved ekstraktmetoden lages det ekstrakter av fiskemuskelen, og prøven fortynnes. Dette kan være årsaken til hvorfor det ikke ble målt enzymatisk aktivitet i sild med raudåte ved hjelp av ekstraktmetoden.

Konklusjonen fra dette studiet var at lysutvikling bør måles ved inkubasjonstid på mellom 40 og 60 minutt. Oppsummering av resultater og kommentarer fra fiskerne viser at overflatemetoden er foretrukket fordi den er enklere å utføre. Metoden er følsom nok for å måle enzymatisk aktivitet på nyfanget fisk full av raudåte.

6.3 Tidspunkt for prøveuttak fra fangst

Enzymatisk aktivitet målt som utvikling av lys ble testet på Nordsjøsilid ved forskjellige tidspunkt for prøveuttak: Rett etter fangst (nyfanget fisk), samt etter 1 time og 2 timers lagring ombord. Fisk ble tatt ut både ved starten og slutten av pumpeprosessen. Både overflate- og ekstraktmetoden ble testet. Resultatene er vist i Figur 3A, Figur 3B, Figur 4A og Figur 4B. Ekstraktmetoden var ikke følsom nok til å se enzymaktivitet i fisk ved de tidspunktene for prøveuttak. Overflatemetode (Figur 3A og Figur 3B) viser at nedgang i utvikling av lys var høye i fisken som var om bord i to timer enn i nyfanget fisk. Det ble målt raskere nedgang i utvikling av lys i sild som var tatt ved slutten av pumpeprosessen sammenliknet med enn i sild som var tatt ut ved starten av pumping. Lengre oppholdstid i nota kan være en årsak til den høyere enzymaktivitet ved slutten av pumpingen. Derfor bør prøvene til test tas ved forskjellig tider under ombordpumping.

Ulike tidspunkt for prøveuttak ble også testet på NVG sild. Sild ble tatt fra en RSW-tank hvor fisken var lagret fra ett til tre døgn (Figur 5). Utviklingen av lys var høyere en 50 % på alle tidspunkt for prøveuttak, noe som indikerer at det ikke var aktive enzymer til stede, og dermed ingen fare for buksprenning.

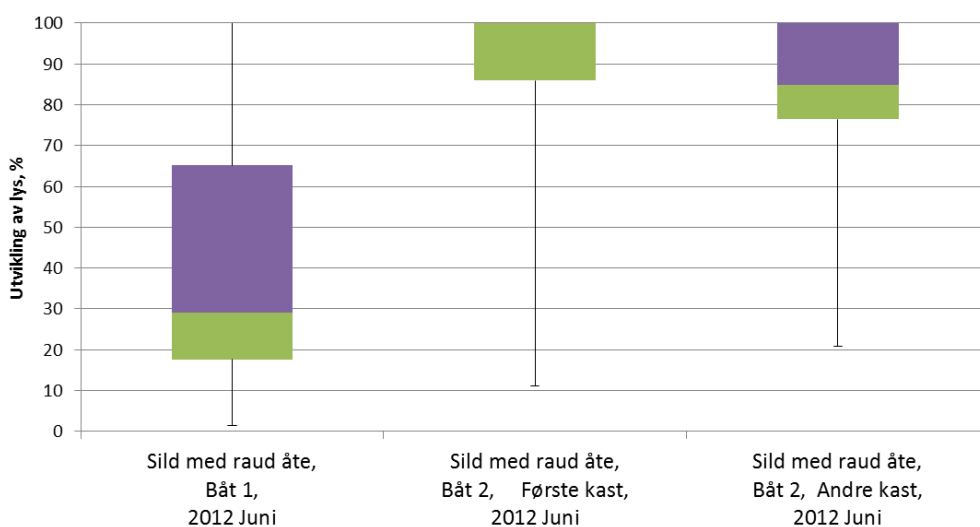


Figur 5. NVG sild. Prøvene ble tatt fra RSW tanken under lagring i opp til 3 døgn. Hver søyle representerer en enkelt prøvefisk.

