



## Forord

Ås, 12.mai 2015

Dette arbeidet er gjennomført som et ledd i utdannelsen ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap.

Arbeidet med denne masteroppgaven startet allerede juni 2013 med prosjektering, størstedelen av forsøkene ble utført i april og august 2014 på Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Matre i Masfjorden kommune (Hordaland). Noen avsluttende analyser ble utført på NMBU i februar 2015.

Prosjektet har blitt til ved et tett og godt samarbeid med medstudent Even Flønes Skare. Vi har delt arbeidsoppgavene mellom oss og lagd hver vår disposisjon etter at alle forsøkene var utført. Introduksjonen, illustrasjonene og statistikkutregningene i denne oppgaven er også bygd på tett samarbeid, men vi har utover dette separate masteroppgaver.

Av analyser som er satt bort er databehandlingen av sammentrekningen utført av forsker Lars Helge Stien v/Havforskningsinstituttet forskningsstasjon på Austevoll, samt proteinanalysene på kvalitet er utført av forsker Line Bach Christensen v/Nofima AS, Stavanger. Farge- og fettanalyser ble utført på Høgskolen i Sør-Trøndelag (HiST), Trondheim. Tolkningen av disse resultatene ble utført av førsteamanuensis Jørgen Lerfall.

Prosjektet på diploid og triploid atlantisk laks hadde ikke vært gjennomførbart uten forsker Rolf Erik Olsen v/Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Matre, nå førsteamanuensis på Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim.

Økonomisk har prosjektet blitt finansiert av forskere fra flere institusjoner; forsker Rolf Erik Olsen (Havforskningsinstituttet), professor Bjørg Egelanddal (Norges miljø- og biovitenskapelige universitet) og forsker Bjørn Roth (Norsk Fiskeri- og Matforskning AS).

Det er utrolig mange å takke for hjelp og veiledning i arbeidet med min mastergradsoppgave. Først av alt vil jeg ærbødigst takke mine hovedveiledere professor

Erik Slinde og professor Bjørg Egelanddal. Det samme gjelder Rolf Erik Olsen. Min veileder i Stavanger, Bjørn Roth fortjener ros. Takk til Jørgen Lerfall. Takk til overingeniør Lene Ruud Lima, IKT-konsulent Geir Gundersen og alle ansatte på Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Matre, en spesiell takk til Stian Morken, Grethe Torsheim, Ivar Helge Matre, Britt Sværen Daae, Karen Anita Kvestad og stasjonssjef Øivind Torslett.

Og ikke minst takk til min medstudent; Even Flønes Skare.

---

Pål Rune Hasli

Det erklæres at en interessekonflikt rundt tema i denne oppgaven ikke eksisterer fra forfatterens side.

## Innholdsfortegnelse

Forord .....	2
Forkortelser .....	9
Sammendrag .....	10
Abstract .....	12
1.0 Introduksjon .....	1
1.1.1 Historien til norsk akvakultur, et avlsmessig eventyr.....	1
Laksens livssyklus i oppdrett .....	3
Laksens livssyklus i naturen .....	4
Laksen er et gammelt dyr.....	5
1.1.2 Dagens tall .....	7
1.1.3 Politikk.....	8
Rømning.....	9
1.1.4 Sjøtemperaturens påvirkning på laks.....	10
1.2 Hva kjennetegner laks med god kvalitet?.....	10
Hva er kvalitet? .....	10
Hva påvirker kvaliteten? .....	11
Vanntap .....	12
Hva er væskeslipp, og når starter det? .....	12
Vannbindingsevne avhenger av det isoelektriske punktet .....	12
1.2.1 Farge .....	14
Astaxanthin .....	14
1.2.2 Filet–tekstur .....	15
Filet tekstur .....	15
Muskeloppbygning i laks .....	15
Sesongvariasjoner .....	17
pH.....	17
Fiskemuskel proteiner .....	17
Pre-og post mortem reaksjoner, rigor mortis .....	18
Osmolaritet.....	19
1.2.3 Fersk smak (forventning), sensorikk, holdbarhet .....	20
Sensorisk kvalitet .....	20
1.3 Diploid versus triploid atlantisk laks.....	21
Generelt.....	21

Generelle og kvalitative forskjeller .....	23
Produksjonsforskjeller .....	24
Genetikk .....	24
Celle teori .....	26
Kvalitet .....	28
Næring og marked tilpasser seg mulig fremtidsrettet produksjon .....	28
1.4 Respirasjon .....	28
Krebs syklus .....	28
Oksidativ fosforylering .....	29
Mitokondrie– hvordan de er bygget opp? .....	31
Hvorfor er mitokondrier i laks interessant nå, og fremover i tid? .....	33
2. Målet med oppgaven .....	37
3. Material .....	38
3.1 Diploid og Triploid laks .....	38
Fiskehistorikk .....	38
Generell beskrivelse av fiskematerialet og eksperimentdesign .....	39
3.2 Dødsstivhet – Rigor Mortis .....	41
Dataprogrammer .....	41
Forbruksmateriell .....	41
Teknisk utstyr .....	41
3.3 Kvalitetsforskjeller av diploid og triploid laks ved 5°C, 10°C, 15°C .....	41
Kjemikalier .....	41
Dataprogrammer .....	42
Forbruksmateriell .....	42
Teknisk utstyr .....	42
3.4 Mitokondrier .....	43
Kjemikalier .....	43
Løsninger .....	44
Dataprogrammer .....	45
Forbruksmateriell .....	45
Teknisk utstyr .....	45
4. Metode .....	46
4.1 Dødsstivhet – <i>Rigor mortis</i> .....	46
Uttak av prøvematerialet .....	46
Rigorindeks, laktat, pH og temperatur .....	46

4.2 Kvalitetsforskjeller av diploid og triploid laks ved 5°C, 10°C, 15°C .....	47
Uttak av fisk til kvalitetsanalyser .....	47
4.2.1 Farge .....	48
Astaxanthin .....	49
4.2.2 Fiskemuskel .....	50
Drypptap .....	50
Tørrstoff .....	51
Muskelsammentrekning .....	51
Tekstur .....	52
4.2.3 Kjemisk sammensetning .....	53
Protein, proteindenaturering og enzymaktivitet .....	53
Lipid .....	53
4.3 Mitokondrier .....	54
Respirasjonskapasitet i mitokondrier .....	54
Uttak av prøvematerialet .....	54
Homogenisering av vev fra hjerte og rød laksemuskel med PBI-Shredder HRR .....	54
Vevspreparering med Biobs med saponin .....	56
Oxyograf .....	56
DataLab .....	59
Proteinanalyse .....	59
5. Resultater .....	60
5.1 Generelle resultater .....	60
Helvekt .....	60
5.2 <i>Rigor</i> -utvikling .....	61
Ploiditetsforskjeller i <i>rigor-mortis</i> forløp .....	61
5.2.1 <i>Rigor mortis</i> og pH .....	62
5.2.2 Diagramfremvisning samlet alle grupper <i>rigor mortis</i> utvikling. ....	63
5.2.3 Laktatmåling av <i>rigor-mortis</i> målte fiskegrupper .....	64
5.3 Kvalitetsforskjeller på diploid mot triploid laks. ....	64
Samletabell for drypptap, muskelsammentrekninger, vannbindingsevne og tørrstoffandel .....	64
Sammenligning av forskjell i drypptap på ploiditetsnivå .....	65
Tekstur .....	65
Kjemisk sammensetning .....	66
Ploiditetsforskjellen i totalt fettinnhold samlet .....	67

Cathepsiner og collagenase aktivitet.....	67
Ploiditetsforskjellen i collagenase aktivitet samlet .....	68
HunterLab .....	69
5.4 Karakterisering av mitokondrierespirasjon i hjerte ( <i>apex cordis</i> (hjertespi-ss)) og rød muskel på diploid og triploid laks i sjøvannfasen på 5°C, 10°C, 15°C.....	70
5.4.1 Diploid/triploid laksehjerte på 5°C, 10°C, 15°C.....	70
5.4.2 Diploid mot triploid laksehjerte på samme temperaturmetabolisme.....	70
5.4.3 Metabolsk respons mellom temperaturer uavhengig av ploiditet.....	71
5.4.4 Ploiditetsforskjeller i mitokondrierespirasjon for hjerte.....	71
5.4.5 Run fra hjerte ( <i>apex cordis</i> ) hos diploid og triploid laks i sjøvann. ....	72
5.4.6 Gjennomsnittsdata diploid/triploid rød muskel 5°C, 10°C, 15°C .....	73
5.4.7 Diploid mot triploid rød laksemuskel på samme temperaturmetabolisme .....	74
5.4.8 Metabolsk respons i rød muskel mellom temperaturer uavhengig av ploiditet.....	74
5.4.9 Ploiditetsforskjeller i mitokondrierespirasjon for rød muskel .....	75
5.4.10 Run fra rød muskel hos diploid og triploid laks i sjøvann.....	75
5.4.11 Innveid våtvekt mot succinate respons, 5°C ,10°C og 15°C. Hjerte og rød muskel .	77
5.5 Karakterisering av mitokondrierespirasjon i hjerte ( <i>apex cordis</i> ) og rød muskel på diploid og triploid laks i ferskvannsfasen på 4°C. ....	78
5.5.1 Gjennomsnittsdata diploid/triploid hjerte ferskvann. ....	78
5.5.2 Ploiditetsforskjeller i mitokondrierespirasjon for hjerte.....	78
5.5.4 Gjennomsnittsdata diploid/triploid muskel 4°C .....	79
5.5.5 Ploiditetsforskjeller i mitokondrierespirasjon for rød muskel .....	80
5.5.6 Run fra rød muskel hos diploid og triploid laks i ferskvann. ....	80
5.5.7 Innveid våtvekt mot succinate respons, hjerte og rød muskel. ....	81
5.6 Sammenligning av Shredder vs. Biobs med standardavvik .....	82
5.6.1 Shredder mot biobs på 1,5mg, 3mg, 4,5mg og 6mg innveid vev. ....	82
5.6.2 Innveid våtvekt (vev) mot succinate-respons. Shredder og Biobs metoder. ....	83
5.6.3 Shredder mot Biobs .....	83
5.6.4 Run med Shredder PSI-HRR som permabiliseringsmetode.....	84
5.6.5 Run med Biobs <sup>m</sup> /Saponin som permabiliseringsmetode .....	84
5.7 Titring av Carbonyl cyanide p-(trifluoro-methoxy) phenyl-hydrazone .....	84
6. Diskusjon.....	86
6.1 Diploid og triploid laks (generelt) .....	86
6.2 <i>Rigor-mortis</i> .....	88

6.3 Kvalitetsforskjeller .....	92
6.4 Mitokondrier/respirasjon .....	93
6.4.1 Vevsprepareringsmetoder Shredder mot Biobs <sup>m</sup> /saponin .....	98
6.4.2 Totalt innveid protein (Proteinanalyse) .....	99
6.5 Avsluttende totalvurdering .....	100
7. Konklusjon .....	102
7.1 <i>Rigor-mortis</i> .....	102
7.2 Kvalitetsforskjeller .....	102
7.3 Mitokondrier .....	102
Referanser.....	1
Appendix 1 .....	1
Forespørsel fra journalist Anders Furuset i IntraFish Media .....	1
Appendix 2 .....	1
Kronikk i Norsk fiskeoppdretts juni nummer. ....	1



## Forkortelser

Forkortelse	Full name	Fullstendig navn
ADP	Adenosine diphosphate	Adenosindifosfat
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosfat
<i>Apex Cordis</i>	Apex of the heart (engelsk)	Hjertespiss
CMS	Cardiomyopatisyndrom	Cardiomyopatisyndrom
CV	Coefficient of variation	Variasjonskoeffisienten
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoksyribonukleinsyre
ETS	Electron transport chain	Elektrontransportkjede
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Mat og jordbruks organisasjon for USA
GMO	Genetically modified organisms	Genetisk modifisert organisme
HiST	Sør-Trøndelag University College	Høgskolen i Sør-Trøndelag
ICES	International Council for the Exploration of the Sea	Det internasjonale havforskningsrådet
IMM	Inner mitochondrial membrane	Indre mitokondrie membran
IMR	Institute of marine research	Havforskningsinstituttet
MYA	Million years ago	Millioner år siden
NASCO	North Atlantic Salmon Conservation Organization	Nord atlantisk laks bevarings organisasjon
NFD	Ministry of Trade, Industry and Fisheries	Nærings –og fiskeridepartementet
NKS	Norwegian Quality Cut	Norsk kvalitets kutt
NMBU	Norwegian University of Life Sciences	Norges miljø-og biovitenskapelige universitet
NOFIMA	The Norwegian Institute of. Food, Fisheries and Aquaculture Research	Norsk Fiskeri- og Matforskning AS
NTNU	Norwegian University of science and technology	Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
PH	<i>pondus hydrogenii</i> (latin)	potential of hydrogen (engelsk)
SGR	Specific Growth Ratio	Beregning av daglig tilvekst
SSS	Citric acid cycle	Sitronsyresyklusen
TYA	Thousand years ago	Tusen år siden
WHC	Water holdning capacity	Vannbindingsevne
YMM	Outer mitochondrial membrane	Ytre mitokondrie membran

For flere av de biokjemisk aktive forbindelsene i oppgaven har jeg valgt å bruke engelsk termologi.

## Sammendrag

Min motivasjon og bakteppet for arbeidet med denne masteroppgaven er norsk laksenærings kanskje mest omtalte lisensutdeling gjennom tiden: «De grønne A konsesjonene» i Troms og Finnmark, effektivert av Erna Solberg (H) sin 1. regjering ved fiskeriminister Elisabeth Aspaker (H). Her baseres 60 % av lisensene (12 av 20) på bruk av triploid laks. Denne laksetypen omtales også som steril laks.

Atlantisk laks  $\pm 1$ kg med diploid og triploid status, og tre forskjellige temperaturregimer (5°C, 10°C og 15°C) ble i to måneder holdt i seks forskjellige kar inne på Havforskningsinstituttets forskningsstasjon, «Miljøhallen» på Matre i Masfjorden kommune, (60°52'31"N 5°35'2"Ø). I august 2014 ble fisken slaktet og analysert.

Oppgaven har tatt for seg sammenligning av diploid og triploid laks med flere kvalitetsparametere. I tillegg til dette har det blitt utført karakterisering av mitokondrierespirasjon på diploid og triploid laks både før og etter smoltifisering i rød muskel, samt hjertet. For å kunne analysere mitokondrier, ble vevshomogenisering med shredder PSI-HRR for opparbeiding av prøve benyttet og testet mot bruken av biops<sup>m</sup>/saponin som oppløser cellemembraner, noe som gjør mitokondriene tilgjengelige for analyse.

Det er ploide forskjeller i *rigor-mortis* forløpet, da triploid laks har signifikant mykere (<0,001) *rigor* sammenlignet med diploid laks ved de tre temperaturene der analyse ble foretatt.

Kvalitetsanalysene viser at diploid og triploid laks har få til ingen markante kvalitetsforskjeller. Analysene viser nominelt høyere drypptap hos triploid laks. Fiskefiletene med størst muskelsammentrekning var filetene med mest drypptap uavhengig av ploiditet. Collagenaseaktiviteten er signifikant høyere (<0,05) i triploid laks enn i diploid laks. Triploid laks har høyere fettdeponering enn diploid laks. Mengden av karotenoidet astaxanthin er lik i de analyserte fiskene. HunterLab verifiserer likt fargebilde hos diploid og triploid laks.

Mitokondrierespirasjonen hos laks er ikke direkte påvirket av ploiditet. Mitokondriene er godt koblet. Mitokondriene lot seg ikke avkoble med FCCP, og av den grunn fungerer ikke FCCP som en avkobler hos mitokondrier i laks.

