

MASTEROPPGAVE

AK305F Master i havbruk

Elisabeth Karlsen

Cathepsiner i muskel hos Atlantisk laks og mulig påvirkning av ulike strømhastigheter i lukket merd

Fakultetet for biovitenskap og akvakultur

Mai 2016

Forord

Masteroppgaven teller 30 studiepoeng og inngår som det siste obligatoriske emnet i Mastergrad i Havbruk. Tittel på oppgaven er *Cathepsiner i muskel hos Atlantisk laks og mulig påvirkning av ulike strømhastigheter i lukket merd*. Masteroppgaven var en del av et større prosjekt: *Oppdrett av atlantisk laks i semi-lukket merd; kan ny teknologi bidra til større bærekraft?*. Prosjektnr: 239178. Takk til Regionalt Forskningsfond, Nord-Norge for økonomisk støtte til prosjektet og Norsk Havbrukssenter for hjelp til gjennomføring av prosjektet.

Valg av tema er blant annet påvirket av tidligere utdanning og oppgaven kan sies å være en forlengelse av studiet «Ettårig påbyggingsstudium i kvalitetsanalyse og foredling av marint råstoff» jeg tok i 2001-2002. I tillegg er jeg i stor grad inspirert av min veileder som har vært engasjert i denne oppgaven; En stor takk rettes til Dr. Marit Bjørnevik, som har vært fantastisk imøtekommen, hjelpsom og tilgjengelig, under hele prosjektet. Stor takk rettes også til min biveileder Dr. Ørjan Hagen som har gitt meg opplæring i analysemetoden og kommet med gode innspill underveis i prosessen. Takk også til avdelingsingeniør Anjana Palihawadana og lærling Mathias Kristiansen som har vært til uvurderlig hjelp under analysene, og til min medstudent Bingfei Zhou som har delt sine data og erfaringer med meg.

Min arbeidsgiver Nordland fylkeskommune fortjener en stor takk for å ha gitt meg støtte og anledning til nødvendig fleksibilitet for å gjennomføre oppgaven. Uten dette hadde det ikke vært mulig å gjennomføre studiet. Takk til mine kollegaer, Ketil og Ann Helen, som har vist forståelse og gitt meg motivasjon til å ferdigstille dette prosjektet.

Til slutt vil jeg takke min familie Christian, Amalie, Miriam og Aurora som har vært tålmodige og støttet opp om dette arbeidet.

Nord universitet

Fakultet for Biovitenskap og Akvakultur

2016

Elisabeth Karlsen

Sammendrag

Et forsøk med laks ble gjennomført i lukkede minimerder i sjø med to ulike strømhastigheter i perioden juni 2015 til november 2015 ved Norsk Havbrukssenter. Tre merder hadde lav strømhastighet på 8 cm/s og tre merder hadde høy strømhastighet på 22 cm/s, tilsvarende 0.2 og 0.5 kroppslengder per sekund ved start av forsøket. Ved start og avslutning av forsøket ble all fisk veid og målt, og ved midtveisuttak i august ble 50 fisk per merd veid og målt. Ved start, midtveis og ved avslutning av forsøket ble 15 fisk fra hver merd tatt ut for analyse av enzymene cathepsin B, B+L og H, tekstur, filetspalting, farge og kjemisk innhold i filet.

Laks som svømte under høyere strømhastighet hadde høyere vekt (+8%) enn gruppa på lav strømhastighet ved avslutning av forsøket, mens det ikke ble funnet forskjell i lengde. Ved avslutning av forsøket i november ble det funnet signifikant lavere enzymaktivitet i gruppen holdt på høy strømhastighet enn i lav strømhastighet ($p < 0.05$). Liten fisk hadde signifikant høyere cathepsin B, B+L og H aktivitet enn større fisk. Det ble også funnet at hunfisk hadde litt høyere cathepsin H-aktivitet enn hanfisk. Cathepsinaktivitet i laks korrelerte positivt med filetspalting, vanninnhold og proteininnhold. Cathepsinaktivitet korrelerte negativt med a*- og b*-verdier og fettinnhold.

Summary

In this project, salmon were conducted into closed mini cages in the sea with two different water speed during the period June 2015 to November 2015 at Norsk Havbrukssenter. Three cages were given low water speed of 8 cm/s and three cages were given high water speed of 22 cm/s, corresponding to 0.2 and 0.5 body lengths per second at the start of the experiment. At the start and end of the experiment, all fish were weighed and measured, and by halfway sampling in August 50 fish per cage were weighed and measured. At the start, halfway and at the end of the experiment 15 fish from each cage was removed for analysis of the enzymes cathepsin B, B + L and H, texture, gaping, color and chemical content in the fillet.

At the end of the experiment, salmon kept in high water speed had higher weight (+ 8%) than the salmon kept in low water speed. There was no difference in length. At the end of the experiment in November it was found significantly lower enzyme activity in the group kept in high water speed than kept in low water speed ($p < 0.05$). Small fish had significantly higher cathepsin B, B + L and H activity than larger fish. It was also found that females had slightly higher cathepsin H activity than males. Cathepsin activity in salmon correlated positively with gaping, water content and protein content. Cathepsin activity was negatively correlated with a * - and b * values and fat.

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag.....	ii
Summary	iii
Innholdsfortegnelse	iv
Figurliste.....	vi
Tabelliste	vii
1.0. Innledning.....	1
1.1 Lakseproduksjon i Norge	1
1.2. Lukket merdteknologi	2
1.3. Fiskemuskelen.....	4
1.4. Rigor mortis.....	5
1.5. Enzymer	6
1.5.1. Proteolytiske enzymer	7
1.5.2. Cathepsiner.....	8
1.6. Kvalitet.....	10
1.7. Svømmetrening og påvirkning på vekst, kvalitet og enzymer	11
2.0 Material og metode.....	13
2.1. Fiskens historie.....	13
2.2. Strømhastighet.....	14
2.3. Prøveuttak.....	14
2.4. Forberedelser grovlab Brønnøysund	15
2.5. Forberedelser lab Nord Universitet	15
2.5.1. Filetspalting.....	15
2.5.2. Farge.....	16
2.5.3. Tekstur.....	16
2.5.4. Vann	16
2.5.5. Protein	16
2.5.6. Fett.....	17
2.6. Enzymanalyser cathepsin B, B+L og H	17
2.6.1. Enzym ekstraksjon	17

2.6.2. Spektrofotometrisk enzymanalyse	18
2.7. Statistiske analyser	18
3.0. Resultater.....	20
3.1. Vekt og lengde	20
3.2. Cathepsinaktivitet.....	20
3.3. Korrelasjoner mellom cathepsin og utvalgte kvalitetsvariabler	22
3.3.1. Korrelasjoner mellom cathepsinaktivitet og vekt og lengde.....	22
3.3.2. Korrelasjoner mellom cathepsinaktivitet og tekstur/filetspalting	24
3.3.3. Korrelasjoner mellom cathepsinaktivitet og farge	24
3.3.4. Korrelasjoner mellom cathepsinaktivitet og vann-, protein- og fettinnhold	24
3.3.5. Korrelasjoner mellom cathepsinaktivitet og kjønn	25
4.0. Diskusjon.....	26
5.0. Konklusjon	32
6. Litteraturliste	33
7. 0. Vedlegg	46
7.1. Cathepsinaktivitet.....	46

Figurliste

Figur 1 Solgt mengde laks i Norge.....	1
Figur 2 Prinsippskisse lukket merd.....	3
Figur 3 Muskulatur hos laks.....	4
Figur 4 Enzymklassifisering og gruppeinndeling.....	7
Figur 5 Temperaturregistreringer merd.....	14
Figur 6 Cathepsinaktivitet hele perioden.....	21
Figur 7 Sammenheng cathepsinaktivitet og vekt.....	23

Tabelliste

Tabell 1 Oversikt utvalg til analyse.....	15
Tabell 2 Sammensetning assaybuffer.....	18
Tabell 3 Sammensetning substrat.....	18
Tabell 4 Vekt og lengde.....	20
Tabell 5 Korrelasjon cathepsinaktivitet.....	22
Tabell 6 Korrelasjon cathepsinaktivitet og lengde/vekt.....	22
Tabell 7 Korrelasjon cathepsinaktivitet og farge.....	24
Tabell 8 Korrelasjon cathepsinaktivitet og vann-, protein og fettinnhold.....	24
Tabell 9 Cathepsinaktivitet i forsøksperioden.....	46
Tabell 10 Cathepsinaktivitet november.....	47

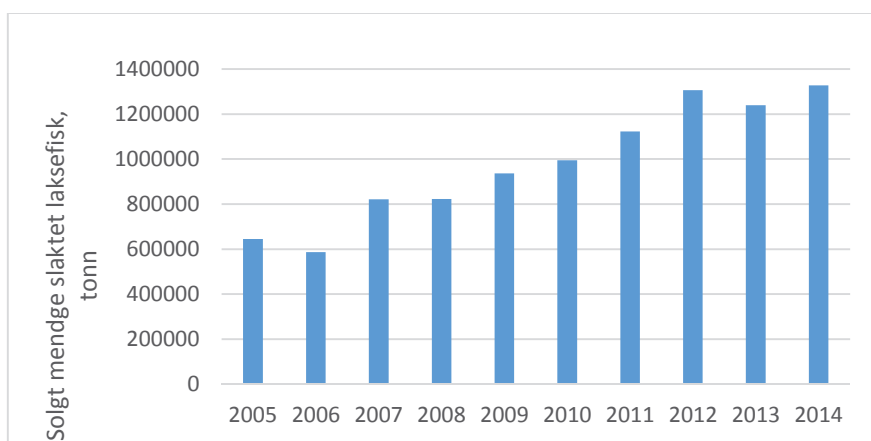
1.0. Innledning

Sjømat fra fiskeri og akvakultur bidrar til viktige næringsstoffer til verdens befolkning; proteiner og essensielle aminosyrer, vannløselige vitaminer A og D, mineraler og sporstoffer, samt flerumettede fettsyrer (Vinagre et al., 2011).

Verdens sjømatproduksjonen har økt fra cirka 60 millioner tonn i 1970 til i overkant av 164 millioner tonn i 2014. Sjømatproduksjon i Norge var i 2014 cirka 3,8 millioner tonn. Det er en økning på 13 prosent sammenlignet med ti år tilbake. Økningen kommer i hovedsak fra oppdrett av laks og ørret, hvor det fra 1980-tallet og frem til i dag har skjedd en betydelig positiv utvikling innen avl, sykdomsbekjempelse og teknologiutvikling (Nærings- og fiskeridepartementet, 2015a).

1.1 Lakseproduksjon i Norge

Laks er den dominerende arten innen norsk havbruksnæring. Mens det i 1980 ble produsert 4000 tonn (tilsvarer omtrent det man produserer på en gjennomsnittlig lokalitet i dag) ble det i 2014 solgt i overkant av 1,3 millioner tonn laksefisk. Av dette utgjør produksjon av Atlantisk laks (*Salmo salar*) omtrent 1.258 000 tonn, mens regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss/Salmo gairdneri*) står for omtrent 69 000 tonn og ørret (*Salmo trutta*) beskjedne 76 tonn. Etter år med eventyrlig vekst har imidlertid lakseproduksjonen stagnert de siste årene (Figur 1) (Fiskeridirektoratet.no, 2016; Nærings- og fiskeridepartementet, 2015a).



Figur 1. Utviklingen i solgt mengde slaktet laks, oppgitt i tonn, i Norge i perioden 2005-2014. Data er hentet fra Fiskeridirektoratets statistikkbank.

Laksen oppnår høy pris og det er svært god lønnsomhet i den norske lakseoppdrettsnæringen, det er et tydelig signal om at verden vil ha mer laks (Nærings- og fiskeridepartementet, 2015b). Produksjon av laks, ørret og regnbueørret er imidlertid ikke markedsstyrt. Vekstmuligheter er regulert av myndighetene gjennom et tillatelsessystem og tidspunkt for vekst, antall nye tillatelser/vekst på eksisterende tillatelser, geografisk spredning og vilkår fastsettes av departementet (Akvakulturloven, 2005).

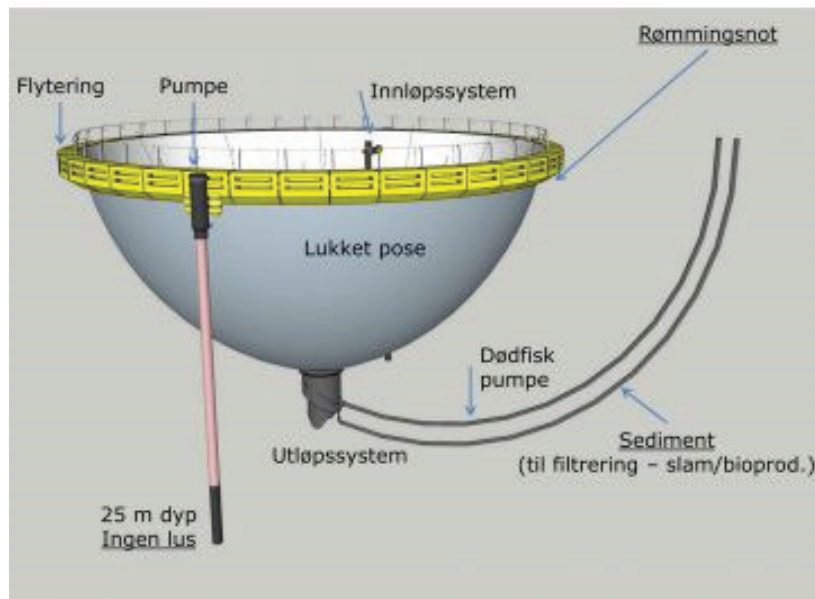
1.2. Lukket merdteknologi

Tradisjonelt lakseoppdrett foregår i åpne merdanlegg i sjø. Dette er en effektiv produksjonsform som gir god utnyttelse av våre naturgitte forhold. Norske myndigheter uttrykker ønske om videre vekst i havbruksnæringen, men det er en forutsetning at dette skal skje innenfor miljømessige bærekraftige rammer (Nærings- og fiskeridepartementet, 2015b).

Ingen kan med sikkerhet si at næringen ikke vil være avhengig av nye teknologier for å sikre bærekraftig drift i fremtiden (Teknologirådet, 2012). Siste års store utfordringer spesielt i forhold til lakselus og rømming aktualiserer bruken av lukkede merder. Interessen kan betraktes som stor for denne anleggstypen, både hos oppdrettsselskaper, utstyrsleverandører, forsknings- og utviklingsmiljøer og interesseorganisasjoner (Iversen et al, 2013). Myndighetene har tildelt flere akvakulturtillatelser på vilkår om at produksjonen skal skje med lukket merdteknologi og ønsker å åpne for å kunne tildele vederlagsfrie tillatelser til landbasert oppdrett av laksefisk (Nærings- og fiskeridepartementet, 2015b).

Det pågår flere interessante utviklingsprosjekter med lukkede anlegg. De som er kommet lengst kan fortsatt sies å være på et pilot-/demonstrasjonsstadium (Jensen, 2012). Ulike teknologiske løsninger for lukkede anlegg i sjø er under utvikling; merder med fleksible vegger av tekstilmaterialer eller plast, og merder med rigide vegger av betong, stål eller glassfiber.

Akvadesign i Nordland, som har utviklet merdene som benyttes i vårt prosjekt, har drevet med utvikling av lukkede merdkonsept i ulike størrelser. Merdene er basert på tekstilposer med flyteringer i plastelementer (Figur 2) (Aadland, 2015).



Figur 2. Prinsippskisse av en lukket merd med fleksible vegger. Hentet fra Aftenposten.

