

Feste av pinnebein i torsk og laks - bindevevets rolle og prosesser involvert i nedbrytning av dette

Sluttrapport

Mona E. Pedersen, Tram T. Vuong*, Tone-Kari Østbye, Eva Veiseth-Kent, Thomas Larsson, Svein O. Kolset*, Kristin Hollung, og Sissel B. Rønning (*Institutt for ernæring, UiO, Oslo, Norge)





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 400 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra, Averøy og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

	ISBN: 978-82-8296-189-9 (trykt) ISBN: 978-82-8296-190-5 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Feste av pinnebein i torsk og laks - bindevevets rolle og prosesser involvert i nedbrytning av dette Sluttrapport	<i>Rapportnr.:</i> 21/2014
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Mona E. Pedersen, Tram T. Vuong*, Tone-Kari Østby, Eva Veiseth-Kent, Thomas Larsson, Kristin Hollung, Svein O. Kolset* og Sissel B. Rønning (*Institutt for ernæring, UiO, Oslo, Norge)	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Avdeling:</i> Råvare og prosess	<i>Dato:</i> 15. mars 2014
<i>Oppdragsgiver:</i> FHF - Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 24
<i>Stikkord:</i> Pinnebein, bindevev, laks, torsk, matriks metalloproteinaser	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> 900872
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i>	
<p>Det er begrenset kjennskap til hvordan pinnebein er festet til muskelen, hvilke strukturer som inngår og hvilke prosesser som er involvert i nedbrytningen når disse løsner. Målsetningen til dette prosjektet har vært å få mer kunnskap om dette. Pinnebein fra torsk og laks ble dissekert ut fra fileter lagret på is ved ulike tidspunkter etter slakt, og analysert med ulike metoder. I torsk fester bindevevet beina til muskelen, men hos laks utgjør også fettvev en stor del av festestrukturen. Sammensetningen av bindevevskomponenter og typer enzymer som uttrykkes i dette festet var forskjellig på mRNA nivå mellom laks og torsk. Vi ser at kollagener, elastin, lektin-bindende proteiner og proteoglykaner er viktig i dette festet. Det ble påvist flere typer nedbrytningsenzymer, både matriks metalloproteinaser, serin proteaser og elastaser, i bindevevet rundt beina hos begge arter, og disse har forskjellig aktivitetsprofil under lagring <i>post mortem</i>. Nedbrytningen av festestrukturen skjer i bindevevsdraget innerst mot pinnebeina.</p> <p>Denne studien viser at festet av pinnebein i torsk og laks er forskjellig, og utvikling av metoder og betingelser for optimal fjerning bør tilpasses hver enkelt art. Videre ser vi at det er forskjeller i regulering av enzymer som bryter ned bindevev rundt pinnebein sammenlignet med bindevev i muskel. Denne kunnskapen bør man prøve å utnytte til å løsne beina ved hjelp av naturlige prosesser, med minimal påvirkning på muskelmasse i fiskefileten. Kunnskap om prosess og behandling av fisken som påvirker enzymaktiviteten vil kunne være en naturlig innfallsvinkel i det videre arbeidet med å løsne pinnebeina.</p>	
<i>English summary/recommendation:</i>	
<p>An experiment has been conducted to study how pinbones are attached to the muscle, what components are present, and how these are degraded. The results show that there are major differences between salmon and cod. When developing methods for automatic removal of bones it is important to take this into consideration. Another major finding was that the enzyme profiles and connective tissue composition around the pinbones differed from the profile in the muscle tissue. This allows us to optimise the process of bone loosening with minimal effects on muscle tissue texture, and thus reduced fillet damage. Fish processing and treatment affects enzyme activity, and knowledge on how this can be utilized for improved pinbone releasing is an interesting approach that merits further studies.</p>	

Innhold

1	Innledning.....	5
1.1	Bakgrunn.....	5
1.2	Prosjektets omfang.....	5
1.3	Prosjektorganisering:.....	5
2	Problemstilling og mål:	6
2.1	Prosjektets effektmål:	6
2.2	Prosjektets resultatmål:	6
3	Prosjektgjennomføring:.....	7
4	Oppnådde resultater og konklusjon:	8
4.1	Detaljert oversikt over oppnådde resultater.....	8
4.2	Drøfting av funnenes betydning, muligheter for implementering av resultater fra prosjektet og nytteverdi for sjømatnæringen: Konklusjoner og videre anvendelse/FoU behov.....	21
5	Leveranser	22
6	Kvalitetssikring av prosjektgjennomføring og resultater	23
7	Referanser	24

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Etterspørselen etter sjømat på verdensmarkedet er økende, og høy kvalitet er en viktig parameter for forbrukerne. Forbrukerne ønsker ferske og beinfrie fiskefileter av høy kvalitet. Problemet er imidlertid at pinnebeina sitter svært godt festet til både skinnen og muskelen i fisken og kan være vanskelig å fjerne. De uønskede beina er en stor utfordring for fiskeindustrien. Så lite som ett bein kan resultere i en negativ spiseopplevelse og reduksjon i fiskesalget, og det er derfor ønskelig å fjerne pinnebeina. Dette har imidlertid vist seg å være omfattende og vanskelig.

Ved maskinell fjerning er det to hovedproblemer - filetkjøttet skades eller beina knekker inne i fileten. Det er også store forskjeller mellom fiskeslag både når det gjelder beinstyrke og hvor mye trekraft som er nødvendig for å fjerne pinnebeina¹⁻³. I dag fjernes beina etter rigor når de har løsnet fra festet, det vil si 3-5 dager etter slakt. Fiskeindustrien har stort fokus på å utvikle metoder som gjør det mulig å fjerne pinnebein umiddelbart etter slakt, og dermed få et ferskere produkt ut i markedet. Det er foreløpig liten kunnskap om hvordan beina er festet til muskelen, hvorfor det er forskjeller mellom laks og hvitfisk og hvor mye kraft som kreves.

Bindevev er med på å feste beina i muskelen, og bindevevets styrke er bestemt av hvilke biologiske komponenter bindevevet består av og av hvordan disse er⁴. Bindevevet er dynamisk, og kan forandres over tid i forbindelse med økt/minket belastning, forandret næringsinntak, alder osv^{5, 6}. Nedbrytning av bindevev skjer enzymatisk, og enzymer påvirkes av blant annet salter og pH^{7, 8}. Noen komponenter brytes også lettere ned enn andre. Dersom man får identifisert faktorer av sentral betydning for festet til pinnebeina kan fokuset være rettet mot disse i videre arbeid for å løsne beina. For å oppnå dette trenger vi mer kunnskap om hvordan pinnebeina er festet, hvilke strukturer som inngår i dette beinfestet og hvilke prosesser som er involvert i nedbrytningen av disse. Slik kunnskap vil også kunne gi svar på om det er definerte tidspunkter etter slakt som er bedre egnet for fjerning av pinnebeina.

1.2 Prosjektets omfang

Prosjektet hadde oppstart 15. Mars 2013, og ble avsluttet 15. Mars 2014. Budsjettrammen var 3.825.000 kr.

1.3 Prosjektorganisering:

Prosjektet var et samarbeidsprosjekt mellom Nofima og Universitetet i Oslo, hvor Nofima har hatt prosjektledelsen. Nofima har hatt ansvar for prøveuttak, mRNA analyser, proteinanalyser og histologi. UiO har vært ansvarlig for enzymaktivitetsanalyser og histologi.

Prosjektets styringsgruppe består av:

- Arild Holmeset H.P. Holmeset AS
- Kjell-Olaf Larsen Båtsfjordbruket
- Per Gunnar Hansen Aker Seafoods Båtsfjord
- Kurt Olav Oppedal Marine Harvest Norway AS
- Atle Vartdal Vartdal Seafood AS

Prosjektet følges opp av FHF, kontaktperson: Frank Jakobsen

Observatører FHF: Frank Jakobsen, Kristian Prytz, Roar Pedersen

2 Problemstilling og mål:

2.1 Prosjektets effektmål:

Kostnadsproblemer knyttet til filetproduksjonen av laks og hvitfisk omfatter blant annet metodene knyttet til fjerning av pinnebein. Problemene er knyttet til at pinnebeina er for godt festet til muskulaturen slik at fileten blir ødelagt når de skal fjernes, eller at de knekker halvveis inn i fileten slik at bare en del av beina blir fjernet.

