



N I F E S
NASJONALT INSTITUTT
FOR ERNÆRINGS- OG
SJØMATFORSKNING



Rapport

2014

Prosjektrapport FHF prosjekt #900786:

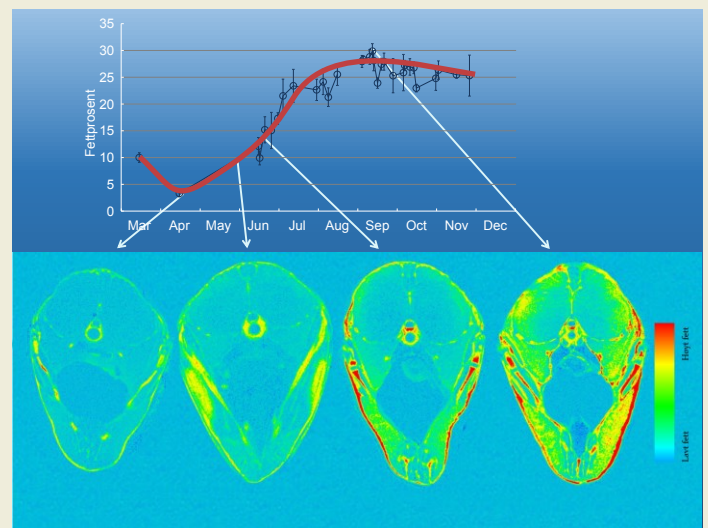
Fettavleiring, tekstur og struktur i makrell fra juni til november

Arne Duinker¹ og Mona E. Pedersen²

¹Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (NIFES)

²NOFIMA

20.06.2014



SAMMENDRAG

Formålet med prosjektet var vitenskapelig dokumentasjon av endring i fettavleiring og tekstur hos makrell fra Norskehavet og Nordsjøen gjennom sesongen. Fettinnhold ble analysert i lagdelte fileter, og fettnivåer i tverrsnitt av makrell ble dokumentert med MR og histologi. I tillegg ble tekstur analysert instrumentelt fra samme fisk analysert med histologi.

Makrellen har et tynt fettcellelag like under huden. Innenfor dette laget avtar fettinnholdet innover i muskelen, mens buklappene har relativt høyt fettinnhold i hele muskelvevet. Fettinnholdet i filet var lavt i juni, økte frem mot september og holdt seg stabilt høyt ut november. Fettavleiringen fulgte fettinnholdet som varierte en del innenfor hver prøve. Den magre fisken hadde generelt mindre fett i alle deler av fileten, men også denne fisken hadde også høyest fettinnhold like under skinnet. Mager fisk hadde derimot svært lite fett avleiret innover i muskel. Fettavleiringen i muskel økte med økende fettinnhold. En typisk fet høstmakrell vil dermed ha mer fett marmorert inn i muskel enn en typisk mager sommermakrell, selv om fetere og magrere fisk forekommer gjennom hele sesongen. Analyse av lagdelte fileter, MR og histologi ga samme bildet, men MR og histologi ga et langt mer detaljert bilde. Fettdråpene ble observert i histologien både mellom muskelskivene og mellom muskelcellene.

Det var en tendens til at høstfisken hadde fastere tekstur enn sommerfisken, men med en del variasjon mellom de ulike uttakstidspunktene fra samme periode slik at det ikke kunne finnes et klart sesongmønster. Ulik behandling og innfrysning av fisk i de ulike prøvene kan ha påvirket teksturen en del.

Innhold

Sammendrag	2
Bakgrunn	3
Metoder.....	3
Prøveinnsamling.....	3
Teksturanalyser	4
Histologi.....	4
Opparbeiding av hel makrell NIFES	4
Fettinnhold i lagdelte fileter.....	4
MR-bilder av fettinnhold	5
Resultater	6
Fettinnhold i lagdelte fileter.....	6
Generell beskrivelse fettavleiring fra MR-bilder	7
Endring i fettavleiring gjennom sesongen.....	8
Tekstur og fettfordeling.....	9
Appendiks.....	13

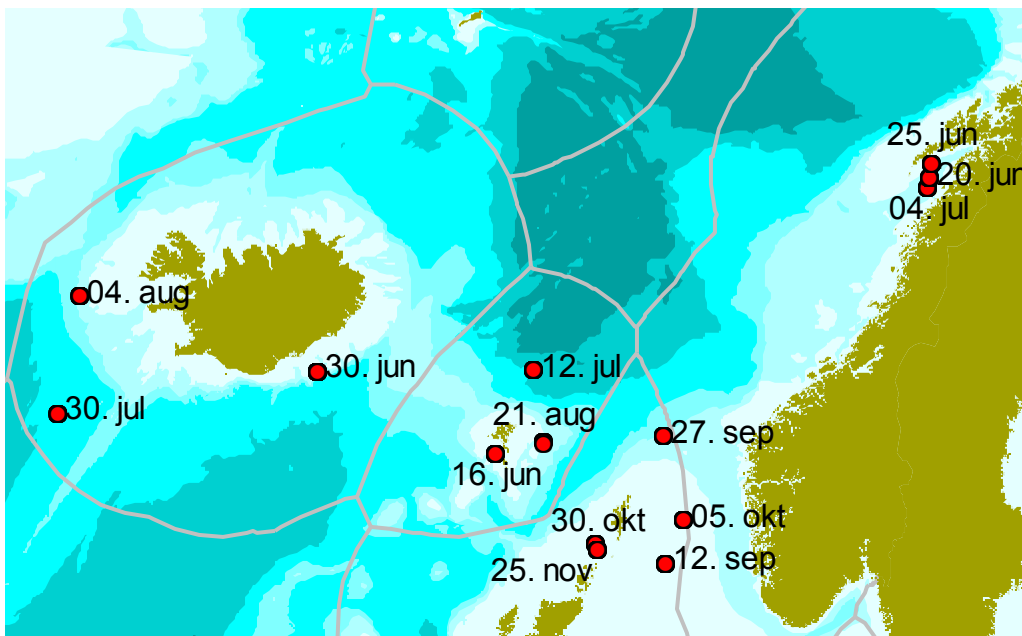
BAKGRUNN

Prosjektet har sin bakgrunn i at næringen i mange år har hatt inntrykk av at fettavleiring i makrell endres gjennom året ved at den tidlig på året lagrer fett like under skinnen og at fettreservene senere i sesongen trekkes mer inn i muskelen. Dette har imidlertid ikke vært dokumentert tidligere, og målet for prosjektet var å dokumentere vitenskapelig hvor i fileten fett er fordelt hos makrell til ulike tider i sesongen. Næringen har også hatt inntrykk av at teksturen til makrellfiletene endrer seg gjennom sesongen, eventuelt i sammenheng med fettfordelingen, med betydelig bløtere tekstur tidlig i sesongen i mai-juni sammenliknet med høstfisket. Prosjektet skulle derfor også dokumentere tekstur og struktur i de samme prøvene som skulle samles inn til fettavleiringen.