For at lukkede anlegg skal kunne tas i kommersiell bruk er det nødvendig å dokumentere og optimalisere drift i slike systemer. Lukkede anlegg reiser nye utfordringer blant annet i forhold til fiskehelse- og velferd, energibruk, arealtilgang, pumping av vann ved eventuelt driftsstans og lønnsomhet. Bruk av lukkede anlegg kan også rokke ved Norges største naturlige fortrinn som oppdrettsnasjon, nemlig tilgangen på rent vann og gode strømforhold (Teknologirådet, 2012).

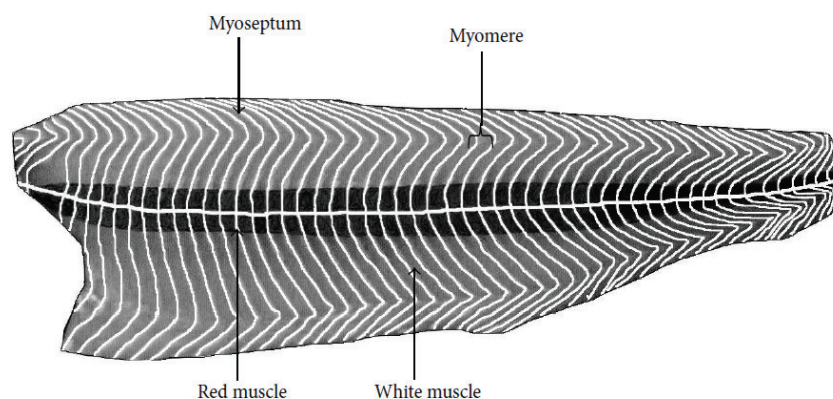
På den annen side er det mange fordeler med å lage en tett barriere mellom fisk og omkringliggende vannmasser; faren for smitte og spredning av sykdom reduseres, det er mulighet for kontrollert oksygentilførsel, slammet kan pumpes opp og gjenbrukes som for eksempel gjødsel, vann kan hentes fra dyp hvor det er færre patogener enn i de øvrige vannmassene og man kan påvirke svømmehastigheten ved å kontrollere strømhastigheten. Med lukket merdteknologi kan også nye områder uegnet for åpne merdanelegg tas i bruk.

Mange oppdrettere har i dag store kostnader forbundet med lakselus, sykdom og rømming og overstiger dette kostnadene knyttet til strømbruk på resirkulasjon og pumping av vann i lukkede anlegg, kan lukket teknologi være konkurransedyktig. Ettersom dybden på vanninntaket kan varieres slik at temperaturen tilpasses optimal tilvekst og fôrutnyttelse (Iversen et al., 2013), er det potensiale for økt vekst da fisk vokser fortere med høyere temperaturer (Handeland et al, 1998).

God vekst, lav kjønnsmodning, lite sykdom og god velferd er en forutsetning for at lukkede anlegg skal få fotfeste i norsk oppdrettsnæring. Likeså må fisken holde god kvalitet slik at produktet godtas i markedet. Kunder av norsk laks klager på filetspalting og bløt tekstur (Espe et al., 2004; Mørkøre, 2008), ujevn farge og melaninflekker (Kiessling et al, 2006; Mørkøre, 2012). En av påvirkningsfaktorene er miljøet fisken lever i, og trening har positiv effekt for vekst og kvalitet (Totland et al., 1987). Før denne teknologien tas i bruk i norsk oppdrettsnæring er det viktig med økt kunnskap innen drift og utfordringer i slike lukkede anlegg.

1.3. Fiskemuskel

Det er tre ulike typer muskulatur; tverrstripet, glatt og hjertemuskulatur. Av disse er tverrstripet muskulatur den dominerende typen i fisk (Kristinsson & Rasco, 2000). Fiskemuskel kan utgjøre opptil 60% av den totale kroppsvekten (Listrat et al., 2016). Forskjellene mellom fiskemuskel og muskel til landlevende dyr skyldes hovedsakelig ulike krav til muskulaturen knyttet til svømming og oppdrift, og fisk har derfor mindre bindevev enn landlevende dyr (Kristinsson & Rasco, 2000). Fiskemuskel er oppbygd som skiver, *myotomer*, som er adskilt av bindevevshinner, *myosepter*. Myotomene består av parallelle muskelfibre (muskelceller) som strekker seg fra myosept til myosept (Figur 3).



Figur 3. Muskulatur hos laks i form av en filet, delt inn i myotomer og myosept (hvit tverrgående stripe) som danner en form av W. Viser også lokalisering av rød og hvit muskulatur. Hentet fra Listrat et al 2016.

Muskelfibrene inneholder blant annet myofibriller som består av proteinene aktin og myosin. Myofibrillene opptar nesten hele det intracellulære volumet i muskelfiberet (Listrat et al., 2016). Myosin, som er det vanligste muskelprotein, utgjør omtrent 38% av den totale mengden muskelprotein, mens aktin er det nest viktigste og utgjør omtrent 13% (Caballero et al., 2009; Kristinsson & Rasco, 2000).

Myofibrillene er delt opp i avsnitt av tversgående proteinskiver, Z-linjen, hvor aktinrådene er festet. Avsnittet mellom to Z-linjer kalles sarkomer og det er dette avsnittet som er den funksjonelle enheten (Lynum, 1997). Det er interaksjonen mellom aktin og myosin som genererer kraften til muskelkontraksjon (Caballero et al., 2009).

Den tverrstripete muskulaturen hos fisk kan bestå av tre ulike typer muskelfiber: røde, hvite og rosa avhengig av mengden muskelmyoglobin (Bone, 1978; Johnston & Goldspink, 1977). Røde muskelfibre har hovedsakelig aerob forbrenning og kjennetegnes av høyt innhold av oksidative enzymer, mitokondrier, fett og kapillærer og brukes til langsom svømming. Hvite muskelfibre har hovedsakelig anaerob forbrenning og kjennetegnes av lavt innhold av mitokondrier, fett og kapillærer og brukes mest ved kortvarige kraftanstrengelser. Rosa muskelfiber er en mellomting mellom hvite og røde fibre. Atlantisk laks har ikke rosa muskelfibre (Kiessling et al., 2006; Sänger & Stoiber, 2001).

Hovedkomponenten i bindevevet i fiskemuskel er kollagen, som er et fibrøst glykoprotein (Suárez et al., 2005), og mengde kollagen varierer mellom ulike fiskearter fra 0,34 til 2,19 % i vått muskelvev (Sato et al., 1986).

I motsetning til fugl og pattedyr, som i all hovedsak vokser ved at muskelfibrene øker i størrelse (hypertrofi) etter at de er klekket/født, vokser fisk både ved hypertrofi og ved dannelse av nye muskelfibre (hyperplasi) gjennom en større del av livet (Greer-Walker, 1970).

1.4. Rigor mortis

Forandringer i fiskemuskel post mortem har stor betydning for oppdrettsnæringen da dette påvirker filetkvalitet og kundens aksept av produktet (Caballero et al., 2009; Vinagre et al., 2011). Få minutter etter slakt oppstår biokjemiske endringer i muskelen. Den mest markante endringen fiskemuskel gjennomgår i løpet av de første timene etter slakt er rigor mortis. Denne prosessen er delt inn i ulike faser; pre rigor, rigor mortis, og post rigor. Under pre rigor fasen forblir musklene myke i noen timer og opprettholder konstant ATP (adenosintrifosfat)-nivå. Rigor mortis initieres av synkende ATP- nivå og reaksjonen skjer når ATP- nivået når en viss terskelverdi (2 μ M). Det dannes permanente bånd mellom aktin og myosin-filamentene, og dette medfører at muskelen mister elastisiteten og blir hard (Delbarre-Ladrat et al., 2006). Oppløsningen av rigor i post rigor-fasen øker bløtgjøringen av muskulaturen hovedsakelig på grunn av proteolyse (prosessen når proteiner kappes opp i mindre biter) av

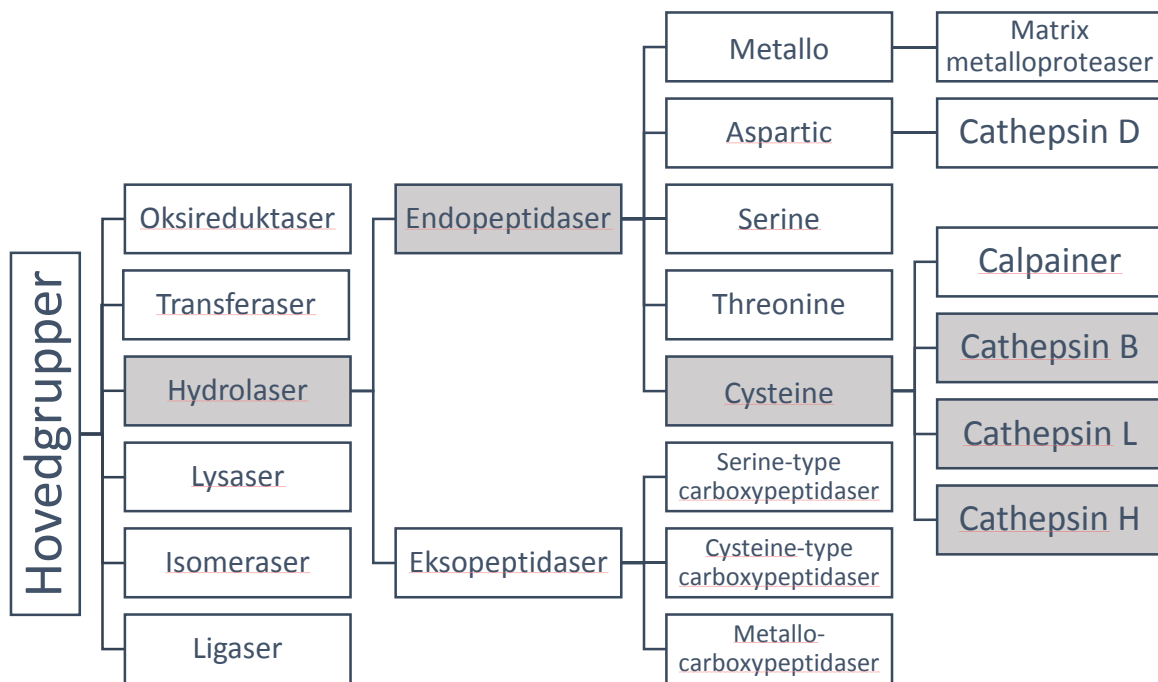
muskelproteiner (Ayala et al., 2010). pH i muskel synker sakte fra nøytral rett etter slakt, til 6 eller lavere (Delbarre-Ladrat et al., 2006).

1.5. Enzymer

Enzymer er spesielle proteiner som katalyserer bestemte kjemiske reaksjoner i kroppen. Enzymene virker ved å redusere aktiveringsenergien for reaksjonen og gjør at reaksjonshastigheten øker. Stoffer som påvirkes av et enzym kalles *substrat*. Enzymet binder seg til substratet med svake bindinger og dette katalyserer den kjemiske reaksjoner som fører til et produkt. Temperatur og pH påvirker proteinenes form og dette er faktorer som har stor innvirkning på enzymenes aktivitet. Ulike enzymer er derfor aktive ved ulike pH-verdier (Bjålie et al., 1998).

I organismen finnes et vidt spekter av ulike enzymer med forskjellige virkeområder og oppgaver. Enzymene har en systematisk navngivning, bortsett fra noen få unntak. Enzymene er klassifisert med utgangspunkt i dets funksjon og er fordelt på seks hovedgrupper; oksidoreduktaser, transferaser, hydrolaser, lyaser, isomeraser og ligaser, etter arten av den reaksjon den katalyserer. De har et systematisk nummer og systematisk beskrivende navn som skal ende på *-ase* (Fossum, 2016; Kierulf, 2009). Hovedgruppen er videre fordelt på undergrupper og undergruppers grupper (Figur 4).

Enzymene i hovedgruppen hydrolaser katalyserer spalting med vann, og undergruppen peptidaser katalyserer spaltingen av peptidbindinger i proteiner (Fossum, 2016). Peptidasene deles ofte inn i endopeptidaser og eksopeptidaser. Endopeptidaser bryter ned proteiner midt i molekylet, mens eksopeptidaser spalter peptidbindinger i enden av molekylet. Enzymene som analyseres i denne oppgaven, cathepsinene B, B+L og H, tilhører undergruppen cycteine endopeptidaser (Hauge, 2009; McDonald, 2010). Endopeptidaser finnes hovedsakelig i muskelfiber, cytoplasma og ekstracellulær matriks (nettverk av fiberdannende proteiner og polysakkarider i vevet rundt cellene) i bindevevet som omgir muskelcellene i fisken. De fleste endopeptidasene er lysosomale (finnes i lysosomene, membranavgrenset celleorganell) eller cytosolisk (finnes i cytosol), men noen finnes i sarkoplasma og assosieres med myofibriller eller makrofager (Jiang, 2000).



Figur 4. Oversikt og gruppeinndeling av enzymene som er inkludert i prosjektet (farget grått) eller omtalt i oppgaven, slik de er funnet i fisk.

1.5.1. Proteolytiske enzymer

Proteolytiske enzymer (peptidaser) er funnet i alle levende organismer og i alle typer vev. Den største aktiviteten er funnet i innvoller og lever, men det er også en betydelig aktivitet i muskelvev (Hultmann, 2003). I levende organismer spiller disse enzymene en viktig rolle i protein turnoveren (Mótyán et al., 2013).

Det er flere proteolytiske enzymer tilstede i fiskemuskel, deriblant cathepsiner, calpainer og matrix metalloproteaser, som antas å ha en viktig rolle i mørningsprosessen post mortem (Ladrat et al., 2003; Okitani et al., 1980). Foreløpig har det ikke satt seg en felles oppfatning av de komplekse mekanismene som er ansvarlig for post mortem forandringene i fiskemuskel (Delbarre-Ladrat et al., 2006), og litteraturen er sprikende. Den synkende intracellulær pH post mortem er en mulig årsak til at membranen rundt lysosomene brister slik at de lysosomale enzymene frigjøres (Ando et al., 2001). Etter døden forsvinner de biologiske reguleringsmekanismene av enzymene og de hydrolyserer muskelprotein og løser opp rigor mortis (Hultmann, 2003).

Matrix metalloprotease er et proteolytisk enzym som antas å ha en rolle i nedbrytningsprosessen (Chéret et al., 2007). Enzymet kan bidra til uønskede forandringer i

teksturen som blant annet filetspalting som følge av nedbrytning og svekking av bindevev med påfølgende bløt fiskemuskel (Ando et al., 1995).

Calpainer har flere funksjoner i biologiske prosesser, blant annet oppbygning av cytoskjelett, celledifferensiering og apoptose (nedbrytning av celler) (Khorchid & Ikura, 2002). I pattedyr er post mortem-forandringene knyttet til calpainene, men dette enzymets rolle i fisk er omdiskutert (Verrez-Bagnis et al., 2002). Det antas at de deltar i muskelnedbrytning post mortem ved å bryte myofibrillproteiner (Ladrat et al., 2000).

Calpainer er funnet å være aktive i de første dagene post mortem med høy pH, mens cathepsinenes aktivitet øker gjennom lagringsperioden ettersom pH synker (Li et al., 2012; Sentandreu et al., 2002). Calpainer kan bli inaktivert når muskel-pH blir så lav som 5.5-5.8 (Kanawa et al., 2002). Calpainer og cathepsiner komplementerer trolig hverandre og bidrar i synergi til hurtig proteolyse av muskelproteiner (Ayala et al., 2010).

1.5.2. Cathepsiner

Det er kjent at lysosomene kan inneholde omkring 13 ulike typer cathepsiner, hvorav cathepsin B, D, L og H er viktigst i fiskemuskelcellene (Aoki et al., 2000; Sentandreu et al., 2002).

Cathepsinene syntetiseres i cellene som preproenzymer. I etterfølgende synteser fjernes prepeptiden i løpet av passasjen til endoplasmatisk retikulum og procathepsiner gjennomgår en proteolytisk prosess til den får sin aktive, ferdige form (Turk et al., 2000).