Respiratorisk restoksygen i hjertet hos triploid laks i sjøvannfasen var signifikant høyere ( $<0,05$ ) fra diploid laks. Årsaken til dette kan muligens være forskjellen i fettsyresammensetning hos diploid og triploid laks. Det var signifikant høyere ( $<0,05$ ) ADP-respons i ferskvannsfasen hos triploid laks enn hos diploid laks, dette kan ha betydning for veksthastigheten i ferskvann.

Shredder ga høyere oksygenrespons ved samme vevsmengde ( $<0,001$ ) enn biops <sup>m</sup>/saponin i oxyografen.

Måling av protein i oxyografen må gjøres ved å ta ut alt vevet, og deretter løse det opp. Da en mest sannsynlig bare tok ut deler av oppløsningen i kammerne, er de mitokondrielle dataene basert på innveid våtvekt og succinate respons.

## Abstract

My motivation and reason for this work with my master thesis is due to Norwegian salmon industry perhaps the most cited license distribution through all time: “The green A licensing” in Troms and Finnmark, effectuated of Erna Solberg (H) first government by the Minister of fisheries Elisabeth Aspaker (H). 60 % of all licenses (12 of 20) are based on use of triploid salmon. This type of salmon is also referred to sterile salmon.

Atlantic salmon  $\pm 2.2$  pounds with diploid and triploid status, and three different temperature regime (5°C, 10°C and 15°C) were in six different wats for two months. It was localized at hall of Environment, Institute for Marine Research, Matre in the rural district Masfjorden (60°52'31"N 5°35'2"Ø). In August 2014, the fish were slaughtered and analysed.

The thesis has focused on the comparison of diploid and triploid salmon with several quality parameters. In addition to this, there has been performed characterization of mitochondrial respiration at diploid and triploid salmon before and after smoltification on red muscle, as well as the heart. To analyse the mitochondria tissue homogenization with Shredder PSI-HRR for preparation of sample was used and tested against Biops<sup>with</sup>/Saponin, which dissolves cell membranes making mitochondria available for analysis.

There are ploidy differences in *rigor-mortis* precursor. Triploid salmon has significantly softer ( $<0.001$ ) *rigor* compare with diploid salmon at the three analyzed temperatures.

The quality analyses showed that diploid and triploid salmon have no clear quality differences. The analyses show nominal higher drip loss of triploid salmon. The fish filet with the highest level of muscle contraction was the filet with highest amount of drip loss independent of ploidy. Collagenase activity is significantly higher ( $<0.05$ ) in triploid salmon compared with diploid salmon. Triploid salmon has a higher fat deponation than diploid salmon. The amount of the carotenoid astaxanthin is equal in the analysed fish. HunterLab verify equal colour image at diploid and triploid salmon.

Mitochondrial respiration of salmon is not directly affected by ploidity. The mitochondria is well coupled in salmon. The mitochondria was not uncouple with FCCP, and of this reason FCCP does not work as an uncoupler of mitochondria in salmon.

Respiratorical leftover oxygen in the heart at triploid salmon in seawater was significantly higher ( $<0.05$ ) than that of diploid salmon. The reason for this can possibly be the difference in the fat acid composition at diploid and triploid salmon. It was a significantly higher ( $<0.05$ ) ADP-response in freshwater phase of triploid salmon compared to diploid salmon. This may affect growth rate in freshwater.

Shredder gave higher oxygen response in the same tissue volume ( $<0.001$ ) than biops<sup>with</sup>/saponin in the oxyograph.

The measuring of proteins in the oxyograph is to be done by taking out all the tissue from the chamber, and after that dissolve it. Most probably, it was taken out just a small part of the solution in the chamber. The mitochondrial results are based on weighed wet weight and succinate response.

## 1.0 Introduksjon

### 1.1.1 Historien til norsk akvakultur, et avlsmessig eventyr.

Laksefisk i oppdrett er uten tvil blitt en suksesshistorie for Norge. Suksesser har som regel rot i fortiden, og helter blir glemt på sin vei. Selv om ildsjelene i pionertiden for norsk oppdrettsnæring på 1950 og 60-tallet ikke nådde helt opp med fullskala matfiskoppdrett, bygget de ubevisst opp produksjonssystemer som var til stor hjelp da eventyret virkelig eskalerte (Hovland 2014 s.15, s.57-58).

Mowi AS i Bergen var det første firmaet som satte et betydelig volum av laksesmolt i merd i sjøen. Dette skjedde på Sotra utenfor Bergen (Hordaland) våren 1969 (Gjedrem et al. 1991), og slaktevolumet to år etter lød på 60 tonn (Hovland 2014 s.77).

På Hitra (Sør-Trønderlag) året etter klarte brødrene Sivert og Ove Grøntvedt å sette 20 000 smolt i sjøen (Gjedrem et al. 1991). Deres åttekantede flytemerder fylt med laks ble en umiddelbar suksess, og to år etterpå var den første lønnsomme oppdrettslaksen et faktum (Hovland 2014 s.79).

På Institutt for husdyravl ved Norges landbrukshøgskole på Ås arbeidet professor Harald Skjervold (1917-1995) med avlsforsøk, og i 1971 fikk han med seg professor Trygve Gjedrem (1929-). Disse to ønsket å lage et avlsprogram for anadromfisk med samme ideologi som ble benyttet på husdyr (Gjedrem et al. 1991). Gunnar Nævdal (1936-) og Dag Møller (1931-) som var tilknyttet Havforskningsinstituttet, ønsket også å drive avlsforskning med lokalisering på Matre i Masfjorden kommune (Hordaland). Et samarbeid ble på et tidspunkt vurdert, men kollapset da de ikke ble enige om arbeidsdeling på arter. Et ønske om forvaltningsansvar for næringen fra både sterke krefter innen fiskeri og landbruk sto sentralt. Resultatet ble to forsøksstasjoner for fiskeoppdrett (Hovland 2014 s.111-114).

I 1971 startet selekteringsforsøk på atlantisk laks. Lokalitetene de benyttet lå da på Sunndalsøra og på Averøy. Etter hvert ble forsøkene og lokalene både eid og styrt av Akvaforsk der Skjervold var leder (Gjedrem et al. 1991).

Samme år kom også avlsforskningen på Matre i gang (Hovland 2014 s.115), men det er Skjervold og Gjedrem som blir omtalt først i historiebøkene innen avl på anadrom fisk i Norge.

Skjervold og Gjedrem samlet i en fireårsperiode inn laks fra 41 forskjellige elver fra Lysaker i sør til Målselv i nord (Gjedrem et al. 1991). Det ble valgt elver etter antagelser om at elven ga stor villaks. Laksens opphav og geografiske tilholdssted ble det ikke tatt hensyn til ved den genetiske avlskryssingen. Etter 1,5 år i kar på land og 2 år i sjøfasen, ble laks selektert etter størrelse, og den avlsmessige fremgangen kunne starte. Et moderne eventyr var skapt. (Gjedrem et al. 1991)

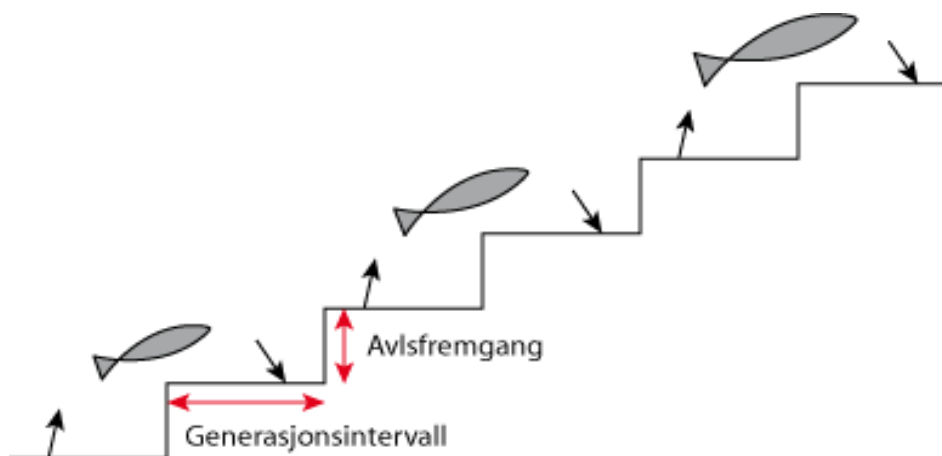
«Laksen ble selektert etter størrelse.»  
(pers.med professor Trygve Gjedrem)

Det måtte flere generasjoner laks for å avvende dem fra kannibalisme, tilegne seg et liv i kar og merd, samt å få de til å spise pellets. (pers.med Trygve Gjedrem 2014)

I merder langs hele norskekysten svømmer i dag 11. generasjon oppdrettslaks.

Dagens avlsprogram baserer seg fortsatt på innhenting av laks fra 1970-tallet. I dag er det AquaGen AS eid av EW Group som har råderett over avlsmaterialet fra Skjervold og Gjedrem. I følge selskapet AquaGen AS har det vært en enorm genetisk framgang fra oppstart til dagens moderne oppdrettsteknologi. Nøysomt avlsarbeid har gitt en kraftig reduksjon i produksjonstid, bedre overlevelse, høyere alder for kjønnsmodning, bedre fôrutnyttelse og slaktekvalitet på laksen mener de. Når det er sagt, har også andre faktorer hatt betydning, slik som produksjonsutstyr, driftsrutiner, eget vaksineprogram og ikke minst erfaringer og forskningsbasert kunnskap.

**Figur 1** viser avlsfremgang og generasjonsintervall. Et generasjonsintervall utgjør 4 år.



Figur 1: Den avlsmessige fremgangen illustreres godt ved hjelp av en avlstrapp. Et steg på trappen er et generasjonsintervall. Trinnet opp viser fremgangen skapt ved seleksjon. Illustrasjonen har lik høyde på trinnene, dette avhenger av arvegraden til fisken (Hentet fra: [www.aquagen.no](http://www.aquagen.no)) Nedlastet: 28.11.2014

## Laksens livssyklus i oppdrett

I oppdrett deler man livsstadiene til laks inn i tre ulike «stasjoner»; Stamfiskanlegg, klekkeri og sjøanlegg. Stamfisk blir på stamfiskeanleggene nøye selektert ut og stryket. Egg og melke blir blandet sammen og lagt til inkubasjon i sylindere. Etter 230 døgngrader får yngelen øyne inne i egget, dette kalles øyerogn og ubefruktede egg kan fjernes ved sjokking (metode for ut selektering av døde egg). Dette gjøres for å hindre at dødt materiale skaper eventuell smitte til levende. Øyeroggen blir lagt utover i kar. Ved 350-400 døgngrader «klekker» eggene, og man får plommesekk yngel. Etter dette stadiet «flyter» yngelen opp og startfôringen kan starte. Lakseparr er siste «fase» før smolt og smoltifisering. Parr har tydelige merker i skinnet. Denne fasen er vesentlig for oppbyggingen av muskelstørrelse i ferskvannsfasen. De karakteristiske «fingermerkene» på lakseparr forsvinner når laksen blir smolt. Når laksen har blitt 20 gram stor, kan lysmanipulasjon starte, og når den har blitt 40 gram, kan den vaksineres. Smolt karakteriseres som laksens ungdomstid der den gjennomgår fysiologiske, morfologiske og atferdsmessige endringer. Kloridcellene utvikles av enzymaktivitet, og når cellene når riktig utviklingsnivå, kan fisken selv styre saltreguleringen i blodet. Ved hjelp av lys kan man manipulere laksen slik at laksen smoltifiserer seg etter kun ett år. Dette kalles 0+ smolt. Oppdrettere kan

også velge å benytte 1+ smolt.

Kjønnsmodningen kan styres

med lys ved og i merdene.

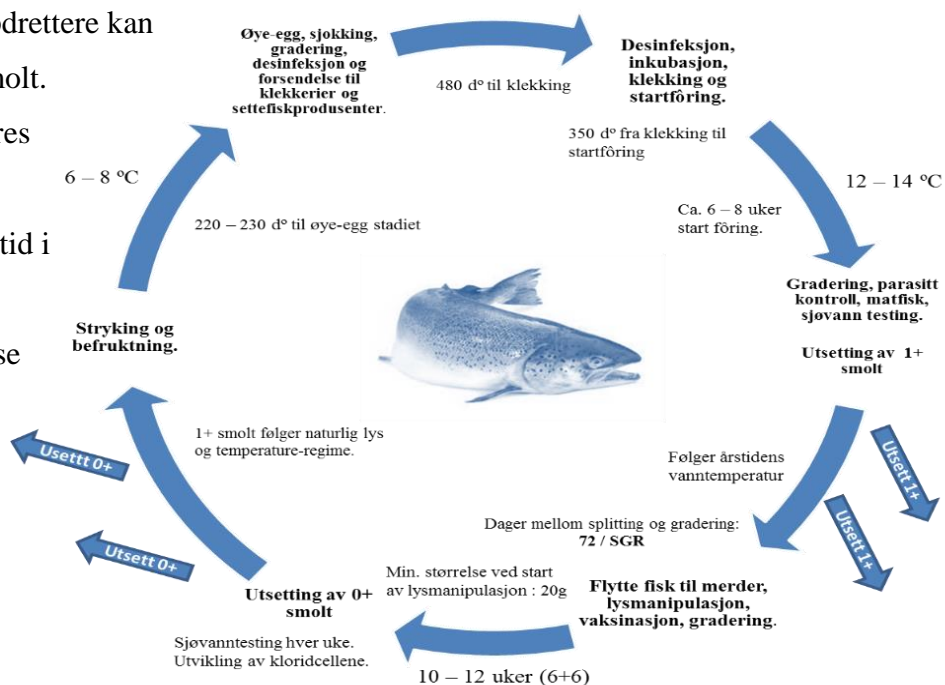
Laks i oppdrett har en levetid i

merden på 12-24 måneder,

avhengig av ønsket størrelse

og gjennomsnittlig

sjøtemperatur.



Figur 2: Oppdrettlaksens vekstsyklus kan fremstilles som et hjul der de tre ulike stasjonene laksen er innom er representert. Stamfiskanlegg: Stryking, inkubasjon, sjokking og gradering m.m. Klekkeri: Klekking, gradering, startfôring vaksinerings, lysmanipulasjon testing av kloridceller og utsett av 0+ & 1+. Sjøanlegg: Vekst i saltvann, lysmanipulasjon, sesongvariasjoner og sulting før slaktning. (Hentet fra: Forelesning i emne AQP211, NMBU 2014)



## Laksens livssyklus i naturen

Laksens livssyklus i naturen består av åtte forskjellige livsstadier. Hver sommer og tidlig høst svømmer laks fra havet og opp i ferskvannselver for å gyte. Her skifter de til gytedrakt for å tiltrekke seg en partner. Bare de sterkeste laksene blir gytelaks. De befruktede eggene klekker på våren når eggene er rundt 350-400 døgngader gamle. Ferskvannsstadiet fra egg, plommeseekkyngel, yngel, parr og smolt kan ta fra 1-6 år avhengig av miljø, temperatur, mattilgang og konkurranse i habitatet. Lakseparrene svømmer når tiden er inne ut mot elvemunningen der den blir til sølvblank smolt og smoltifiseringen kan finne sted (også omtalt i oppdrett stadiet). På den måten vandrer laksen fra sin føde- elv og ut i havet. Laks som blir kjønnsmodne uten å vandre ut i sjøen, kalles dverghanner.

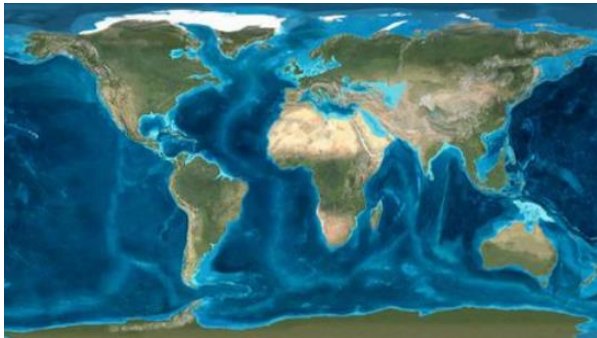
**Figur 3** viser laksens livssyklus i naturen.