METODER

Prøveinnsamling

Prøver fra høstfisket ble samlet inn ved hjelp av Havforskningsinstituttet og referanseflåten. Prøver fra Lofoten ble samlet inn fra FHF prosjekt «Låsetting av sommermakrell». Prøver fra Island og Færøyene ble samlet inn ved hjelp av forskerkolleger i disse landene.



Figur 1. Kart som viser posisjoner og dato for de ulike prøvene av makrell. Grensene for de ulike fiskerisonene er markert med grå linjer.

Teksturanalyser

Tekstur av tinte fileter fra rundfrosset fisk ble målt instrumentelt ved hjelp av Texture analyser (TA-XT2, Stable Micro Systems Ltd), og bruk av en sylinder (7 mm diameter, type P/0,25) og press perpendikulært i forhold til muskelfiberretningen ved en hastighet på 1 mm/s. Sluttunkt ved målingen var ved 90 % av initiale filethøyde. Antall fisk fra hver uttaksgruppe var n=10, og 3 punkter langs fileten ble målt for hver fisk. Følgende parameter ble registrert fra resulterende tid-kraft kurven: Kraft (N) for punktering filet overflaten, og kraften målt ved 60 % og 90 % kompresjon (F60 og F90, respektivt).

Histologi

Blokker fra fryste fileter i området fra skinn og innover i fileten ble tatt ut til fiksering i 2,5 % glutaraldehyd, pH=7,2 over natt ved 4 °C, før innstøping i metyl methacrylate ifølge prosedyre beskrevet av Torgersen et al. (2009). Snitt på 3 µm tykkelse ble snittet ved bruk av rotasjonsmikrotom (Leica RM2165) og videre montert på poly-L-lysine glass slides før farging med 0,1 % toulidine blå (Sigma Aldrich). Snittene ble analysert mikroskopisk (Carl Zeiss Microimaging GmbH), og vevsområdet fra skinn og innover i fileten ble vurdert visuelt for rester etter fettdråper. Rester av fettdråper sees som runde formasjoner, mens derimot fryseartefakter sees som kantede formasjoner i vevstrukturen. Antall fisk fra hver uttaksgruppe var n=3.

Opparbeiding av hel makrell NIFES

Fisken ble halvtint. Fremre del ble skåret av i forkant av ryggfinnen og fryst ned for analyse med MR. Resten av fisken ble filetert halvtint der én filet ble homogenisert og analysert for fettinnhold. Den andre fileten ble brukt til lagdeling. Denne ble tint videre på kjøll og deretter fryst inn med skinnsiden ned og med press på bukdelen og ryggdelen for å få mest mulig at fileten flatt ned mot underlaget.

Fettinnhold i lagdelte fileter

Frosne fileter ble trimmet slik at den ytterste delen av ryggsiden av fileten som ikke var helt plan ble trimmet av. Deretter ble bukklappen skåret av og analysert for seg. Den resterende delen av fileten fikk først fjernet det gjennomsiktige skinnen før den ble skåret opp i skiver fra skinnsiden og inn mot midten. Fileten ble så kuttet opp i skiver ved hjelp av påleggskjærer fra skinnsiden med økende tykkelse på ca. 2, 2, 4 og så 4 mm og deretter en rest på ca. 8 mm fra den innerste delen nærmest ryggbenet. Tykkelsene ble justert noe i forhold til tykkelse på filet. Skivene ble så hakket opp på kjølt metallplate og analysert for innhold av fett ved ekstraksjon med etylacetat og gravimetrisk bestemmelse av fettinnhold.

MR-bilder av fettinnhold

Opprinnelig var det bestemt at prosjektet skulle bestemme prosentandel av fett i makrellen ved skanning med en såkalt helkroppsmåler. Ved vurdering av denne metoden ble det imidlertid klart at det tidligere har vært dokumentert fettinnhold i makrell med bruk av MR (magnetisk resonans) (Brix et al 2009, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology). Bildene fra dette bildet ga relativt lite detaljer, men det viste seg at ny instrumentering med bedre oppløsning var tilgjengelig ved

Universitetet i Bergen sin utstyrsplattform

MIC (Molecular Imaging center).

Det ble da gjort et forsøk på å tilpasse metodikk beregnet på forsøksdyr som rotter og mus på én makrellprøve for å fremstille bilder av fettfordeling i tverrsnitt av hel makrell. Resultatet fra dette med en mer visuell fremstilling av fettfordelingen ble så lovende at styringsgruppen vedtok å inkludere mer arbeid på MR-bilder og mindre arbeid på lagdeling og fettanalyse.



Figur 2. MR-skanneren ved MIC/Universitetet i Bergen.

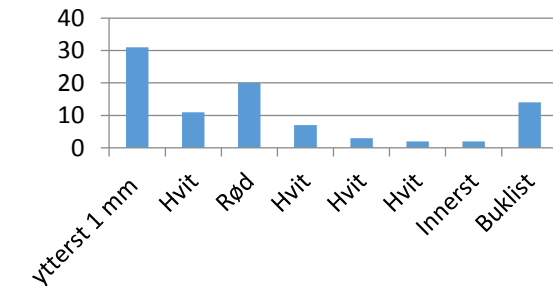
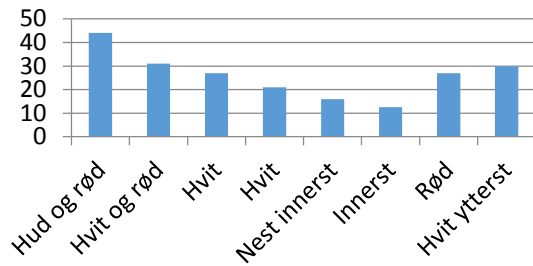
Metoden for skanning med MR ble utviklet i samarbeid med Dr. Tine Pavlin ved MIC. Tverrsnitt av makrell ble scannet ved bruk av en 7T preklinisk MR skanner (Pharmascan 70/16 AS, Bruker Corporation) som normalt brukes til analyse av rotter og mus. Metoden bruker T1-vektede aksiale RARE bilder med og uten fett-suppresjon, og bilder av feltnivåer ble beregnet fra differansen mellom disse. Prøverør med muskelvev av ulik fettprosent ble brukt som standarder og skannet sammen med fisken.