Aktiviteten til cathepsinene kontrolleres av flere faktorer, som pH, redoks potensial, mengden proenzymer/forløpere og mengden inhibitorer (Sentandreu et al., 2002). Cathepsin B, H og L er regulert in vivo (levende organismer) av peptidaseinhibitoren cystatin (Turk & Bode, 1991). Cystatin er lokalisert i cytoplasma, adskilt fra cathepsinene, og kan hindre uønsket cathepsinaktivitet utenfor lysosomene (Sentandreu et al., 2002).

Cathepsin B, L og H synes å være allestedsnærværende i celler hos pattedyr (Stoka et al., 2005). De kan degradere proteiner også utenfor lysosomene, og prosessere andre proteiner som renin og thyroglobulin (forløper til thyroidea hormoner) og de er funnet å være involvert i flere sykdommer som kreft, Alzheimers, Multiple Sklerose (Adams et al., 1995) og muskeldystrofi (Turk et al., 2000).

Hos fisk finnes cathepsinene hovedsakelig i lysosomene og er derfor for det meste inaktive i levende fiskevev (Delbarre-Ladrat et al., 2006). Det er imidlertid funnet at nivået av cathepsin

B og L økte i ketalaks under gyting (Konagaya, referert i Shahidi & Botta, 1994). De er også funnet som makrofag-aktige fagocytter mellom muskelfibrene og har sterk tilknytning til bløtgjøringen av muskelen under gyting hos laks (Jiang & Chen, 1999). Det kan tyde på at de er viktig for produksjon av gonader under kjønnsmodning og gyting når fisk slutter å spise og bruker proteinene til å produsere gonader.

Cathepsinenes rolle i nedbrytningsprosessen post mortem er omdiskuterert (Sentandreu et al., 2002). Cathepsiner antas å være involvert i bløtgjøringen av både pattedyr- og fiskemuskel post mortem (Bahuaud et al., 2008; Chéret et al., 2007; Martinez et al., 2011; Yamashita & Konagaya, 1990), ved at de degraderer myofibriller eller bindevev (Ladrat et al., 2003; Sato et al., 1986; Yamashita & Konagaya, 1990). Høy cathepsinaktivitet relateres til bløt tekstur i Atlantisk laks (*Salmo salar*) (Larsson et al., 2012) og er funnet å medføre redusert holdbarhet på kveite (*Hippoglossus hippoglossus*) (Hagen et al., 2008).

Flere studier trekker frem cathepsin B, L, H og D som de viktigste cathepsinene involvert i aldring av muskelen (Ahmed et al., 2015; Chéret et al., 2007; Delbarre-Ladrat et al., 2006).

Cathepsinene B, B+L og H assosieres vanligvis med muskelceller, men det er oppdaget cathepsin L i blodceller hos flere fiskearter (karpe, amberjack og rød sea bream) (Ahimbisibwe et al., 2010). Dersom fisk utsettes for stress før slakt som fører til pH i blodet synker, kan cathepsin L fra blodet også bidra til hurtigere degradering muskelvev om fisken ikke sløytes og vaskes (Jacobsen et al., 2015).

Aktiviteten av disse enzymene øker vanligvis med tiden post mortem, og de er svært aktive ved lav pH (Gaarder et al., 2012). Optimum pH for cathepsin B og L er mellom 5.5- 6.5, og optimal pH for cathepsin H er under 6.5- 6.8 (Sentandreu et al., 2002). Cathepsin B, H og L kan bli irreversibelt inaktivert ved pH over 7. pH optimum for det enkelte enzym kan variere mellom ulike fiskearter (Ahmed et al., 2015).

De tre cathepsinene B, D og L kan ha en synergieffekt på hverandre ved at enkelte komponenter kan degraderes når alle tre enzymene er tilstede, men ikke av hvert enzym alene (Delbarre-Ladrat et al., 2004).

Molekylvekta til cathepsin B varierer mellom ulike arter og hos laks er den funnet å være 28 kDA. Cathepsin B klyver flere syntetiske substrater og har kapasitet til å degradere Z-Arg-Arg-MCA og Z-Phe-Arg-MCA. Aktiviteten av cathepsin B er rapportert å være 29.7 ganger

høyere i fiskemuskel enn i storfekjøtt. Dette sier noe om hvor viktig rolle dette enzymet har i forbindelse med tekstuelle forandringer i fiskemuskelen (Chéret et al., 2007).

Molekylvekt for cathepsin L er for flere fiskearter (chum salmon (*O.keta*), blue scad (*Decapterus maruadsi*), sølvkarpe (*Hypophthalmichthys molitrix*), makrell (*S. Australasicus*)), funnet å være 30 kDA (Ahmed et al., 2015). Cathepsin L er svært sensitiv mot det syntetiske substratet Z-Phe-Arg-MCA (Barrett & Kirschke, 1981), og har kapasitet til å degradere mange ulike proteiner og myofibriller (Ahmed et al., 2015). Det er funnet at cathepsin L, men også cathepsin B i noen grad, er medvirkende i bekjempelsen av enkelte virusinfeksjoner (Ebert et al., 2002). Aktiviteten til cathepsin L er funnet å være fire ganger høyere i muskel hos sea bass enn i storfekjøtt (Chéret et al., 2007). I forsøk på makrell er det funnet at degradering av muskelvev i hovedsak skyldes aktiviteten til cathepsin L (Aoki & Ueno, 1997). Det er funnet signifikant negativ korrelasjon mellom filetfasthet og nivå av cathepsin L-aktivitet i Atlantisk laks, noe som indikerer at det er en relasjon mellom høy cathepsinaktivitet og bløtgjøring av muskelen post rigor (Bahuaud et al., 2010).

Tidligere var det vanlig å bruke betegnelsen cathepsin B₃ om enzymet som vi i dag kjenner som cathepsin H. Ifølge Shahidi og Botta (1994) har det en molekylvekt på 25 kDA og er svært varmemestabilt. Aktiviteten av Cathepsin H kan testes ved bruk av syntetisk substrat Arg-MCA. Cathepsin H genererer store peptidfragmenter som trenger videre degradering av andre peptidaser (Ahmed et al., 2015). Det er gjort få studier med utvinning og identifisering av cathepsin H i fiskemuskel og storfekjøtt i forhold til studier knyttet til cathepsin B, D og L, trolig på grunn av det lave nivået av dette enzymet i muskel post mortem. Cathepsin H sitt bidrag til bløtgjøring av fiskemuskelen post mortem synes å være ubetydelig (Chéret et al., 2007).

1.6. Kvalitet

Omtrent 80% av norsk laks blir eksportert fersk hel med hode (Nærings- og fiskeridepartementet, 2015b), mens en mindre del blir videreforedlet. En økt bløtgjøring av fiskekjøttet kan gjøre den for uegnet for prosessering (Mitchie, 2001). Norsk lakseindustri har som målsetting å øke produksjon av høyverdige produkter for å oppnå høyest mulig lønnsomhet (Elvevoll et al., 1996). Viktige kvalitetsparametere for fisk er mattrygghet, næringsinnhold, smak, tekstur, farge og egnethet for bearbeiding og holdbarhet (Haard, 1992). Filetspalting, blek filet og bløt tekstur er hovedårsaken til nedgradering av Atlantisk laks (Mitchie, 2001).

Teksturen i fiskemuskel er en av de viktigste kvalitetsparameterne i fisk for produsenter, videreforedler og konsumenter (Gjedrem, 1997; Hyldig & Nielsen, 2001; Listrat et al., 2016; Rasmussen, 2001; Veland & Torrissen, 1999), og påvirkes blant annet av sammensetningen av muskelfibre, antall fibre og størrelse på muskelfibrene (Mørkøre, 2008; Vieira et al., 2007). Teksturen kan variere med art og stamme innenfor samme art (Mørkøre, 2008), alder, størrelse, ernæringsstatus (Dunajski, 1980), temperatur under lagring (Haard, 1992), mengde kollagen (Sato et al., 1986), fettinnhold (Johansson et al., 2000), sulteperioder (Einen & Thomassen, 1998), pH (Dunajski, 1980), stress (Sigholt et al., 1997), trening (Totland et al., 1987) og post mortem faktorer som glykolyse og rigor mortis (Fauconneau et al., 1995).

Det er funnet sammenheng mellom bløt tekstur og filetspalting, men det trenger nødvendigvis ikke å være det (Mørkøre, 2008; Mørkøre & Rørvik, 2001). Muskelkontraksjoner under rigor medfører ofte separering av muskelsegmentene, filetspalting (Dunajski, 1980), og skjer når bindevevet ikke greier å holde sammen muskelsegmentene (LavÉTy et al., 1988). Det er flere mulige faktorer som påvirker graden av filetspalting, blant annet stress, håndtering pre eller post rigor samt kollageninnholdet i fiskemuskel (Kristoffersen et al., 2006). Mye tyder på at de underliggende grunnene til at bløt tekstur og spalting oppstår ikke er fullt ut forstått, spesielt for spalting, da det er en del motstridende funn på området (Jacobsen et al., 2015).

Fargen på muskulaturen hos Atlantisk laks er også et svært viktig kvalitetskriterium (Kiessling et al., 2004). Rødfargen kommer hovedsakelig fra fôrtilsetning av carotenoiden astaxathin som binder seg til aktomyosin-komplekset i fiskemuskel (Henmi et al., 1990). I lakseoppdrett utgjør kostnader til syntetiske fargestoffer en betydelig andel av de totale førkostnadene (Torrissen et al., 1995). Farge og avsetning av astaxanthin avhenger av flere faktorer, blant annet biotilgjengelighet (Torrissen, 1985), fôringsregime (Einen et al., 1999), fettinnhold (Torrissen, 1985), tetthet på muskelfiber (Johnston et al., 2000) og kjønnsmodning (Reid et al., 1993), fiskestørrelse, vekstrate, genetiske faktorer og modningsstatus (Ando et al. 1985, Torrissen & Torrissen 1985, Torrissen & Nævdal 1984 og Blanc & Choubert 1985 refert i Torrissen et al., 1995).

1.7. Svømmetrening og påvirkning på vekst, kvalitet og enzymer

Svømmetrening blir oppfattet å ha positiv effekt på fiskevelferden, og det er rapportert at trening øker vekst og proteindeponering hos flere arter av laksefisk (Castro et al., 2011; Farrell et al., 1990; Houlihan & Laurent, 1987). Svømmetrening kan også gi en mer robust fisk med bedre evne til å motstå sykdom (Castro et al., 2011), en mer homogen vekst innad i

gruppa (Jobling et al., 1993), redusert stress (Boesgaard et al., 1993) og mindre aggressiv adferd (East & Magnan, 1987; Jobling et al., 1993). Svømmetrening kan ha positiv effekt på kvalitet, og i en studie hvor en gruppe laks (*Salmo salar*) ble holdt i forhøyet strømhastighet fikk 9.2% flere superior kvalitet ved fastsettelse av kvalitetsnorm enn laksen i referansegruppen (Totland et al., 1987).

I forhold til vekst finnes motstridende studier på området og i forsøk på kongelaks (*O. Tshawytscha*) og rødlaks (*O. Nerka*) ble det ikke registrert positiv effekt av trening på vekst (Dougan, 1993). I forsøk utført på torsk *Gadus morhua* hadde heller ikke trening innvirkning på vekst, noe som ifølge forfatterne kunne komme av for lav svømmehastighet (Bjørnevik et al., 2003).

Svømmetrening er vist å kunne gi økt diameter på muskelfibrene i hvit (Davison, 1994; Hinterleitner et al., 1992; Totland et al., 1987) og rød muskulatur hos fisk (Sänger, 1992). Det antas at trening har positiv effekt på tekstur (Totland et al., 1987) og protein turnover i regnbueørret (Houlihan & Laurent, 1987) og det kan redusere stress (Boesgaard et al., 1993). Dersom fisk utsettes for stress før slakt kan dette påvirke enzymaktiviteten i muskulaturen. Forsøk har vist at aktiviteten av cathepsin B og genuttrykk for cathepsin L og B øker i muskelen hos Atlantisk laks som blir utsatt for stress før slakt (Bahuaud et al., 2010). Forsøk på torsk har imidlertid vist at stress ikke har samme effekten. Torsk skiller seg imidlertid fra andre fiskearter som for eksempel laks og det har vist seg at torsk påvirkes mindre av stress før slakt (Hultmann, 2012; Hultmann, 2015).

Det bør forskes mer på enzymnivå i muskel og hvordan dette påvirkes av ulike svømmehastigheter. Svømmetrening og påvirkning av cathepsinaktivitet er det ikke gjort mange studier på, om noen. Det er fortsatt mange ubesvarte spørsmål knyttet til biokjemi og trening og det finnes motstridende studier på området. Det er funnet at intracellulære peptidaser har økt genuttrykk ved endring i tekstur (Larsson et al., 2012). Når vi vet at trening har innvirkning på tekstur er det interessant å undersøke om trening også påvirker nivået av proteaser, da disse sannsynligvis har betydning for tekstur. Det er viktig å få mer kunnskap om laksens behov og drift av lukkede systemer for å sikre god vekst, fiskehelse og velferd samt kvalitet på sluttproduktet. Hovedmålet med denne oppgaven var å undersøke om aktiviteten av enzymene cathepsin B, L og H i laksemuskel påvirkes av ulike strømhastigheter, og hvordan enzymaktiviteten samvarierer med fiskestørrelse og ulike kvalitetsvariabler som tekstur, filetspalting, farge, protein, fett og vann.

2.0 Material og metode

2.1. Fiskens historie

I dette prosjektet ble laks (*Salmo salar*) holdt i lukkede minimerder med to ulike strømhastigheter på lokalitet 10898 Lamholmen i Brønnøy kommune, Nordland, 65.5°N 12.1°E.

Fisken kom opprinnelig fra settefiskanlegget 13183 Saglifossen tilhørende Bindalssmolt AS i Bindal kommune i Nordland. I november 2014 ble smolt transportert fra Saglifossen og satt ut i lukkede merder på lokalitet 33837 Møllebogen i Bindal kommune. 20. mai 2015 ble fisken som skulle være med i det kommende forsøket transportert med brønnbåt og satt ut i en lukket merd på lokalitet Lamholmen.

Den 27. og 28. mai 2015 ble 1800 laks (889 ± 114 g, $41,6 \pm 2$ cm) tatt ut og fordelt på seks lukkede småskala merder på 30 m^3 , 300 individer i hver merd. 10. juni 2015 ble det påsatt to ulike strømhastigheter.

Fisken ble føret 5 ganger daglig ved hjelp av Betten feeders S1 (Betten Maskinstasjon AS, Norge) med 7 mm pellets fra Skretting AS.

Temperatur, oksygen, pH og saltholdighet ble målt med smarTROLL Multiparameter Handheld (In-Situ inc, USA) og OxyGuard CO₂ Analyzer (OxyGuard International A/S, Denmark). Sensorer var plassert på 2 meters dyp, 1 meter fra merdveggen.

Temperaturen i merd 2 i perioden 1. juni til 18. november 2015 varierte mellom minimumstemperatur på 8.7°C og maksimaltemperatur på 14.2°C (Figur 5).

Gjennomsnittstemperatur under forsøket var 10.85°C.

Gjennomsnittlig oppløst oksygen varierte i de seks merdene fra 87.2 % metning til 94.4%.

Oksygenivået var aldri under tålbart grense i forsøksperioden

Akkumulering av CO₂ og ammonium var moderat og langt under akseptabelt nivå gjennom forsøksperioden: pH>7,5 indikerer en CO₂- konsentrasjon under 3 mg/L og en maksimal TAN konsentrasjon på 0.7 mg/L, noe som svarer til mindre enn 1 µg NH₃-N/L.