Figur 3: Laksens livssyklus i naturen går fra egg stadiet i grusen der den ligger hele vinteren til de befruktete eggene som får ligge i fred er 350-400 døgngader gamle. Plommeseekkyngel, parr og smolt er svært kritiske epoker i villaksens liv der konkurransen i elvene om å spise og ikke bli spist er elementært. Etter 1-6år reiser laksesmolt fra fødeelven og ut i Atlanterhavet. Mange laks kommer aldri tilbake til fødeelven, trolig de aller sterkeste kommer tilbake etter beitereisen i det 106 400 000 km<sup>2</sup> store Atlanterhavet. De som kommer tilbake gyter om høsten og vandrer på nytt ut igjen i havet. (Hentet fra: <http://www.nasco.int>) Nedlastet: 20.11.2014

## Laksen er et gammelt dyr

Evolusjonært sett er laks er et gammelt virveldyr. Fossile (Behnke 1992) og molekylære data (Devlin 1993) tyder på at slektene *Salmo* (atlantisk laks/ørret) og *Onchorhynchus* (stillehavslaks) skilte lag tidlig i Miocen da kjølingen av Polhavet tok til. Miocen er den aller første geologiske epoken av Neogen perioden som strekker seg fra 23 millioner år frem til 2,6 millioner år før vår tidsregning. Vi kan derfor si at slekten *Salmo* er rundt 20



Figur 4: Kart fra Miocen (Neogen perioden) på jorden. Verdenshavene er «åpne» mellom kontinentene. Siste istid har enda ikke startet. Hentet fra (British Broadcasting Corporation 2015) Nedlastet 18.2.2015

(Tiwary et al. 2004), så selv om samfunnet i dag skiller mellom diploid og triploid laks, er dette en noe forenklet virkelighet.

Laksens genuttrykk har bidratt til bedre overlevelse, noe som kan relateres videre mot semi-isolerte avlspopulasjoner som etter istid, tørke og flommer har kunnet krysse seg inn med mangfoldet i lakseartene. Deres anadromiske utvikling har trolig vært svært avgjørende (Allendorf & Thorgaard 1984; Zhivotovsky et al. 1994). På bakgrunn av at det skjedde en autotetraploid polyploidisering med fisk i Salmonidae familien for 65-95 millioner år siden har fisk i denne familien fått mange flere kromosomarmar og dobbel så mye deoksyribonukleinsyre (DNA) enn nært beslektede familier. På den måten kan kromosomtallet i atlantisk laks variere. Arter i salmonidae familien er trolig mer evolusjonært fleksibel enn andre arter (Allendorf & Thorgaard 1984; Ramsden et al. 2003). Anadrome fisker har kunnet eksistert i Norge i ca. 11000 år. I klimaepoken

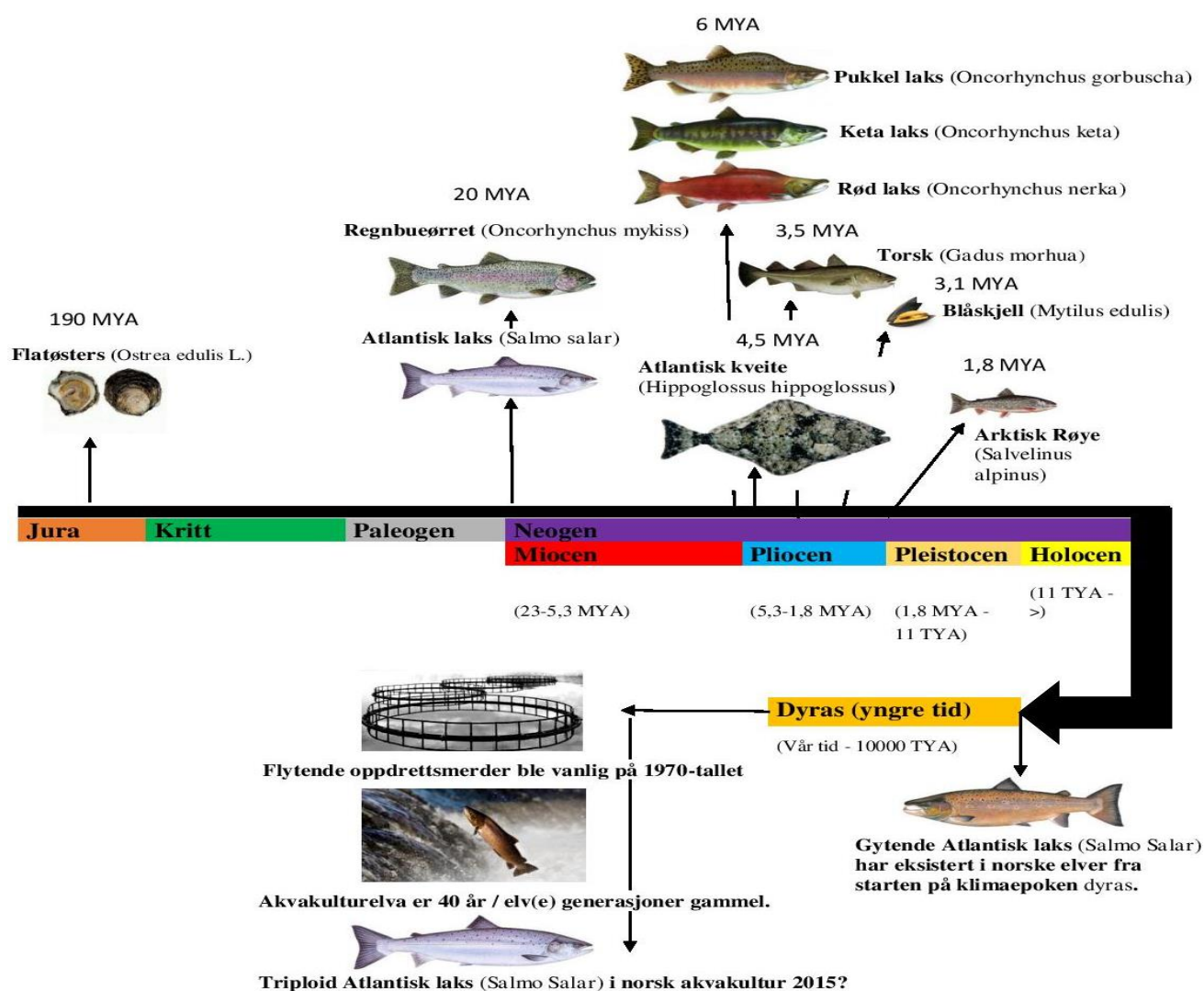


Figur 5: Kart over store deler av Europa under siste istid. Hele Norge og Sverige var dekket med tykk is. Hentet fra: (British Broadcasting Corporation 2014b) Nedlastet 8.2.2015

ynge dyras trakk isen seg tilbake og dannet de norske elvene (Aschehoug og Gyldendals store norske leksikon 2005).

Atlantisk laks er nå inne i en pseudotetraploid tilstand (Danzmann et al. 2008) og en konstant rediploidisering skjer fortsatt. Ingen atlantisk laks har full diploid status ennå (Fuerst 1972).

**Figur 6** viser en tidslinje for evolusjonen til ulike fisk og skalldyr som de fleste i dag også er å finne i oppdrett. Utfoldingen av artene er fremvist på tidslinjen i millioner år siden (MYA) og tusen år siden (TYA).



Figur 6: Atlantisk laks er et ca. 20 millioner år gammelt dyr (Allendorf & Thorgaard 1984; Volff 2005; Waples et al. 2008) og er sammen med Regnbueørret ca. 20 MYA (Volff 2005) mye eldre enn de aller fleste andre marine arter som det oppdrettes på i dag. Arktisk Røye hadde sin utfoldelse for ca. 1,8 MYA (Brunner et al. 2001). Blåskjell hadde sin utfoldelse for rundt 3,1 MYA (Rawson & Hilbish 1995). Torsken som mange ser på som en gammel marin art er kun ca. 3,5 millioner år gammel (Pogson & Mesa 2004). Atlantisk kveite hadde sin utfoldelse for ca. 4,5 MYA (Grant et al. 1984). Laks i slekten *Oncorhynchus* er rundt 6 millioner år gammel og adskillig yngre enn *Salmo salar* (Altukhov et al. 2008; McPhail 1997; Stearley 1992). Flatøstersen dyrkes i ulike poler langs norskekysten og er den marine arten som er desidert eldst i utfoldelse. Flatøstersen oppsto for ca. 190 MYA (Buroker et al. 1979). Under klimaepoken dyras vandret laksen til norske elver. Akvakultureventyret i Norge startet på 70-tallet og rømt laks har siden da gått opp i elvene for å gyte. Nå står tripløid laks for tur i norsk akvakultur. (Figur: Egen)

### 1.1.2 Dagens tall

Innen akvakultur er laks det husdyret langs norskekysten med desidert størst populasjon med en andel på nesten 94 % av totalandelen. I 2013 solgte norsk oppdrettsnæring laks for 40,48 milliarder kroner, som tilsvarer et slaktevolum på 1 168 324 tonn laks (Statistisk sentralbyrå 2013). For å sette mengden laks i perspektiv, eksporten av laks gir 37 millioner måltider rundt omkring i verden hver eneste dag (Norges Sjømatråd 2014). Når det er sagt, var det en nedgang i slaktevolum fra 2012-2013, noe som kan gi bekymring i næringen hvis lakseprisene synker og holdes stabilt lavere enn de faktisk var ( $\pm 40$ Nkr pr.kg) i 2013 og 2014 (Norges Sjømatråd 2014).

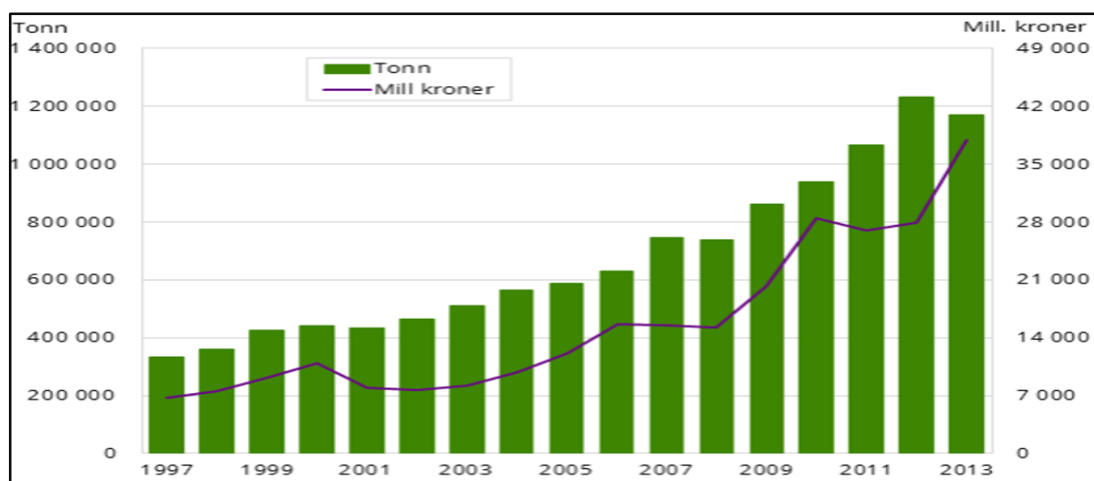
**Tabell 1** viser total mengde matfisk i tonn produsert i Norge i 2013, prosentvis nedgang i volum fra 2012 til 2013, samt førstehandsverdi av fisken og prosent økning i verdi.

Akvakultur i Norge 2013	Matfisk (tonn)	Prosent Andel	Prosent (2012-2013)	Forhåndsverdi (Millioner kroner)	Prosent (2012-2013)
I alt (totalt)	1 247 865	100 %	-5,5 %	40 480	34,8 %
Laks	1 168 324	93,6 %	-5,2 %	37 922	35,7 %

Tabell 1: Laks står for over 90% av akvakultur i Norge og har en enorm økonomisk betydning for norsk eksportnæring og verdens matvareprofil (Statistisk sentralbyrå 2013). Nedlastet: 11.11.2014

Norsk laksenæring har de siste 7-8 årene hatt en enorm økning i volum og ikke minst prismessig. Dette kan forklares med at flere mennesker i verden har økonomi til å kjøpe mer luksuriøs mat, og at industriens bransjeorganisasjoner har jobbet målrettet for å treffe disse menneskene med promotering og reklame.

**Figur 7** viser mengde laks i tonn som er solgt i perioden 1997-2013 og førstehandsverdien på samme laks fra 1997-2013 fremstilt i søylediagram.



Figur 7: Hver dag i 2013 ble det solgt laks for 104 millioner norske kroner. Pris og volumutviklingen siden 1997 og frem til i dag har vært enorm. (Statistisk sentralbyrå 2013) Nedlastet: 11.11.2014.



### 1.1.3 Politikk

I 1973 vedtok Stortinget en midlertidig lov om fiskeoppdrett, en ordning som baserte seg på offentlige løyver (Hovland 2014 s.118). Willoch regjeringen med fiskeriminister Thor Listau (1938-2014) i spissen fremmet i 1981 forslag om en permanent oppdrettslov. Dette er bakgrunnen for forvaltningen av matfiskkonsesjoner som vi i dag har med sporadiske konsesjonsrunder (Hovland 2014 s.163).

Forskrift 2013-06-24 nr. 754 tar for seg tildelingen av de nye løyvene anno 2013. Denne konsesjonsrunden har blitt døpt «De grønne konsesjonene», og det legges vekt på at lisensene skal være miljøfremmende for næringen.

*«§ 1 Formål: Forskrifta skal medverke til å leggje til rette for ei berekraftig og konkurransedyktig havbruksnæring som kan bidra til aktivitet og verdiskaping langs kysten, og stimulere til realisering av nye teknologiske løysingar eller driftsmåtar som legg til rette for å redusere miljøutfordringane med rømming av oppdrettsfisk og spreing av lakselus.»* (Nærings- og fiskeridepartementet 2013)

De 45 konsesjonene er fordelt slik: A) Gjelder tildelingen av 20 konsesjoner fordelt på Troms og Finnmark fylke til fastpris. B) Gjelder tildelingen av 15 konsesjoner uten regionspesifikke kriterier med en lukket budrunde C) Gjelder tildelingen av 10 konsesjoner uten regionspesifikke kriterier til fast pris. Den totalt tillatte biomassen er forskjellig både innad i grupper og på tvers av gruppene (Nærings- og fiskeridepartementet 2013).

Det er kun tildelingen i gruppe A som setter som vilkår bruk av steril laks, herav 7 konsesjoner i Troms og 5 konsesjoner i Finnmark. Faggruppas vedtak ble anket av oppdrettsselskaper som mener at faggruppas vurdering ikke er godt nok dokumentert (Fiskeridirektoratet 2014a). Bruk av triploid laks i fullskala er fortsatt ikke godt nok utforsket, mener oppdrettsselskapene. At dette er politisk betent, ble tydeliggjort med journalistiske henvendelser allerede tidlig etter kvalitetsanalysene var utført (appendix 1).

Den 22. desember 2014 ble klagen avvist av Nærings- og fiskeridepartementet (NFD) ved fiskeriminister Elisabeth Aspaker (H), i Erna Solbergs (H) 1. regjering (Nærings- og fiskeridepartementet 2014).