RESULTATER

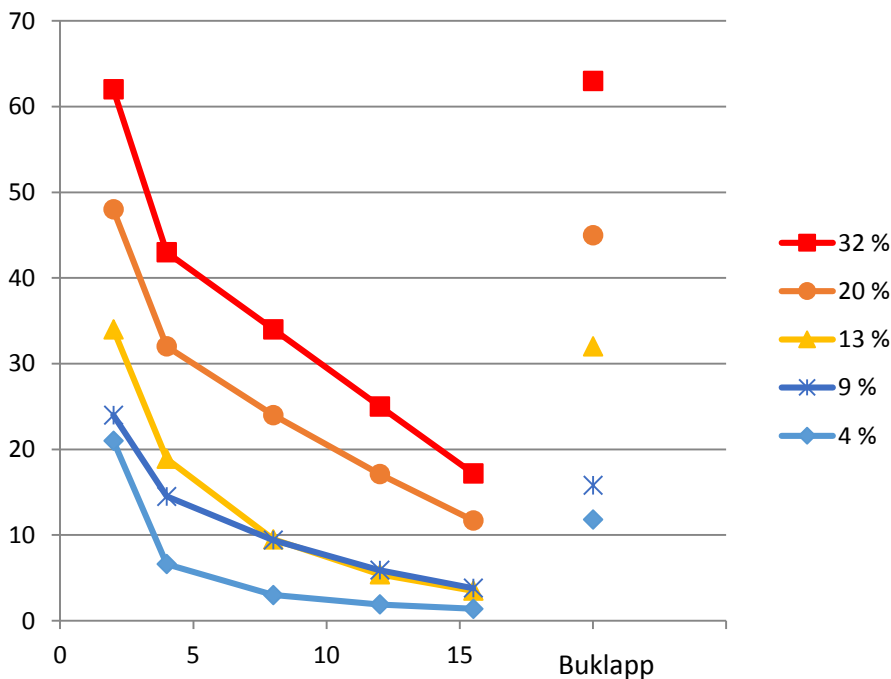
Fettinnhold i lagdelte fileter

Under metodeutviklingen ble det gjort målinger på rød muskel («brunfett») og hvit muskel hver for seg. I magre fisk var det høyere fettinnhold i rød muskel enn i hvit muskel mens i fetere fisk var fettinnholdet likt i de to muskeltypene (Figur 3).

Et utvalg av makrell med fettnivåer i filet typisk for ulike deler av sesongen, fra lavt til høyt fettinnhold, ble lagdelt og analysert for fettinnhold, og resultatene er vist i Figur 4. For alle fettnivåer var det en tydelig nedgang i fettinnhold fra skinnsiden og inn mot ryggen, mens bukklappene er på nivå med de ytterste to millimeterne for den fetere fisken eller litt lavere for den magrere fisken på 4 og 9 % fett i hel filet.



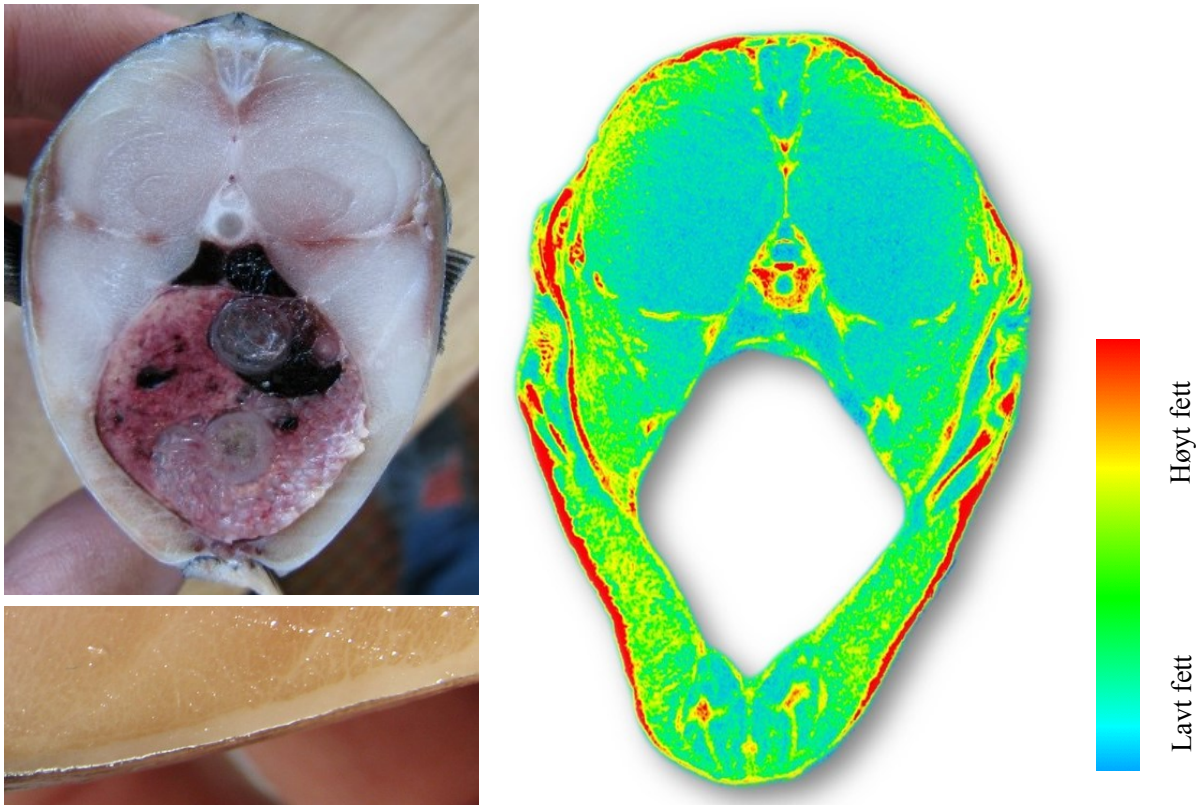
Figur 3. Fettnivåer i lagdelte fileter fra metodeutviklingen. Merk mindre forskjell mellom rød og hvit muskulatur i fetere fisk (øverst) enn i magrere fisk (nederst).