Figur 5. Temperaturregistreringer i °C merd nr 2 perioden 1. juni til 18. nov 2015.

Merdene hadde kontinuerlig vannutskiftning, estimert vannutskiftningshastighet var 250-275 l/min for hvert bur. Fisketetthet var omtrent 9 kg/m³ ved starten av forsøket, og økte til omtrent 25 kg/m³ på slutten av forsøket.

2.2. Strømhastighet

Strømhastighet ble påsatt ved hjelp av horisontalt monterte innløpsrør og en ekstra ventil. Strømhastighet ble målt ukentlig ved hjelp av Flow Rate Sensor LQ2-LE, koblet til Labquest 2 (Vernier Software & Technology, US). Merd 2, 3 og 4 hadde lav strømhastighet og 5, 6 og 7 hadde høy strømhastighet, dvs 8 og 22 cm/s som tilsvarer 0.2 og 0.5 kroppslengde per sekund (KL/s) ved start av forsøket, og 0.1 og 0.4 KL/s ved forsøksslutt. Vann ble hentet fra 25 m dyp.

2.3. Prøveuttak

Det ble gjennomført tre prøveuttak for cathepsinanalyser og kvalitetsanalyser, ved oppstart 10. juni, midtuttak 25. august og sluttuttak 17. november 2015.

Fisken ble sultet 1 dag før hvert uttak.

Laks ble samlet inn med orkastnot, håvet ut og bedøvet med MS222 Tricaine methane sulphonate (50 mg/L). Det ga en innsovningstid på ca 1,5 til 2 minutter og samme lengde på oppvåkningstid.

All fisk ble veid ($\pm 1g$) og lengdemålt (± 0.5 cm) ved fordeling i merder 27.- 28. mai og ved avslutning 17. november. I midtuttaket 25. august ble 50 fisk per merd veid og målt. 15 fisk ble tatt ut fra hver merd til analyse av henholdsvis cathepsiner og kvalitet den 10. juni og 25.

august. På grunn av tekniske problemer ble merd 3 og 5 tatt ut av forsøket i oktober, og ved sluttuttak 17. november er kun fisk fra merd 2, 4, 6 og 7 veid og målt, samt tatt ut til enzym og kvalitetsanalyser (Tabell 1).

Tabell 1. Antall fisk analysert for henholdsvis cathepsinaktivitet og kvalitetsvariabler fra de ulike merdene for samtlige uttak og strømhastighet i hver enkelt merd.

Merd nr	Juni		August		November	
	Cathepsin	Kvalitet	Cathepsin	Kvalitet	Cathepsin	Kvalitet
2 (8 cm/s)	15	15	15	15	15	15
3 (8 cm/s)			15			
4 (8 cm/s)	15	15	15	15	15	15
5 (22 cm/s)			15			
6 (22 cm/s)	15	15		15	15	15
7 (22 cm/s)	15	15		15	15	15

2.4. Forberedelser grovlab Brønnøysund

De 15 fisk per merd til enzym og kvalitetsanalyser ble individuelt merket med sauemerke i gjellen, før gjellebue ble kuttet og fisken fikk blø i en halvtime i friskt sjøvann før sløying og vasking. Deretter ble de målt for lengde og vekt før fisken ble sløyd og kjønn registrert. Sløydvekt ble så registrert og fisken pakket i isoporkasser med is, før de ble sendt med Hurtigruta til Nord Universitet og plassert i et kjølerom i +4°C.

2.5. Forberedelser lab Nord Universitet

5 dager post mortem ble fisken filetert. Hele venstre filet ble brukt til analyse av filetspalting. Farge ble målt i Norsk kvalitetssnitt (NQC) fra venstre filet, og deretter ble to muskelblokker skjært ut for analyse av skjærekraft. NQC fra høyre side ble homogenisert i en foodprosessor og brukt til senere analyse av aktivitet av cathepsin B, B+L og H og kjemisk innhold av fett, protein og vann. Homogenisert fiskemuskelmasse ble frosset ned i zip-posere ved -80°C for senere enzymanalyser.

2.5.1. Filetspalting

Måling av filetspalting ble vurdert visuelt i hele fileten i henhold til Johnson et al. 2011. Måling ble gjort etter en skal fra 0-4.0: 0 er ingen spalting; 0.5 er 1-3 små spalter (<0.5 cm) i myoseptet; 1.0 er 4-6 små spalter; 1.5 er 7-9 små spalter eller 1-3 medium spalter (0.5-1.5 cm); 2.0 er >10 små spalter eller 4-6 medium spalter; 2.5 er 7-9 medium spalter eller 1-2 store spalter (>1.5 cm); 3.0 er >10 medium spalter eller 3-5 store spalter; 3.5 er >6 store spalter; og 4.0 er ekstrem spalting (myotomene faller fra hverandre).

2.5.2. Farge

Farge ble målt instrumentelt ved bruk av Spectrophotometer CM700d (Konica Minolta, Japan). Målingene ble utført på tre ulike plasser rett over lateral linje av NQC. Fargen ble karakterisert ved å bruke L a b systemet der L* variabelen representerer lyshet (L*=0 for svart, L*=100 for hvit), a* representerer rød/grønn (a* positiv representerer rød farge og a* negativ representerer grønn farge), og b* representerer gul/blå (henholdsvis positiv og negativ).

2.5.3. Tekstur

Til å måle tekstur ble det brukt en TA-XT2 PLUS texture analyzer med Texture Expert Exceed 2.52 software (Stable Micro System, England) som var utstyrt med Warner-Bratzler skjæreblad (Zwick, USA). Teksturanalysene ble utført i duplikater. En bit på 25x25x10 mm ble skåret ut av fileten med kniv. Skjærebladet på 3x70 mm ble presset ned på muskelbiten i 90° vinkel. Hastigheten på skjærebladet var konstant på 1 mm/s og skar 120 % gjennom biten. Maksimal skjærekraft ble målt i Newton.

2.5.4. Vann

Vanninnhold ble funnet ved å tørke homogenisert muskelmasse. Aluminiumsbeger ble merket og veid før muskel (5 g ± 0.05 g) ble veid opp i samme beger. Prøven ble tørket i ovn på 105 °C i 20 timer. Prøven ble etter dette veid på nytt for å finne tørrvekt. Vanninnhold ble funnet ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Vanninnhold (\%)} = \frac{\text{Våtvekt} - \text{Tørrvekt}}{\text{Våtvekt}} \times 100$$

2.5.5. Protein

Proteininnhold ble funnet ved hjelp av Kjeldahls metode. Homogenisert muskelmasse ble veid opp (1 g ± 0.05 g) på nitrogenfritt veiepapir (Kjeltec weighing boat) (GE Healthcare life science whatman, UK) og overført til store prøverør. 2 Kjeltabs etterfulgt av 15 ml konsentrert svovelsyre (98%) ble tilsatt hvert prøverør under avtrekksskap. Prøvene ble kokt i 45 minutter på Foss Tecator 2020 digestor (Foss Analytical AB, Sweden) kokeblokk på 420°C. 75 ml destillert vann ble tilsatt etter at tubene var avkjølt. Laksens proteininnhold ble analysert i Kjeltec 2300 (Foss Analytical AB, Sweden) ved bruk av en faktor på 6.25.

2.5.6. Fett

Fettinnholdet ble funnet ved å ekstrahere ut fettene med etylacetat. Homogenisert fiskemuskel (5 ± 0.05 g) ble veid inn og overført til porselensmorter sammen med 20 g vannfritt natriumsulfat. Dette ble blandet sammen og overført til en 100 ml glassflaske med tett lokk, og tilsatt 50 ml etylacetat. Glassflasken stod til ekstrahering på ristebord i 1 time. I avtrekksskap ble 20 ml av prøven filtrert gjennom et filter (12-15 μm) (VWR international, Belgium) til en målesylinder. 20 ml filtrat ble pipettert til en inndampningsskål, inndampet på vannbad 100°C i 15-20 minutter, tørket tørkeskap ved 105°C i 15-20 minutter før den ble avkjølt i eksikator og veid. Fettinnhold ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\text{Fettinnhold}(\%) = \frac{10300 \times \text{inndampet}(\text{g})}{(40 - 2.17 \times \text{inndampet}(\text{g})) \times \text{innveid}(\text{g})}$$

2.6. Enzymanalyser cathepsin B, B+L og H

Analysene ble gjennomført etter prosedyrer utarbeidet av Ørjan Hagen (Hagen et al., 2008), som er en modifisert metode etter Barrett & Kirschke (1981). Dette er en indirekte metode hvor man måler enzymaktiviteten som mengden akkumulert produkt i løpet av inkuberingen. Produktet er AMC, cyclohexanamine. Alle substratene har samme AMC-gruppe, men ulike bindingssteder, og er enzymspesifikke.

2.6.1. Enzym ekstraksjon

Homogenisert muskel av laks ($1 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$) ble veid opp i 10 ml plasttuber. Det ble tatt parallelle prøver av hver fisk. Prøvematerialet ble holdt på is gjennom hele analysen for å hindre at temperatur påvirker enzymaktiviteten. Muskelen ble videre homogenisert med 5 ml kald ekstraksjonsbuffer (50 mM NaOAc, pH 5.0 1 mM Na_2EDTA , 100 mM NaCl, 0.2% Tween 20 eller CHAPS w/v) i til sammen 30 sekunder i en Polytron PT 1200 (Kinematica AG, Luzern, Sveits). Ekstraksjonsbuffer ble tilsatt og muskelmassen homogenisert i to omganger; 2,5 ml og 15 sekunder hver gang. 1.5 ml av den ekstraherte fiskemuskelen ble overført til gjennomsiktige eppendorfrør. Prøvene fikk hvile på is i 10 minutter før sentrifugering i 30 min ved 20.000g i 4°C . Lipidlaget på toppen av prøven ble fjernet ved hjelp av vakuüm. 0.6 ml supernatant, væsken som var igjen etter sentrifugering og som inneholdt de vannløselige proteinene, ble pipettert ut og fordelt i to nye eppendorfrør for videre analyser. Første 0.3 ml gikk til hovedprøven for analysen. Den sekundære pipetteringen av 0,3 ml gikk til en *back-up*.

Prøvene ble frosset ned i -80°C for senere spektrofotometrisk enzymanalyse.

2.6.2. Spektrofotometrisk enzymanalyse

Enzymene ble aktivert med assay buffer (Tabell 2). 975 µl assay buffer og 25 µl supernatant ble tilsatt hver kuvette og fikk hvile i to minutter før 1000 µl substrat (Tabell 3) for det respektive enzymet som skulle analyseres ble tilsatt. Hver fisk ble analysert i duplikater og analysert for henholdsvis for cathepsin B, B+L og H. Ferdig laget assaybuffer og substrat ble holdt i vannbad på 30°C.

Tabell 2. Sammensetning og pH for cathepsin B, B+L og H assay buffer.

Cathepsin B (pH 6.6)	Cathepsin B+L (pH 6.0)	Cathepsin H (pH 6.6)
200 mM Na-phosphate	200 mM NaOAc	200 mM Na-phosphate
2 mM Na ₂ EDTA	2 mM Na ₂ EDTA	2 mM Na ₂ EDTA
0.05% Tween-20	0.05% Tween-20	0.05% Tween-20
4 mM DTT*	4 mM DTT*	4 mM DTT*

*DDT tilsettes ferskt rett før bruk.

Tabell 3. Sammensetning enzymspesifikke substrater.

Enzym	Substrat
Cathepsin B	benzyloxycarbonyl-Arg-Arg-7-(4-methyl)coumaryl-amide FW 621.7 (25 mg in 4.02 ml DMSO)
Cathepsin B+L	benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-7(4-methyl)coumaryl-amide FW (5 mg in 3.85 ml DMSO, 10 mM løsning)
Cathepsin H	H ₂ N-Arg-7-(4-methyl)coumaryl-amide. FW 331.4 (5 mg in 1.51 ml DMSO)

Analysene ble utført i en fluoresserende spektrofotometer av typen VARIAN CoryEclipse Fluorescence Spectrophotometer (Holger, Oslo, Norge/Agilent Technologies, USA). Kuvetter med magnetblander ble plassert i spektrofotometeret. Temperaturen var 30°C, innstilling for *excitation* og *emission wavelength* var henholdsvis 380 og 460 nm. Innstilling for *Excitation* og *emission slit gap* var 15/10 nm. Varighet på analysen var satt til 2 minutter med data intervall på 0.10 min. Responsvidde var 0.5 min.

Resultatene ble avlest fra programvare. Cathepsinaktiviteten var oppgitt i mmol av 7-amino-4-methylcoumarin, AMC, per min per gram våt masse; en enhet av enzymaktivitet er definert som mengden som hydrolyserer 1 mmol av substrat per minutt ved 30°C.

2.7. Statistiske analyser

For statistiske analyser ble SPSS Statistics 24 (IBM, 2016) benyttet, og figurer som omhandler data er prosessert i Excel (Microsoft, 2013). Datamaterialets gjennomsnittsverdier med tilhørende standardavvik ble beregnet. Ekstremverdier ble sortert ut av datamaterialet

ved hjelp av explore-funksjon i SPSS. Data i figurer og tabeller vises som gjennomsnitt \pm standardavvik.

Datamaterialet ble analysert for normalitet ved bruk av Kolmogorov-Smirnov og Shapiro-Wilk test. Homogenitet i varians mellom grupper ble testet ved bruk av Levenes test som er en parametrisk test. Dersom verdiene i gruppen ikke var normalfordelt og det var ulik varians mellom gruppene (signifikant ulikhet), ble det kjørt en ikke-parametrisk Mann-Whitney U Test.

Enveis variansanalyse (ANOVA) ble brukt for å teste eventuelle forskjeller mellom lav og høy strømhastighetsgruppene.

Pearsons korrelasjonstest er benyttet for å finne om det er korrelasjon mellom enzymaktivitet og vekt og lengde, tekstur, filetpalting, farge og vann-, protein- og fettinnhold.

Signifikansnivå var satt til $p \leq 0.05$ for alle testene.

3.0. Resultater

3.1. Vekt og lengde

Det ble funnet signifikante forskjeller ($p < 0.001$) for vekt i siste uttak. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller for lengde (Tabell 4).

Tabell 4. Gjennomsnittlig vekt (g) og lengde (cm) for laks som har gått under henholdsvis lav og høy strømhastighet, tatt ut 27.-28. mai ($n=1800$), 26. august ($n=300$) og 17. november ($n=865$). a og b indikerer signifikante forskjeller mellom vekst på høy og lav strømhastighet på 0.001 nivå.

	Mai		August		November	
	Vekt	Lengde	Vekt	Lengde	Vekt	Lengde
Lav	884 ± 112	41.5 ± 1.6	1395 ± 280	48.6 ± 2.7	2782 ± 547 ^a	58.9 ± 3.8
Høy	893 ± 115	41.8 ± 2.4	1442 ± 260	49.1 ± 2.3	2996 ± 567 ^b	58.7 ± 4.8

I mai var gjennomsnittlig vekt (g) og lengde (cm) for hele uttaket sammenslått 889 ± 114 og 41.6 ± 2.0, og tilsvarende sammenslåtte data i november var 2892 ± 567 og 58.8 ± 4.3.