Det er nødvendig med mer kunnskap om de biologiske komponentene som inngår i festet av pinnebein.

I dette prosjektet ville vi:

1. Få kunnskap om vevstrukturer og biologiske enkeltkomponenter som har betydning for hvordan pinnebeina er festet i muskel og/eller i skinnet. Med økt kunnskap vil det være mulig å utvikle mer kostnadseffektive metoder for fjerning av beina, samtidig som man produserer fiskefileter av høy kvalitet.
2. Karakterisere nedbrytningsprosesser ved å måle protolytisk aktivitet og identifisere enzymer som er involvert. Når man har identifisert de mest aktive enzymene kan man med bruk av bibliografiske data få kunnskap om ytre forhold som kan påvirke aktivitet og eventuelt bruke dette til å optimalisere prosessen.
3. Finne ut om det er forskjeller i sammensetning og nedbrytning i beinfestene på ulike steder i fisken. Dette kan eventuelt brukes til å gi anbefalinger til maskinleverandører for videre optimalisering av trekraft.

2.2 Prosjektets resultatmål:

Hovedmål: Å karakterisere strukturen der pinnebeinet er festet, og hvilke prosesser som inngår i nedbrytningen av disse festene ved ulike *post mortem* tidspunkter etter slakt.

Følgende delmål er definert:

1. Karakterisere struktur av festene ved å identifisere bindevevskomponenter og festeproteiner som inngår i denne strukturen.
2. Kvalitativt sammenligne strukturen før og etter napping av pinnebein.
3. Kvantitativ bestemmelse av nedbrytningen av bindevevskomponenter og festeproteiner som inngår i strukturen. Dette gjøres for å se hvilke faktorer og festeproteiner som brytes ned ved de ulike *post mortem* tidspunkter.
4. Måle proteolytisk aktivitet i festeområdet ved ulike tidspunkter og identifisere hvilke enzymgrupper som er involvert.

3 Prosjektgjennomføring:

I dette prosjektet har vi benyttet en rekke ulike molekylærbiologiske, histologiske og biokjemiske metoder som til sammen har gitt et godt grunnlag for å kunne oppnå målet i prosjektet - å karakterisere strukturen der pinnebeinet er festet i muskelen, og hvilke prosesser som inngår i nedbrytningen av disse festene ved ulike *post mortem* tidspunkter etter slakt. Metodene som er benyttet har sikret høy faglig kvalitet og presisjon. Prosjektet har blitt gjennomført i forhold til kontraktfestet prosjektplan, og ingen endringer i faglige prioriteringer har vært nødvendig underveis. Prosjektet er gjennomført i henhold til budsjett og kontrakt med FHF, men med noe reduserte kostnader i forhold til drift fordi enkelte av analysene ble billigere enn først antatt. Dette gjelder array og proteomikk analysene. Ved optimalisering av metodene ble det klart at man kunne bruke billigere kjemikalier, og likevel oppnå samme resultater. Kostnader til microarray – ca kr 17.000,-, var iberegnet driftsmidler for 2013. Produksjonen av disse ble utført av en forsker hos oss, og dermed kom disse kostnadene som timekostnader istedenfor driftskostnader i prosjektrengskapet for 2013. Dette avviket i forhold til timekostnader for 2013 ble rapportert til FHF (20 januar 2014). Det ble også søkt om omdisponering av gjenstående driftsmidler til reise og opphold til presentasjon på programkonferansen Havbruk 2014 (31.03-02.04.2014, Tromsø) og en muntlig godkjenning ble gitt. Gjenstående driftsmidler fra prosjektperioden utgjør dermed rundt 160 000 kr.

4 Oppnådde resultater og konklusjon:

4.1 Detaljert oversikt over oppnådde resultater.

Resultatene for de ulike delmålene er presentert i de påfølgende kapitlene.

Delmål 1: Karakterisering av struktur i festet av pinnebein i torsk og laks

Hvilke gener uttrykkes i festeområdet for pinnebein?

- mRNA analyser viser at det er forskjell i genuttrykk
 - på pinnebein plassert foran og bak i fisken
 - mellom pinnebeinsområdet og muskelvev
 - av ulike bindevevskomponenter mellom laks og torsk

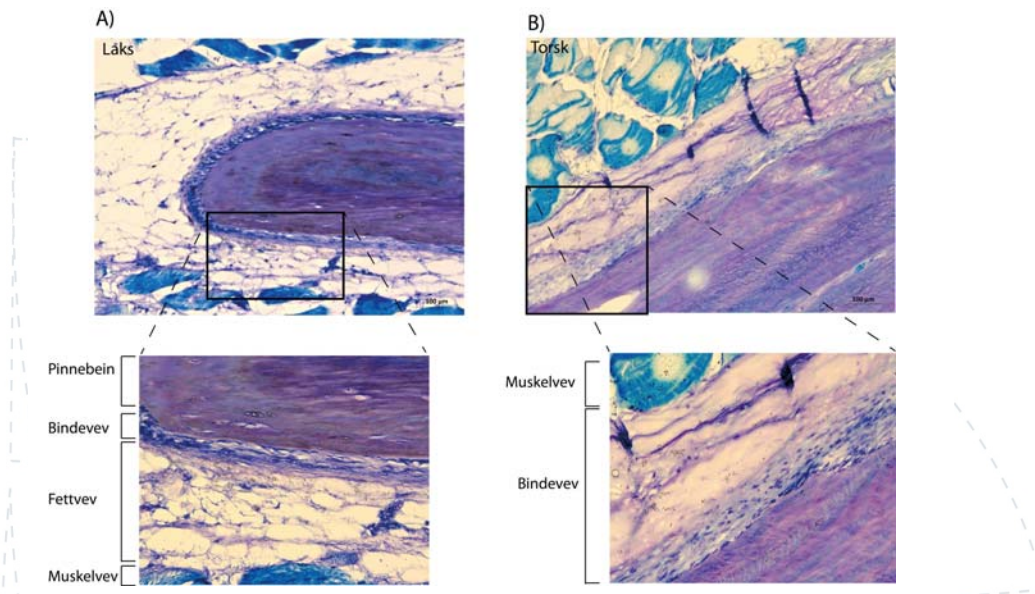
Genekspresjonsanalyser viser at det er store forskjeller i mRNA uttrykk mellom pinnebeinsområdet og muskelvev både hos laks og torsk. I laks var mer enn 193 gener ulikt uttrykt i vevet rundt pinnebein sammenlignet med muskelvev, med blant annet forskjeller i viktige bindevevskomponenter og nedbrytningsenzymmer. For torsk var forskjellene enda større, og mer enn 2000 gener var ulikt uttrykt. Vi fant også at det var høyere genuttrykk i området bak i fileten sammenlignet med pinnebein festet foran, både for torsk og laks. Til sist fant vi at det er forskjellige bindevevskomponenter som finnes hos laks og torsk.

Våre data viser at det er store forskjeller mellom bindevevet i muskel og bindevevet rundt pinnebeina, og disse forskjellene kan man potensielt utnytte for lettere å løsne pinnebeina og samtidig beholde høy kvalitet på fiskefileten.