Figur 4. Fettprosent i ulike deler av fileten fra skinn (0-2 mm) og inn mot ryggen, i ulike intervaller (se teksten). I tillegg er bukklapp analysert for seg. Fisk med ulike fettnivåer i hel filet ble analysert, og alle viser en nedgang fra høyest fettinnhold ytterst mot skinnen til lavest fettinnhold innerst, og bukklapp er på nivå med ytterste delen eller litt under. Merk at i den magreste fisken på 4 % fett i hel filet er kun de ytterste to mm over 10 % fett.

Generell beskrivelse fettavleiring fra MR-bilder

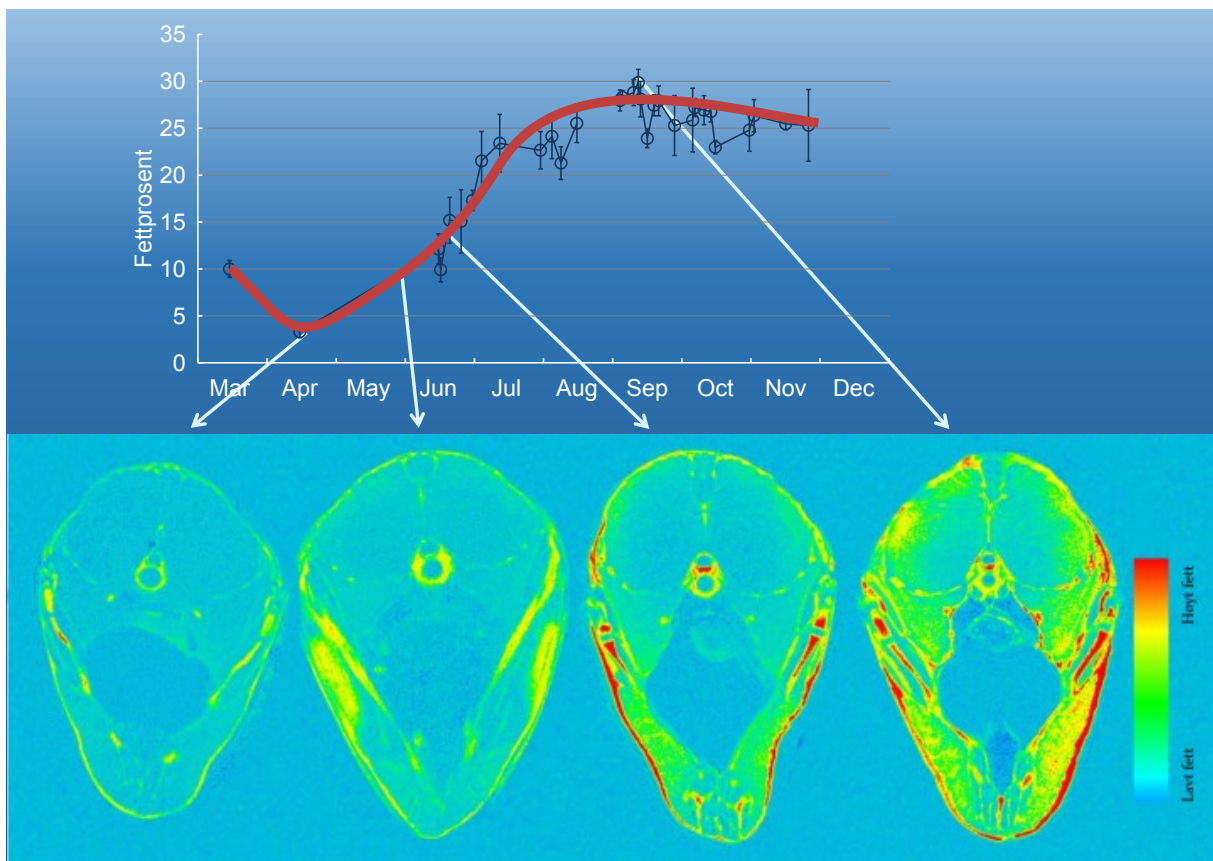
Makrellen har et tynt lag som trolig består av rene fettceller like under huden, som vist både med foto av tverrsnitt av makrell og i MR-bild i Figur 5. Innenfor dette marmoreres fett i muskel med avtagende konsentrasjoner inn mot ryggbenet. I mager fisk er det lavere konsentrasjoner også i det ytterste fettcellelaget og lave konsentrasjoner innover i muskelen. Ettersom fisken blir fetere fylles først fettcellene under huden opp og deretter øker fettmarmoreringen i muskel, fortsatt med de høyeste konsentrasjonene ytterst.



Figur 5. Øverst til venstre vises foto av tverrsnitt av makrell der vi ser muskelfibrene med ulike bindevevsdrag samt rød muskulatur («brunfett») og det tynne fettcellelaget like under huden. Dette fettcellelaget er vist tydeligere i utsnittet nederst til venstre fra bukklapp. Bildet til høyre er differansen mellom et vanlig MR bilde og ett med fett-suppresjon som så er fargesatt etter en RGB-skala der blått er lavest og rødt er høyest fettinnhold.