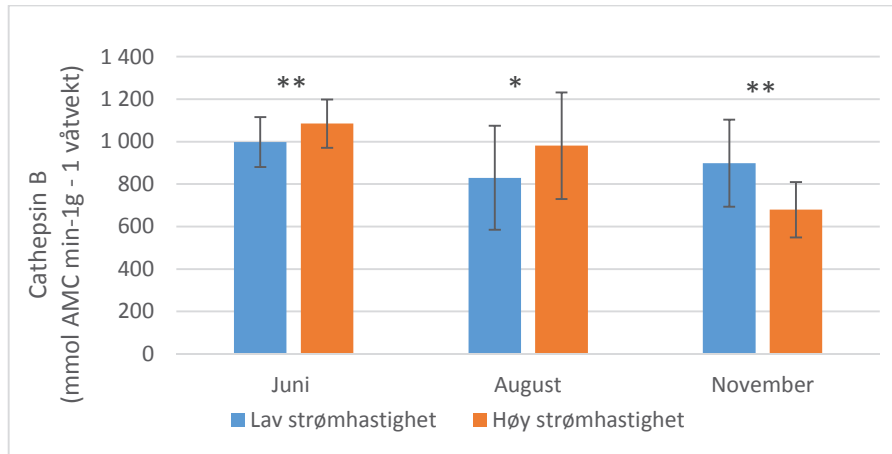
3.2. Cathepsinaktivitet

For cathepsin B var det totale gjennomsnittet for hvert uttak 1040 ± 123 i juni, 868 ± 254 i august og 779 ± 203 mmol AMC min⁻¹ g⁻¹ i november. Cathepsin B+L hadde en gjennomsnittlig enzymaktivitet på 563 ± 110 i juni, 427 ± 140 i august og 377 ± 93 i november. Cathepsin H hadde en gjennomsnittlig enzymaktivitet på 319 ± 116, 331 ± 229 og 230 ± 131 for henholdsvis juni, august og november (Tabell 9 a, b og c, i vedlegg).

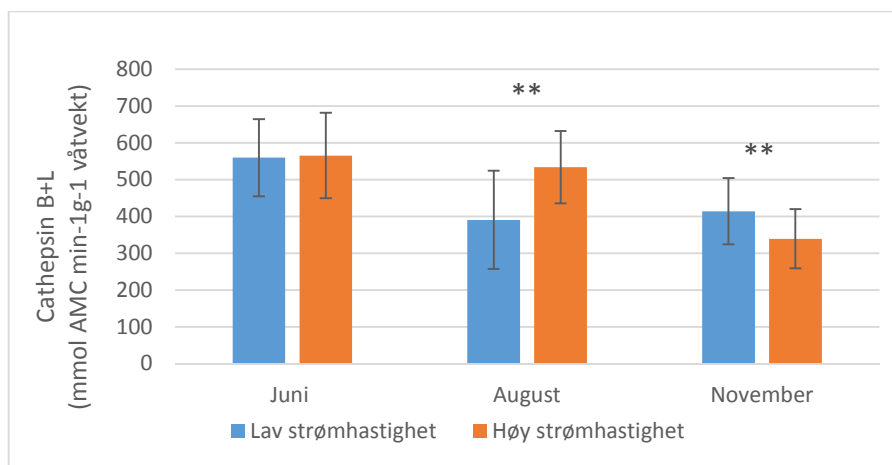
Gjennomsnittlig aktivitet sank for alle de tre cathepsinene utover i forsøket. Prosentvis nedgang for aktiviteten av cathepsin B, B+L og H var henholdsvis 25.1 %, 33.0 % og 27.9 % fra juni til november. I august hadde høyhastighetsgruppa signifikant høyere aktivitet for cathepsin B og B+L sammenlignet med lavhastighetsgruppa. I november var det motsatt, alle cathepsinene hadde signifikant lavere cathepsinaktivitet i høyhastighetsgruppa (Figur 6 a, b og c). Cathepsinaktiviteten var høyest i lavhastighetsgruppa ved slutten av forsøket.

Prosentvis nedgang i enzymaktivitet fra lavhastighetsgruppen til høyhastighetsgruppen i november var 28.1 %, 17.9 % og 35 % for henholdsvis cathepsin B, B+L og H.

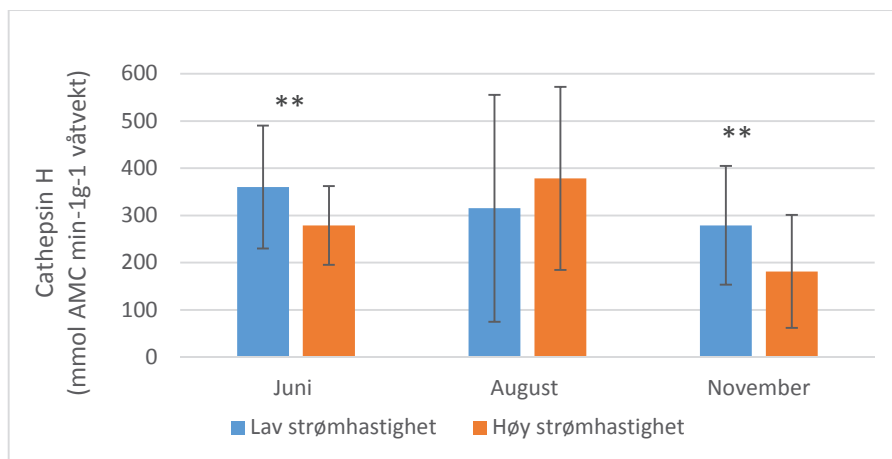
a)



b)



c)



Figur 6. Gjennomsnittlig aktivitet av cathepsin B (a), B+L (b) og H (c) målt i tre ulike uttak gjennom forsøksperioden. Blå søyle illustrerer gjennomsnittverdier ved lav strømhastighet og rød søyle illustrerer gjennomsnittverdiene ved høy strømhastighet. Standardavviket er også illustrert. * indikerer om det er signifikante forskjeller mellom cathepsinaktivitet på høy og lav strømhastighet på henholdsvis 0.01-nivå (**) og 0.05-nivå (*).

Det ble funnet signifikant positiv korrelasjon mellom aktiviteten til cathepsinene B, B+L og mellom H ($p < 0.01$) (Tabell 5).

Tabell 5. Korrelasjonskoeffisienter mellom aktivitet av cathepsin B, B+L og H sammenslått alle uttak ($n=180$). Signifikant sammenheng på 0.01-nivå er markert med **.

	Cathepsin B	Cathepsin B+L	Cathepsin H
Cathepsin B	1	,377**	,362**
Cathepsin B+L	,377**	1	,232**
Cathepsin H	,367**	,232**	1

3.3. Korrelasjoner mellom cathepsin og utvalgte kvalitetsvariabler

3.3.1. Korrelasjoner mellom cathepsinaktivitet og vekt og lengde

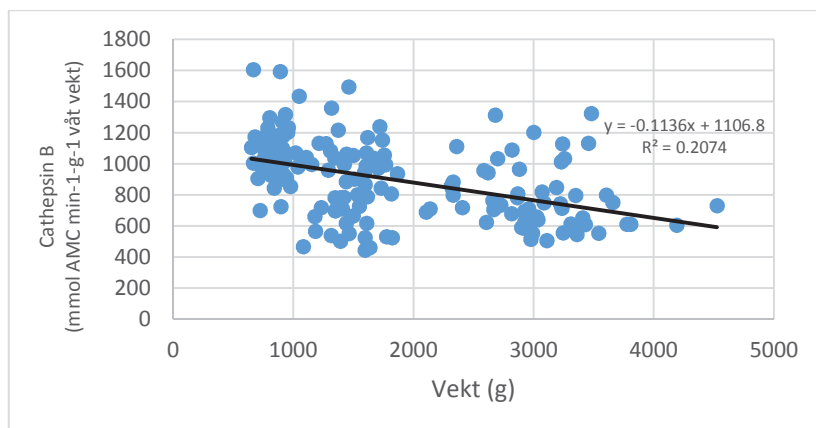
Enzymaktiviteten og vektregistreringene for uttakene i hele forsøksperioden viser en tydelig sammenheng mellom aktivitet og vekt for samtlige cathepsiner (Figur 7 a, b og c). Det er signifikant korrelasjon mellom fiskestørrelse og enzymaktivitet (Tabell 6). Alle enzymene, cathepsin B ($r = -0.549$, $p < 0.01$), B+L ($r = -0.485$, $p < 0.01$) og H ($r = -0.247$, $p < 0.01$), viste negativ korrelasjon med fiskestørrelse. Liten fisk har større enzymaktivitet enn stor fisk.

Det ble gjort tilsvarende funn for enzymaktivitet og lengde. Enzymene viste negativ korrelasjon med lengde, og kort fisk har større enzymaktivitet enn lang fisk (Tabell 6).

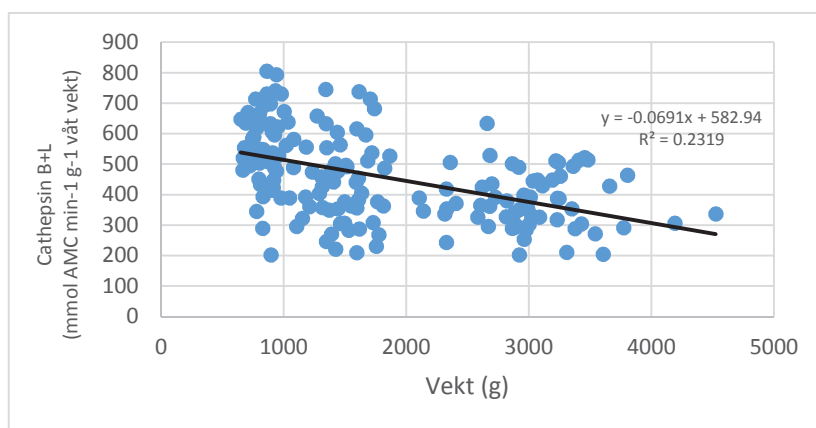
Tabell 6. Korrelasjonskoeffisient mellom aktivitet av cathepsin B, B+L og H og vekt/lengde ($n=150$). Signifikant sammenheng på 0.05-nivå er markert med *, og signifikant sammenheng på 0.01-nivå er markert med **.

	Cathepsin B	Cathepsin B+L	Cathepsin H
Vekt	-,549**	-,485**	-,247**
Lengde	-,526**	-,516**	-,240**

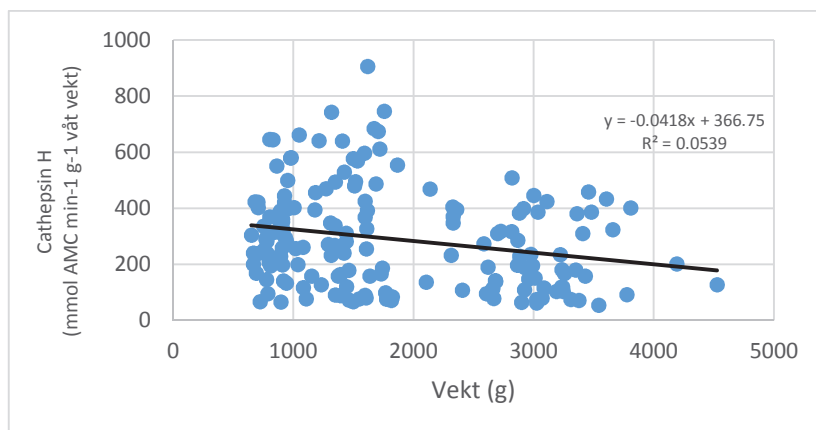
a)



b)



c)



Figur 7. Sammenhengen mellom aktivitet av cathepsin B (a), B+L (b) og H (c), og vekt med trendlinje alle tre uttak (n=180) sammenslått. Halvparten av fisken i uttak i august er ikke de samme individer. Formel for trendlinja og R-kvadrert verdi er vist i diagrammet.

3.3.2. Korrelasjoner mellom cathepsinaktivitet og tekstur/filetspalting

Det ble ikke funnet signifikant sammenheng mellom enzymaktivitet og tekstur (n=90), men det ble funnet signifikant positiv forskjell mellom filetspalting og aktivitet for alle cathepsinene (n=150). Cathepsin B (r= 0.311, p<0.01), B+L (r= 0.375, p<0.01) og H (r = 0.185, p<0.05) viste positiv korrelasjon med filetspalting. Fisk med mye spalting har større enzymaktivitet enn fisk med lite spalting.

3.3.3. Korrelasjoner mellom cathepsinaktivitet og farge

Det ble ikke funnet signifikant korrelasjon mellom enzymaktivitet og L- verdi.

Det ble imidlertid funnet signifikant negativ korrelasjon mellom enzymaktivitet og a*- verdi (rødhet) og b*- verdi (gulhet) (Tabell 7).

Tabell 7. Korrelasjonskoeffisienter mellom aktivitet av cathepsin B, B+L og H og farge målt som L-, a*- og b*- verdier (n=150). Signifikant sammenheng på 0.05- nivå er markert med *, og signifikant sammenheng på 0.01- nivå er markert med **.

	Cathepsin B	Cathepsin B+L	Cathepsin H
L-verdi	0.064	0.027	0.031
a*-verdi	-,421**	-,457**	-,182*
b*-verdi	-,290**	-,230**	-,217**

3.3.4. Korrelasjoner mellom cathepsinaktivitet og vann-, protein- og fettinnhold

Det ble funnet en sammenheng mellom cathepsinaktivitet og innhold av vann, protein og fett. Cathepsinaktiviteten var positivt korrelert mot vann (p<0.01) (Tabell 8). Enzymaktiviteten øker med økende vanninnhold. Cathepsin B og B+L viste positiv korrelasjon mot protein (p<0.01), men det ble ikke funnet korrelasjon mellom cathepsin H og protein. Aktiviteten av cathepsin B og B+L øker med økende proteininnhold. Det ble funnet negativ korrelasjon mellom aktiviteten av alle cathepsinene og fett (p<0.01). Cathepsinaktiviteten synker med økende fettinnhold.

Tabell 8. Korrelasjonskoeffisienter mellom aktivitet av cathepsin B, B+L og H, og vann-, protein- og fettinnhold (n=150). Signifikant sammenheng på 0.01-nivå er markert med **.

	Cathepsin B	Cathepsin B+L	Cathepsin H
Vann	,461**	,321**	,297**
Protein	,366**	,494**	0.091
Fett	-,480**	-,388**	-,289**

3.3.5. Korrelasjoner mellom cathepsinaktivitet og kjønn

Det ble ikke funnet signifikant korrelasjon mellom aktiviteten av cathepsin B og B+L og kjønn. Cathepsin H viste en negativ korrelasjon med kjønn ($r = -0.181$, $p < 0.05$, $n = 150$), noe som betyr at aktiviteten av cathepsin H er noe høyere i hunnfisken.

4.0. Diskusjon

Når strømhastigheten øker må fisken svømme tilsvarende hurtigere for å opprettholde sin posisjon og unngå å havne i karveggen (D. Johansson et al., 2014). Det kan være vanskelig å få til lik strøm i hele merden (Solstorm et al., 2015) og i sirkulære kar kan vannstrømmen være hele tre ganger høyere mot karveggene enn i senter (Duarte et al, 2011). Solstorm et al. (2015) anser lengdestrømsrenner å gi et mer korrekt bilde av faktisk strømhastighet og en jevnere strømhastighet i enheten. Vanskeligheter med å måle homogeniteten i vannstrømmen og faktisk svømmehastighet i sirkulære kar kan derfor forklare hvorfor det finnes sprikende resultater i litteraturen.

Våre funn med høyere vekst med økt strømhastighet er i samsvar med flere andre studier (Bugeon et al. 2003, Lefevre, & Fauconneau, 2003; Castro et al., 2011; Christiansen & Jobling, 1990; Davison, 1997; Totland et al., 1987). Yngel av Atlantisk laks er funnet å ha best tilvekst på svømmehastighet tilsvarende 1.5 KL/s (Jørgensen & Jobling, 1993). For pre-smolt fant Castro et al (2011) 20% økt vekst når laksen måtte svømme kontinuerlig eller i intervaller i hastigheter tilsvarende 0.8-1.0 KL/s sammenlignet med kontrollgruppen (0.05 KL/s). Solstorm et al. (2015) fant maksimal vekst på svømmehastigheter tilsvarende 0.8 KL/s hos post-smolt av Atlantisk laks i forhold til referansegruppen (0.2 KL/s). Ved høyere svømmehastigheter (1.5 KL/s) ble veksten redusert.