Morfologi i festeområdet av pinnebein:

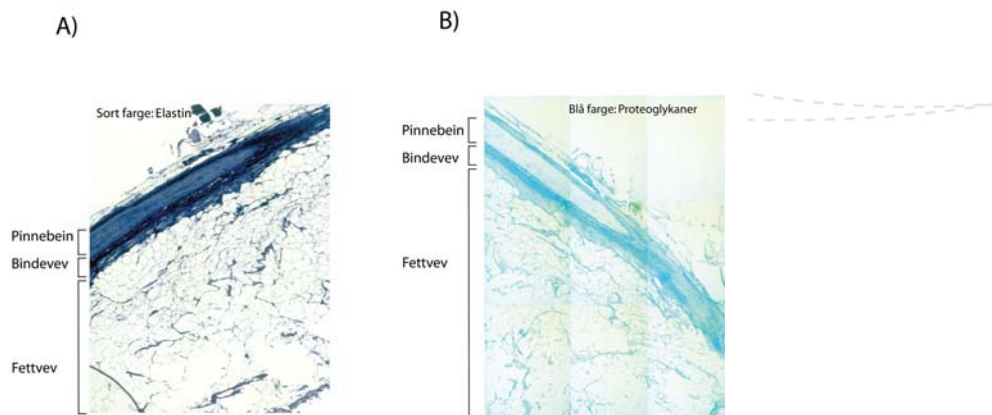
- Strukturen og type proteiner er forskjellig i laks og torsk
- Pinnebein i laks er festet til bindevev, fettvev og muskel
- Pinnebein i torsk er festet til bindevev og muskel
- Festet er rikt på kollagener, elastin, lektin-bindende proteiner og proteoglykaner

Morfologisk ser vi at strukturen i festet varierer for laks og torsk. I laks er beina festet til bindevev, fettvev og muskel. Resultatene tyder på at fett utgjør en stor del av strukturen (Figur 1A). I torsk er imidlertid pinnebeina festet direkte til muskel via bindevev, og fett er ikke viktig (Figur 1B).

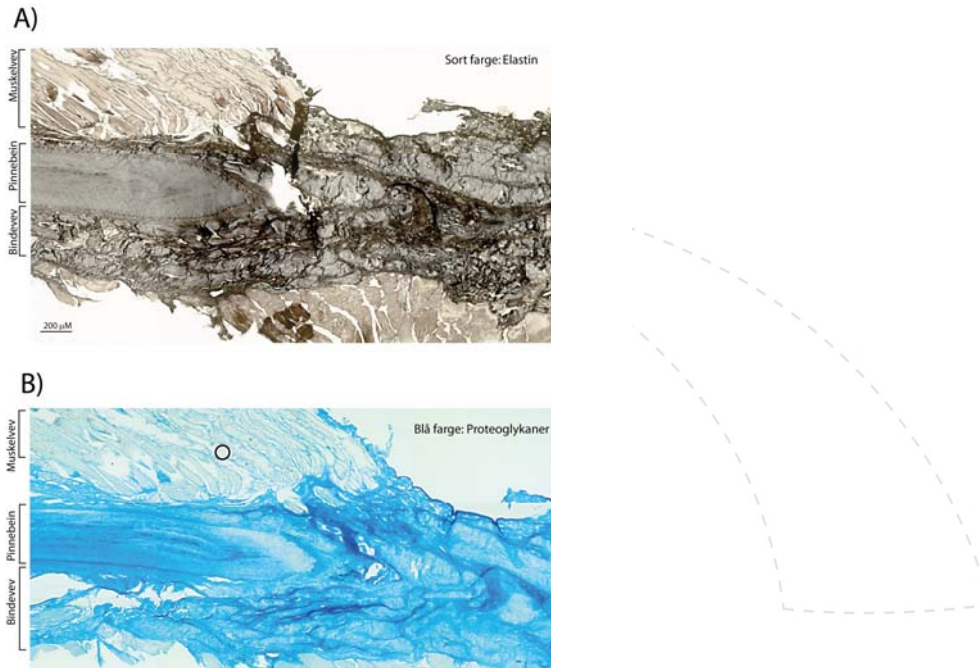


Figur 1 Toulidinfargede snitt av pinnebein og omkringliggende vev. A) Strukturen rundt pinnebein i laks består av et bindevevsdrag tett inntil pinnebeinet. Dette er festet til fettvæv som igjen er festet til muskelvæv. B) Strukturen rundt pinnebein i torsk består av et bindevevsdrag tett inntil pinnebeinet, som igjen er festet direkte til muskelvevet.

Bindevevsområdet rundt pinnebeina hos begge artene er rikt på elastin og proteoglykaner (Figur 2 og 3).



Figur 2 A) Verhoeff Van Gieson og B) Alcian blå 0.4 M MgCl₂ farging av pinnebeinsområdet hos laks viste at både pinnebeinet, bindevevsdraget og bindevevet i fettvevet inneholder elastin (A) og proteoglykaner med sulfaterte GAG-kjeder (B).



Figur 3 A) Verhoeff Van Gieson og B) Alcian blå 0.4 M MgCl₂ farging av pinnebeinsområdet hos torsk viste at både pinnebeinet, bindevevsdraget og bindevevet i muskel inneholder elastin (A) og proteoglykaner med sulfaterte GAG-kjeder (B).

Det er ulikt sulfateringsmønster (type modifikasjon på sukkerkjeden) i bindevevsdraget i pinnebeinsfestet sammenlignet med bindevevet i omkringliggende muskel hos laks. Vi ser også at det er ulikt sulfateringsmønster i bindevevsdraget mellom torsk og laks. Sulfatering påvirker ladningstettheten og dermed egenskapene til bindevevet.

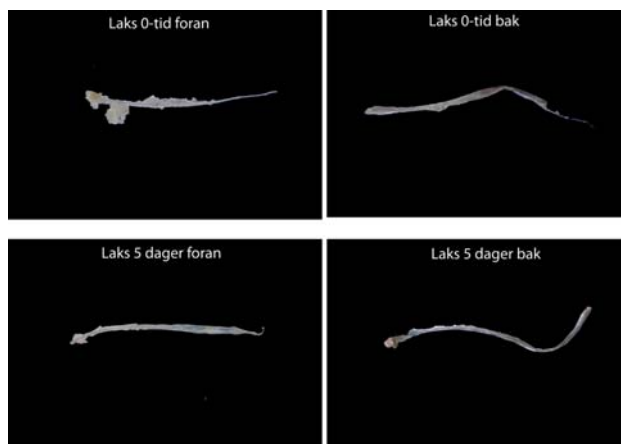
Delmål 2: Kvalitativ sammenligning av strukturen før og etter napping av pinnebein.

Napping av pinnebein:

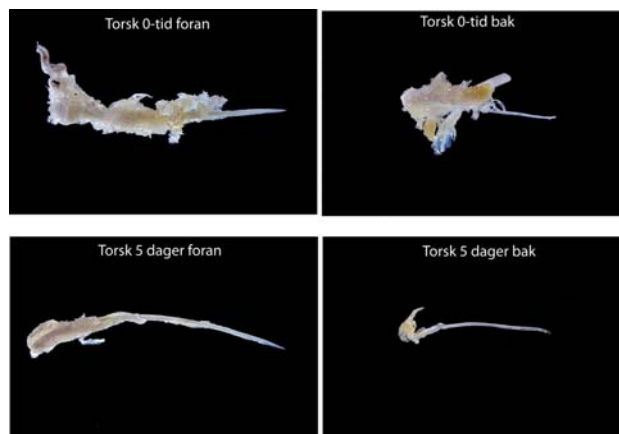
- Det er enkelt å nappe ut pinnebein fra laks etter 5 dagers lagring på is. Det sitter lite muskel igjen på pinnebeinet, kun noe fett og bindevev
- Det er vanskeligere å nappe ut pinnebein fra torsk etter 5 dagers lagring på is. Det sitter fremdeles igjen muskelrester på pinnebeinet
- Det er lettere å nappe ut pinnebein bak i fileten sammenlignet med pinnebein foran i filetene i begge fiskesortene

Det ble trukket ut pinnebein med pinsett foran og bak i fileten, både hos laks og torsk, ved slaktetidspunkt og etter 5 dagers lagring på is. Ved slaktetidspunktet ble det hos laks sittende igjen litt muskel. Etter lagring i 5 dager var det derimot lett å trekke ut pinnebeina, og det satt igjen lite rester av vev (Figur 4).

