

Rapport av FHF prosjekt 900830

Faglig forskermøte om feste av pinnebein / tykkfiskbein i laks og hvitfisk
Kategori: Havbruk

Ansvarlig: FHF, med Kristian Prytz som kontaktperson

Prosjektleder: Mona E. Pedersen, Nofima

Hovedmål: Hovedmålet med forskermøtet var å få i gang en faglig diskusjon rundt biologiske komponenter og mekanismer knyttet til feste av pinnebein. I tillegg ville vi avdekke kunnskapshull, kartlegge behov for ny kunnskap og metodikk, samt etablere tilnæringsmetoder for videre å kunne arbeide målrettet med problematikken.

Bakgrunn: Problematikken rundt pinnebeina er at de er svært godt festet til muskulaturen slik at fileten enten blir ødelagt når de fjernes eller at de knekker halvveis inn i fileten slik at bare deler av pinnebeina fjernes. Det er store forskjeller mellom fiskeslag i nødvendig trekkraft og bruddstyrke ved fjerning av beina maskinelt. Trekkraften er også forskjellig mellom pre-rigor og post-rigor fisk, med en sterk reduksjon i trekkraft post-rigor. Hva som er årsaken til disse forskjellene er ikke kjent. Per i dag finnes det lite detaljert kunnskap om hvordan pinnebein er festet til muskelen. Man vet at pinnebein er festet til muskelen via bindevev, muskelfibre og fett. Mengde og organisering av disse komponentene varierer langs ribbenet, gjennom fisken, mellom individer og mellom ulike fiskeslag, som laks og torsk. Alt i alt er biologien rundt hvordan pinnebein er festet i fileten og hvordan man lettere kan løsne dem uten å forringe kvaliteten på kjøttet komplisert.

Møtet ble gjennomført 26.10.2012 av forskere med ulik kunnskap som er relevant for problemstillingen, bl.a. praktiske problemer og erfaringer med fjerning av pinnebein, kompetanse og detaljkunnskap på ekstracellulær matriks/bindevev, bein, fett, muskelutvikling og enzymer involvert i nedbrytningsprosesser. Dette ga et godt grunnlag for en faglig diskusjon rundt ulike aspekter knyttet til feste av pinnebein.

Møtedeltagere: Ulf Erikson (SINTEF), Harry Westavik (SINTEF), Svein Olav Kolset (UiO), Elin Hadler Olsen (UiT), Kristin Hollung (Nofima), Sissel B. Rønning (Nofima), Elisabeth Ytteborg (Nofima), Tone-Kari Østbye (Nofima), Jacob Torgersen (Nofima), Harald Takle (Nofima), Mona Pedersen (Nofima), Kristian Prytz (FHF), Frank Jakobsen (FHF) og representanter fra Matis og Marell.

Oppsummering møte:

Hvilken kunnskap har vi i dag om feste av pinnebein og hvor er kunnskapshullene?

Det var generell enighet om at det finnes lite kunnskap om hvordan pinnebein er festet i fisk. Fra komparative studier, og også fra studier på fisk, vet man at feste av pinnebein består av bindevev, muskelfibre og fett. Det finnes også god kunnskap om at dette festet endres ved *post mortem* prosesser. Forsøk med MR-microimaging viser at det oppstår en spalte mellom pinnebeinet og vevet rundt, noe som antakelig gjør det enklere å fjerne pinnebeina. Hvordan

denne spalten oppstår, og hvilke enzymatiske prosesser som er involvert er foreløpig ukjent. Sammensetningen og detaljkunnskaper av de ulike vevstypene rundt dette festet er ukjent, og det er ikke tidligere utført sammenlikning mellom laks og torsk. Dette er to fiskearter som skiller seg ut i forhold til nødvendig trekkraft som kreves for å få ut pinnebeina. Bindevev har som rolle å feste og binde sammen vev. Hvor godt pinnebeina er festet avhenger av styrken til bindevevet. Hvilke komponenter som bestemmer styrke, og hva som regulerer dette vil da være sentralt. I tillegg knekker pinnebeina ved maskinell fjerning. Hva som gjør at pinnebeina knekker vil også ha betydning i denne problemstillingen. Målsettinga i dag er å fjerne pinnebeina maskinelt fra ferskest mulig filet, dvs. pre-rigor for å sikre best mulig kvalitet på fileten. Etter slakting gjennomgår fiskemuskelene ulike faser post-mortem. I pre-rigor fasen er muskelen myk og prosesserbar. Når rigor inntreffer (2-55 timer etter avlivning) blir muskelen gradvis hardere, og prosessering er ikke å anbefale. Post-rigor (20-60 timer etter avlivning) blir muskelen igjen myk og prosessering er da mulig. Det er ønskelig med forlengelse av tiden før rigor, hvor muskelen ennå er prosesserbar. Stresset og utmattet fisk utvikler tidligere og kraftigere rigor post mortem. Dette gir dårligere fiskekvalitet og spesielt dersom fisken blir håndtert mens den er i rigor. Det ideelle vil være en ustresst fisk med lang tid før rigor inntreffer slik at man har god tid til å fjerne pinnebeina. Ulike metoder er imidlertid under utvikling for å kunne fjerne pinnebein på laks på et tidligere tidspunkt, metoder der man kutter beinet ved festet til bindevevet med en kniv før pinnebeina trekkes ut (Trio-maskin) eller metoder for ulike behandlinger av fileten før fjerning. Ved bruk av disse ulike teknikkene ser man en reduksjon i antall pinnebein som ikke lar seg fjerne. Betydningen av riktig maskininnstilling av Trio-maskins for sluttresultatet var viktig, og betydning av stress, miljø, lokaliteter etc kunne ikke bekreftes eller avkreftes i denne studien.