Endring i fettavleiring gjennom sesongen

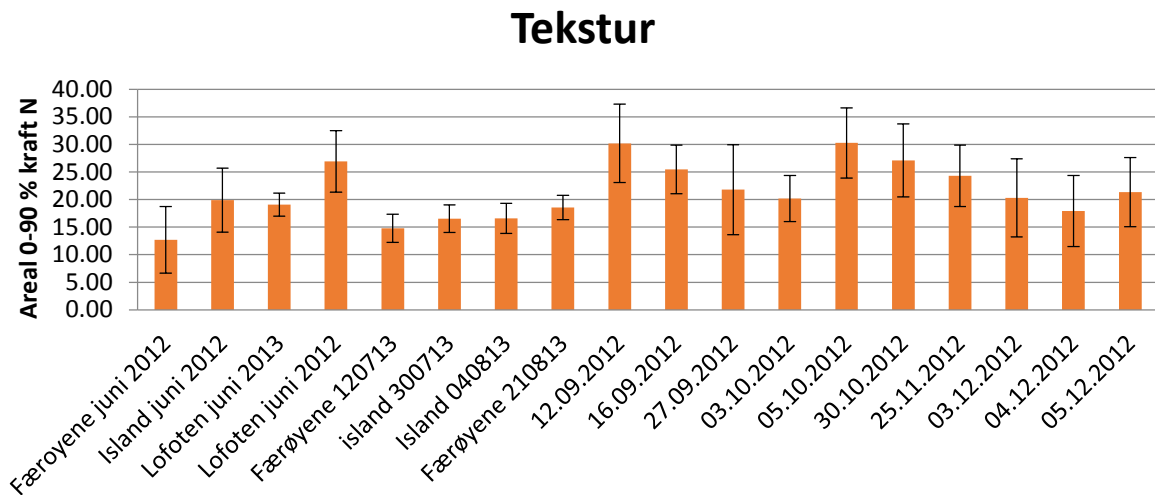
Makrellen begynner å spise i mai-juni og øker dermed gradvis fettinnholdet til ca. august (Figur 6). Denne figuren viser også data fra andre prosjekter på makrell ved NIFES (Basisundersøkelse makrell og FHF-prosjektet SIMA). Deretter er fettinnholdet stabilt høyt gjennom sesongen til ut november, med ofte de høyeste konsentrasjonene i september. Innenfor hver fangst er det en viss spredning i fettinnhold, og den største spredningen ser vi gjerne tidlig i sesongen. I dette prosjektet ble det fra disse prøvene valgt ut fisk fra ulike måneder med lavest fettprosent, median/typisk fettprosent og høyest fettprosent, og disse bildene er vist i appendiks (Figur 11). Ved sammenlikning av bilder fra ulike måneder men fra fisk med samme fettinnhold i filet ser det ikke ut til å være en vesentlig forskjeller mellom tidlig og sent i sesongen (appendiks, Figur 12). Fettavleiringen ser dermed ut til å følge fettprosenten, slik at jo fetere makrellen er desto mer fett er marmorert i muskel. En makrell med 20 % fett i juni vil dermed ha lik fettavleiring som en tilsvarende fet makrell fra september. Det er dermed fettinnholdet og ikke sesong som bestemmer fettavleiringen. Gjennomsnittlig fettinnhold øker gjennom sesongen fra vår til høst, og en typisk makrell fra høsten vil ha mer fett marmorert i muskel enn en typisk makrell fra våren. Dette har vi illustrert med en serie av MR-bilder fra typisk fisk mellom fra mars og utover høsten (Figur 6).



Figur 6. Figuren øverst viser fettprosent i filet i ulike prøver av makrell fra dette og tidligere prosjekter fra minimum om våren frem til det flater ut fra ca. august. Under er det vist MR-bilder av tverrsnitt av makrell med typisk fettinnhold for ulike deler av sesongen.

Tekstur og fettfordeling

Fileter fra ulike årstider innen perioden juni mot desember ble vurdert for fasthet ved måling av tekstur (Figur 7). Teksturmålingene viste en økning av fasthet i fileten i tidlig høstperioden, med høyest verdier i september og oktober. Det ble deretter observert en reduksjon i desember måned. I tillegg ble det observert variasjon innen samme uttaksperiode, både for juni, september og oktober fisk.



Figur 7. Måling av tekstur i fileter fra fisk ved ulike tidsperiodene. Feilgrensene angir standardavvik.

Det ble videre utført histologi med farging med toluidin av de ulike fileter fra hele perioden. I dette studie er histologi utført etter at fileten har vært fryst. En bløtere og mer vanninnholdig fisk vil ha mere synlige fryseartefakter enn en fastere fisk ved at iskrystaller dannes lettere ved frysing. Rester etter fettdråper/fettvev vil være synlig som små runde formasjoner ved farging med toluidin.

Det ble observert tydelige forskjeller i fettfordeling etter årstid ved histologi. Fordelingen av fettdråper, runde små formasjoner i septemberfischen (Figur 9) ble observert i alle posisjoner fra skinnsiden og innover mot buken i fisken. I tillegg ble det også observert forskjeller innad i samme periode mellom ulike fisk, med enkeltfisk som var fetere versus magrere, der antall formasjoner av fettdråper var høyere innerst hos fet fisk. Hos makrell fisket i perioden juni og juli ble det observert formasjoner av fettdråper ytterst mot skinnet, mens derimot ingen/lite i midt og innerst (Figur 10). Også her var det forskjeller mellom ulike fisk fra samme periode, hvor enkelte fisk var fetere (figur 1). Fettdråpene ble observert både mellom muskelskivene (sarcomerene) og mellom muskelcellene (i endomysiet) for begge årstider.

Ved histologi kunne vi se en tendens til at fetere fisk hadde mindre fryseartefakter enn magrere fisk. Dette gjaldt både for sommer og høstmakrell. Fettmengden i fisk kan derfor ha betydning for teksturmålinger, ved at bløtere fisk med mere fryseartefakter kan resultere i lavere teksturverdier. Fisk fra uttak Lofoten juni 2012 med høyere teksturverdier enn fisk fra uttak Lofoten juni 2013 med lavere teksturverdier hadde mer fett og mindre fryseartefakter. Fettmålingene ved NIFES viste like nivåer av fett i disse to prøvene (Figur 8), men dette var et annet utvalg fisk og det kan ha blitt valgt ut fisk med ulikt fettinnhold. Vi kunne også se samme tendens for fisk fra uttak 27.09.2012 med lavere teksturverdier sammenliknet med fisk fra uttak 30.10.2012 med høyere teksturverdier. Fisk fra uttak 27.09.2012 hadde tendens til mindre fett og mer fryseartefakter.