Når det gjelder torsk var det mye vanskeligere å trekke ut beina sammenlignet med laks. Det satt mye muskel igjen på pinnebeinet etter at det var trukket ut, og selv om det ble lettere å trekke ut etter 5 dagers lagring satt det fremdeles rester av vev igjen på pinnebeinet (Figur 5). Det var lettere å nappe ut beina bak enn foran på filetene, dette gjaldt begge artene.



Figur 4 Napping av pinnebein med pinsett foran og bak, ved slaktetidspunkt og 5 dager lagring på is hos laks.



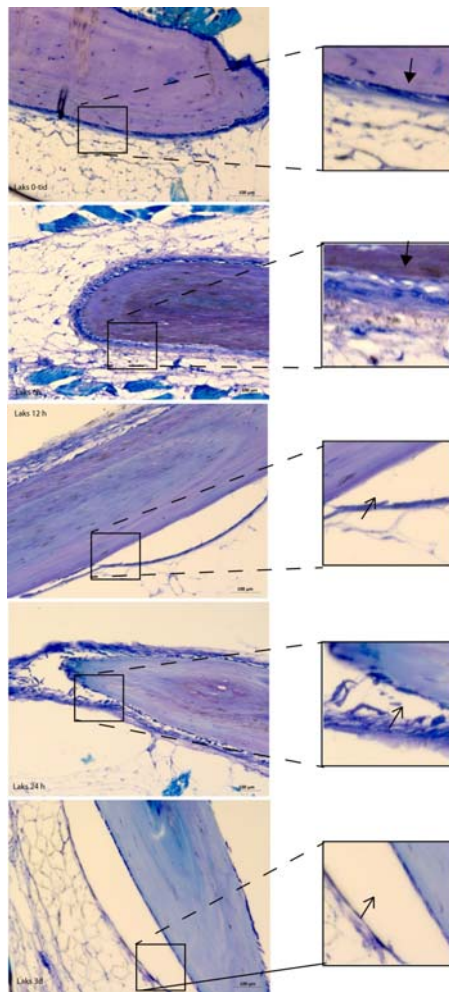
Figur 5 Napping av pinnebein med pinsett foran og bak, ved slaktetidspunkt og 5 dager lagring på is hos torsk.

Delmål 3: Løsning av pinnebein, og nedbrytning av bindevevskomponenter ved lagring på is.

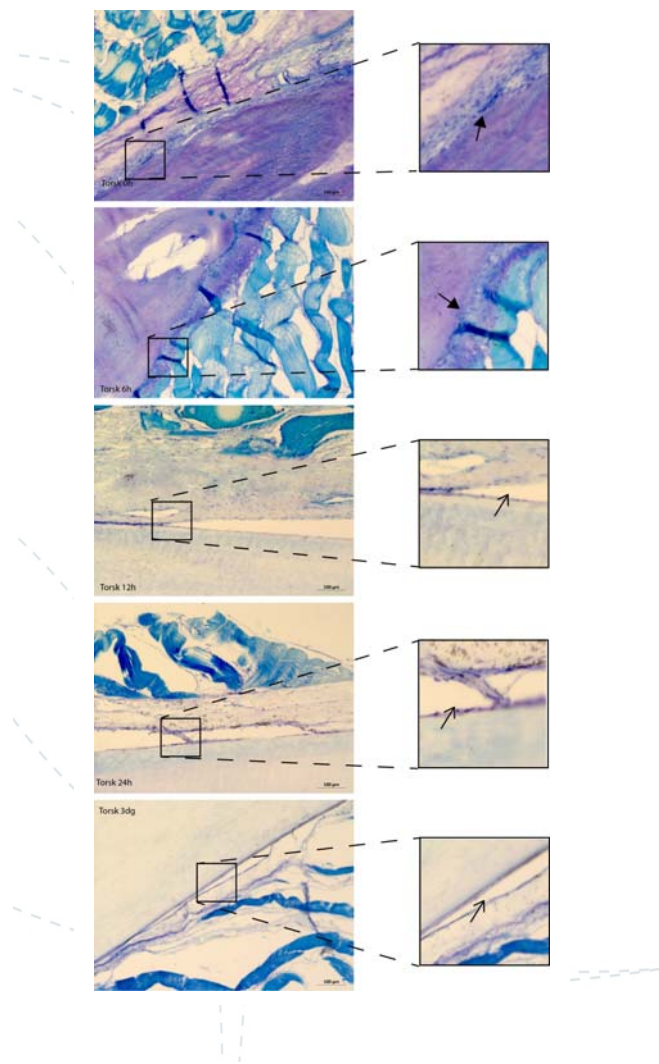
Hva skjer ved lagring av fiskefileter på is?

- Pinnebeina begynner å løsne fra vevet allerede etter 12 timer, men det er store individforskjeller
- I laks løsner hele bindevevsdraget fra pinnebeina, via aggregatlignende strukturer
- I torsk revner bindevevsdraget i trådlignende strukturer
- Elastin, proteoglykaner, kollagener og lektin-bindende proteiner er viktige i prosessen
- Kollagen brytes ned ved lagring
- Mange proteinendringer finner sted i begge fiskeslag under lagringsperioden

Pinnebeina begynner å løsne fra vevet allerede etter 12 timers lagring, både hos laks og torsk (Figur 6 og 7).

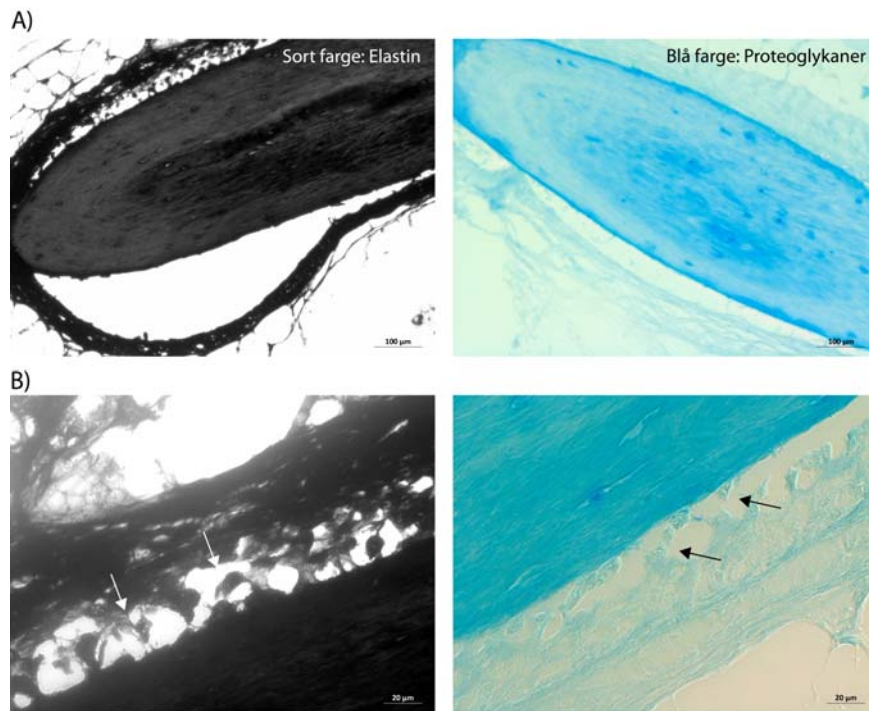


Figur 6 Toulidin-fargede snitt av pinnebein og omkringliggende vev i laks ved lagring på is (0 timer, 6t, 12t, 24t og 3 dg). Ved 0t og 6t ligger bindevevsdraget tett inntil beinet (lukkede piler). Ved lagring på is ser vi en løsning av bindevevsdraget (åpne piler).