Det ble definert noen viktige områder som må være sentrale i det videre arbeidet med pinnebein:

1. Bindevevskomponenter involvert i oppbygging av bindevev rundt pinnebeina
2. Mineralisering og struktur av pinnebein og betydningen av dette i forbindelse med brudd.
3. Fettvev som inngår i feste rundt pinnebein
4. Enzymer tilstede
5. Nedbrytningsprosesser i feste tidlig post mortem
6. Hvit fisk og laks

Hvilken kunnskap finnes i dag som vi kan ta med inn i problemstillingen?

Bindevev: Det finnes i dag kunnskap om ekstracellulær matriks/bindevev fra både pattedyr og fisk. En vet i dag at bindevevet er en dynamisk struktur der styrken bestemmes av sammensetning og organiseringen av en rekke komponenter. Hos pattedyr utgjør f.eks. laminin en viktig bestanddel og er et stort protein med molekylvekt på 850.000 kDa. Det interagerer med de fleste andre bindevevsproteiner, som proteoglykaner, fibronectin, entactin, kollagen, og kan anses som en strukturell organisator. Laminin kan polymerisere

(danne 3d-strukturer) og polymerisering avhenger av miljø. Fibronectin er en annen relevant ekstracellulær komponent som er med på å feste celler (eksempelvis beinceller og muskelceller) til matriksen. Elastin derimot danner uløselige polymerer som er kryssbundet og derfor danner sterke bindinger. Høye nivåer av elastin i vev er også viktig for elastisitet til vevet. Kollagen er med på å gi styrke til vevet og det finnes en rekke forskjellige kollagentyper (i alt 20 typer). Styrken til vevet er avhengig av hvilke kollagentyper som finnes i vevet. Proteoglykaner er bindevevskomponenter som regulerer vevsdynamikk. De binder blant annet enzymer og regulerer deres aktivitet. De er også viktige ved at de binder vann og danner store aggregater, som er med på å bestemme kompresjonsevnen til et vev.

Mange av disse komponentene er identifisert hos fisk. I fisk har bindevevet blant annet blitt studert i forhold til teksturproblemer/kvalitet i muskel. Denne kunnskapen kan brukes innen pinnebeinproblematikk for å avgjøre hvor hardt beina er festet i muskelen. Effekten av fôr og stress på muskelkvalitet har også blitt studert, og vist å ha en effekt på bindevevet.

Torsk og steinbit er to fiskeslag med ulik kvalitet i forhold til tekstur, dvs. at styrken til bindevevet er forskjellig i disse to fiskeslagene. Det er detektert store forskjeller i sammensetningen og organisering av bindevevskomponenter i muskel hos disse to artene. I steinbit ser man en jevn fordeling i bindevevsdrag, mens hos torsk var de samme bindevevskomponentene mer restriktivt lokalisert. Ulik lokalisering og mengdeforhold av blant annet proteoglykaner og kollagener har betydning for styrken til bindevevet. Hvordan sammensetningen av bindevev rundt pinnebeina i laks og torsk er, og forskjeller i dette som kan gi utslag i trekraft på pinnebeina er derimot foreløpig ukjent.