For ørret (*Salmon gairdneri*) er det funnet at maksimal tilvekst var ved svømmehastighet tilsvarende 1 KL/s (Walker & Emerson, 1978). Svømmetrening gir også en mer robust fisk, og en robust fisk vokser bedre (Castro et al., 2011). Økt svømmehastighet er vist å gi mindre aggresjon (East & Magnan, 1987) og agonistisk oppførsel krever mer energi (Adams et al., 1995). Dette kan forklare noe av den økte veksten ved økt strømhastighet. I tillegg bidrar svømmetrening til bedre fôrutnyttelse og at appetitten øker slik at fisken spiser mer (Davison 1989 referert i Davison, 1997).

En annen studie viste at høyere strømhastighet i 8 mnd hadde betydelig effekt på vekst og muskelsammensetning hos Atlantisk laks. Økt strømhastighet ga en vektøkning på nesten 40% i forhold til referansegruppen. Måling av fiberstørrelse i rød og hvit muskulatur viste at den største forskjellen i vekst fantes i hvit muskulatur (Totland et al., 1987). Dette kan være en medvirkende årsak til at svømmetrening gir økt vekst. Det er lite informasjon som forklarer mekanismene som bidrar til at svømmetrening gir økt vekst, men kvantitative og kvalitative endringer i muskulaturen bidrar til denne veksten (Palstra & Planas, 2011).

Svømmetrening er vist å gi hypertrofi av muskelceller (Davison, 1997; Totland et al., 1987), men det er usikkert om det også kan bidra til hyperplasi.

For å oppnå maksimal effekt på tilvekst med svømmetrening er det viktig at fisken ikke blir overtrent og det er en øvre grense for når økt strømhastighet går på bekostning av fiskevelferd og vekst (Davidson & Goldspink, 1977; East & Magnan, 1987; Farrell et al., 1991; Jørgensen & Jobling, 1993; Solstorm et al., 2015). Overtrening fører til høyt energibruk som gjør at fisken ikke klarer å opprettholde vekst, energien brukes til å opprettholde svømmehastigheten (Solstorm et al., 2015).

Våre resultater ga høyest vekst ved 0.5 KL/s, og sett i lys av andre arbeider er det kanskje sannsynlig at optimal svømmehastighet for stor Atlantisk laks ligger mellom 0.5 og 1.0 KL/s.

I vårt prosjekt fant vi lavere cathepsinaktivitet i høyhastighetsgruppa enn i lavhastighetsgruppa i november (23 uker etter forsøksstart). Tatt i betraktning at cathepsin B og L antas å være de viktigste bidragsgyterne til degradering av protein i fiskemuskel (Delbarre-Ladrat et al., 2006), at proteolytiske enzymer påvirker tekstur (Bahuaud et al., 2008; Chéret et al., 2007; Larsson et al., 2012) og at svømmetrening antas å ha positiv effekt på tekstur (Totland et al., 1987) var det forventet å finne lavere aktivitet av cathepsin B og B+L i høyhastighetsgruppen enn i lavhastighetsgruppen. Det har ikke lyktes å finne tilsvarende studier som kan legges til grunn som direkte forklaring, men det kan stilles spørsmål om våre funn kan skyldes at trening medfører lavere produksjon av cathepsin, eller om muskulaturen blir mindre tilgjengelig for proteolytisk nedbrytning når den er veltrent. I følge Yates et al. (1983) kan enzymaktivitet påvirkes av forandringer i pH og intramuskulær ionestyrke i muskelen post mortem, eller av at pH og endringer i ionestyrke former myofibrillproteinene på en måte som gjør de mer mottakelig for proteolytisk kutting. I følge Hagen et al. (2008) er ikke de biologiske faktorene som fører til økt cathepsinaktivitet kjent, men det kan komme av en økning i aktivering og sekresjon av cathepsin proenzymer som er lagret i lysosomene, økt transkripsjon, redusert mengde inhibitorer i muskulaturen eller en kombinasjon av disse. Nomata et al. (1985) rapporterte om en senking av spesielle inhibitorer for blant annet calpainaktivitet i muskulaturen hos kjønnsmoden ketalaks i sammenlignet med umoden laks, og det kan stilles spørsmål om de samme faktorene kan påvirke cathepsinaktiviteten. Det er mulig at pH også påvirker dannelsen av enzymer (Olsson et al., 2003), og at muskelstrukturen endres av trening slik at den blir mindre tilgjengelig for proteolytisk nedbrytning.

Cathepsinaktiviteten korrelerer med fiskestørrelse i vår studie, og en årsak til at vi så lavere cathepsinaktivitet i høyhastighetsgruppa kan være at denne fisken er større. At fisk som tvinges til å svømme hurtigere har lavere cathepsinaktivitet kan skyldes at den vokser raskere, er mindre aggressiv eller at fisken er så opptatt av å bygge muskler at andre metabolske aktiviteter overstyres, eller en kombinasjon av disse. Cathepsinanalyser av de ulike uttak viser også at aktiviteten reduseres for alle enzymene mot slutten av forsøket. Det kan forklares med at fisken vokser da større fisk har lavere enzymaktivitet.

Cathepsin H er ansett å være ubetydelig i fiskemuskel (Chéret et al., 2007), og det var ikke forventet å finne særlig aktivitet av denne, eller forskjell mellom gruppene på høy og lav strømhastighet. Det fantes likevel forskjell i aktivitet av cathepsin H.

Bahuaud et al. (2008) fant signifikant korrelasjon mellom enzymaktivitet av cathepsin B og L og degradering av muskel hos Atlantisk laks og Delbarre-Ladratt et al. (2006) antok at cathepsin B og L var de viktigste bidragsgyterne til proteinnedbrytning i fiskemuskel. Det var derfor forventet å finne sammenheng mellom tekstur og cathepsinaktivitet i vårt prosjekt, men resultatene viser ingen slik sammenheng. Datagrunnlaget for korrelasjonstesten mellom tekstur og enzymaktivitet var mangelfullt og kan være en medvirkende årsak til at denne forventede sammenheng ikke fantes. I en studie for å finne effekten av svømming på muskulatur på torsk *Gadus morhua*, ble det riktignok ikke gjort funn som tilsa at svømming hadde effekt på tekstur, men forfatterne konkluderte med at svømmehastigheten burde økes for å finne en effekt av svømming på tekstur (Bjørnevik et al., 2003).

Svømmetrening kan som tidligere nevnt redusere aggresjon (East & Magnan, 1987) og stress (Boesgaard et al., 1993), og stress kan medføre høyere enzymaktivitet post mortem (Bahuaud et al., 2010). Dette kan også være en medvirkende årsak til at svømmetrening påvirker tekstur og viser at ulik behandling av levende fisk påvirker enzymaktiviteten etter død. Det synes som at de lysosomale cyteine cathepsinene i fisk er mest aktive etter at fisken er død. Fisken bruker cathepsiner i levende live når de trenger tilgang på egne muskelproteiner i forbindelse med oppbygging av gonader (Shahidi & Botta, 1994) eller ved dårlig tilgang på mat (sulteperioder). Det er derfor liten grunn til at disse enzymene blir aktivert i den levende fisken i vårt forsøk ettersom det å svømme under disse strømhastigheter gir ikke behov for mer tilgang på muskelprotein.

Larsson et al 2012 analyserte genuttrykk for utvalgte proteaser i laks som hadde varierende tekstur fra veldig bløt til fast. De fant positiv korrelasjon mellom fasthet i tekstur og økt genuttrykk for cathepsin H og C.

Det ble funnet positiv korrelasjon mellom filetspalting og enzymaktivitet i vårt prosjekt. I følge Mørkøre (2008) har filetspalting ofte sammenheng med tekstur, men ikke alltid. Det er foreslått at filetspalting post mortem kan relateres til aktiviteten av et annet proteolytisk enzym, metallo kollagenase (Ando et al., 1995), men de underliggende årsakene til at filetspalting oppstår er fortsatt ikke fullt ut forstått. Andre påvirkningsfaktorer er temperatur, grundig rengjøring av bukhalen (Jacobsen et al., 2015) og fileteringsmetode og det er en forutsetning at alle individene er filetert likt for å kunne utelukke at resultatene er påvirket av håndtering. Fletcher et al (1997) fant ikke signifikant forskjell i filetspalting hos kongelaks mellom gruppen som hvilte og de som trente.

Andersen et al 1997 refererer til en tidligere studie de har gjennomført i 1994 hvor det ble funnet en sammenheng mellom spalting og proteininnhold; fileter uten spalting hadde signifikant høyere proteininnhold enn fileter med spalting.

I denne oppgaven ble det funnet positiv korrelasjon mellom aktivitet av cathepsin B og B+L og proteininnhold, og mellom aktivitet av samtlige cathepsiner og vanninnhold. Det trenger ikke å bety at proteininnholdet er avhengig av enzymaktiviteten, men samvariasjonen kan skyldes andre årsaker. Det ble funnet negativ korrelasjon mellom enzymaktiviteten og fettinnhold. Sammenhengen mellom cathepsinaktivitet og fett kan skyldes at stor fisk inneholder mer fett og i vår studie hadde den største fisken lavere enzymaktivitet. Mye fett gir plass til mindre vann og proteiner og kan forklare hvorfor det var positiv korrelasjon mellom cathepsinaktivitet og protein- og vanninnhold.

Våre funn med positiv korrelasjon mellom cathepsinaktivitet og vanninnhold kan forklares med at myofibrillenes struktur er viktig for vannbindingsevnen (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005), og det er sannsynlig at degradering av myofibriller vil påvirke vannbindingsevnen og muligens forårsake lekkasje av væske fra muskelvev, spesielt under prosessering. Både cathepsin B, L og H kan degradere strukturelle muskelproteiner som myofibriller (Aoki & Ueno, 1997; Okitani et al., 1980) og kan derfor potensielt påvirke vanninnholdet i fiskemuskel.

Solstorm et al (2015) fant at lav svømmehastighet kan gi høyere fettinnhold og lavere proteininnhold i fiskemuskel enn moderat til hurtig svømmehastighet. Dette kan forklares

med Farell et al (1991) og Lauff og Wood (1996) sine funn om at økt svømmetrening ga økt fettforbrenning hos trent regnbueørret. Houlihan & Laurent (1987) fant at økt svømmehastighet ga økt proteininnhold i fiskemuskelen.

I vårt prosjekt ble det funnet en negativ korrelasjon mellom enzymaktiviteten og rødheten og gulheten i fiskemuskelen, altså økt enzymaktivitet i fileter med mindre grad av rødhet og gulhet. Cathepsiner er funnet å bidra til utvikling av blakket farge i Atlantisk kveite (Hagen, 2011). De viktigste proteolytiske enzymene, som cathepsiner (B, B+L, D og H) og calpainer bryter ned viktige strukturelle proteiner som myosin, troponin, tropomyosin, kollagen, desmin, dystrophin, tubulin og titin (Aoki & Ueno, 1997; Delbarre-Ladrat et al., 2004; Yamashita & Konagaya, 1991), proteiner som også trolig bidrar til blank gjennomskinnelig farge (Hagen, 2011). Robb et al (2000) fant at slaktemetode kan påvirke farge i muskel hos regnbueørret, og foreslår at endring i farge skyldes endringer i muskelstrukturen. Filetering pre rigor i stedet for post rigor har vist at muskelen får sterkere rødfarge (Einen et al., 2002). Rigor fører til en bløtere tekstur (Ayala et al., 2010) og filetoverflaten er viktig for refleksjon av farge. Forklaringen kan være at når økt enzymaktivitet fører til mer proteinnedbrytning påvirker dette hvordan fargen oppfattes. Det kan være en medvirkende årsak til at vi fant negativ korrelasjon mellom rødhet og gulhet og enzymaktiviteten i vårt prosjekt.

Samvariasjonen vi fant mellom farge og cathepsinaktivitet kan også skyldes variasjon i fett- og proteininnhold i fiskemuskelen. Avsetning av astaxanthin hos Atlantisk laks er funnet å avhenge av flere faktorer, blant annet fettinnhold i fôret (Torrissen, 1985). Farge på fileten avhenger også av tettheten på muskelfibrene; Mange små muskelfiber gir en kraftigere visuell rødfarge i laksefisk (Johnston et al., 2000). Det er også gjennomført studier som ikke finner denne sammenhengen mellom fibertetthet og rødfarge (Sigurgisladottir et al., 2001).

I forhold til andre studier på strømhastighet og påvirkning fiskemuskulatur er det brukt høyere strømhastigheter. I dette forsøket tilsvarte høy strømhastighet (22 cm/s) 0,5 KL/s. Den vokste i løpet av forsøksperioden og faktisk svømmehastighet var enda lavere ved forsøkets slutt (0.4 KL/s). I tillegg er fisken i forsøket stor i forhold til andre forsøk, og det er mulig mindre fisk påvirkes sterkere av ulike svømmehastigheter enn stor fisk. Plasma kortisol brukes som indikator på stress i fisk (Gall & Pickering, 1992) og stress har forårsaket en økning i plasma kortisol i flere fiskearter som ørret og Atlantisk laks (Thomas et al., 1999), regnbueørret (Lefèvre et al., 2008) og sea bream (Lupatsch et al., 2010). Boesgaard et al (1993) fant at mengden plasma kortisol hos Atlantisk laks ble redusert når svømmehastigheten økte fra umålbart til 0.5 KL/s. Dette betyr at selv om det i vårt prosjekt var relativt lav strømhastighet

selv for høyhastighetsgruppa i forhold til andre studier, var strømhastigheten likevel stor nok (0.5 KL/s) til å kunne påvirke stress, og resultatene viser signifikante forskjeller mellom høy og lav strømhastighetsgruppene

Bedøvelsesmetode før slakt har også vist å gi utslag på flere av kvalitetsparameterne, som tekstur, farge og vannbindingsevne, og den underliggende årsaken er trolig hvor stressa fisken blir med ulike bedøvelsesmetoder og dermed påvirker pH i muskel (Kiessling et al., 2004). Kvalitet på oppdrettsfisk er også sesongavhengig og varierer med årstid (Olsson et al., 2003), og proteininnhold og peptidaseaktivitet kan variere med miljøforhold og fysiologiske faktorer (Delbarre-Ladrat et al., 2006). Forskjeller i filetpalting relateres også til sesong (LavÉTy et al., 1988). Forskjellene er imidlertid små (Espe et al., 2004), men det kan tenkes at kvalitet fra juni til november også kan påvirkes av sesong.

5.0. Konklusjon

Forsøket viser at stor laks som svømmer i høy strømhastighet på 22 cm/s etter 23 uker har lavere aktivitet av cathepsin B, B+L og H enn laks som svømmer i lav strømhastighet på 8 cm/s i samme periode. Høy strømhastighet ga også 8% høyere vekt sammenlignet med lav strømhastighet. Stor laks har lavere cathepsinaktivitet enn mindre fisk. I tillegg viser forsøket at det var positiv korrelasjon mellom cathepsinaktivitet og filetspalting, vanninnhold og proteininnhold. Det var negativ korrelasjon mellom cathepsinaktivitet a*- og b*-verdier og fettinnhold.