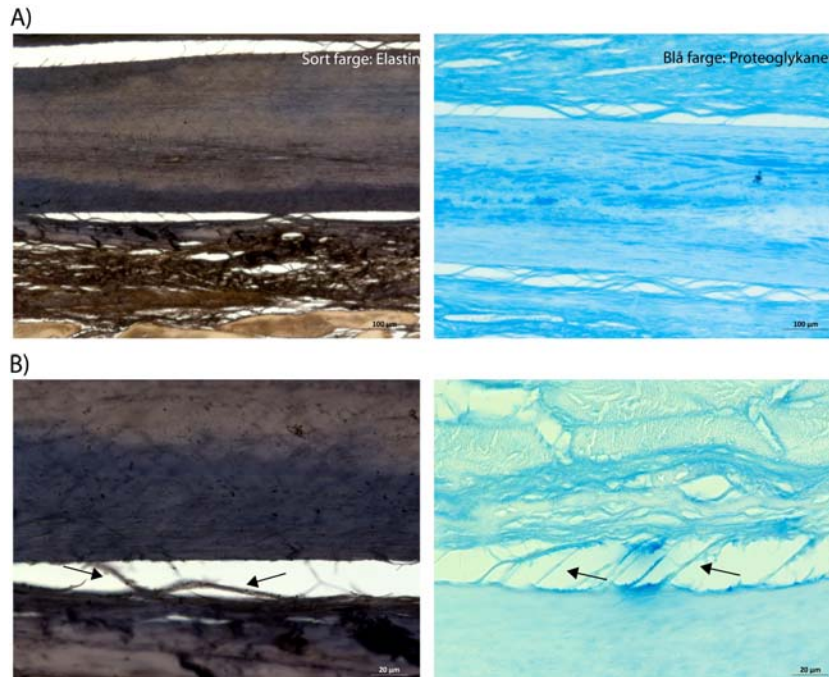
Figur 7 Samme farging som figur 6, men for torsk.

Det er individforskjeller, og vi observerte begynnende løsning allerede ved slakt i enkelte av fiskefiletene. Tilsvarende fant vi at det i andre fileter ikke var tegn til at beina var løsnet selv etter 5 dager. Både elastin og proteoglykaner er lokalisert i bindevevsdraget som har løsnet, både hos laks og torsk (Figur 8 og 9). I laks ser vi at hele bindevevsdraget løsner fra pinnebeinet, samtidig som bindevevet fortsatt er festet til fett (Figur 8A). Fra bildene ser vi at bindevevet løsner fra beinet i aggregatliggende (runde) strukturer (Figur 8B).

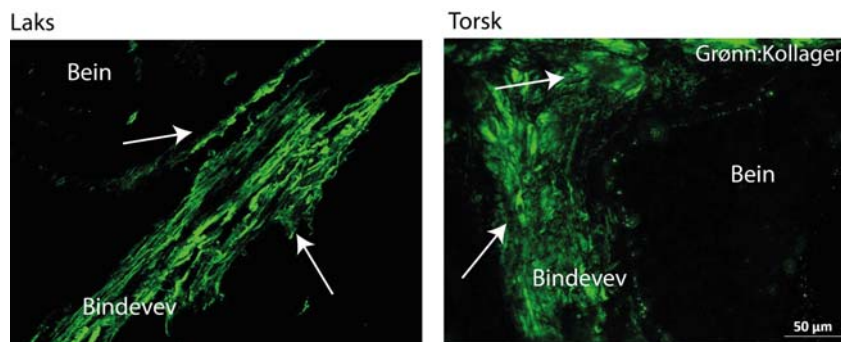


Figur 8 Verhoeff Van Gieson og Alcian blå 0.4 M MgCl₂ farging av pinnebeinsområdet hos laks. A) Både elastin og sulfaterte proteoglykaner finnes i løsningen. Hele bindevevsdraget løsner fra pinnebeinet, men det er fremdeles festet til fettvevet. B). Bindevevsdraget løsner fra pinnebeinet ved store «aggregatlignende» strukturer, illustrert ved piler.

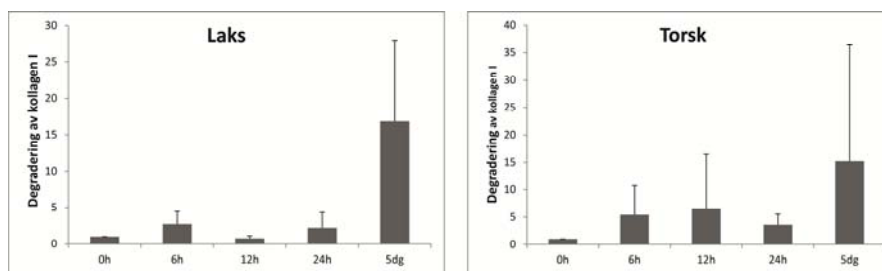
I torsk derimot ser vi at bindevevet revner i trådlignende strukturer inn mot pinnebeinet (Figur 9)



Figur 9 Verhoeff Van Gieson og Alcian blå 0.4 M MgCl₂ farging av pinnebeinsområdet hos torsk. A) Hele bindevevsdraget løsner fra pinnebeinet, men det er fremdeles festet til fettvevet. B) Både elastin og sulfaterte proteoglykaner finnes i løsningen. Bindevevsdraget løsner fra pinnebeinet trådlignende strukturer, illustrert med piler.



Figur 10 Immunofluoresens farging av kollagen 1 i pinnebeinsområdet hos torsk og laks. Grønn farge viser kollagen lokalisering, indikert med piler.



Figur 11 Degradering av kollagen i bindevevet rundt pinnebeina hos laks og torsk analysert ved western blot. Ved kvantisering er mengde degraderingsprodukt detektert normalisert mot 0h prøven, og kurvene viser økning i degradering ved tid.

Både hos laks og torsk er det kollagener i bindevevet (Figur 10) som brytes ned ved lagring. Bindevevet har begynt å brytes ned allerede etter 6 timer, og dette blir tydeligere og mer omfattende i løpet av lagringsperioden (Figur 11).

Proteiner i pinnebeinsfestet ble også karakterisert ved hjelp av proteomikk. Vi ekstraherte proteiner fra pinnebeinsfestet ved slaktetidspunktet og sammenlignet dem med prøver tatt etter 5 dagers lagring. Prøvene ble analysert med 2-dimensional gelelektroforese, bildeanalyse og statistikk. I hver analyse så vi på endringene i flere hundre proteiner. Hos laks så vi signifikante endringer i over 60 ulike proteinvarianter under lagringsperioden, hvorav 7 ble plukket ut og deretter identifisert ved hjelp av massespektrometri. Dette viste seg å være proteiner som bl.a. er involvert i energimetabolisme, protein-protein interaksjoner og proteiner som beskytter cellene i forhold til ulike stressituasjoner. Hos torsk så vi signifikante endringer i over 150 proteinvarianter under lagringsperioden, men det var ikke mulig å identifisere disse til tross for gode resultater fra massespektrometrien. Utfordringen med å få identifisert proteinene fra torsk skyldes at databasene med gen- og proteinsekvenser for denne arten ikke er like fullstendige som for laks. Slike databaser forbedres kontinuerlig, og vi regner med at det vil bli mulig å identifisere disse proteinene om noen få år. Dette var heller ikke mulig for laks for noen få år siden.

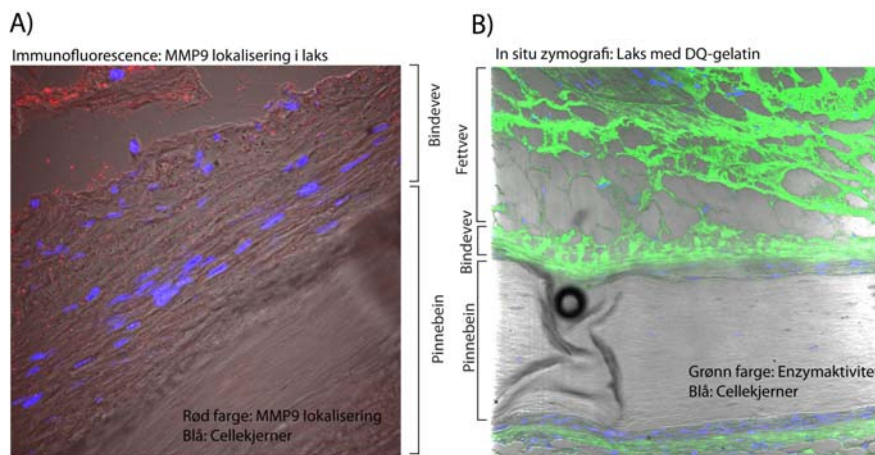
Delmål 4: Identifisere nedbrytningsenzymmer i festeområdet, og måling av proteolytisk aktivitet ved lagring av fileten på is.