I fisk fôret med høy og lav stivelse, så en klart at bindevevsprofilen var forskjellig i muskel. Bindevevskomponenter relatert til et sterkt bindevev var redusert i gruppen som var fôret med et høyt stivelsesnivå. Ulike fettsyrer i fôret påvirker også muskelstrukturen i fisk, med konsekvens mhp splitting av myofibre (dvs en degradering av bindevev). Studier har vist at stress påvirker strukturen av muskel, med en splitting av muskelfibrene (dvs degradering av bindevev). Det er påvist at langtidsstress fører til større strukturelle forskjeller enn korttidsstress.

Nedbrytning av bindevev vil ha betydning for hvor godt pinnebeina er festet i muskelen. Fra pattedyr vet man at det finnes en rekke proteaser som bryter ned bindevevskomponentene. Proteasene danner et komplekst nettverk sammen med sine inhibitorer, og er involvert i de fleste biologiske prosesser. Proteasene er lokalisert både intracellulært (inni cellen) og ekstracellulært (utenfor cellen). De er aktive ved forskjellige pH. En gruppe proteaser kalles matriks metallo- proteaser (MMP). Som gruppe kan MMPene kløye strukturelle proteiner, adhesjons proteiner, kjemokiner og andre proteaser. Aktiviteten av dem påvirkes blant annet av antibiotika, temperatur, pH og ulike saltkonsentrasjoner. Det er også påvist at aktiviteten av dem påvirkes av stress. Om det er forskjeller i «proteolytisk profil» mellom fisk der det er lett å fjerne pinnebein versus vanskelig vil være aktuelt å kartlegge. Behandlingen fisken har fått fra slakting til fjerning av pinnebeina kan ha betydning for blant annet MMPer og deres aktivitet (enzymene som bryter ned bindevevet).

Bein: Problemer ved fjerning av pinnebein er at de enten knekker eller sitter for godt fast i muskelen. Hvorfor og hvor beina knekker – om det er bestemte svake punkter eller om de knekker på tilfeldige steder eller om dette avhenger av hvilke maskiner som brukes i prosessene - vet man ikke. Generelt er det lite kunnskap om utvikling av ribbein i fisk.

Mineraliseringen av ribbeina begynner tidlig hos laksen, allerede på plommesekk-stadiet (300d°). Vi vet at disse tidlige fasene i fiskens liv er svært sensitive til ytre påvirkning. Skjellettdeformiteter og svakheter i benstruktur har gjennom en rekke studier blitt linket til feilernæring eller feil behandling av fisken i tidlig livsfase. Blant annet har det vært vis at økt temperatur på larvestadiet kan gi en krøllete ribbensstruktur hos laks – noe som kan bidra til at disse blir vanskeligere å trekke ut av muskelen og/eller knekker. I senere livsstadier er lignende deformiteter rapportert fra fisk med ulike mineralmangler, men ingen grunnleggende forsøk er utført på dette temaet. I takt med at fisken vokser må pinnebeina øke både i lengde og tykkelse, men hvordan disse prosessene foregår vet vi lite om. Tilsvarende har mennesker 4 vekstsentre fordelt på ribbena under utvikling. Disse vekstsentrene er områder med ulike celletyper i ulike faser og med ulike oppgaver. Det er derfor ikke overraskende at kun små forandringer i vekstforholdene kan ha store konsekvenser for utviklingen og kunne gi inndelinger på ribbena med svakere områder enn andre. Dette vil kunne være områder som f.eks knekker lettere når man forsøker fjerne dem. Misdannelser med dårlig mineralisering og misdannede ribbein er også påvist hos hvitfisk med vitamin A mangel. Mulige årsaker til at pinnebeina knekker eller er vanskelig å få ut kan skyldes feilutvikling, feilernæring og/eller feilbehandling. Det kan også skyldes spesifikke sensitive perioder i utviklingen, eks. dårlig mineralisering i perioder. Grunnleggende kunnskap, både i tidlig utvikling og i videre vekst av ribben, er derfor nødvendig for å forstå problematikken og detektere hvor eventuelle feil og svakheter kan oppstå.

Fett : Fettinnholdet i hvitfisk er alltid lavt, og sesongvariasjoner sees hovedsakelig i lever hvor størstedelen av fett lagres. I fet fisk (laks) er det sesongvariasjoner, med ujevn fordeling av fett i fileten. Ulike faktorer påvirker fettinnhold. Dette er faktorer som lokalitet, årstidsvariasjoner, førtilgjengelighet, fôrinnhold, bevegelse/trening og gyting. Om det er relasjoner mellom fettfordeling nær pinnebein og betydning for trekkraft er ukjent, men det er naturlig å anta at fett rundt ribbena vil bidra til lettere å kunne trekke pinnebeina ut av fileten. I tillegg degraderes fett post mortem slik at lipider vil kunne frigjøres rundt beina. Tidspunktet for når dette skjer og i hvilken grad det spiller en rolle i trekkraften som trengs for å trekke ut beina er ukjent. En trenger mer grunnleggende kunnskap om dette, og hvordan ytre faktorer eventuelt kan påvirke dette.