## Rømning

At det skjer rømninger av laks fra oppdrettsanlegg er ingen hemmelighet. I 2013 ble det rapportert om 198 181 laks på flukt, og tallene anses å være som et minimumstall (Fiskeridirektoratet 2014b). Til sammenligning ble det rapportert 106 768 laksefangster i norske elver i 2014 (Statistisk sentralbyrå 2014). Rømning av laks fra oppdrettsanlegg er ikke ønskelig verken fra konsesjonseier, røkter eller andre for øvrig. Ingen ønsker å tape penger. Imidlertid er det viktig å presisere at det ikke er ulovlig pr. definisjon at laks rømmer. Eieren av oppdrettsanlegget har plikt i henhold til Akvakulturdriftsforskriften §37 å forebygge og begrense rømning (Nærings- og fiskeridepartementet 2008).

At rømt oppdrettslaks kan gyte fritt og etterlater seg avkom i naturen er forskningsmessig dokumentert (Glover et al. 2013). I hvilken grad rømt oppdrettslaks har krysset seg inn i villaksens genmateriale er fortsatt ukjent (Taranger & Albretsen 2014 s.76). Risikoen for at rømt oppdrettslaks påvirker elvene trend måles med høstundersøkelser i ulike vassdrag langs hele norskekysten (Taranger & Albretsen 2014). Trendmålingene har blitt kritisert for sitt lave statistiske grunnlag (Skilbrei et al. 2011), og hvilke stammer er det målingene faktisk måler mot (Brekke 2012). Uansett har undersøkelsene i perioden 2006-2012 gitt en gjennomsnittlig års prosent på innslag av rømt laks som er beregnet til 8,0-10,7 % (Taranger & Albretsen 2014 s.87).

Vi har til nå ikke kjente rømninger fra merder med triploide laks. Det har vist seg at triploid hannlaks viser gyteadfærd overfor diploide hunnlaks i kar (Fjellidal et al. 2014). Dette skyldes trolig at den mitotiske divisjonen i testiklene ikke forstyrres tilstrekkelig (Thorgaard 1983).

Store interesseorganisasjoner som jobber for villaksens eksistens; North Atlantic Salmon Conservation Organization (NASCO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) og International Council for the Exploration of the Sea (ICES), er tydelige på at den genetiske forurensningen som rømt oppdrettslaks utgjør, bør bremses med bruk av triploid fisk i oppdrett (Hansen & Windsor 2006; Hutchinson 1997; ICES General Secretary 1991; Taranger & Albretsen 2014 s.152)

#### 1.1.4 Sjøtemperaturens påvirkning på laks.

Temperatur påvirker laksen i mange sammenhenger og gjennom hele livssyklusen (vekst, helse, stress, variasjoner i havtemperaturen, etter slakting og til kunden).

Effekten av antatt kommende klimaendringene knyttet opp mot fisk er utredet av flere fagmiljøer (Finstad et al. 2010; Framstad 2006; Friedland et al. 2000; Stien et al. 2010).

Oppdrettsnæringen er selvfølgelig opptatt av vannstrøm, oksygenivå i vannet og temperatursvingningene Atlanterhavsstrømmen gir langs norskekysten.

Siden Golfstrømmen gir én temperert vannføring langs hele norske kysten, har vi høye sjøtemperaturer i vinterhalvåret, hvor minimumstemperaturen ikke er under 4 grader celsius. Skagerrakkysten og nord i Finnmark fylke har lave vintertemperaturer i sjøvannet. Laksefisk har et høyt oksygenbehov og tåler av den grunn ikke høye vanntemperaturer. Det antas at når temperaturen går over 18 til 20 grader celsius, er det ugunstig for fiskene (Gjedrem 1975; Hansen et al. 2015).

Temperaturen er en viktig faktor for å kunne bestemme frekvensen av mange reaksjoner hos laks. Reaksjonshastigheten øker med temperaturen. En temperaturstigning på 1°C vil kunne øke hastigheten på reaksjonen med 10% (Pedersen 2014).

Den klassiske Arrhenius modellen er ofte brukt til å beskrive hastighet og temperatur relasjoner i mat og biologiske systemer. Den er spesielt egnet for systemer over et bredt spekter av temperaturer uten en vesentlig endring av mekanismene som bestemmer kinetiske hastighetskonstanter. Akkurat slik det er i oppdrett langs kysten i dag. Men det finnes situasjoner der endringer i systemparametere er bare merkbar over visse terskeltemperaturer (Kong et al. 2007).

#### 1.2 Hva kjennetegner laks med god kvalitet?

Hva er kvalitet?

Kvalitet er et sammensatt begrep som stammer fra det latinske ordet *Qualitas*, og betyr eiendom. Det å definere kvalitet er vanskelig fordi alle har en subjektiv oppfatning av hvilke egenskaper fisken bør ha for at produktet skal behage oss. Det tradisjonelle kravet er at fisk må være fersk, men vi som kunde er også bekymret for hvordan fisken ser ut, hvordan den er pakket, tekstur, smak og lukt. Selv om begrepet kvalitet virker selvforklarende i daglig bruk, er det i praksis mange forskjellige syn på hva det betyr og

hvordan det skal oppnås. (Garvin 1984) skiller mellom flere overordnede tilnærminger til å definere kvalitet.

- Produktkvalitet: en iboende egenskap av produktet bestemmes ved nærvær eller fravær av målbare produktattributter.
- Produksjon kvalitet: et produkt som er i samsvar med spesifiserte krav.
- Bruker opplevd kvalitet: kombinasjonen av produkt-attributter som gir størst tilfredsstillelse til en bestemt bruker.
- Økonomisk kvalitet: et produkt som gir ytelse til en akseptabel pris, eller samsvar til krav til en akseptabel kostnad (Lengnick-Hall 1996).

Fiskeprodukter avhenger av flere ulike attributter av matkvalitet, sånn som matsikkerhet, ernæring, smak, konsistens, farge, utseende, egnetheten av råstoffet for behandling og konservering. Begrepet kvalitet, avhenger også av regionale preferanser, forbrukernes holdninger, metoder for oppbevaring og forbruk. Når det kommer til kvalitets preferanser av laksefilet, finnes det regionale preferanser, forbrukernes holdninger, at ulike markeder har ulike kriterier samt metoder for oppbevaring og forbruk (Einen & Skrede 1998; Einen et al. 1999; Folkestad et al. 2008; Haard 1992; Koteng 1992; Love 1988; Torrissen et al. 1995).

### Hva påvirker kvaliteten?

Produktkvalitet omfatter en rekke aspekter (både biologiske og ikke-biologiske parametere), og fiskeernæring har en direkte innvirkning på flere parametere som påvirker kvalitet, for eksempel farge og utseende, lukt og smak, tekstur, ernæringsmessig kvalitet, holdbarhet, og nivået av forurensninger i fisken i merdene (Kolstad et al. 2004; Lie 2001; Powell et al. 2008; Thodesen et al. 1999; Vieira et al. 2007; Wild et al. 1994). Kvaliteten på fisken varierer fra årstid til årstid året igjennom, dette har betydning for konsistens (fasthet / mykhet), farge og fettinnhold (Mørkøre & Rørvik 2001). Den muskel kjemiske og strukturelle sammensetningen, vannbindingsevne (Water holding capacity, WHC) og de biokjemiske prosessene som skjer etter døden har stor innflytelse på disse faktorene (Huff-Lonergan & Lonergan 2005).

Kvaliteten på fisken kan også påvirkes av *pre*, *ante* og *post mortem* forhold, herunder håndteringen før slakting, slaktings metoder og lagringsbetingelser (Concollato et al.



2014). Kvaliteten av det ferdige produkt avhenger av *rigor mortis* prosessen (*rigor* = stiv, *mortis* = død). Varigheten og styrken av denne prosessen vil igjen være påvirket av faktorer som art, størrelse, metode for fangst, håndtering av fisk (stress), temperatur, og hvordan fiskens tilstand var før den ble slaktet (Ando et al. 1991; Arimoto et al. 1991; Kumano & Seki 1993; Sigholt et al. 1997; Thomas et al. 1999; Tsuchiya et al. 1992). Eksopeptidaser som spalter peptidbindinger er kjent for effektivt å bryte ned fisk *post mortem*, kathepsin D er spesielt effektiv i surt miljø og kommer til uttrykk raskere ved hard håndtering av fisken (Gildberg 1988). Sesongvariasjoner påvirker derfor også slaktekvaliteten til laks (Mørkøre & Rørvik 2001).

### Vanntap

Muskelens evne til å holde på vann er en viktig kvalitetsfaktor som påvirker tørrhet, tygge- motstand og konsistens på fileten. Vanninnholdet av fileten påvirkes av muskelstruktur, varighet, styrke av *rigor mortis* prosessen og sesongvariasjon. I tillegg vil fryseprosedyrer påvirke vanninnholdet ved celledrenging. Hvis frysing skjer når fisken er på vei inn *rigor mortis*, oppstår det en ekstra kraftig muskelkontraksjon (Bito 1986; Ma & Yamanaka 1991; Ma et al. 1992). Dette kan føre til muskelfibre ryker, og vi får «gaping» og ekstra vanntap med påfølgende endring av egenskaper (Cappeln & Jessen 2001; Johnston 2001). Dersom fisken blir frosset før *rigor mortis* inntreffer, er resultatet tinn-rigor, det betyr at fisken får stort dryp tap noe som igjen har negativ innvirkning på kvaliteten (Elvevoll et al. 1996).

### Hva er væskeslipp, og når starter det?

Hovedandelen av dryp tap i rå laks er vann (Ofstad et al. 1995), men noe tap av lipider, proteiner og karotenoider forekommer naturlig i relativt små mengder. Faktorer som sult (Mørkøre et al. 2008) og stress før slakting (Lerfall et al. 2015; Roth et al. 2006) påvirker dryp tap av rå laks. Det meste av vannet i fiskemuskel holdes i enten myofibrillene, mellom myofibriller og mellom myofibriller og cellemembranen (sarcolemma), mellom muskelceller og mellom muskelbunter (grupper av muskelceller) (Huff-Lonergan & Lonergan 2005).

### Vannbindingsevne avhenger av det isoelektriske punktet

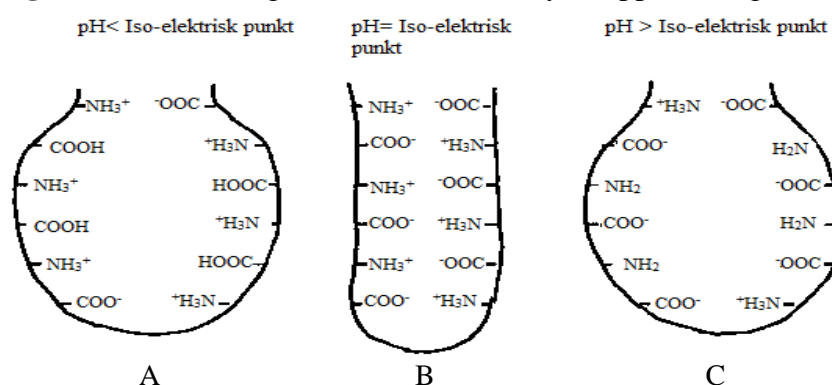
Water Holding Capacity er definert som "*produktets evne til å holde på vann når den utsettes for en fortetnings kraft*" (Lynum & Rustad 2005; Olsson et al. 2003). WHC til musklene påvirkes av faktorer som varme-indusert strukturelle endringer, sarkomer

lengde, osmotisk trykk, pH, ionestyrke og tilstand av *rigor mortis* (Ofstad et al. 1995). Vannbinding i fersk fisk er et sentralt tema når det kommer til saftighet og smak. Det er viktig å merke seg at tining av fisk gir høyere drypptap. Forbrukere flest klarer kun å bedømme åpenbare kvalitetsparametere sånn som flaking (om fisken faller fra hverandre på tallerkenen), tekstur, ømhet og saftighet. Alle disse parameterne er relatert til WHC (Skipnes et al. 2007).

Det er mange faktorer som påvirker WHC slik som kapillar-størrelse, ladninger på proteinnettverket type-ioner, pH-verdi, temperatur, likevekt mellom protein og vann og tilstedeværelsen av lavmolekylære substanser (Albarracín et al. 2011).

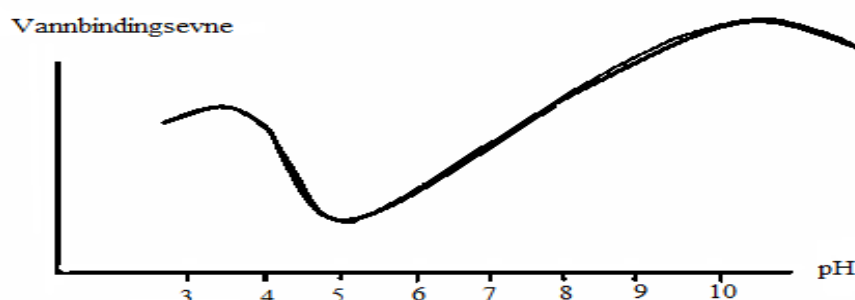
I muskelvev skilles det mellom fritt vann og bundet vann. Det frie vannet holdes i muskelvevet av kapillære krefter, for eksempel i hulrom mellom myofilamenter og myofibriller. Vann er bundet til proteiner ved sterke hydrogenbindinger, og påvirkes av overflateladninger og polaritet av proteinene. I hakket muskelvev ligger også en stor andel av vannet inne i nettverket av de myofibrillære proteinene (Strasburg et al. 2008).

**Figur 8** viser billedlig hvordan vannmolekyler oppfører seg i ulikt i forskjellig pH.



*Figur 8: Vannmolekyler binder seg til ledige ioner ( $\pm$ ), A + C og muskelproteinene sveller. Når det er balanse mellom ladningene til ionene vil de binde seg til hverandre. Ved det isoelektriske punktet B er det ikke ledige ioner å oppdrive og proteinene vil naturlig nok forbli usvullet i denne fasen (Lynum & Rustad 2005 s. 116). Nedlastet: 5.2.2015*

**Figur 9** viser grafisk hvordan vannbindingsevnen påvirkes av det isoelektriske punkt.



*Figur 9: Det isoelektriske punktet til muskelproteiner i fisk ligger mellom pH 4,5-5,5. Vannbindingsevnen til laksekjøtt er best ved det isoelektriske punktet (Lynum & Rustad 2005 s.116). Nedlastet: 5.2.2015*

### 1.2.1 Farge

#### Astaxanthin

Kjøttfargen for laks er en av de viktigste egenskapene som påvirker forbrukernes oppfatning av kvalitet (Francis 1995). Den mest brukte karotenoidet for muskel pigmentering for laks er astaxanthin (3,3'-dihydrokxy- $\beta$ ,  $\beta$ -karoten-4,4'-dione) som gir rødlig farge (Bjerkeng 2000; Christiansen et al. 1995; Skrede & Storebakken 1986). Astaxanthin er hovedsakelig produsert av gjær *Xanthophyllomyces dendrorhous* (tidligere *Phaffia rhodozyma*) og bakterier *Paracoccus carotinifaciens* (Panaferd-AX) (Lerfall 2011). I dag er 5-6 karotenoider relevante for karotenoid analyser av laksekjøtt, av totalt 600 eksisterende karotenoider i naturen (Britton 1995). Karotenoidene, forekommer i forskjellige stereo isomerer (*cis* og *trans*) og optiske isomerer (R og S) der den geometriske all-*trans* isomeren er dominerende i laksemuskel (~ 90%) (Bjerkeng, Bjørn et al. 1997; Henmi et al. 1987; Schiedt & Liaaen-Jensen 1995).

Det menneskelige øyet har begrenset opplevelse av farge og unøyaktig persepsjon i fargefulle næringsmidler. Når det menneskelige øye ikke kan se forskjell i fargenyanser kaller man at øynene blir «mettet». Unøyaktig oppfatning av farge i laksemuskelen skjer når astaxanthinkonsentrasjonen overstiger 6-8 deler per million (Foss et al. 1984).