6. Litteraturliste

- Aadland, C. (2015). Se alt de gjør for å få lukket fisken i sjøen, *Sysla*. Hentet fra sysla.no/2015/10/27/havbruk/se-alt-de-gjor-for-a-fa-lukket-fisken-i-sjoen-inne_64598/
- Adams, C. E., Huntingford, F. A., Krpal, J., Jobling, M. & Burnett, S. J. (1995). Exercise, agonistic behaviour and food acquisition in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Environmental Biology of Fishes*, 43(2), 213-218.
- Ahimbisibwe, J. B., Inoue, K. & Aoki, T. (2010). Detection of cathepsin L in red cell membranes from fish blood. *Original Article Chemistry and Biochemistry, Fisheries Science*(76), 155-159.
- Ahmed, Z., Donkor, O., Street, W. A. & Vasiljevic, T. (2015). Calpains- and cathepsins-induced myofibrillar changes in post-mortem fish: Impact on structural softening and release of bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 130-146. doi: 10.1016/j.tifs.2015.04.002
- Akvakulturloven, LOV-2005-06-17-79 (2005). Hentet fra lovdata.no/dokument/NL/lov/2005-06-17-79
- Andersen, U. B., Thomassen, M. S. & Rørå, A. M. B. (1997). Texture properties of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of diet, muscle fat content and time of storage on ice. *Journal of the science of food and agriculture*, 74(3), 347-353. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199707)74:3<347::AID-JSFA802>3.0.CO;2-F
- Ando, M., Joka, M., Mochizuki, S., Satoh, K.-I., Tsukamasa, Y. & Makinodan, Y. (2001). Influence of death struggle on the structural changes in chub mackerel muscle during chilled storage. *Fisheries science*, 67(4), 744-751. doi: 10.1046/j.1444-2906.2001.00315.x
- Ando, M., Yoshimoto, Y., Inabu, K., Nakagawa, T. & Makinodan, Y. (1995). Post-mortem change of three-dimensional structure of collagen fibrillar network in fish muscle pericellular connective tissues corresponding to post-mortem tenderization. *Fisheries science*, 61(2), 327-330. doi: 10.2331/fishsci.61.327
- Aoki, T. & Ueno, R. (1997). Involvement of cathepsins B and L in the post-mortem autolysis of mackerel muscle. *Food Research International*, 30(8), 585-591. doi: 10.1016/S0963-9969(98)00014-3
- Aoki, T., Yamashita, T. & Ueno, R. (2000). Distribution of cathepsins in red and white muscles among fish species. *Fisheries science*, 66(4), 776-782. doi: 10.1046/j.1444-2906.2000.00126.x

- Ayala, M. D., Abdel, I., Santaella, M., Martínez, C., Periago, M. J., Gil, F., Blanco, A. & Albors, O. L. (2010). Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream, *Sparus aurata* L., during post-mortem storage. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(3), 465-475. doi: 10.1016/j.lwt.2009.08.023
- Bahuaud, D., Gaarder, M., Veiseth-Kent, E. & Thomassen, M. (2010). Fillet texture and protease activities in different families of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, *310*(1-2), 213-220. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.10.008
- Bahuaud, D., Mørkøre, T., Langsrud, Ø., Sinnes, K., Veiseth, E., Ofstad, R. & Thomassen, M. S. (2008). Effects of -1.5 °C Super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) pre-rigor fillets: Cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage. *Food Chemistry*, *111*(2), 329-339. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.03.075
- Bahuaud, D., Mørkøre, T., Østbye, T. K., Veiseth-Kent, E., Thomassen, M. S. & Ofstad, R. (2010). Muscle structure responses and lysosomal cathepsins B and L in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) pre- and post-rigor fillets exposed to short and long-term crowding stress. *Food Chemistry*, *118*(3), 602-615. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.05.028
- Barrett, A. J. & Kirschke, H. (1981). Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol*, *80*, 535-561.
- Bjørnevik, M., Karlsen, Ø., Johnston, I. A. & Kiessling, A. (2003). Effect of sustained exercise on white muscle structure and flesh quality in farmed cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, *34*(1), 55-64. doi: 10.1046/j.1365-2109.2003.00794.x
- Bjålie, J. G., Sand, O., Haug, E., Sjaastad, Ø. V. & Toverud, K. C. (1998). Grunnleggende kjemi og fysikk. *Menneskekroppen : fysiologi og anatomi*. (s. 438-465). Oslo: Universitetsforlaget.
- Boesgaard, L., Nielsen, M. E. & Rosenkilde, P. (1993). Moderate exercise decreases plasma cortisol levels in atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *106*(4), 641-643. doi: 10.1016/0300-9629(93)90373-C
- Bone, Q. (1978). Locomotor muscle. *Fish physiology* (Vol. 7, pp. 361-424). New York: Academic Press.
- Bugeon, J., Lefevre, F. & Fauconneau, B. (2003). Fillet texture and muscle structure in brown trout (*Salmo trutta*) subjected to long-term exercise. *Aquaculture Research*, *34*(14), 1287-1295. doi: 10.1046/j.1365-2109.2003.00938.x
- Caballero, M. J., Betancor, M., Escrig, J. C., Montero, D., Espinosa de los Monteros, A., Castro, P., Ginès, R & Izquierdo, M. (2009). Post mortem changes produced in the

- muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture*, 291(3–4), 210-216. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.03.032
- Castro, V., Grisdale-Helland, B., Helland, S., Kristensen, T., Jørgensen, S., Helgerud, J., Claireaux, G., Farrell, A.P, Krasnov, A. & Takle, H. (2011). Aerobic training stimulates growth and promotes disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 160(2), 278-290. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.03.032
- Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., Lamballerie-Anton, M. & Verrez-Bagnis, V. (2007). Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry*, 101(4), 1474-1479. doi: doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.023
- Christiansen, J. S. & Jobling, M. (1990). The behaviour and the relationship between food intake and growth of juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L., subjected to sustained exercise. *Canadian Journal of Zoology*, 68(10), 2185-2191. doi: 10.1139/z90-303
- Davidson, W. & Goldspink, G. (1977). The effect of prolonged exercise on the lateral musculature of the Brown Trout (*Salmo Trutta*). *Journal of Experimental Biology*, 70(1), 1-12.
- Davison, W. (1994). Exercise training in the banded wrasse *Notolabrus fucicola* affects muscle fibre diameter, but not muscle mitochondrial morphology. *New Zealand Natural Sciences*, 21, 11-11.
- Davison, W. (1997). The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 117(1), 67-75. doi: 10.1016/S0300-9629(96)00284-8
- Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R. & Verrez-Bagnis, V. (2006). Trends in Postmortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(5), 409-421. doi: 10.1080/10408390591000929
- Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. & Fleurence, J. (2004). Relative contribution of calpain and cathepsins to protein degradation in muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Food Chemistry*, 88(3), 389-395. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.01.053
- Dougan, M. R. C. (1993). *Growth and development of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* : effects of exercise training and seawater transfer*. (PhD), University of Canterbury Christchurch, New Zealand.

- Duarte, S., Reig, L., Masaló, I., Blanco, M. & Oca, J. (2011). Influence of tank geometry and flow pattern in fish distribution. *Aquacultural Engineering*, 44(2), 48-54. doi: 10.1016/j.aquaeng.2010.12.002
- Dunajski, E. (1980). Texture of fish muscle. *Journal of Texture Studies*, 10(4), 301-318. doi: 10.1111/j.1745-4603.1980.tb00862.x
- East, P. & Magnan, P. (1987). The effect of locomotor activity on the growth of brook charr, *Salvelinus fontinalis* Mitchill. *Canadian Journal of Zoology*, 65(4), 843-846. doi: 10.1139/z87-134
- Ebert, D. H., Deussing, J., Peters, C. & Dermody, T. S. (2002). Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 24609-24617. doi: 10.1074/jbc.M201107200
- Einen, O., Guerin, T., Fjæra, S. O. & Skjervold, P. O. (2002). Freezing of pre-rigor fillets of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 212(1-4), 129-140. doi: doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00874-2
- Einen, O., Mørkøre, T., Rørå, A. M. B. & Thomassen, M. S. (1999). Feed ration prior to slaughter - a potential tool for managing product quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 178(1-2), 149-169. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00126-X
- Einen, O. & Thomassen, M. S. (1998). Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*): II. White muscle composition and evaluation of freshness, texture and colour characteristics in raw and cooked fillets. *Aquaculture*, 169(1), 37-53. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00332-9
- Elvevoll, E. O., Sørensen, N. K., Østerud, B., Ofstad, R. & Martinez, I. (1996). Processing of marine foods. *Meat Science*, 43, Supplement 1, 265-275. doi: 10.1016/0309-1740(96)00071-X
- Espe, M., Ruohonen, K., Bjørnevik, M., Frøyland, L., Nortvedt, R. & Kiessling, A. (2004). Interactions between ice storage time, collagen composition, gaping and textural properties in farmed salmon muscle harvested at different times of the year. *Aquaculture*, 240(1-4), 489-504. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.04.023
- Farrell, A. P., Johansen, J. A., Steffensen, J. F., Moyes, C. D., West, T. G. & Suarez, R. K. (1990). Effects of exercise training and coronary ablation on swimming performance, heart size, and cardiac enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Canadian Journal of Zoology*, 68(6), 1174-1179. doi: 10.1139/z90-174

- Farrell, A. P., Johansen, J. A. & Suarez, R. K. (1991). Effects of exercise-training on cardiac performance and muscle enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 9(4), 303-312. doi: 10.1007/bf02265151
- Fauconneau, B., Alami-Durante, H., Laroche, M., Marcel, J. & Vallot, D. (1995). Growth and meat quality relations in carp. *Aquaculture*, 129(1-4), 265-297. doi: 10.1016/0044-8486(94)00309-C
- Fiskeridirektoratet.no. (2016). Akvakulturstatistikk - Laks, ørret og regnbueørret. Hentet 13.4.2016 fra fiskeridir.no/Akvakultur/Statistikk-akvakultur/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Laks-regnbueoerret-og-oerret
- Fletcher, G. C., Hallett, I. C., Jerrett, A. R. & Holland, A. J. (1997). Changes in the fine structure of the myocommata-muscle fibre junction related to gaping in rested and exercised muscle from King Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *LWT - Food Science and Technology*, 30(3), 246-252. doi: 10.1006/fstl.1996.0175
- Fossum, S. (2016, 10.3.16). *Proteasom*. Hentet 14.4.2016 fra sml.snl.no/proteasom
- Gaarder, M. Ø., Bahuaud, D., Veiseth-Kent, E., Mørkøre, T. & Thomassen, M. S. (2012). Relevance of calpain and calpastatin activity for texture in super-chilled and ice-stored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets. *Food Chemistry*, 132(1), 9-17. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.09.139
- Gall, G. A. E. & Pickering, A. D. (1992). Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture*, 100(1), 125-139. doi: 10.1016/0044-8486(92)90354-N
- Gjedrem, T. (1997). Flesh quality improvement in fish through breeding. *Aquaculture International*, 5(3), 197-206. doi: 10.1023/A:1014546816984
- Godiksen, H., Morzel, M., Hyldig, G. & Jessen, F. (2009). Contribution of cathepsins B, L and D to muscle protein profiles correlated with texture in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Chemistry*, 113(4), 889-896. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.08.012
- Greer-Walker, M. (1970). Growth and Development of the skeletal muscle fibres of the cod (*Gadus Morhua* L.). *Journal du Conseil*, 33(2), 228-244. doi: 10.1093/icesjms/33.2.228
- Haard, N. F. (1992). Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*, 25(4), 289-307. doi: 10.1016/0963-9969(92)90126-P
- Hagen, Ø. (2011). Protease activity impacts flesh colour during post-mortem storage of farmed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): A condition referred to as

- chalky halibut. *Food Chemistry*, 125(4), 1294-1298. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.10.035
- Hagen, Ø., Solberg, C. & Johnston, I. A. (2008). Activity of aspartate (cathepsin D), cysteine proteases (B, B+L, and H) and matrix metalloproteinases (collagenases) and their influence on protein and water-holding capacity of muscle in commercially farmed Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Agricultural and food chemistry*, 56, 5953-5959.
- Handeland, S. O., Berge, Å., Björnsson, B. T. & Stefansson, S. O. (1998). Effects of temperature and salinity on osmoregulation and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in seawater. *Aquaculture*, 168(1-4), 289-302. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00356-1
- Hauge, J. G. (2009, 14.02.2009). *Proteolytiske Enzymer*. Hentet 12.4.2016 fra snl.no/proteolytiske_enzymmer.
- Henmi, H., Hata, M. & Hata, M. (1990). Combination of Astaxanthin and Canthaxanthin with Fish Muscle Actomyosins Associated with Their Surface Hydrophobicity. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, 56(11), 1821-1823. doi: 10.2331/suisan.56.1821
- Hinterleitner, S., Huber, M., Lackner, R. & Wieser, W. (1992). Systemic and Enzymatic Responses to Endurance Training in Two Cyprinid Species with Different Life Styles (Teleostei: Cyprinidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(1), 110-115. doi: 10.1139/f92-013
- Houlihan, D. F. & Laurent, P. (1987). Effects of Exercise Training on the Performance, Growth, and Protein Turnover of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(9), 1614-1621. doi: 10.1139/f87-195
- Huff-Lonergan, E. & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71(1), 194-204.
- Hultmann, L. (2003). *Endogenous proteolytic enzymes - Studies of their impact on fish muscle proteins and texture*. (110), NTNU, Digitala Vetenskapliga Arkivet. Retrieved from diva-portal.org/smash/get/.../FULLTEXT01.p
- Hultmann, L., Phu, T. M., Tobiassen, T., Aas-Hansen, Ø. & Rustad, T. (2012). Effects of pre-slaughter stress on proteolytic enzyme activities and muscle quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 134(3), 1399-1408. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.03.038

- Hultmann, L., Tobiassen, T., Aas-Hansen, Ø., Phu, T. M. & Rustad, T. (2015). Muscle quality and proteolytic enzymes of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) during storage: Effects of pre-slaughter handling and increased storage temperature. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, null-null. doi: 10.1080/10498850.2014.890990
- Hyldig, G. & Nielsen, D. (2001). A review of sensory and instrumental methods used to evaluate the texture of fish muscle. *Journal of Texture Studies*, 32(3), 219-242. doi: 10.1111/j.1745-4603.2001.tb01045.x
- Iversen, A., Andreassen, O., Hermansen, Ø., Larsen, T. A. & Terjesen, B. F. (2013). *Oppdrettsteknologi og konkurranseposisjon*. 32/2013. Tromsø: Nofima.
- Jacobsen, Á., Joensen, H. & Eysturskarð, J. (2015). Gaping and loss of fillet firmness in farmed salmon (*Salmo salar* L.) closely correlated with post-slaughter cleaning of the abdominal cavity. *Aquaculture Research*, n/a-n/a. doi: 10.1111/are.12884
- Jensen, P. M. (2012, 29.05.2015). Norsk lakseoppdrett ved et veiskille: Teknologirådet anbefaler ny strategi for teknologiutvikling. Hentet 14.5.2016 fra kyst.no.
- Jiang, S.-T. (2000). Effect of proteinases on the meat texture and seafood quality. *Food Science and Agricultural Chemistry*, 2(2), 55-74.
- Jiang, S. T. & Chen, G. H. (1999). Effect of Cathepsins B, L, L-Like and Calpain on the Protein Degradation of Surimi. In Y. L. Xiong, H. Chi-Tang & F. Shahidi (Eds.), *Quality Attributes of Muscle Foods* (pp. 393-405). Springer Book Archive.
- Jobling, M., Baardvik, B. M., Christiansen, J. S. & Jørgensen, E. H. (1993). The effects of prolonged exercise training on growth performance and production parameters in fish. *Aquaculture International*, 1(2), 95-111. doi: 10.1007/bf00692614
- Johansson, D., Laursen, F., Fernö, A., Fosseidengen, J. E., Klebert, P., Stien, L. H., Vågseth, T. & Oppedal, F. (2014). The interaction between water currents and salmon swimming behaviour in sea cages. *PLoS ONE*, 9(5), e97635. doi: 10.1371/journal.pone.0097635
- Johansson, L., Kiessling, A., Kiessling, K. H. & Berglund, L. (2000). Effects of altered ration levels on sensory characteristics, lipid content and fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Quality and Preference*, 11(3), 247-254. doi: 10.1016/S0950-3293(99)00073-7
- Johnsen, C. A., Hagen, Ø. & Bendiksen, E. Å. (2011). Long-term effects of high-energy, low-fishmeal feeds on growth and flesh characteristics of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 312(1-4), 109-116. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.12.012