Konklusjoner og veien videre:

Det var generell enighet på møtet at man mangler kunnskap om fester av pinnebein og beinstruktur av disse generelt i fisk. Biologien rundt hvordan pinnebein er festet i fileten og hvordan man lettere kan løsne dem uten å forringe kvaliteten på kjøttet er komplisert. Det er viktig å se på bindevevet som en dynamisk struktur. Det er et nettverk som kan stivne og løsne i struktur. Oppbygging og nedbrytning avhenger i tillegg av ytre faktorer som påvirker disse prosessene, bl.a. temperatur og stress. Kunnskap om hvilke bindevevskomponenter som er tilstede, og hvordan de er organisert i ulike deler av fester vil kunne gi oss mere kunnskap om aktuelle komponenter/kandidater det er nødvendig å se videre på i forhold til å løsne bindevevet og hvordan nettverket lettere kan brytes opp. I tillegg vil MMP enzymer og andre proteaser involvert i nedbrytningsprosessen være aktuelle å identifisere. Om det er forskjeller i proteolytisk profil mellom fisk (laks og torsk) der det er lett å fjerne pinnebein versus vanskelig vil være aktuelt å kartlegge. Kunnskap om pinnebeinas styrke,

mineralisering, form (krøllete versus rette) og hvor de knekker (svake punkter) er nødvendig.

Det ble konkludert med at videre kartlegging er nødvendig. Tre tilnæringsfaser for å oppnå tilstrekkelig kunnskap ble skissert:

Trinn 1. Grunnleggende kartlegging av biologisk komponenter rundt pinnebein og beinstrukturen til disse hos både laks og hvitfisk. Vi vet at trekkraften av pinnebein er forskjellig mellom laks og hvitfisk – grunnleggende kunnskap vil kunne gi oss informasjon om nøkkelkomponenter som kan være årsak til at trekkraft er så forskjellig og som det vil være relevant å studere videre. Det vil også være relevant å studere hvordan feste endres ved tidlig post mortem prosesser og enzymer involvert i dette. Ulike metoder ble nevnt på møtet for å kunne belyse problemstillingen: immunohistokjemi og immunofluoresens til å identifisere bindevevskomponenter, protomikk for å identifisere og screene aktuelle proteiner, real-time qPCR for å studere mRNA ekspresjonen, biokjemiske analyser for å studere protease aktivitet, FTIR analyser for å studere beinkvalitet i tillegg til vanlig histologiske metoder for å farge ulike cellyper og analysere generell morfologi.

Det ble lagt vekt på at trinn 1 er første og viktigste tilnærming til pinnebeinproblematikken. Deretter ble det skissert trinn videre som kunne være relevant å studere for både laks og hvitfisk basert på kunnskap generert i trinn 1 (trinn 2-4).

Trinn 2. Det vil være ønskelig å studere hvordan ytre faktorer som f.eks. stress påvirker festet av bindevevet i fileten. Ytre faktorer som stress, fôr og temperatur er faktorer som kan påvirke både bindevevets sammensetning og nedbrytning, men også beinutvikling og mineralisering. Siden reduksjon av stress er av industriell betydning for prosessering (fiskekvalitet) og at en ønsker å forlenge rigor-forløpet er dette en ytre faktor som er spesielt interessant å studere med hensyn på feste av pinnebein. Andre faktorer som fôr, lokaliteter, genetisk bakgrunn etc kan også være av interesse. Siden det er stor variasjon mellom fisk og fordi en rekke faktorer kan påvirke prosessene samtidig vil det være nødvendig å utføre kontrollerte fiskeforsøk. Kontrollerte fiskeforsøk med laks og hvitfisk hvor man undersøker hvordan de ulike komponentene som er beskrevet i trinn 1. varierer i forhold til behandling av fisken og gjennom tidlig post mortem prosesser.

Trinn 3. Utnytte kunnskap fra utstyrleverandører for å trekke ut pinnebein ved mest gunstig tidspunkt og eventuell justering av metoder og utstyr for å optimalisere prosessen i lab skala. Bedøving av fisk med elektrisk stimulering påvirker rigorforløpet, men det er ikke klarlagt hvordan dette vil påvirke fjerning av pinnebein.

Trinn 4. Uttesting og implementering i industriell skala basert på resultater fra forsøk i trinn 1-3.