I sjøvannfasen er den normale andelen av astaxanthin i kommersiell laksefôr mellom 20-50 mg kg<sup>-1</sup>. Det er mange parametere som påvirker fargen til laksekjøtt, blant andre; genetisk bakgrunn (Gjerde et al. 1994; Thodesen et al. 2001a; Thodesen et al. 2001b; Torrissen & Nævdal 1988), komposisjon og totalt mengde av karotenoider i fôret (Bjerkeng 2000; Christiansen et al. 1995; Einen & Roem 1997; Torrissen et al. 1995), sesongvariasjoner (Mørkøre & Rørvik 2001; Shearer et al. 1994; Shearer 1994), sult og stress før slakting, slakteprosedyrer, is kjøling, muskelfibertetthet (Erikson & Misimi 2008; Kiessling et al. 2004; Kolstad et al. 2004; Lerfall et al. 2015; Powell et al. 2008; Roth et al. 2010; Vieira et al. 2007) og den generelle helsetilstanden til fisken (Christiansen et al. 1995; Dawson-Coates et al. 2003; Moran et al. 1999; Whitaker & Kent 1991).

## 1.2.2 Filet–tekstur

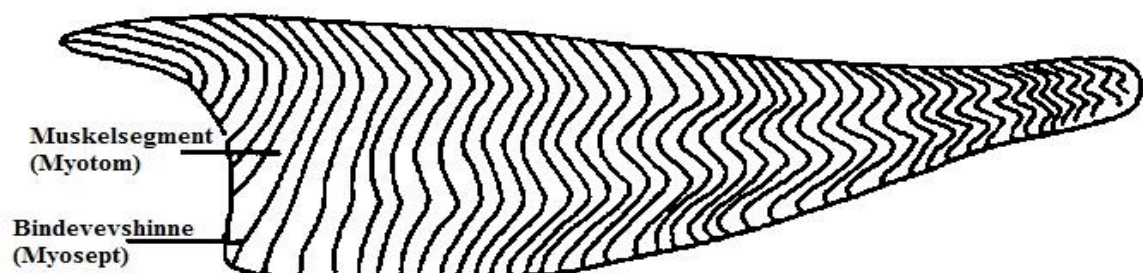
### Filet tekstur

Teksturen av fisk kan bli definert ved sin tørrhet, hardhet, og saftighet og blir typisk testet i industrien ved hjelp av "finger-metoden" (Lie 2001). Tekstur er regnet som en av de viktigste kvalitetsegenskapene i laksemuskel (Koteng 1992) og er svært komplekst fordi det er mange faktorer som påvirker en laksefilet. Termene «gaping» og tekstur er ofte brukt om hverandre. Årsaker til avvikende tekstur og gaping kan knyttes til avl fase (miljøforhold, fôr / fôring, helsetilstand, redusert styrke i bindevev) (Bremner 1999; Hatae et al. 1986; Thodesen et al. 2001a), slakteprosessen (stressnivå, transport, pumping, bedøving) (Kiessling et al. 2004; Mørkøre et al. 2008) og lagring (temperatur, hygieniske forhold, varighet) (Espe et al. 2004; Hultmann & Rustad 2004), sesongvariasjoner (Espe et al. 2004; Lavety et al. 1988; Mørkøre & Rørvik 2001) eller en kombinasjonen av alle disse faktorene (Mørkøre 2008).

### Muskeloppbygning i laks

Fiskemuskel i oppdrettet laks består i hovedsak av vann, fett og proteiner. Andelen av de ulike komponentene varierer med type fiskefôr og avl. Laks har to typer muskelfibre, og det skilles mellom røde og hvite muskelfibre (Lynum & Rustad 2005 s.54). Den røde muskulaturen er aerob og benyttes for å opprettholde kontinuerlig svømming, samt å kunne gi hurtigere flukt respons ved eventuelle farer. Hvit muskel skaper fylde og dominerer som muskelmasse i laks, mens rød muskel ligger som en stripe like under skinnet og løper herav under den laterale linje. Hvis vi ser på den ernæringsmessige sammensetningen mellom muskeltyper, består rød muskel av flere lipider enn den hvite muskulaturen (Aursand et al. 1994).

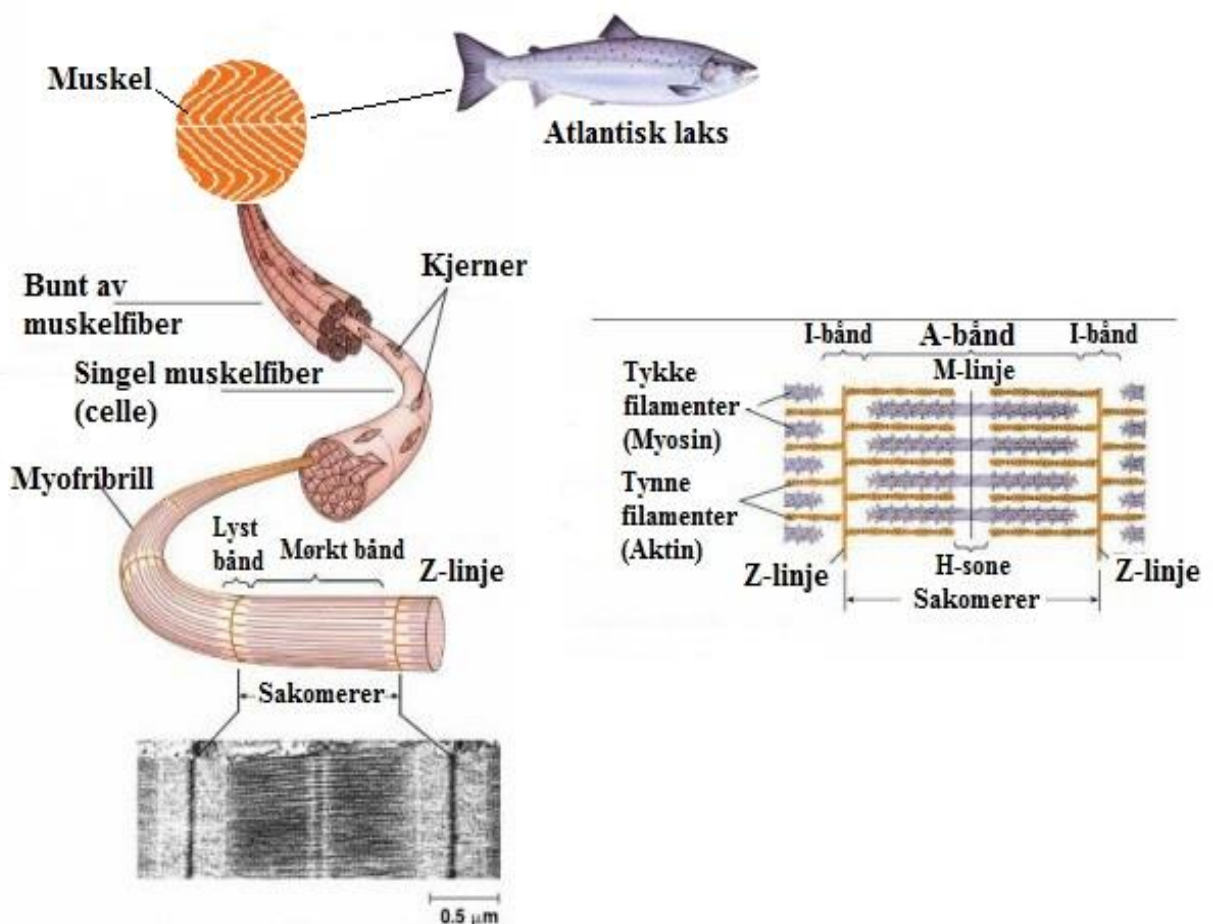
**Figur 10** viser hvordan fiskemuskulaturen er bygget opp med muskelsegment og bindevev



*Figur 10: Muskulaturen til fisk består av muskelsegmenter og bindevevshinner. Segmentene danner en loddrett W i fiskemuskulaturen. Figuren viser kun hvit laksemuskel, mens den aerobe røde muskelen ligger mellom skinn og hvit muskel (Lynum 1999 s.28) Nedlastet: 4.2.2015.*

Laksemuskelen er lagdelt i stedet for buntet til skjelettet som i andre virveldyr. Hvert segment av muskelen inneholder horisontale muskelfibre (myotom) og er adskilt fra hverandre ved hjelp av et ark av bindevev (myosept) (Kryvi & Totland 1997; Lynum & Rustad 2005). I triploid laks er det oppdaget unormal cellestørrelse på muskelfibre og endret utvikling av muskelfibre som myotubes og myofibriller (Johnston et al. 1999). Myotomene består av myofibriller som er plassert horisontalt som strekker seg fra myosept til myosept. Muskelkontraksjoner mellom aktin og myosin; aktomyosin er velkjent. Myofibriller består av aktin og myosin som er bygget opp som lange parallelle bunter av proteintråder, hvorav aktintråden er fast i en tverrgående skive kalt Z-linje. Myosin består av tråder som kan skape kontraksjon slik at de kan trekke seg sammen. Lengden mellom to Z-linjer kalles sarkomerlengde og opererer som den funksjonelle enheten (Lynum & Rustad 2005).

**Figur 11** viser hvordan en muskulaturen i atlantisk laks er bygget opp del for del.



*Figur 11: Det dannes kryssbindinger mellom muskelproteinene aktin og myosin som gir en muskel i låst posisjon når tilstedeværelsen av ATP i muskelen kommer ned mot 5% av totalt ATP. Reaksjonen er ikke reversibel. I muskelfiberen til høyre ser man tydelig Z-linjene, M-linjen og sarkomer lengdene. (Hentet fra: [www.sakshieducation.com](http://www.sakshieducation.com)) Nedlastet og modifisert: 22.2.2015*

## Sesongvariasjoner

Atlantisk laks klassifiseres blant de fete fiskeslag, hvor den utløsende sammensetningen av slaktestørrelse laksekjøtt er vann (60-65%), etterfulgt av protein (18-20%) og lipider (16-19%) (Einen et al. 1998; Mørkøre & Rørvik 2001; Shearer et al. 1994).

Vanninnhold og fett har negativ korrelasjon med hverandre (Lynum & Rustad 2005 s.54). Fisk viser en signifikant kapasitetsøkning gjennom et kalenderår for å endre muskel- sammensetning. I laksens vekstsesong vil proteinutnyttelsen være dårligere enn utenfor sesong (Einen & Roem 1997). Dette fører igjen til endring i fett og vann komposisjonen mens proteinnivået er stabilt (Mørkøre & Rørvik 2001; Shearer et al. 1994). Ploiditet påvirker ikke kjemisk sammensetning (Bjørnevik et al. 2004).

Når fiskemusklene vokser, kan de individuelle muskelfibrene vokse i størrelse, og/eller nye muskelfibre kan bli dannet. I vinterhalvåret, er dannelsen av nye fibre høyest, fordi fiskens vekst er liten ved denne årstiden. Vekstraten er temperaturavhengig. Forholdet mellom små og store muskelfibre er høyest om høsten og vintersesongen, og vil naturlig minske i løpet av våren, før starten av en ny vekstsesong. Fisk med høyere andel av små fibre er mindre utsatt for «gaping» enn fisk med store fibre. Kvaliteten påvirkes når forholdet mellom bindevevsprotein og muskelprotein blir endret (Bjørnevik et al. 2004; Einen & Thomassen 1998; Espe et al. 2004; Johnston et al. 2002; Lavety et al. 1988; Mørkøre & Rørvik 2001; Veland & Torrissen 1999).

## pH

pH påvirker fiskekjøttet hos laks på flere forskjellige måter og har stor betydning for kvalitet på fisk, både *pre* og *post mortem* (Erikson & Misimi 2008; Sigholt et al. 1997; Sigurgisladottir et al. 1997) Skalaen for pH ble oppdaget av Søren Peter Lauritz Sørensen og senere forklart i to publikasjoner i anno 1909 (Sørensen 1909). pH er en forkortelse av *pondus Hydrogenii* og er en logaritmisk skala som angir konsentrasjonen av H<sup>+</sup>-ioner i målemediet. Denne skalaen går fra 0-14 der 0 er surest og 14 er mest basisk (Nørby 2000).

## Fiskemuskel proteiner

Proteiner er komplekse polymerer som består av opptil 21 forskjellige aminosyrer (Damodaran 1996). De er bundet sammen av aminobindinger. Funksjonene til proteinene blir bestemt av den tredimensjonale strukturen, som bestemmes ved aminosyresekvensen. Strukturen av proteinene er anordnet i fire nivåer:

primærstrukturen beskriver alle kovalente bindinger som binder sammen aminosyrene i polypeptidkjeden, og omfatter sekvensen av aminosyrer. Sekundær struktur arrangerer bestemte deler av polypeptidkjeden i enten  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -ark eller  $\beta$  folder.

Tertiærstrukturen er den tredimensjonale strukturen av det foldede proteinet.

Kvartærstruktur, beskriver hvordan de ulike polypeptidkjeder er anordnet i forhold til hverandre (Damodaran 1996; Lynum & Rustad 2005).

Fiskeproteiner er gruppert i tre deler, basert på deres oppløselighetsegenskaper. Salt-løselige myofibril proteiner (65-80 %, kontraktile nettverk, aktin, myosin, tropomyosin, troponin), vannløselige sarkoplasmaproteiner (18-20 %, hovedsakelig enzymer, globulin, myogen, myoalbumin) og uløselige stromale celleproteiner (3 -5 %, bindevev, kollagen, retikulum, elastin) (Hall & Ahmad 1997). Tekstur og WHC egenskaper til fisken er betydelig avhengig av fordelingen mellom gruppene av proteiner. Endogene proteaser, som er i stand til å hydrolysere forskjellige proteiner i muskel, er viktig i nedbrytingen tidlig i stadiet under is-lagring av rå fisk (Cepeda et al. 1990).

### Pre-og post mortem reaksjoner, rigor mortis

*Post-mortem* betyr etter døden og er en fellesbetegnelse på forandringer som skjer i fisk etter at døden inntreffer. Etter døden starter enzymatisk nedbrytning av strukturelle proteiner, nedbrytningen kaltes autolyse (Delbarre-Ladrat et al. 2006). Dette går for å være de aller første mørningsprosessene i fiskemuskel og utgjør de viktigste kvalitetsegenskapene fiskemuskel får.

Det skilles mellom hjernedød, hjertedød og muskeldød. Dødsstivheten (*rigor mortis*) er en fysisk forandring som skjer i musklene til alle virveldyr *post mortem* (Bendall 1973). Ved dødstidspunktet opphører naturlig nok blodsirkulasjonen, men de katabolske prosessene fortsetter å fungere i muskelcellene så lenge det er energi tilgjengelig.

Oksygenets transport til mitokondriene stopper opp og forårsaker anaerobe betingelser, etterfulgt av de overnevnte biokjemiske reaksjoner slik som akkumulering av melkesyre, som fører til pH-fall, og reduksjon av adenosintrifosfat (ATP).