Basert på oppsummerte resultater og kommentarer fra fiskerne ble det konkludert med at for å få et godt bilde av enzymløsløst i fisken bør en ta ut tre prøver under ombordtaking; ved starten, midt i og på slutten av ombordpumping.

6.4 Mengde åte og enzymatisk aktivitet

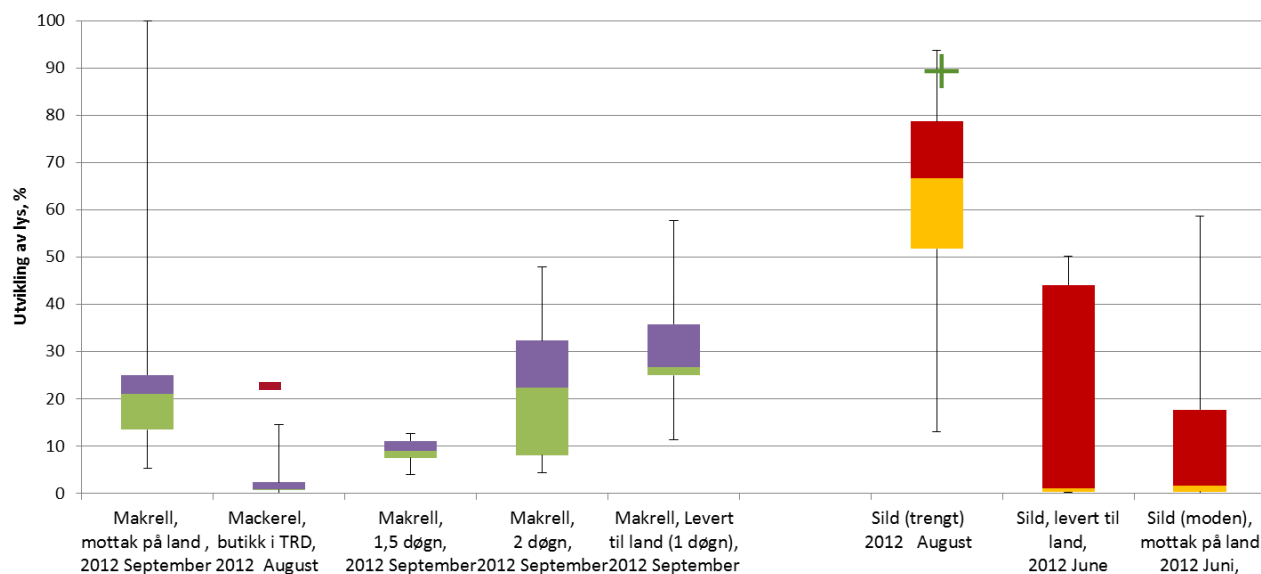
I juni 2012 ble det utført to tokt hvor Nordsjø-sild ved raudåte ble testet. Begge båter rapporterte samme mengde åte inn til auksjonen: 3. Resultater presentert i Figur 6 viser at selv om samme mengde åte ble rapportert inn til auksjon hadde åten i fisken ved tokt 2 (Båt2) en mindre mengde aktive enzymer (mer lys produsert) enn på tokt 1. Dette resultatet viser at måleteknikken som er testet ut kan gi en mer objektiv informasjon om faren for bukspregning enn dagens metode.



Figur 6. Enzymatisk aktivitet i nyfanget nordsjø-sild som ble målt en time etter fangst, inkubasjonstid i prøverøret var 1 time. Begge båter rapporterte samme mengde åte inn til auksjonen: 3. Box plot som viser kvartiler, median og utliggere i hver måling.

6.5 Fisk levert til land (laget fisk)

Ett av delmålene i prosjektet var å tilpasse måleteknikk og utvikle måleprotokoll slik at både fiskebåter og industri hadde nytteverdi av målemetoden. Det ble utført en rekke forsøk på både sild og makrell for å sjekke hvilke resultater man får når metoden anvendes etter landing av fangsten (Figur).