Hvilke enzymgrupper finnes i pinnebeinsområdet, og forandres enzymaktiviteten under lagring?

- Matriks metalloproteinaser (MMPer) finnes både hos torsk og laks, men med variasjon mellom de to artene
- Lokaliseringen av de ulike MMPene i bindevevsdraget varierer. Enkelte typer MMPer er spesifikt lokalisert inn mot pinnebeinet, samtidig som andre MMPer er jevnere fordelt utover i hele bindevevsdraget (også ut mot muskel/fettvev)
- Det er tydelig forskjell i enzymaktivitet mellom laks og torsk. MMP aktiviteten øker tidlig *post mortem* hos laks før den avtar, mens aktiviteten er uforandret gjennom hele lagringsperioden hos torsk
- Flere enzymgrupper kan være involvert, og de ulike enzymgruppene regulerer hverandres aktivitet
- De ulike enzymgruppene er aktive ved ulike tidspunkter i løpet av *post mortem* perioden
- Enzymaktiviteten varierer foran og bak i fileten

MMPer og enzymaktivitet i bindevevsdraget rundt pinnebeinet

I bindevevsdraget og omkringliggende vev finnes det flere store enzymfamilier, inkludert MMPer, serin-proteaser og elastaser. MMPer er ekstracellulære enzymer som bryter ned en rekke bindevevsproteiner som kollagener, proteoglykaner og andre glykoproteiner. Elastaser er enzymer som bryter ned elastin. Vi har påvist begge disse enzymgruppene i bindevevsdraget som fester pinnebeina mot muskelen. Ved å bruke immunofluoresens kan vi se på lokaliseringen av de ulike MMPene i vevet. Et eksempel på lokalisering av MMP-9 er vist i figur 12A. Enkelte MMPer ble påvist i bindevevet i torsk, men ikke i bindevevet i laks. I tillegg ser vi at lokaliseringen er forskjellig i bindevevsdraget. Noen er lokalisert i bindevevsdraget helt innerst mot pinnebeinet. Det er i dette området at vi ser tydelige trådlike strukturer i torsk ved lagring på is *post mortem*, mens andre MMP-typer har en mer punktvis fordeling og er jevnt fordelt utover hele bindevevsdraget.



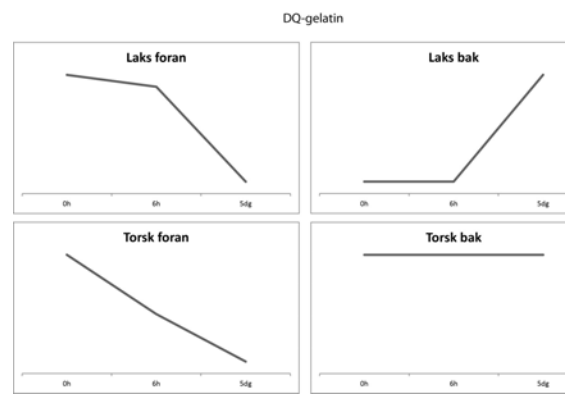
Figur 12 Enzymaktivitet og lokalisering i pinnebeinsområdet hos laks. A) Immunofluorescensfarging av MMP9 i bindevevet. Røde prikker viser lokalisering, mens blå farge viser cellekjerne. Det er ikke lokalisert MMP9 i selve pinnebeinet. B) In situ zymografi med DQ-gelatin som substrat. Grønn farge viser enzymaktivitet, mens blå farge viser cellekjerne. Vi ser ingen enzymaktivitet i selve pinnebeinet.

Ved å bruke forskjellige substrater for MMPer (DQ-kollagen, DQ-gelatin, DQ-kasein) og elastase (elastin) kan vi helt spesifikt påvise hvor i vevet enzymaktiviteten til ulike typer MMPer eller elastase er. Tabell 1 gir en kort oppsummering om hvilke typer MMPer (og ev. andre proteaser) som har DQ-kollagen, DQ-gelatin og DQ-kasein som sine substrater. Figur 12B viser et eksempel hvor DQ-gelatin (nedbrutt form for kollagen) er brukt som substrat. Aktiviteten til MMPer som bryter ned gelatin vises som grønn farge, og i dette eksemplet viser den grønne fargen aktivitet både i bindevevet, fettvevet og muskelvevet.

Tabell 1 Substratspesifisitet-overlappende mellom ulike proteaser

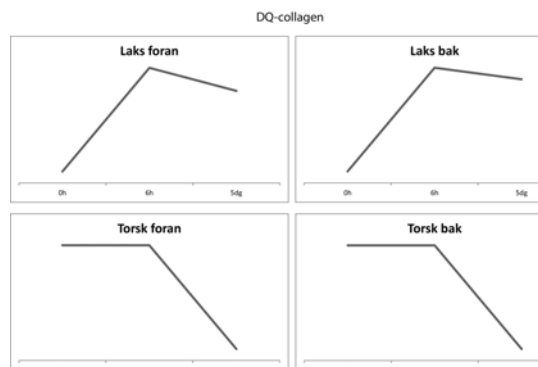
DQ-gelatin	DQ-Kollagen	DQ-kasein
MMP-2	MMP-1	MMP-7
MMP-9	MMP-8	MMP-3
MMP-1	MMP-13	MMP-10
MMP-13	MMP-2	MMP-1
Plasmin	++	++
Trypsin		
++		

Visuell bedømming av intensiteten på enzymaktiviteten i bindevevet viste at de ulike enzymgruppene hadde ulikt aktivitetsmønster *post mortem* (Figur 13-16).



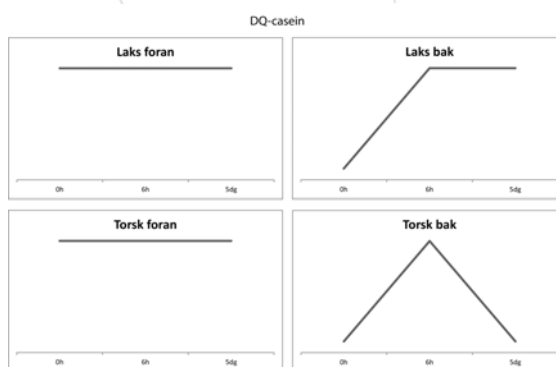
Figur 13 Visuell bedømming av om enzymaktiviteten med DQ-gelatin som substrat i pinnebeinsområdet i laks og torsk, foran og bak. Merk at figuren kun viser en økning/reduksjon i aktivitet, og ikke kvantifisering.

DQ-gelatin viste motsatt resultat for enzymaktiviteten foran og bak i fileten. Enzymaktiviteten avtok ved lagring foran i fileten både hos laks og torsk, mens den økte i bakre del hos laks men var uforandret hos torsk (Figur 13).



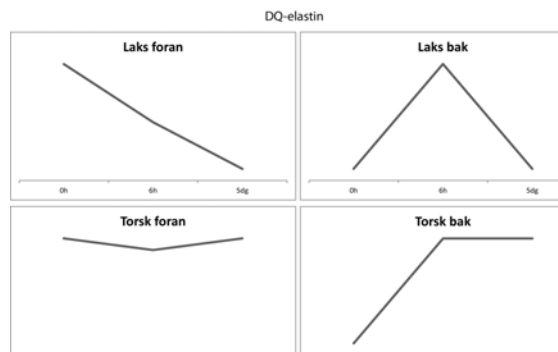
Figur 14 Visuell bedømming av om enzymaktiviteten med DQ-collagen som substrat i pinnebeinsområdet i laks og torsk, foran og bak. Merk at figuren kun viser en økning/reduksjon i aktivitet, og ikke kvantifisering.