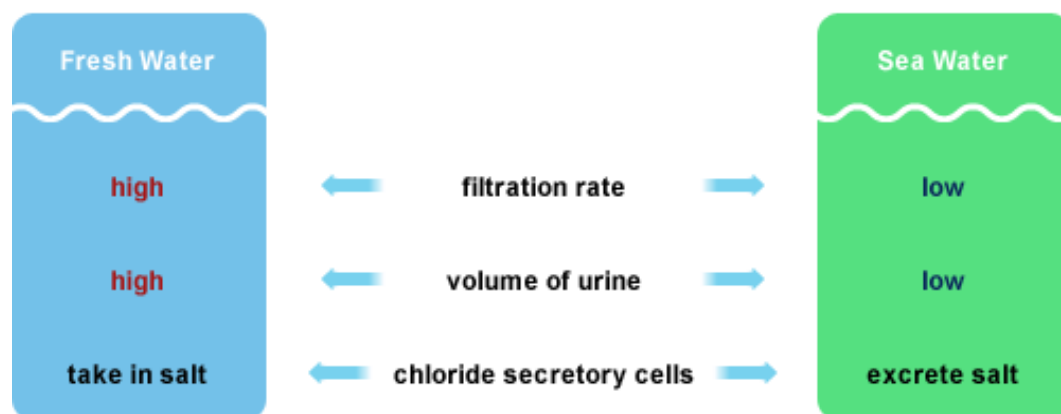
Muskelcellene angir *rigor mortis* funksjon når ATP-nivået når et minimum, antagelig ved 5% ATP tilstede. Aktin og myosin danner kryss-bro komplekser, og disse kompleksene blir brukt til å forklare stivhet eller stivhet karakterisering av disse broene (Currie & Wolfe 1979). Dødsstivheten vil altså gjøre fisken hard og ubøyelig. I hvilken

grad dette skjer er avhengig av fisketype, glykogenlager, stress før døden og temperatur (Haard 1992). Siden actomyosin broene er irreversible, kan oppløsningen av *rigor mortis* ikke forklares med oppløsning av broene (Bendall 1951; Marsh 1953). Det er fremsatt uttalelige teorier rundt *rigor mortis* oppløsning spesielt mye diskutert er nedbrytingen av muskelstrukturen ved hjelp av proteolytisk aktivitet i dødt vev (Hultin 1984; Khan 1977; MacNaughtan 1978; Tsuchiya et al. 1992), samt osmotiske endringer i celler (Balevik 2004). Forskjellig ploiditet med endret cellestørrelse som resultat kan gi ytterligere svar på osmoseteorien og bedre forståelse av vanntransporten i vev i muskulaturen og celler vil øke vår kunnskap om *rigor mortis* og WHC av muskel (Slinde u.å).

### Osmolaritet

Osmose er når en mindre konsentrert flytende løsning trekker seg mot og inn gjennom en semipermeabel membran til en løsning med høyere konsentrasjon, inntil det er likevekt mellom løsningene,  $\pi=cRT$  (Grazi et al. 1996). Osmoseregulering i fisk er forskjellig fra andre dyr, på grunn av deres miljø. Laks begynner sine liv i elver og vandrer til sjøen, og tilbake til de samme elvene senere i livet for å gyte (Mills 1991). De er i stand til å takle disse endringene ved å endre osmoseregulatorcellene.

**Figur 12** viser osmoseregulering i laks fra ferskvann (0,1% salt) til saltvann (3,5% salt) og tilbake.



Figur 12: I ferskvann er filtreringsraten høy, produksjonsvolumet av urin høyt og regulerer salt fra sjøvannet til 1% i blodbanen hos laks. I saltvann er filtreringen av salt unødvendig da det er nok salt tilgjengelig. Urinvolumet er lavt og kloridcellene jobber optimalt for å få hindre for mye salt i blodbanen (Hentet fra: (British Broadcasting Corporation 2014a)) Nedlastet: 1.2.2015.

Ferskvannsfisk er hyperton til sine omgivelser. Dette betyr at deres blod, har en lavere vannkonsentrasjon enn det omgivende i ferskvann. Når rent vann passerer gjennom



munnen og over gjelle membranene vil vannmolekyler diffundere fra ferskvann til blodet ved osmose. Disse fiskene må produsere et meget stort volum av urin for å balansere det store inntaket av vann. Det store volumet av urin bærer salt med seg, og saltet må erstattes. Løsningen på dette problemet er å produsere et stort volum av urin slik at fisken igjen må fjerne store mengder vann fra blodet ved å ha en særdeles høy grad av filtrering i nyretubuliene. Dette gjøres ved å ha en nyre med mange store glomeruli - kapillært nettverk som fluid filtreres ved starten av nyretubuli. Salt utskifting er løst ved klorid sekretoriske celler i gjellene, som aktivt transporterer salter fra ferskvann inn i blodet (Evans 1980; Heggberget 1992; Jonsson & Jonsson 2011; McCormick & Saunders 1987).

Saltvannsfisk er hypoton til sine omgivelser. Dette betyr at deres blod har et høyere vannkonsentrasjon enn det omgivende sjøvannet. Sjøvannet passerer gjennom fiskens munn og over gjelle membraner, der vil vannmolekyler diffundere ut av blodet inn i sjøvann ved osmose. På grunn av dette må fiskene erstatte vannet som de stadig taper ved osmose. De kan også bare ha råd til å produsere et meget lite volum av urin. Ved å drikke sjøvann bringer en stor mengde av salt inn i blodet, og dette må fjernes. De løser dette problemet er å erstatte vannet de taper. Saltvannsfisk drikker sjøvann. For å fremstille et lite volum av urin må de ha en lav hastighet på filtrering av vann inn i nyretubulene. Dette gjøres ved å ha en nyre med relativt få og små glomeruli. Salt blir fjernet ved klor sekretoriske celler og ioner i gjellene ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase og  $\text{Na}/\text{Ca}^{2+}$  ATPase-pumpen) som aktivt transporterer salter fra blodet inn i det omgivende vann (Evans 1980; Foskett et al. 1983; Heggberget 1992; Jonsson & Jonsson 2011; Maetz et al. 1976; McCormick & Saunders 1987; Payan et al. 1984).

### 1.2.3 Fersk smak (forventning), sensorikk, holdbarhet

#### Sensorisk kvalitet

For kunden er sensorisk kvalitet den avgjørende faktoren som former helhetsinntrykket av et fiskeprodukt. Sensorisk kvalitet angår egenskaper som kan oppfattes av sansene, for eksempel utseende, lukt, smak, tekstur og saftighet. Disse erfaringene er subjektive og varierer fra person til person. Totalbildet av sensorisk kvalitet dannes ikke før kunden har kjøpt og spist produktet (Berg & Dyrnes 1997).

Når autolytiske reaksjoner starter i muskelen, gir dette tap av friskhet, pH senkning med påfølgende vanntap da pH nærmer seg det isoelektriske punkt, og en rekke andre

nedbrytningsmekanismer igangsettes (Delbarre-Ladrat et al. 2006; Lynum 1999 s.52). pH i musklene til pattedyr og fisk er rundt 7,0. I fiskemuskel synker pH-verdien i intervallet 6,2 til 6,5 når glykolysen har stoppet opp, mens pattedyrs pH stopper ved pH 5,4 til 6,0 (Sigholt et al. 1997). Vanntap kan også forklares med mikrobiologisk forurensing (Delbarre-Ladrat et al. 2006), mikroorganismer er ikke viktig i forhold til teksturendringer i laksemusklene (Hultmann & Rustad 2004).

### 1.3 Diploid versus triploid atlantisk laks

#### Generelt

Det sterke ønske om bruk av triploid laks i akvakultur oppsto med bransjens behov for å hindre kjønnsmodning av oppdrettsfisk før de når marked størrelse, fordi moden laks blir kronisk stresset, har redusert kjøttkvalitet og er mer utsatt for sykdom (Mazeaud et al. 1977).

Metoden som benyttes ved triploidisering ble benyttet allerede på midten av 1970-tallet, men interessen for steril fisk stagnerte når produksjonsproblemene ble større enn fordelene med steril fisk. Forslag om bruk av triploid laks i norsk oppdrettsnæring har med ujevne mellomrom blitt diskutert, nå sist ved utdelingen av de grønne konsesjonene.

Det er tatt til ordet for at triploid laks bør anses som en egen art (Benfey 2001) dette baserer seg på de fysiologiske forskjellene mellom diploid og triploid (Benfey 1999; Piferrer et al. 2009).

Triploid laks er ikke å regne som en genmodifisert organisme (GMO). I følge den norske genteknologiloven §4 defineres GMO som: «*Mikroorganismer, planter og dyr hvor den genetiske sammensetning er endret ved bruk av gen- eller celleteknologi*» (Klima- og miljødepartementet 1993).

Genteknologi: Teknikker som innebærer at arvestoff isoleres, karakteriseres, modifiseres og innsettes i levende celler eller virus. Celleteknologi: Teknikker for framstilling av levende celler med nye kombinasjoner av genetisk materiale ved fusjon av to eller flere celler (Klima- og miljødepartementet 1993). Triploid laks blir jamfør norsk lov ikke regnet som genmodifisert basert på produksjonsmetode.

Norsk forskningsråd (Nævdal 2003 s.44) ønsket i 2003 et kollektivt svar om blant annet triploidisering bør bli forbrukermessig akseptert før praktisk bruk i oppdrett og forskning fortsetter (Nævdal 2003 s.45).

To politiske grunner til triploidisering er at norskproduserte lakseeegg og/eller laksesmolt kan selges til resten av verden uten at arvematerialet blir eksportert. Det andre og kanskje det som er mest politisk betente, er at triploid laks ikke blir kjønnsmoden da de ikke produserer funksjonelle kjønnsceller (Benfey 1999) og den kan derfor ikke videreføre sine gener til villaksen ved en eventuell rømning fra merdene.

Hvis den menige oppdretter skal velge triploid foran diploid laks i sine merder må kvalitet, mengde superior fisk og produksjonsbetingelsene være lik eller bedre enn produksjonen av diploid laks (O'Flynn et al. 1997).

Dyrevelferd er et av nåtidens trendord. Sensasjonsjournalistikken som vi blir møtt med i dagens samfunn er med på å fyre oppunder diskusjonene som høye produksjonsvolum, dyreforsøk og generelle dyrevelferdsspørsmål i akvakulturnæringen. Det store ønske om økonomisk suksess setter forskere, politikere og næring i dårlig lys (Huntingford et al. 2006; Johansen et al. 2006). Triploid fisk har hatt sine velferdsproblem (Fraser et al. 2012) uavhengig av dette blir dyrevelferd definert likt. Definisjonen er funksjonsbasert, naturbasert og/eller følelsesbasert (Huntingford et al. 2006).

**Tabell 2** tar for seg tre av de største dyrevelferdsbetegnelse vi har på fisk. Selv om dyrevelferden skal ivaretas på best mulig måte hos dyr i akvakultur må det finnes en balansegang mellom god dyrevelferd og produksjon av mat. Det er punkt 1 og 2 som er mest pålitelig indikator på dyrevelferd (Huntingford & Kadri 2008).

---

### Dyrevelferdsbetegnelser

---

<sup>1)</sup> Funksjonsbasert	Fisk skal ha mulighet til å tilpasse seg omgivelsene slik at alle sine biologiske systemer fungerer på riktig måte.
<sup>2)</sup> Naturbasert	Fisk skal ha mulighet til å leve et naturlig liv, kunne uttrykke seg på lik linje med villfisk gjør.
<sup>3)</sup> Følelsesbasert	Fisken skal ikke ha negative opplevelser, som smerte, frykt og sult, og har tilgang til positive opplevelser, for eksempel sosialt samvær

---

## Generelle og kvalitative forskjeller

Det er samsvar mellom produksjonsresultatet en avlsfamilie for laks ga som diploid og triploide individer (Taylor et al. 2011). Dette tyder på at det ikke er generelle forskjeller, og det er ikke nødvendig med et eget avlsprogram for triploid fisk (Taylor et al. 2011).

Tidlig forskning rundt triploid laks viste at det var noen utfordringer da det var tydelig høyere dødelighet på triploid laks enn diploid (O'Flynn et al. 1997).

Dårligere vekst på triploid laks enn diploid laks (Galbreath, Peter F & Thorgaard, Gary H 1997) og ikke minst en utstrakt mengde skjelettdeformasjoner både i kjeve og rygg (O'Flynn et al. 1997; Sadler et al. 2001).

Studiet til (O'Flynn et al. 1997) viste høyere overlevelse i både ferskvann og saltvannsfasen hos diploid laks i flere årsklasser sammenlignet med triploid laks. Det er viktig å merke seg at forsøket hadde generelt stor dødelighet på begge laksetyper pga. dårlig eggkvalitet og lus problem i sjøvannsfasen (O'Flynn et al. 1997).

Nye forsøk med triploid fisk med lærdom fra tidligere har gitt forskningsrapporter der det ikke er betydelige forskjeller i vekst mellom gruppene totalt. Triploid fisk vokser således nå også raskere i ferskvannsfase sammenlignet med diploid (Bonnet et al. 1999; Cotter et al. 2000; Oppedal et al. 2003; Tave 1993).

Oppdagelsen av lavere tetthet av satellitt celler i triploid laks (Johnston et al. 1999), og testforsøk med økende fosfornivå i startfôring til sjøvannsoverføring på triploid laks (Fjelldal et al. 2012) har gitt deformasjoner i skjelettet på nivå med diploid laks (Fjelldal et al. 2012).

Hypoksi og temperaturfølsomhets analyser viser store forskjeller mellom triploid og diploid laks ved 19°C og lavt oksygenivå (Hansen et al. 2015), selv om diploid og triploid fisk virker til å ha samme aerobe kapasitet (Stillwell & Benfey 1997). Triploid fisk sin misnøye ved å svømme i varmt vann er godt dokumentet (Altimiras et al. 2002; Hyndman et al. 2003; Ojolic et al. 1995).

Diploid laks hadde signifikant høyere andel superior enn triploid laks ved slakting (Fraser et al. 2013; Taylor et al. 2013) i to av tre studier (Cotter et al. 2002).

## Produksjonsforskjeller

Hovedelementet i produksjonsforskjellene er trykkbehandlingen triploid laks blir utsatt for. Metoden er effektiv og bredt akseptert (Benfey 1999; Tave 1993). Den temperaturavhengige metoden utføres med en konstant trykkbehandling på 655 bar fra de befruktede lakseeggene er 300 minuttgrader til de er 350 minuttgrader (Hansen 2012 s.41). Ytterligere endringer i prosedyrer utarbeidet for diploid laks er desinfisering og lavere inkubasjonstemperatur for triploidegg (Fraser et al. 2015) for å redusere deformasjoner i rygg og hjerte hos triploid (Sambraus et al. 2014).

## Genetikk

Genetikk er læren om hvordan egenskaper går i arv (Bioteknologirådet 2010). Gregor Johann Mendel (1822-1884) er grunnleggeren av moderne avlslære og har flere arvelover oppkalt etter seg (Gjedrem 1995 s.7).

Arvestoffet i alle levende organismer er DNA og består av trådformede molekyler som er bygget sammen til en dobbeltspiral, DNA-dobbelthelix. De trådformede molekylene er bygget opp av basene; Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Tymin (T), der C+G og A+T danner basepar (Harvey & Ferrier 2011 s.395-413). Genomet (hele arvestoffet) er strukturert i lineære molekyler kalt kromosom (Harvey & Ferrier 2011 s. 464-470).

Antall kromosomoppsetninger i en celle kan variere fra art til art. Dette kalles ploiditet.

**Tabell 3** viser en liste over et fåtall av alle ploiditeter som finnes i naturen i dag. Navnene gjenspeiler antallet kromosomoppsetninger det er i cellen. Ordforklaringer som gjør avsnittet enklere å forstå er også med i tabellen.

Ploiditet	Antall kromosomoppsetning	Eksempel
Haploid	n=1	Kjønnsceller
Diploid	n=2	Pattedyrceller
Triploid	n=3	Diverse frukt
Tetraploid	n=4	Potet, bomull
Pentaploid	n=5	Tresorter
Heksaploid	n=6	Brødhvete
Octaploid	n=8	Jordbær
Decaploid	n=10	Acipenser (Stør familien)
Dodecaploid	n=12	Noen typer frosker
Polyploid	Fellesnavn n=2<	-
Autotriploid	Diploid og haploid formering (Zygoten n=3)	-
Autotetraploid	Dobler egne (like) kromosomer n=2x2	-
Pseudotetraploid	"Uekte", "falsk" tetraploid fisk der kromosomantallet varierer på individnivå.	-

*Tabellen har også med eksempler på en art/celle eller andre levende organismer. Flere av ploiditetene er nevnt senere i oppgaven.*

I dag refereres det til 29 kromosom i hvert kromosomsett for den diploide nordeuropeiske laksen, altså 58 kromosom totalt. (pers.med Simen Rød Sandve 2015) Andre kilder viser til at den diploide atlantiske laksen ( $n=2$ ) har mellom 54-60 kromosom (Gilbey et al. 2004; Gjedrem 1995 s.15; Moen et al. 2004; Rise et al. 2004), mens triploid atlantisk laks ( $n=3$ ) antagelig har 81-90 kromosomer i cellen. Hvor mange av kromosomene som er i funksjon i den triploide laksen vet vi enda ikke. Triploid laks inneholder i tillegg 1,3-1,7 ganger mer nukleært DNA i cellen (Pandian & Koteeswaran 1998). Stor spredning i mengde nukleært DNA tyder på at den pseudotetraploide variasjonen må være stor. Dagens laks er 0-15% tetraploid (feilduplisert) (pers.med Simen Rød Sandve 2015).