- Johnston, I. A., Alderson, R., Sandham, C., Dingwall, A., Mitchell, D., Selkirk, C., Nickell, D., Baker, R., Robertson, B., Whyte, D & Springate, J. (2000). Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 189(3–4), 335-349. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00373-2
- Johnston, I. A., W., D. & Goldspink. (1977). Energy metabolism of carp swimming muscles. *Journal of comparative physiology*, 114(2), 203-216.
- Jørgensen, E. H. & Jobling, M. (1993). The effects of exercise on growth, food utilisation and osmoregulatory capacity of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 116(2), 233-246. doi: 10.1016/0044-8486(93)90011-M
- Kanawa, R., Ji, J. R. & Takahashi, K. (2002). Inactivity of μ -Calpain Throughout Postmortem Aging of Meat. *Journal of Food Science*, 67(2), 635-638. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb10651.x
- Khorchid, A. & Ikura, M. (2002). How calpain is activated by calcium. *Nat Struct Mol Biol*, 9(4), 239-241.
- Kierulf, P. (2009, 13.2.2009). *Enzym*. Hentet 14.4.2016 fra sml.snl.no/enzym
- Kiessling, A., Espe, M., Ruohonen, K. & Mørkøre, T. (2004). Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter iso-eugenol or CO₂ anaesthesia. *Aquaculture*, 236(1–4), 645-657. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.02.030
- Kiessling, A., Ruohonen, K. & Bjørnevik, M. (2006). Muscle fibre growth and quality in fish. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 49(Special Issue), 137-146.
- Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81. doi: 10.1080/10408690091189266
- Kristoffersen, S., Tobiassen, T., Esaiassen, M., Olsson, G. B., Godvik, L. A., Seppola, M. A. & Olsen, R. L. (2006). Effects of pre-rigour filleting on quality aspects of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research*, 37(15), 1556-1564. doi: 10.1111/j.1365-2109.2006.01595.x
- Ladrat, C., Chaplet, M., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. & Fleurence, J. (2000). Neutral calcium-activated proteases from European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) muscle: polymorphism and biochemical studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 125(1), 83-95. doi: 10.1016/S0305-0491(99)00157-1
- Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. & Fleurence, J. (2003). In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus*

- labrax L.): effects of cathepsins B, D and L. *Food Chemistry*, 81(4), 517-525. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00481-8
- Larsson, T., Mørkøre, T., Kolstad, K., Østbye, T.-K., Afanasyev, S. & Krasnov, A. (2012). Gene expression profiling of soft and firm Atlantic Salmon fillet. *PLoS ONE*, 7(6), e39219. doi: 10.1371/journal.pone.0039219
- LavÉTy, J., Afolabi, O. A. & Love, R. M. (1988). The connective tissues of fish. *International Journal of Food Science & Technology*, 23(1), 23-30. doi: 10.1111/j.1365-2621.1988.tb00546.x
- Lefèvre, F., Bugeon, J., Aupérin, B. & Aubin, J. (2008). Rearing oxygen level and slaughter stress effects on rainbow trout flesh quality. *Aquaculture*, 284(1-4), 81-89. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.07.017
- Li, S., Xu, X. & Zhou, G. (2012). The roles of the actin-myosin interaction and proteolysis in tenderization during the aging of chicken muscle. *Poult Sci*, 91(1), 150-160. doi: 10.3382/ps.2011-01484
- Listrat, A., Lebreton, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., Picard, B. & Bugeon, J. (2016). How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *The Scientific World Journal*, 2016, 14. doi: 10.1155/2016/3182746
- Lupatsch, I., Santos, G. A., Schrama, J. W. & Verreth, J. A. J. (2010). Effect of stocking density and feeding level on energy expenditure and stress responsiveness in European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 298(3-4), 245-250. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.007
- Lynnum, L. (1997). *Metabolisme før og rett etter døden*. Fisk som råstoff : holdbarhet og kvalitetssikring (2. utg. ed., pp. 72-85). Trondheim: Tapir.
- Martinez, I., Wang, P. A., Slizyté, R., Jorge, A., Dahle, S. W., Cañas, B., Yamashita, M., Olsen, R. & Erikson, U. (2011). Protein expression and enzymatic activities in normal and soft textured Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle. *Food Chemistry*, 126(1), 140-148. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.10.090
- McDonald, A. (2010). The Enzyme List, Class 3 - Hydrolases. Hentet 12.3.2016 fra enzyme-database.org/index.php
- Mitchie, I. (2001). Causes of downgrading in the salmon industry. In W. P. Kestin SC (Ed.), *Farmed Fish Quality* (pp. 129-136). Oxford: Blackwell Science.
- Mótyán, J. A., Tóth, F. & Tözsér, J. (2013). Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*, 3(4), 923-942. doi: 10.3390/biom3040923

- Mørkøre, T. (2008). *Tekstur i oppdrettslaks. Kunnskapsstatus og forhold som bidrar til fastere filet*. Rapport nr 32/2008. Tromsø: Nofima.
- Mørkøre, T. (2012). *Filet av oppdrettslaks: Kvalitetsavvik og årsakssammenhenger*. (Rapportnr 17/2012). Tromsø: Nofima.
- Mørkøre, T. & Rørvik, K. A. (2001). Seasonal variations in growth, feed utilisation and product quality of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) transferred to seawater as 0+smolts or 1+smolts. *Aquaculture*, 199(1–2), 145-157. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00524-5
- Nomata, H., Toyohara, H., Makinodan, Y. & Ikeda, S. (1985). The Existence of Proteinase Inhibitors in Chum Salmon Muscle and Their Activities in the Spawning Stage. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, 51(11), 1805-1809. doi: 10.2331/suisan.51.1805
- Nærings- og fiskeridepartementet. (2015a). *En konkurransekraftig sjømatindustri*. (Meld. St. 10 2015-2016). Oslo: Nærings- og fiskeridepartementet. Hentet fra regjeringen.no/no/dokumenter/meld.-st.-10-20152016/id2461010/
- Nærings- og fiskeridepartementet. (2015b). *Forutsigbar og miljømessig bærekraftig vekst i norsk lakse- og ørretoppdrett*. (Meld. St. 16 2014-2015). Oslo: Nærings- og fiskeridepartementet. Hentet fra regjeringen.no/no/dokumenter/forutsigbar-og-barekraftig-vekst-ihavbruksnaringen/id2402070/
- Okitani, A., Matsukura, U., Kato, H. & Fujimaki, M. (1980). Purification and some properties of a myofibrillar protein-degrading protease, cathepsin L, from rabbit skeletal muscle. *J Biochem*, 87(4), 1133-1143.
- Olsson, G. B., Olsen, R. L., Carlehög, M. & Ofstad, R. (2003). Seasonal variations in chemical and sensory characteristics of farmed and wild Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 217(1–4), 191-205. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00191-6
- Palstra, A. P. & Planas, J. V. (2011). Fish under exercise. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(2), 259-272. doi: 10.1007/s10695-011-9505-0
- Rasmussen, R. S. (2001). Quality of farmed salmonids with emphasis on proximate composition, yield and sensory characteristics. *Aquaculture Research*, 32(10), 767-786. doi: 10.1046/j.1365-2109.2001.00617.x
- Reid, R. A., Durance, T. D., Walker, D. C. & Reid, P. E. (1993). Structural and chemical changes in the muscle of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) during spawning migration. *Food Research International*, 26(1), 1-9. doi: 10.1016/0963-9969(93)90099-5

- Robb, D. H. F., Kestin, S. C. & Warriss, P. D. (2000). Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. *Aquaculture*, 182(3–4), 261-269. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00273-2
- Sato, K., Yoshinaka, R., Sato, M. & Shimizu, Y. (1986). Collagen Content in the Muscle of Fishes in Association with Their Swimming Movement and Meat Texture. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, 52(9), 1595-1600. doi: 10.2331/suisan.52.1595
- Sentandreu, M. A., Coulis, G. & Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science & Technology*, 13(12), 400-421. doi: 10.1016/S0924-2244(02)00188-7
- Shahidi, F. & Botta, J. R. (1994). Chemistry, processing technology and quality *Seafoods* (pp. 1-29): Springer Science & Business Media Dordrecht.
- Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, S., Nordtvedt, T. S. & Seland, A. (1997). Handling Stress and Storage Temperature Affect Meat Quality of Farmed-raised Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Journal of Food Science*, 62(4), 898-905. doi: 10.1111/j.1365-2621.1997.tb15482.x
- Sigurgisladottir, S., Sigurdardottir, M. S., Ingvarsdottir, H., Torrissen, O. J. & Hafsteinsson, H. (2001). Microstructure and texture of fresh and smoked Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fillets from fish reared and slaughtered under different conditions. *Aquaculture Research*, 32(1), 1-10. doi: 10.1111/j.1365-2109.2001.00503.x
- Solstorm, F., Solstorm, D., Oppedal, F., Fernö, A., Fraser, T. W. K. & Olsen, R. E. (2015). Fast water currents reduce production performance of post-smolt Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquacult Environ Interact*, 7, 125-134 doi: 10.3354/aei00143
- Stoka, V., Turk, B. & Turk, V. (2005). Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *IUBMB Life*, 57(4-5), 347-353. doi: 10.1080/15216540500154920
- Suárez, M. D., Abad, M., Ruiz-Cara, T., Estrada, J. D. & García-Gallego, M. (2005). Changes in muscle collagen content during post mortem storage of farmed sea bream (*Sparus aurata*): influence on textural properties. *Aquaculture International*, 13(4), 315-325. doi: 10.1007/s10499-004-3405-6
- Sänger, A. M. (1992). Effects of training on axial muscle of two cyprinid species: *Chondrostoma nasus* (L.) and *Leuciscus cephalus* (L.). *Journal of Fish Biology*, 40(4), 637-646. doi: 10.1111/j.1095-8649.1992.tb02611.x
- Sänger, A. M. & Stoiber, W. (2001). Muscle fiber diversity and plasticity. In I. A. Johnson (Ed.), *Fish Physiology* (Vol. Volume 18, pp. 187-250). London: Academic Press.

- Teknologirådet. (2012). *Fremtidens lakseoppdrett*. (01/2012). Oslo: Teknologirådet.
- Thomas, P. M., Pankhurst, N. W. & Bremner, H. A. (1999). The effect of stress and exercise on post-mortem biochemistry of Atlantic salmon and rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 54(6), 1177-1196. doi: 10.1111/j.1095-8649.1999.tb02047.x
- Torrissen, O. J. (1985). Pigmentation of salmonids: Factors affecting carotenoid deposition in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 46(2), 133-142. doi: 10.1016/0044-8486(85)90197-8
- Torrissen, O. J., Christiansen, R., Struksnæs, G. & Estermann, R. (1995). Astaxanthin deposition in the flesh of Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., in relation to dietary astaxanthin concentration and feeding period. *Aquaculture Nutrition*, 1(2), 77-84. doi: 10.1111/j.1365-2095.1995.tb00022.x
- Totland, G. K., Kryvi, H., Jødestøl, K. A., Christiansen, E. N., Tangerås, A. & Slinde, E. (1987). Growth and composition of the swimming muscle of adult Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during long-term sustained swimming. *Aquaculture*, 66(3-4), 299-313. doi: 10.1016/0044-8486(87)90115-3
- Turk, B., Turk, D. & Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1-2), 98-111. doi: 10.1016/S0167-4838(99)00263-0
- Turk, V. & Bode, W. (1991). The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Letters*, 285(2), 213-219. doi: 10.1016/0014-5793(91)80804-C
- Veland, J. O. & Torrissen, O. J. (1999). The texture of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle as measured instrumentally using TPA and Warner-Brazler shear test. *Journal of the science of food and agriculture*, 79(12), 1737-1746. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199909)79:12<1737::AID-JSFA432>3.0.CO;2-Y
- Verrez-Bagnis, V., Delbarre Ladrat, C., Noel, J. & Fleurence, J. (2002). In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of European sea bass (*Dicentrarchus Labrax* L.) by an endogenous m-calpain. *Journal of the science of food and agriculture*, 82((11)), 1256-1262.
- Vieira, V. L. A., Norris, A. & Johnston, I. A. (2007). Heritability of fibre number and size parameters and their genetic relationship to flesh quality traits in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 272, Supplement 1, S100-S109. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.08.028
- Vinagre, J., Rodríguez, A., Larraín, M. A. & Aubourg, S. P. (2011). Chemical composition and quality loss during technological treatment in coho salmon (*Oncorhynchus*

- kisutch). *Food Research International*, 44(1), 1-13. doi:
10.1016/j.foodres.2010.10.040
- Walker, M. G. & Emerson, L. (1978). Sustained swimming speeds and myotomal muscle function in the trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Fish Biology*, 13(4), 475-481. doi:
10.1111/j.1095-8649.1978.tb03457.x
- Yamashita, M. & Konagaya, S. (1990). Purification and characterization of cathepsin L from the white muscle of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Comp Biochem Physiol B*, 96(2), 247-252.
- Yamashita, M. & Konagaya, S. (1991). Hydrolytic Action of Salmon Cathepsins B and L to Muscle Structural Proteins in Respect of Muscle Softening. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, 57(10), 1917-1922. doi: 10.2331/suisan.57.1917
- Yates, L. D., Dutson, T. R., Caldwell, J. & Carpenter, Z. L. (1983). Effect of temperature and pH on the post-mortem degradation of myofibrillar proteins. *Meat Science*, 9(3), 157-179. doi: 10.1016/0309-1740(83)90001-3

7. 0. Vedlegg

7.1. Cathepsinaktivitet

Tabell 9 Gjennomsnittlig enzymaktivitet for juni (a), august (b) og november (c) oppgitt i mmol AMC min⁻¹ g⁻¹, standardavvik, og antall fisk fra hvert uttak etter korrigering for ekstremverdier.

a) Cathepsinaktivitet 10. juni 2015

Enzym	Strømhastighet	N	Gjennomsnitt	Standardavvik
Cathepsin B	Lav	28	998	117
	Høy	26	1085	114
	Total	54	1040	123
Cathepsin B+L	Lav	30	560	105
	Høy	30	565	116
	Total	60	563	110
Cathepsin H	Lav	28	360	130
	Høy	29	279	84
	Total	57	319	116

b) Cathepsinaktivitet 25. august 2015.

Enzym	Strømhastighet	N	Gjennomsnitt	Standardavvik
Cathepsin B	Lav	44	830	246
	Høy	15	981	251
	Total	59	868	254
Cathepsin B+L	Lav	44	391	134
	Høy	15	534	98
	Total	59	427	140
Cathepsin H	Lav	45	315	240
	Høy	15	378	194
	Total	60	331	229

c) Cathepsinaktivitet 17. november 2015.

Enzym	Strømhastighet	N	Gjennomsnitt	Standardavvik
Cathepsin B	Lav	30	898	205
	Høy	27	646	84
	Total	57	779	203
Cathepsin B+L	Lav	30	414	90
	Høy	30	340	81
	Total	60	377	93
Cathepsin H	Lav	30	279	126
	Høy	30	181	120
	Total	60	230	131

Tabell 10. Gjennomsnittlig cathepsinaktivitet i november for laks som har gått under høy eller lav strømhastighet i 23 uker fordelt på merd. Cathepsinaktivitet oppgitt i mmol AMC pr min-Ig-1 våtvekt.

Merd	Gruppe	Cathepsin B	Cathepsin B+L	Cathepsin H
2	Lav	952 ± 242	398 ± 80	265 ± 134
4	Lav	844 ± 149	430 ± 99	293 ± 119
6	Høy	645 ± 93	293 ± 66	131 ± 102
7	Høy	647 ± 79	386 ± 66	230 ± 119