DQ-kollagen (trippel heliks kollagen som substrat) viste at enzymaktiviteten økte hos laks ved 6 timer lagring (både foran og bak i fileten), og aktiviteten avtok litt ved lagring i 5 dager (Figur 14). Hos torsk derimot var aktiviteten høy ved tidlige tidspunkter, men avtok ved lagring 5 dager.



Figur 15 Visuell bedømming av om enzymaktiviteten med DQ-casein som substrat i pinnebeinsområdet i laks og torsk, foran og bak. Merk at figuren kun viser en økning/reduksjon i aktivitet, og ikke kvantifisering.

DQ-kasein viste at enzymaktiviteten var uforandret hos laks og torsk foran i fileten, mens den økte ved 6 timer hos både laks og torsk bak i fileten (Figur 15).



Figur 16 Visuell bedømming av om enzymaktiviteten med DQ-elastin som substrat i pinnebeinsområdet i laks og torsk, foran og bak. Merk at figuren kun viser en økning/reduksjon i aktivitet, og ikke kvantifisering.

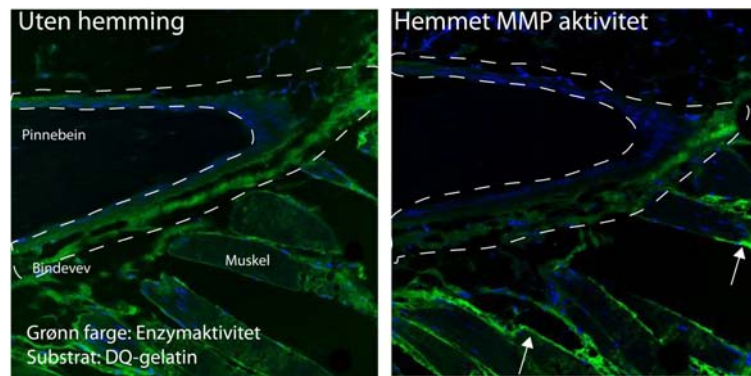
DQ-elastin viste at enzymaktiviteten til elastase avtok i laks foran, mens den økte etter 6 timer for så å minke etter 5 dager i laks bak. For torsk var aktiviteten omtrent uforandret i fremre del av fileten i løpet av lagringen, mens den økte ved 6 timer lagring bak i fileten, og aktiviteten holdt seg uforandret ved lagring i 5 dager (Figur 16).

MMP aktiviteten ved lagring av fileter på is er forskjellig i laks og torsk

Resultatene viser en tydelig forskjell i enzymprofil mellom laks og torsk. MMP aktiviteten øker tidlig *post mortem* hos laks, og allerede etter 6 timer lagring har aktiviteten økt til mer enn det dobbelte sammenlignet med ved slaktetidspunktet (0 tid). Etter 12 timer er aktiviteten i filetene redusert til kun 25 % sammenlignet med enzymaktiviteten ved 0 tid. Aktiviteten er lav i resten av lagringsperioden. Hos torsk er aktiviteten høy allerede ved 0 tid, og fortsetter å være høy gjennom hele lagringsperioden. Vi ser en liten økning i aktivitet etter 12 timer og 24 timers lagring. Det som er interessant er at aktiviteten holder seg så høy selv etter 5 dagers lagring på is hos torsk, mens hos laks er den betydelig redusert.

Hemming av MMP aktivitet viser at flere enzymgrupper er aktive

De ulike enzymgruppene som finnes i bindevevsdraget påvirkes ofte av hverandre, og man kan bruke hemmere av hver enkelt enzymgruppe som en metode for å undersøke dette. GM6001 og Pefabloc reduserer aktiviteten av henholdsvis MMP og serin proteaser. Vi ser at MMP aktiviteten i bindevevsdraget langs pinnebeinet svekkes ved tilsetning av GM6001 (Figur 17). Samtidig er det verdt å merke seg at MMP aktiviteten i muskelvevet øker hos torsk, noe som tyder på at enzymaktiviteten reguleres ulikt i bindevevsdraget sammenlignet med muskelvev, og at det er andre enzymgrupper involvert (Figur 17).



Figur 17 In situ zymografi med DQ-gelatin som substrat for torsk, og hvor GM6001 er tilsatt. Grønn farge viser enzymaktivitet, blå farge viser cellekjerner. Det stiplede området viser bindevevsområdet, og ved tilsetning av GM6001, vist i høyre bilde, ser vi at aktiviteten hemmes (mindre grønnfarge). Tilsvarende ser vi at når vi hemmer MMP aktiviteten øker enzymaktiviteten i muskelvevet, indikert med piler i høyre bilde (sterkere grønnfarge).

Vi har også målt generell MMP aktivitet ved 6 timers lagring på is, hvor vi har tilsatt GM6001 og pefabloc hver for seg eller sammen. For laks blir den generelle MMP aktiviteten redusert med omtrent 50 % når vi tilsetter GM6001. Overraskende er det at når vi hemmer serin proteaser i vevet med pefabloc, får vi tilsvarende reduksjon i MMP aktivitet, noe som kan tyde på at serin proteaser regulerer MMP aktivitet. Vi får ingen additiv effekt ved å tilsette både GM6001 og pefabloc samtidig. I torsk får vi reduksjon i MMP aktivitet når vi tilsetter GM6001, men ingen effekt når vi tilsetter pefabloc. Ved en kombinasjon av disse to får vi imidlertid en forsterket effekt på MMP aktivitet, som også her kan tyde på at disse to enzymgruppene regulerer hverandre.

4.2 Drøfting av funnenes betydning, muligheter for implementering av resultater fra prosjektet og nytteverdi for sjømatnæringen: Konklusjoner og videre anvendelse/FoU behov.

Bindevevet i pinnebeinfestet (hos både torsk og laks) består av både sterke strukturelle fiberkomponenter som kollagen og elastin, men også av andre mindre sterke strukturelle proteiner, som proteoglykaner og lektin-bindende proteiner. Sukker-protein interaksjoner har vist seg å være viktig for feste av ben til muskel. Proteoglykaner er påvist å være tett lokalisert rundt pinnebeinet, og disse binder til ulike proteiner ved hjelp av sine sulfaterte sukkergrupper^{5,9-12}. Vi ser at festet av pinnebein i laks og torsk er forskjellig både med hensyn til struktur, hvilke faktorer som er til stede og hvordan disse brytes ned under lagring. Det er lettere å trekke ut pinnebein hos laks enn torsk. Hos laks fester bindevevet og fettvevet beina til muskelen. Dette utgjør selve festestrukturen. Hos torsk er pinnebeina imidlertid festet direkte til muskelen via bindevevet. En annen tydelig forskjell mellom torsk og laks er sulfateringsmønsteret hos proteoglykaner tett inn mot pinnebeinet. Denne sulfateringen er tidligere vist å være viktig for feste og festestyrke til annet vev¹³. Forskjeller i enkeltkomponenter i bindevevet mellom torsk og laks, i tillegg til at fett inngår i festestrukturen til laks kan være noe av forklaringen på at det er lettere å trekke ut pinnebein i laks enn torsk.

Det at bindevevet omslutter hele pinnebeinet hos både laks og torsk vanskeliggjør en tidlig uttrekking. For å kunne trekke ut beina må festepunkter mot beinet eller bindevevsnettverket være svekket. Sterke fiberstrukturer som kollagen og elastin er tett lokalisert mot pinnebeinet. Elastin er noe av det sterkeste strukturelle komponenten som inngår i bindevevet. Relativt svake, men mange lektin-bindende proteiner bidrar også til at festet mellom bindevev og pinnebein forsterkes. Både hos laks og torsk ser vi at bindevevet starter å brytes ned 12 timer etter slakt og at bindevevet først brytes ned innerst mot (eller nærmest) pinnebeina. Nedbrytningsmønsteret er forskjellig mellom de to artene. Hos torsk ser vi at det fortsatt er trådlike/fiberlignende strukturer i festesonen mellom pinnebein og bindevev 5 dager *post mortem*, mens hos laks er bindingene fullstendig oppløst. Det at strukturen er svekket allerede etter 12 timer kan bety at det er mulig å trekke ut pinnebeina tidligere enn det som gjøres (3-5 dager *post mortem*). Dette ikke minst hvis man kan finne frem til behandling av fisken som akselererer nedbrytningen av bindevevet.