Laksens genom er vanskelig å studere og ikke minst svært biologisk interessant da det som tidligere nevnt skjedde en autotetrapolidisering (genomduplisering) i en felles stamfar for 80-100 millioner år siden (Allendorf & Thorgaard 1984). Sekvensering av genomet hos atlantisk laks viser at laksen fortsatt har en eller to ekstra kromosomarmen (pers.med Simen Rød Sandve 2015).

Innenfor en spesifikk art kan det være store variasjoner i størrelse, farge, alder ved kjønnsmodning, kroppsform, sykdomsmottagelighet, samt mye mer. Mange av disse forskjellene tar til ved starten av livet og forskjellene øker utover i livet, individene miljøtilpasser seg (Gjedrem 1995 s.4).

Menneskelig styring av genetisk variasjon mellom villaks og forskjellige avstamminger innenfor oppdrettslaks over tid har gitt resultater (Norris et al. 1999).

Når genuttrykk skal beskrives skiller det mellom genotype og fenotype. Genotype beskriver alle de gener en organisme drar med seg fra far og mor, mens fenotype er de genuttrykk som uttrykkes på selve individet (Van Buskirk & Schmidt 2000). Seleksjon er da en bestemt genotype har større overlevelse og/eller sprer genene sine i større volum og tempo enn andre genotyper (Gjedrem 1995 s.36).

Variasjonskoeffisienten (CV) benyttes for å sammenligne variasjonene i egenskapene innad i en art, og uttrykker forholdet mellom standardavviket og middeltallet. Disse statistiske virkemidlene blir benyttet for å se om variasjonen i de genetiske egenskapene er stor eller liten innenfor populasjonen (Gjedrem 1995 s.57-58).

Avl i akvakultur baserte seg opprinnelig på økonomisk gevinst ved å selektere ut fenotype som vekt og lengde (kvantitative egenskaper) for så å reprodusere de med fisk med samme fenotype i håp om at de genotype-genuttrykkene ville variere mindre i en bestemt populasjon (Gjedrem 1995 s.5), i dag selekterer vi enda mer spesifikt.

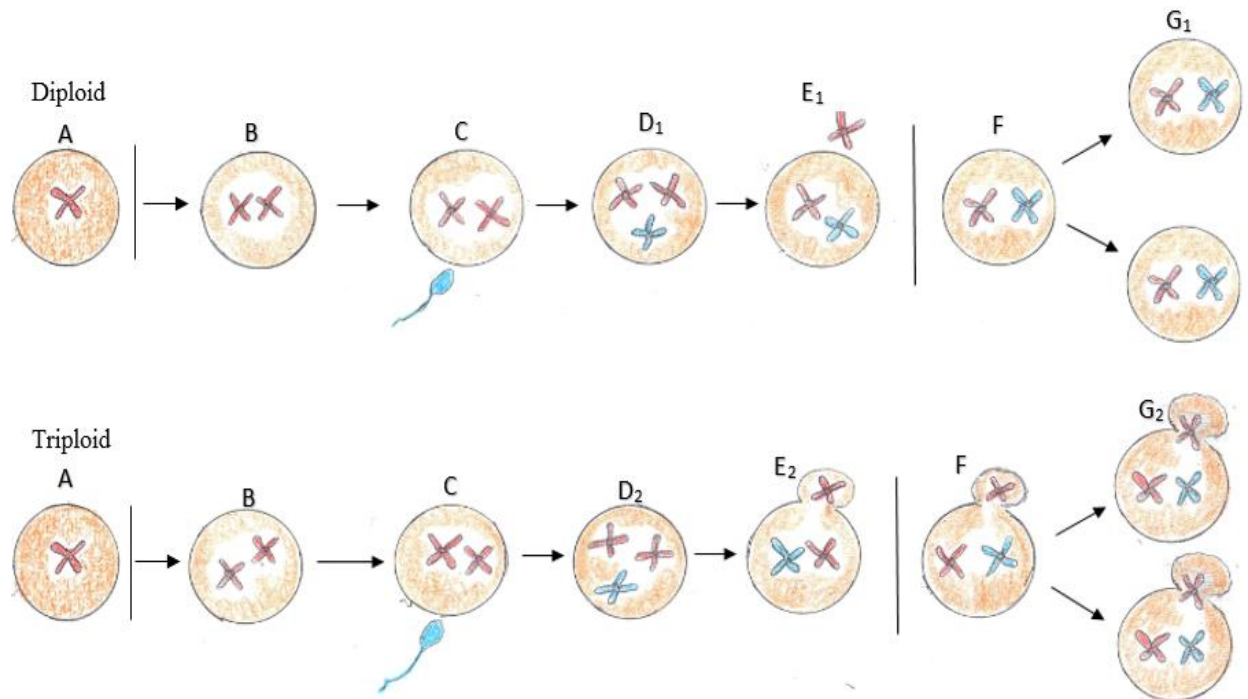
## Celleteori

En celle er den universelle byggesteinen i alle levende vev (Alberts 2014 s.6). Det skilles mellom prokaryot og eukaryote celler. Celler har ingen standardmål, de fleste celler er mellom 10µm til 20µm store (Store Norske Leksikon 2009). De varierer enormt både i utseende, størrelse og funksjon. Det er den arvemessige informasjonen som finnes i det sirkulære DNA-molekylet (genomet) i livsstadiet «embryo» som er med på å dirigere vekst og utviklingen i en voksende organisme. Et fellestrekk ved alle levende celler er at de har lik grunnleggende kjemi (Alberts 2014 s.2-5) En eukaryote celle består av mange ulike organeller, de viktigste er mitokondrier, endoplasmatisk retikulum, golgiapparatet, lysosomene, cellekjerne, ribosomene og celleskjelettet (Sand et al. 2006 s.48).

Triploide celler er større og færre enn diploide celler i laks. Den prosentvise andelen røde blodceller (hematokrittverdien) er lik (Benfey & Sutterlin 1984b; Benfey 1999; Small & Benfey 1987; Thorgaard 1983). Antageligvis kompenserer cellen med økning i størrelse for å kunne gi plass til det økte antall kromosom (Benfey 1999). Størrelsen av cellulære- og nukleotid røde blodcellene i triploid fisk økes for å få plass i cellene til mengden av nukleært DNA og opprettholdelsen av forholdet mellom nukleotidene og cytoplasma volum (Small & Benfey 1987). Dette gjelder også muskelceller (Bjørnevik et al. 2004; Johnston et al. 1999; Sigurgisladottir et al. 2001). Egget til hunnlaksen består av to kromosomoppsetninger ( $n=2$ ) etter meiosen. Overskuddskromosomet blir ved befruktning dyttet ut av egget (Piferrer et al. 2009). Når et befruktet lakse-egg blir utsatt for trykkbehandling, klarer ikke overskuddskromosomet sammen med 2.pollegget å komme ut og en normal balansert kromosom konstitusjon kan av den grunn ikke etableres ved først meitose (Johnston et al. 1999).

**Figur 13** forklarer prosessen fra første modningsdeling hos hunnlaksens egg (meiosen) frem til første kromosomkopiering (mitose) og celledeling hos diploid og triploid laks.

Figuren er forenklet med «X og X» som symboliserer kromosomsett, og baserer seg på andre tegninger og fagrelaterte artikler. Figuren er beskrevet i detalj til tross for at dette ikke er helt forstått enda.



Figur 13: A) Hunnlaksens egg sammen med et kromosomsett før meiosen inntreffer. I meiosen også kalt reduksjonsdeling deler kromosomet seg til to kromosom i hunnlaksens egg der hvert kromosomsett deler antall kromosom mellom seg (f.eks  $58/2=29$ ). B) Hunnlaksens kjønnscelle. Ubefruktet egg med to kromosomsett etter modningsdeling (meiose) Det ene kromosomsett blir ikke en del av det nye individet etter befruktning. Denne hendelsen har betydning for genetisk variasjon i populasjonen fra mor. C) Hanlaksens kjønnscelle på vei inn i egget. Egget blir befruktet (fertilisert).  $D_{1+2}$  Lakseeget er befruktet og det er tre kromosomsett inne i egget.  $E_1$ ) Et kromosomsett fra mor blir selektert bort for å oppnå balansert antall kromosomer i egget og av den grunn blir dyttet ut. Cellen blir diploid.  $E_2$ ) Et kromosomsett fra mot blir selektert bort for å oppnå balansert antall kromosom i egget og blir av den grunn forsøkt dyttet ut av egget. Trykkbehandlingen hindrer det ene av to morkromosomsett å forlate egget. Cellen blir triploid. F) Meitose stadiet. Celledeling med kopiering av likt antall kromosomantall.  $G_1$ ) Første celledeling er foretatt. En diploid laks er skapt.  $G_2$ ) Første celledeling er foretatt. En triploid laks er skapt og cellen forblir cirka 30% større enn en diploid celle. (Figur: Egen) Med forbehold om endringer.



## Kvalitet

Det er oppdaget noen kvalitetsmessige forskjeller når det gjelder filetspalting og bløthet (Bjørnevik et al. 2004). Dette kan relateres til muskelcellulariteten (Johnston et al. 2000) som også påvirker andre kvalitetsparametere (Johnston et al. 2000). Når det gjelder farge, er forskerne usikre på om det er forskjeller eller kun genetisk variasjoner, variasjonen i muskeltettheten eller at forskjellene er forårsaket av at forsøkene er gjort på forskjellige årstider (Bjørnevik et al. 2004; Choubert et al. 1997; Johnston et al. 2000). Generelt kan man ikke finne store forskjeller i slaktekvalitet (Bjørnevik et al. 2004).

Forskning på triploid laks har foregått i lang tid. Når det er sagt har det ikke vært publisert forskningsbaserte data på kvalitet med sammenligning av triploid og diploid laks fra samme genmateriale, dette gjøres det noe med nå i anledning denne oppgaven.

## Næring og marked tilpasser seg mulig fremtidsrettet produksjon

De kommersielle aktørene på markedet posisjonerer seg mot en triploid laksenæring. I 2012 introduserte AquaGen sin triploide produktserie under produktnavnet «AquaGen® Atlantic GREEN STERILE» (AquaGen 2014), og første fôrfirma som kom med 1. generasjon produktlinje rettet direkte mot selskapene som har fått de grønne laksekonsesjonene, var BioMar AS med spesialfôret Tri-X (BioMar 2014).

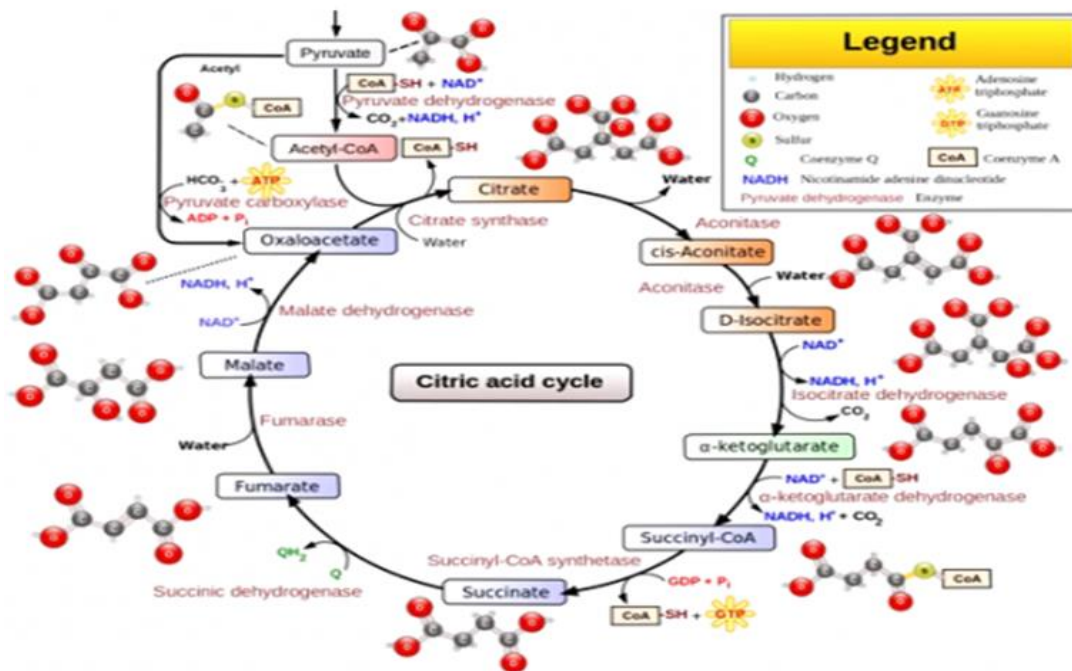
## 1.4 Respirasjon

### Krebs syklus

Full oksidering/nedbrytning i sitronsyresyklusen (SSS) er avhengig av aerob forhold. All mat vi spiser må brytes ned til mindre og enklere molekyler. Denne degraderingen kalles katabolisme og skjer i tre steg (Alberts 2014 s.421). Karbohydrater i form av sukker, fettsyrer og nesten alle aminosyrer styres inn i SSS via Acetyl-CoA i steg to. 1 mol glukose spaltes ned til to pyruvat i glykolysen noe som skjer i cytosolen for deretter å gå inn i mitokondriene, og reagere med koenzym A. Dette gir Acetyl-CoA og prosessen har fått navnet oksidativ dekarboksylering (Campbell & Farrell 2015 s.548-549). Acetyl-CoA kan nå gå inn i SSS og kobler seg på sluttproduktet oksaloacetat som er det åttende og siste enzymkatalyserte steget i syklusen, derav navnet syklus. I syklusen dannes det energi i form av 2 ATP, 2 FADH<sub>2</sub> og 6 NADH fra 1 mol pyruvat. FADH<sub>2</sub> og NADH fungerer som transportører av H<sup>+</sup> inn til elektrontransportkjeden der de skaper energi i form av en gradient i indre mitokondrie membran (IMM) og dannelse

av adenosintrifosfat (ATP) som sluttprodukt. Energien fra  $\text{FADH}_2$  og  $\text{NADH}$  gir mulighet for dannelse av henholdsvis 1,5 ATP av  $\text{FADH}_2$  og 2,5 ATP av  $\text{NADH}$  etter elektrontransportkjeden (Campbell & Farrell 2015 s.578). Grunnen til denne differansen i ATP er at elektronene fra  $\text{FADH}_2$  entrer lenger ned i respirasjonskjeden enn  $\text{NADH}$  som igjen fremmer pumpingen av færre protoner (Alberts 2014 s.460).