Figur 7. Utvikling av lys og indikerer enzymlekkasje i makrell (lilla/grønn boks) og sild (rød/gul boks). Alle målingene ble utført på fisk flere døgn etter fangst. Fisk som sensorisk ble vurdert til å være av ekstra god og dårlig kvalitet er merket med "+" og "-". Box plot som viser kvartiler, median og utliggere i hver måling.

Resultatene viser at hurtigmetoden også kan utføres ved mottaksanlegget, for å estimere kvaliteten ved levering. Flere døgn etter fangst oppnås det lavere verdier enn rett etter fangst. Årsaken til dette er at hurtigmetoden måler summen av de enzymatiske aktiviteter i fisken fra fangst pluss naturlig enzymlekkasje som skjer i fisken fra fangst til levering. Resultatene viser (Figur) at det er vanskelig å skille mellom god og dårlig kvalitet. Men det var også observert at "ekstra" god og dårlig kvalitet skiller seg fra andre (merket med + og - i Figur). Kvaliteten ble bedømt sensorisk.

7 Konklusjoner og forslag til implementering av metoden

7.1 Konklusjoner

- Reaksjonstemperatur har ingen påvirkning på estimering av enzymaktivitet. Derfor kan enzymatiskaktivitet måles ombord uten å ta hensyn til temperaturforholdene.
- Prøveuttak ved ekstraktmetoden tar mer tid og involverer flere steg, og det er derfor utfordrende å kjøre metoden om bord. I tillegg, var ekstraksjon metoden mindre følsom enn overflatemetoden og ble derfor eliminert som aktuell metode.
- Prøveuttak ved hjelp av overflatemetoden er foretrukket fordi den er enklere å utføre. Metoden er følsom nok for å måle enzymatisk aktivitet på nyfanget fisk full av raudåte. Målingene bør ha en inkubasjonstid på 40-60 min.
- For å få et oversiktlig bilde for enzymlekkasje i fisken bør en ta ut tre prøver under ombordtaking; ved starten, midt i og på slutten av ombordpumpingen.
- Resultatene viser at hurtigmetoden også kan utføres ved mottaksanlegget, for å estimere kvaliteten ved levering. Metoden er ikke følsom nok til å måle små forskjeller, men veldig god og dårlig kvalitet kan måles.
- Forsøkene som ble gjennomført på tokt ble utført på fisk uten åte og på fisk med raudåte. Det finnes derfor ikke data fra sterk åte/kruttåte. Det er nødvendig å teste metoden med sterk åte for å kunne definere skalaen for ulike grader av buktæring og sannsynlighet for buksprenging. Disse dataene trengs for å ha basis for implementering målemetodikken.
- Metodebeskrivelsen ble oppfattet som god av referansegruppen i prosjektet, men det er fortsatt mulig å forenkle den noe. Det er ønskelig å se på muligheten for å erstatte bruk av saks med kniv. Dette skal undersøkes av SINTEF.
- SINTEF foreslo at en ny skala (Tabell 5) blir integrert med dagens skala (Tabell 1). Det mangler imidlertid noen resultater for at denne tabellen skal ferdigstilles.

Tabell 5. Utkast til ny skala basert på enzymlekkasje med Hygiena Pi-102.

Gradering enzymlekkasje	Målte verdier	Kvalitetsendringer under lagring
A	> 2 000 000	God kvalitet
B	2 000 000 – ?	God kvalitet, noe buktæring
C	? - 200 000	Buktæring
D	200 000 – 0	Stor sannsynlighet for buksprenging

7.2 Forslag til implementering av metoden

Neste steg i arbeidet er å koble resultater fra målinger med kvalitetsendringer i tidsrommet fra fangst til levering mottaksanlegget. Metoden bør utarbeides for en art av gangen. De forespurte aktørene i næringen ønsker at det først fokuseres på makrell. Det anbefales at flere fartøy tester ut utstyret gjennom en hel makrellsesong for å samle inn data. På denne måten vil en kunne utarbeide en fullstendig skala for målemetoden som sier noe om potensiell grad av buktæring og faren for buksprenging. I framtiden er det ønskelig at resultater fra den objektive målemetoden kan implementeres ved auksjon av fisken, i tillegg til dagens subjektive skala (1-4). For at det skal kunne gjennomføres må følgende trinn gjennomføres:

- Data for enzymlekkasje må knyttes til kvaliteten etter landing av fangsten. En referanseflåte og industri må etableres for innhenting av systematiske data over tid for å få til implementering av målemetoden.
- Dataene må systematiseres og vurderes, og verdier på enzymlekkasje målt ombord må koples til kvalitet etter landing. Følgende aktiviteter er tenkt utført:
 - Et datasystem for innrapportering av data både fra fartøy og landanlegg etableres. Det anbefales at dette ansvaret legges hos Sildesalgslaget for at man i framtida skal kople data til dagens auksjon på en enkel måte.
 - En "referanseflåte" måler enzymlekkasje på fisk rett etter fangst over en sesong
 - Fiskens "historikk" fra fangst til levering samles og innrapporteres elektronisk
 - Landanleggene evaluerer kvaliteten av fisken og rapporterer dette inn i samme system
 - Landanleggene setter kvalitetskarakterer som sammenliknes med resultater for enzymlekkasje
 - SINTEF ferdigutvikler skala for estimering av buksprenging (vist i Tabell 4) basert på innsamlete data.

8 Leveranser

Prosjektleveransene er følgende:

- Rasa Slizyte, Revilija Mozuraityte, Iciar Martinez, Marte Schei, Møte (workshop) og opplæring av aktører i referansegruppe, august 2012, Trondheim
- Rasa Slizyte, Revilija Mozuraityte og Iciar Martinez, En ferdigutviklet måleprotokoll for estimering av buksprenging i pelagiske fangst, september 2012.
- Faktaark "Hurtig metode for å estimere buksprenging i pelagisk fisk om bord", Pelagiske dager, 5-6 September, 2012, Bergen.
- Rasa Slizyte, Revilija Mozuraityte, Ida Grong Aursand, Møte (workshop) og opplæring av aktører i referansegruppe, april og mai 2013, Trondheim.
- Rasa Slizyte, Revilija Mozuraityte, Iciar Martinez, Ida Grong Aursand, "Enkel og brukervennlig metode for å estimere sannsynlighet for buksprenging i pelagisk fisk". Populærvitenskapelig artikkel.
- Rasa Slizyte, Revilija Mozuraityte, Ida Grong Aursand, "Enkel og brukervennlig metode for å estimere sannsynlighet for buksprenging i pelagisk fisk" et nyhets sak, send til Fiskebåt, FHF og Sildelaget for å publisere på den websider av de nevnte foreninger.
- Nyhets sak "Enkel og brukervennlig metode for å estimere sannsynlighet for buksprenging i pelagisk fisk" ble publisert på SINTEF webside i juni 2013:
<http://www.sintef.no/Fiskeri-og-Havbruk-AS/Nyheter/Enkel-metode-for-a-estimere-buksprenging/>
- Ida Grong Aursand, Revilija Mozuraityte, Rasa Slizyte, "Enkel og brukervennlig metode for å estimere sannsynlighet for buksprenging i pelagisk fisk", Presentasjon ved Fiskebåts medlemsmøte for redere innen pelagisk sektor på Gardermoen, den 7.mai 2013.
- Rasa Slizyte, Revilija Mozuraityte og Iciar Martinez, SINTEF-rapport med resultater fra uttesting på nyfanget fisk med og uten åte, optimalisering av målemetode og forslag til implementering, Juni, 2013.
- Nettside for prosjektet:
<http://www.sintef.no/Fiskeri-og-Havbruk-AS/Prosjekter/2011/Hurtig-metode-for-a-estimere-buksprenging-i-pelagisk-fisk-ombord>

9 Kvalitetssikring av prosjektgjennomføring og resultater

Forskningsleder Ida Grong Aursand har vært kvalitetssikrer i prosjektet. Hun har også deltatt som observatør ved flere referansegruppemøter.



Teknologi for et bedre samfunn

www.sintef.no