Pinnebeinfestet og nedbrytningsprosess/løsning av pinnebeina er forskjellig i torsk og laks. Dette er viktig informasjon for industrien. Utvikling og optimalisering av metoder for fjerning av pinnebein bør derfor tilpasses de ulike artene. Enzymer som MMPer, serin proteases og elastase bidrar til å løsne pinnebeina⁸. Vi har identifisert nedbrytningsenzymer som er aktive tidlig i nedbrytningsprosessen i pinnebeinfestet. Enzymaktiviteter er regulert av ulike faktorer som blant annet pH, temperatur og ionestyrke^{1, 8, 14, 15}. Prosesser som påvirker disse faktorene vil kunne ha betydning for hvor fort pinnebeina løsner ved at enzymaktiviteten øker og dermed fremskynder nedbrytningsprosessen¹⁵. Analysene viser også at det er store forskjeller i sammensetningen av proteiner og regulering av enzymer som inngår i bindevevet rundt pinnebeina, sammenlignet med bindevevet i muskel. Dette gir et potensiale som man kan utnytte når man ønsker å løsne pinnebeina og samtidig beholde en filet med høy kvalitet¹⁶⁻¹⁸. Nedbrytningen skjer innerst mot pinnebeinet, og det kan tenkes at man kan optimalisere prosessen både før slakt og på prosesslinja med hensyn til å kontrollere/fremskynde naturlig nedbrytning rundt pinnebeina, og på den måten gjøre det mulig å trekke ut pinnebeina både kortere tid etter slakt og med mindre riveskader på muskel. Potensialet er betydelig, og i eventuelt videre arbeid vil det være viktig å undersøke hvordan ulike betingelser, både i forbehandling og på prosesslinja påvirker pinnebeinfestet, og dermed løsning av pinnebeina.

5 Leveranser

Prosjektet har hatt 2 møter med styringsgruppa (telefonmøte 18.6.2013 og på Gardermoen 27.11.2013) med møtereferat levert i henhold til prosjektavtalen.

Prosjektet har i tillegg generert 3 foredrag (WEFTA 2013, Tromsø; FHF-samling Verdikjede Havbruk, 21.10.2013, Hell; FHF-samling Workshop Tykkfiskbein, 27.11.2013, Gardermoen).

Prosjektet har generert en populærvitenskapelig artikkel i prosjektperioden: Feste av pinnebein i torsk og laks: Bindevevets rolle og prosesser involvert i nedbrytningen av dette: Norsk fiskeoppdrett (2013) **38**, 16-17.

Formidlingsplan i etterkant av prosjektperioden:

En oppsummering av prosjektet vil bli presentert på Nofimas webside.

Et foredrag på Programkonferansen Havbruk 2014: Sissel B. Rønning, Tram.T. Vuong, Tone-Kari Østbye, Kristin Hollung, Eva Veiseth-Kent, Thomas Larsson, Svein. O. Kolset & Mona E. Pedersen. Feste av pinnebein i torsk og laks-bindevevets rolle og prosesser involvert i nedbrytningen av dette. *Programkonferansen Havbruk 2014*. Tromsø, 31.mars-2.april 2014

Det er planlagt to vitenskapelige publikasjoner i internasjonalt anerkjente tidsskrifter i 2014/2015.

6 Kvalitetssikring av prosjektgjennomføring og resultater

Det vitenskapelige arbeidet er gjennomført i henhold til vanlige vitenskapelige standarder som gjør det mulig for publisering av resultat i internasjonalt anerkjente tidsskrifter. Resultater underveis i prosjektet har også blitt presentert på internasjonal konferanse (WEFTA), og diskutert i møter i regi av FHF. Både Nofima og Universitetet i Oslo (UiO) har brukt biokjemiske og molekylærbiologiske metoder som sikrer høy faglig kvalitet i prosjektet. Gjennomgåelse og diskusjon av resultater i prosjektet underveis og i avdelingsmøter med andre forskere på Nofima har også bidratt i faglig høyde.

7 Referanser

1. Esaiassen, M., Sørensen, N.K., Vol. Rapport 28/1996 (Fiskeriforskning AS, 1996).
2. Akse, L., Tobiassen, T., Vol. Rapport 15/2002 (Fiskeriforskning AS, 2002).
3. Westavik, H. 26 (SINTEF Fiskeri og Havbruk AS, 2009).
4. Carmeli, E., Moas, M., Reznick, A.Z. & Coleman, R. Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: A brief review. *Muscle Nerve* **29**, 191-197 (2004).
5. Tingbo, M.G. et al. Type of carbohydrate in feed affects the expression of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs), glycosaminoglycans (GAGs) and interleukins in skeletal muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish & shellfish immunology* **33**, 582-589 (2012).
6. Danielson, K.G. et al. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *Journal of Cell Biology* **136**, 729-743 (1997).
7. Nguyen, Q., Mort, J.S. & Roughley, P.J. Cartilage Proteoglycan Aggregate Is Degraded More Extensively by Cathepsin-L Than by Cathepsin-B. *Biochemical Journal* **266**, 569-573 (1990).
8. Vargova, V., Pytliak, M. & Mechirova, V. Matrix metalloproteinases. *Exs* **103**, 1-33 (2012).
9. Tingbo, M.G., Kolset, S.O., Ofstad, R., Enersen, G. & Hannesson, K.O. Sulfated glycosaminoglycans in the extracellular matrix of muscle tissue in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Spotted wolffish (*Anarhichas minor*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **140**, 349-357 (2005).
10. Hannesson, K.O. et al. An immunological study of glycosaminoglycans in the connective tissue of bovine and cod skeletal muscle. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **146**, 512-520 (2007).
11. Tingbo, M.G., Kolset, S.O., Ofstad, R., Enersen, G. & Hannesson, K.O. Identification and distribution of heparan sulfate proteoglycans in the white muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and spotted wolffish (*Anarhichas minor*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **143**, 441-452 (2006).
12. Tingbo, M.G., Pedersen, M.E., Kolset, S.O., Enersen, G. & Hannesson, K.O. Lumican is a major small leucine-rich proteoglycan (SLRP) in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) skeletal muscle. *Glycoconjugate journal* **29**, 13-23 (2012).
13. Zou, X.H. et al. Chondroitin sulfate in palatal wound healing. *Journal of dental research* **83**, 880-885 (2004).
14. Georges, S., Heymann, D. & Padrines, M. Modulatory effects of proteoglycans on proteinase activities. *Methods Mol Biol* **836**, 307-322 (2012).
15. Larsen, R., Olsen, S.H., Kristoffersen, S. & Elvevoll, E.O. Low salt brining of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua* L.) and the effects on different quality parameters. *Lwt-Food Sci Technol* **41**, 1167-1172 (2008).
16. Martinez, I. et al. Protein expression and enzymatic activities in normal and soft textured Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle. *Food Chem* **126**, 140-148 (2011).
17. Wang, P.A., Vang, B., Pedersen, A.M., Martinez, I. & Olsen, R.L. Post-mortem degradation of myosin heavy chain in intact fish muscle: Effects of pH and enzyme inhibitors. *Food Chem* **124**, 1090-1095 (2011).
18. Ofstad, R., Olsen, R.L., Taylor, R. & Hannesson, K.O. Breakdown of intramuscular connective tissue in cod (*Gadus morhua* L.) and spotted wolffish (*Anarhichas minor* O.) related to gaping. *Lwt-Food Sci Technol* **39**, 1143-1154 (2006).