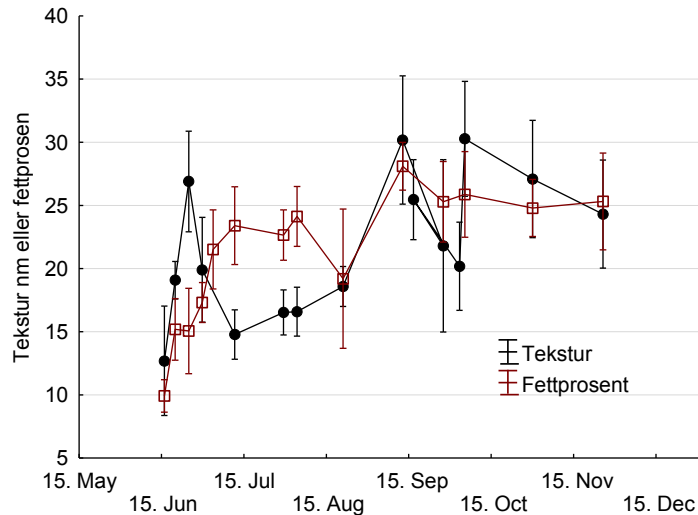
Vi ser altså både ved histologi og MR en økt marmorering av fett innover i fileten ved tidlig høstperiode.

Teksturanalyser viste en tendens til økning i fasthet fra sommer til tidlig høstperiode, og dermed en kvalitetsforbedring på frossen fileten fra høstfisket makrell. Fettnivåene målt hos NIFES på et annet utvalg av fisk fra de samme prøvene viser en del støy ved at tekstur i noen tilfeller ikke følger fettinnhold (Figur 8). Dette kan skyldes både behandling og innfrysning av prøvene samt ulikt utvalg av fisk som kan ha gitt noe ulikt fettinnhold i fisken hos NIFES versus NOFIMA. Det er derimot ikke

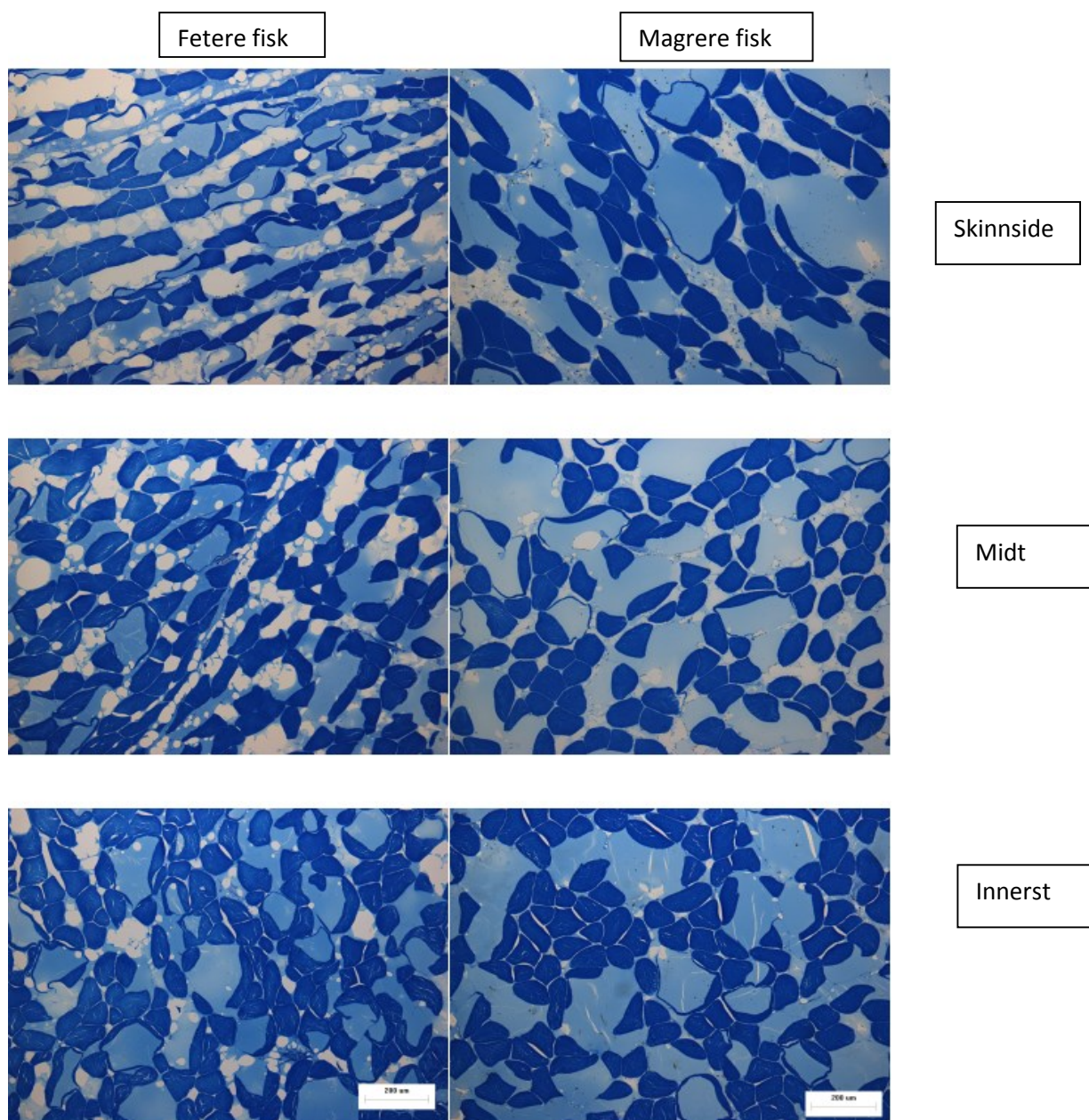
ved nåværende tidspunkt mulig å konkludere om den økte fettmengden og fettmarmorering er årsaken til de høyere teksturverdier målt på frossen fileten. Laks med høyt fettinnhold er ofte mykere. Dette i motsetning til våre resultater på makrell. I studiene på laks var teksturmålinger også utført på fersk fileten. En visuell vurdering med histologi kunne tyde på at magrere fisk hadde mer fryseartefakter/mer ødelagt i struktur. Dette kan være noe av forklaringen på lavere teksturmålinger på frossen fileten fra sommermakrellen med mindre fett. Parametre som størrelse på fisk, muskelfiberstørrelse, og mengde bindevev er også parametre som er kjent å gi fastere tekstur. Flere analyser i forhold til dette vil være nødvendig for endelig kunne forklare mulig årsak til økte teksturverdier utover i høstperioden på frossen makrellfileten.

Oppsummering

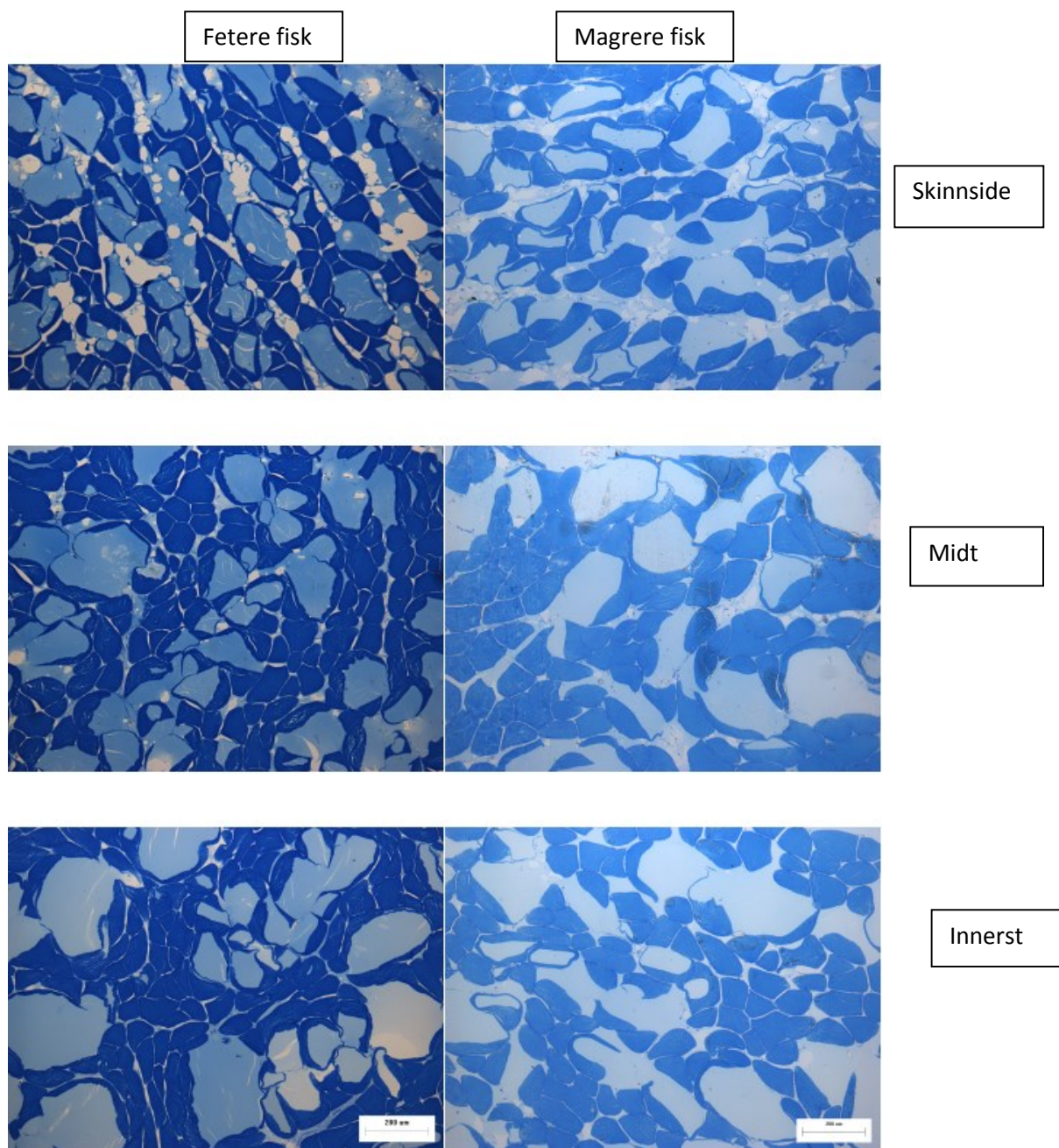
- Jo fetere makrellen er jo mer fett er marmorert i muskel
- Typisk fettinnhold øker gjennom sesongen fra vår til høst
- Dermed vil mer fett være marmorert i muskel fra en typisk fisk om høsten sammenliknet med våren/sommeren
- Det var en tendens til fastere tekstur hos høstmakrellen, men stor variasjon mellom enkelte prøver gjorde at det ikke var mulig å se et klart sesongmønster. Dette må følges opp ved en senere anledning.



Figur 8. Sammenstilling av data fra tekstur fra fisken NOFIMA analyserte og data fra fettmålingene som ble gjort på fisken som ble analysert hos NIFES.

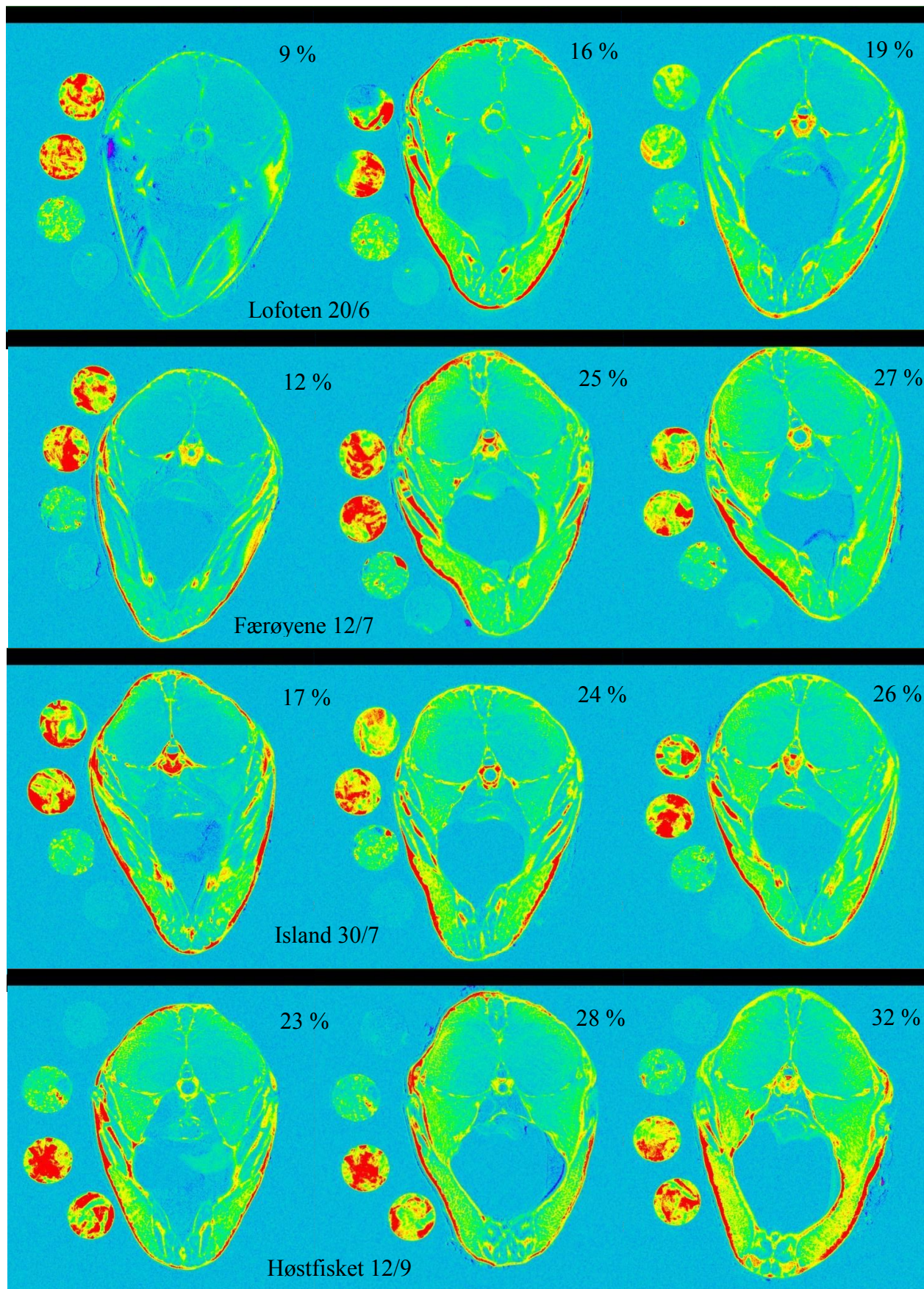


Figur 9. Toulidin fargede vevsnett av makrell fisket september. Runde små former representerer rester etter fettdråper i vevet. Mørkeblå farging representerer intakte muskelfibre. Hvite kantede former og lyseblå farge representerer fryseartefakte i bindevev og muskelfibre.

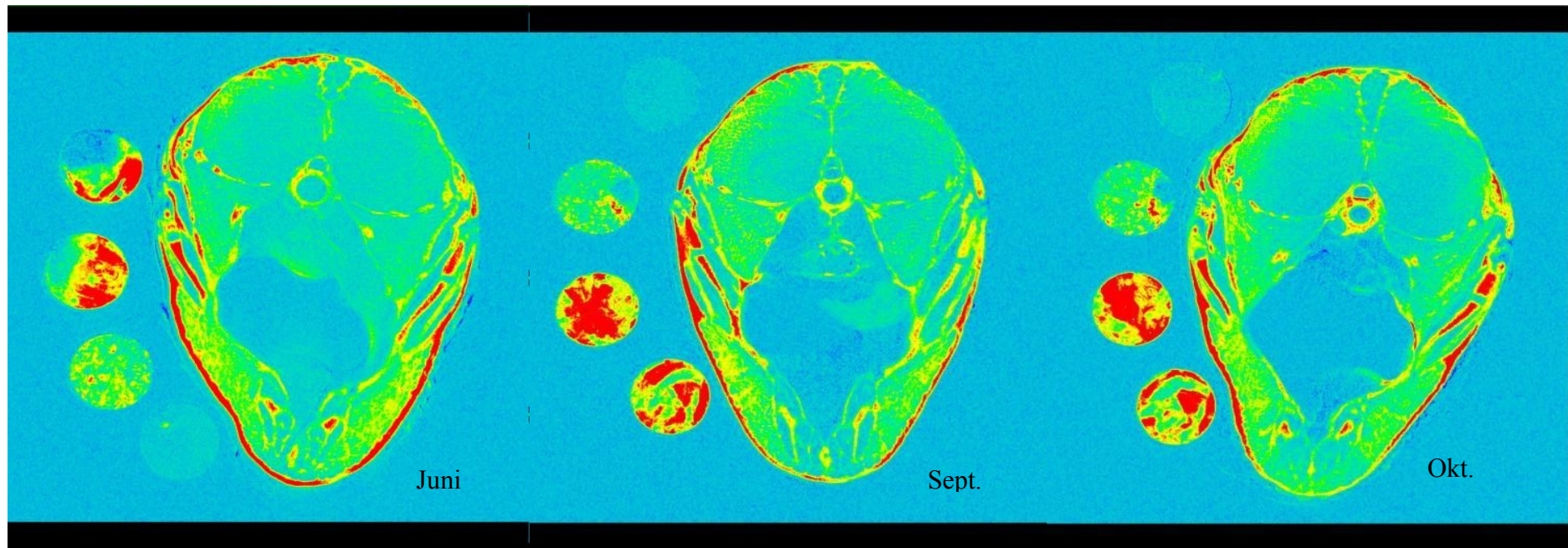


Figur 10. Toulidin fargede vevsnitt av makrell fisket juni. Runde små former representerer rester etter fettdråper i vevet. Mørkeblå farging representerer intakte muskelfibre. Hvite kantede former og lyseblå farge representerer fryseartefakte i bindevev og muskelfibre.

APPENDIKS



Figur 11. Oppstilling av MR-bilder fra ulike deler av sesongen. Innenfor hver prøve er det valgt ut fisk med lavest, typisk og høyt fettinnhold. Bildene er fargesatt slik at blått representerer lavest fettinnhold, gult middels og rødt høyst fettinnhold.



Figur 12. MR bilder fra ulike deler av året fra makrell med likt fettinnhold i filet.