**Figur 14** forklarer Sitronsyresyklusens åtte enzym katalyserte steg



*Figur 14: Sitronsyresyklusen. SSS består av åtte enzym katalyserte steg etter at Acetyl-CoA genereres inn i syklusen. Metoden som er benyttet i denne oppgaven baserer seg på direkte innsprøytning i SSS ved  $\alpha$ -Isocitrate. Dette gjøres for å sikre at syklusen går rundt. I selve SSS dannes det 2 ATP, resterende ATP dannelse skjer i ETS. (Hentet fra: [www.dvice.com](http://www.dvice.com)) Nedlastet: 18.12.2014*

## Oksidativ fosforylering

Oksidativ fosforylering er kjent som den siste degraderingen av matmolekyler eller mitokondriell/cellulærrespirasjon. Oksidativ fosforylering består av 4 membranbundne bærerproteiner kalt Complex 1,2,3 og 4, Coenzym Q, cytokrom C, samt ATP-synthase heretter omtalt som Complex 5. Oksidativ fosforylering er en prosess som skjer i mitokondrienes indre membran. Prosessen består av å danne ATP via to steg. De fire første kompleksene danner en elektrokjemisk protongradient, mens Complex 5 bruker denne gradienten til å danne ATP (Alberts 2014 s.448). For å opprettholde mitokondrietsrespirasjon, må det være kontinuerlig flyt av substrater fra membranen og inn i matrix (Gnaiger 2012 s.19).

Respirasjonskompleksene er mulig å isolere fra den indre mitokondrie membranen. Derfor heter det at kompleksene er en del av et multienzymsystem (Campbell & Farrell 2015 s.581).

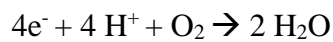
Complex I – Det første komplekset kalt NADH-CoQ oksidoreduktase navngitt etter kompleksets transport av NADH til Coenzym Q der det donerer sitt elektron. Komplekset har subenheter og mange proteiner som jern, svovelklaser og flavoprotein som hjelper NADH med å oksidere. (Campbell & Farrell 2015 s.581). Substrater som gir energi til komplekset er L-formen av glutamin, malate og pyruvat (Gnaiger 2012 s.19). Komplekset inhiberes ved tilsetning av rotenone (Gnaiger 2012 s.26).

Complex II – Det andre komplekset er kalt Succinate-CoQ oksidoreduktase, og er navngitt etter kompleksets transport av elektroner til Coenzym Q. Substratet succinate fra SSS blir i dette komplekset oksidert til fumarate ved hjelp av flavinenzymmer (Campbell & Farrell 2015 s.582). Selv om reaksjonen frigjør energi, genererer ikke dette nok til å pumpe  $H^+$  ioner ut fra komplekset og til matriks (Campbell & Farrell 2015 s.583). Begge kompleksene transporterer elektroner til Coenzym Q som er et mobilt enzym. Enzymet transporterer igjen elektronene til tredje kompleks for videre transport til kompleks fire og oksygen (Campbell & Farrell 2015 s.582).

Complex III – Det tredje komplekset er kalt  $CoQH_2$ -cytokrom C oksidoreduktase og katalyserer oksidasjonen av redusert coenzym Q. Denne oksidative reaksjonen skjer i flere trinn. Cytokrom C er sammen med coenzym Q ikke en del av komplekset og ligger på utsiden av IMM. Coenzym Q har med seg elektroner fra begge foregående kompleks, men reduksjonen av treverdige jern ( $Fe^{3+}$ ) til toverdige jern ( $Fe^{2+}$ ) trenger kun et elektron (Campbell & Farrell 2015 s.584). Ettersom Coenzym Q har igjen et elektron, vil dette enzymet involveres to ganger i den sykliske flyten, men oppførselen den andre gangen avhenger av hvilket av de tre formene Coenzym Q er i. Med ett elektron igjen vil Coenzym Q som «semiquinone» form gi fra seg elektronet via Q-junction til jernsvovelklyngene på Cytokrom C (Campbell & Farrell 2015 s.584-585).

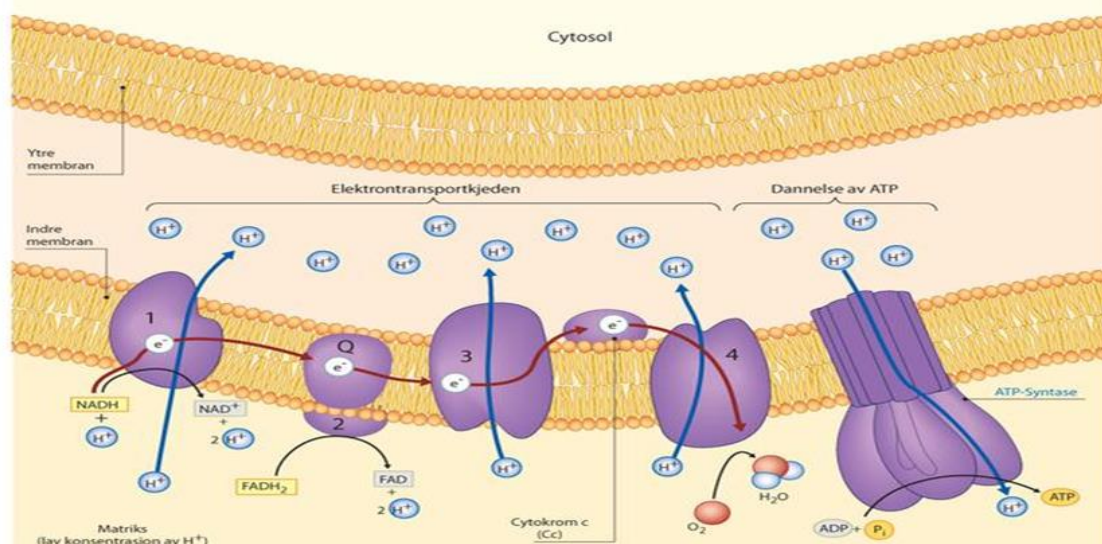
Complex IV – Det fjerde og siste komplekset er kalt Cytokrom-C-oksidasase. I likhet med de foregående kompleksene har oksidert Cytokrom C en viktig rolle i IMM (Campbell & Farrell 2015 s.586). Komplekset katalyserer elektronflyten fra Cytokrom C til oksygen og har det høyeste redoks potensialet av alle kompleksene i elektrontransportkjeden (Alberts 2014 s.468). Komplekset har tosfret antall subenheter.

Cytokrom C og toverdige kobberioner er involvert direkte i elektronflyten da kobberionene er akseptorer som ligger mellom Cytokrom C i sine to (a)-former og danner Cytokromoksidase. Komplekset blir deretter oksidert av oksygen som reduserer seg selv til vann (Campbell & Farrell 2015 s.586). Totalt blir 4 elektroner fra Cytokrom C donert og 4 H<sup>+</sup> ioner fra miljøet plukket opp for sammen med O<sub>2</sub> dannes 2 H<sub>2</sub>O molekyler (Alberts 2014 s.468).



Complex V – Dette siste komplekset i ETS kalles ATP- syntetasen. Syntheasen er en roterende molekylær motor som drives av energi frigjort i oksidasjonsreaksjonen i elektrontransportkjeden, og H<sup>+</sup> ionenes ønske om å utjevne balansen av ionene fra rommet mellom IMM og ytre mitokondrie membran (YMM) og inn i matrix. Protonene benytter seg av ione kanaler i syntheasen for å komme seg inn i matrix igjen (Campbell & Farrell 2015 s.592). Inne i matrix blir H<sup>+</sup> ionene møtt av nukleotidet adenosindifosfat (ADP) sammen med ett fosfat og danner ATP.

**Figur 15** viser oksidativ fosforylering. Elektrontransportkjeden består av totalt fem trinn.



*Figur 15: Oksidativ fosforylering. Elektrontransportkjeden og dannelsen av ATP skjer via fem forskjellige kompleks i IMM der det dannes energirike bindinger. Produksjonen av energi bygger på en protongradient mellom YMM og IMM der ATP dannes i complex 5. (Hentet fra: <http://www.wikispaces.com>) Nedlastet: 18.12.2014.*

## Mitokondrie– hvordan de er bygget opp?

Mitokondrier er selve energihuset i eukaryote celler. De kan ha forskjellige former såkalt; polymorfe form. Mitokondrienes form kan endres under normal cellevekst, ved endring av patologisk tilstand og ved generell utvikling. Organellen er av svært

dynamiske karakter. (Yaffe 1999). I mitokondriene produseres det energirike forbindelser som cellene trenger for å kunne leve ved å utnytte energi fra oksidasjon av ulike matmolekyler (Alberts 2014 s.16-18), Cellens krav til energi er variabel og endres i dyr ut i fra fysiologisk eller miljømessige utfordringer dyr vil måtte takle (Cuezva et al. 1997; Pollak & Sutton 1980). Produksjonen av ATP er det kjemiske brennstoffet som gir mest energi til celleaktivitet. Mitokondrier forbruker oksygen i sin aktivitet og omdanner dette til karbondioksid. Denne prosessen kaller vi cellulær respirasjon. Mitokondrienes har eget arvestoffmolekyl; mtDNA (Alberts 2014 s.16-18), og arvestoffet kommer kun via kromosomer fra mor (Sand et al. 2006 s.48). Eget DNA gjør at mitokondriene har eget apparat for syntesen av RNA (2 rRNA og 22 tRNA) og 13 proteiner (Campbell & Farrell 2015 s.23; Dahl 2008 s.193; Widmaier et al. 2014 s.59-63).

Mitokondrier er en organelle i cellenes cytoplasma, gjennom fluorescensmikroskop kan man se at de har ormelignende struktur med forgreinede nettverk. Mitokondriet har to separate membraner, en yttermembran og en innermembran.

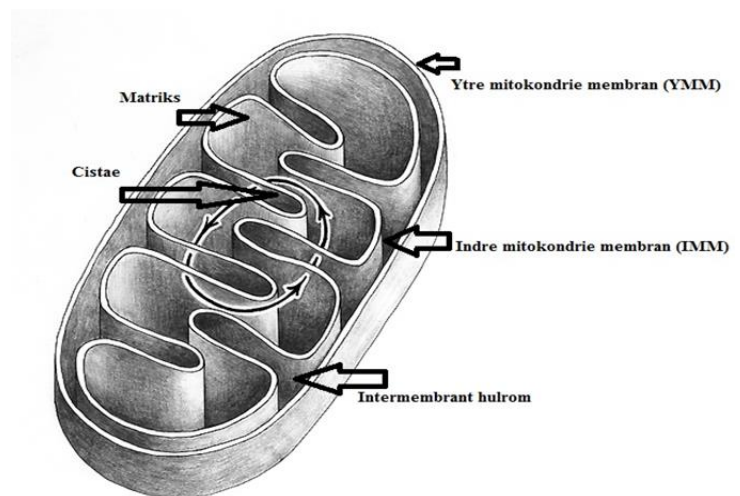
Innermembranen er formet med folder som beskytter organellens indre (Alberts 2014 s.16-18). Disse foldende kalles cristae og plassen inne i innermembranen kalles matrix.

Matrix inneholder proteinmolekyler som utgjør elektrontransportkjeden (Sand et al. 2006 s.48).

Mitokondrienes størrelse er omtrent 1  $\mu\text{m}$  i diameter og 2  $\mu\text{m}$  til 8  $\mu\text{m}$  i lengde (Campbell & Farrell 2015 s.18). Antall og tettheten av mitokondrier varierer mellom vev og reguleres av egne

prosesser i cellene (Cuezva et al. 1997; Enríquez et al. 1999; Pollak & Sutton 1980).

Dette forklares med at respirasjonskapasiteten ikke er lik i alle vev og behovet ikke er like stort (Nagata 2006; Sand et al. 2006 s.48; Yaffe 1999). Fysisk aktivitet er beviselig



Figur 16: Mitokondrie oppbygning. YMM beskytter cellen utenfra. IMM beskytter mitokondriets indre kjerne, det er trykkforskjell mellom indre og ytre. Cistae er foldende i indre membran, mens matriks er indre kjerne i mitokondriene. Midt inne i cellen finner man SSS og ETS. (Hentet fra: [www.deahlworks.com](http://www.deahlworks.com)) Allegheny, Health, Education & Research Foundation Mitochondria artwork for publication © 2008 Gretchen Deahl. Nedlastet: 14.12.2014

med på danning av flere mitokondrier hos mennesker og øker av den grunn metaboliseraten, samt sinker aldringstegn (Koltai et al. 2012).

I dag finnes det to anerkjente opparbeidingsmetoder for analysering av mitokondrier 1) Isolering av mitokondrier 2) permabilisering av mitokondrier (Oroboros\_Bioblast 2014). Det er fordeler og ulemper med begge metodene, men permabilisering er beviselig den beste metoden (Gnaiger 2009; Picard et al. 2011; Saks et al. 1998). At metoden er tidkrevende og baserer seg på bruk av kjemikalie saponin som i verste fall kan gi mennesker hemolytiske anemier, gjør at nye enkle og bedre metoder er ønskelig. En ny metode for opparbeiding av mitokondrier til analyse er homogeniserings verktøyet Oroboro PBI-Shredder HRR (Draxl A 2013), som trolig kan erstatte isolering av mitokondrier (Pecinová et al. 2011).

Hvorfor er mitokondrier i laks interessant nå, og fremover i tid?

Kunnskap om mitokondriefunksjoner i fisk blir stadig mer aktuelt da energiomsetningen spesielt fra fett, har avgjørende betydning for utvikling, vekst, reproduksjon og fiskens fysiske aktivitet i merdene (Eya et al. 2013). Det antas at forskningsbaserte mitokondrielle analyser vil øke de kommende årene. Dette begrunnes med behovet for økt kunnskap om energiforbruk til dyr i oppdrett knyttet opp mot verdens matproduksjon. I tillegg kan flere sykdommer på dyr og mennesker direkte knyttes opp mot mitokondrier. Den økende fedmeproblematikken i verden kan antagelig løses i fremtiden ved mitokondrielle analyser av fettvev. Denne oppgavens resultater kan bane vei for videre mitokondriell forskning. 90% av energien som produseres i dyreceller kommer fra mitokondriene (Lehninger et al. 1993). Det er derfor viktig å forstå mitokondriell funksjon for å optimalisere og utvikle et enda mer effektivt fiskefôr, og for å øke kunnskapen om respirasjon hos vekselvarme dyr. Fisk med optimal mitokondriefunksjon vil gi raskere kroppsstørrelse, bedre fiskehelse, minske fecesvolumet og ikke minst opprettholde den lukrative ernæringsmessige gevinsten fisk gir mennesker (Eya et al. 2013).

Fôrsammensetningen til marine dyr i oppdrett har de siste 20-25 årene endret seg radikalt, i størst grad gjelder dette fettsyresammensetningen, herav tilsetning av planteoljer spesielt rapsolje. (Mørkøre 2014).

Fett og proteinnivåer fra dagens kommersielle dietter har vist signifikant effekt på mitokondrienes enzymatiske aktivitet og genuttrykk i fisk (Eya et al. 2010; Eya et al. 2011; Eya et al. 2012).

Flere studier på ulike fisketyper viser tydelig at funksjonene i mitokondriene svekkes, og i verste fall ødelegges ved aldring (Almaida-Pagan et al. 2014; Hartmann et al. 2011). Dette kan direkte kobles opp mot gjennomsnittlig levealder på artene, kortere levetid gir raskere endring i mitokondriell funksjon. Denne teorien er koblet opp mot «rate-of-living theory of aging» som forklarer at oksidativt stress øker aldringstegnene og kapasitetsreduksjonen i ATP-dannelse (Hulbert et al. 2007; Navarro & Boveris 2004).

En teori er at mitokondriene får oksidativ skade og at de reaktive oksygenforbindelsene ødelegger lipider, proteiner og nukleinsyrer når de blir utsatt for høyt stress. Økt sekundær harskning relatert til øktende alder underbygger dette (Almaida-Pagan et al. 2014).

I Stripet havabbor (*Morone saxatilis*) ble det oppdaget at mitokondriene økte totalvolumet betydelig som en kuldeindusert reaksjon både i rød og hvit muskel. Intermitokondriell avstand ble redusert for ikke å påvirke diffusjonshastigheten til væskene inne i organellen (Egginton & Sidell 1989). Det samme ble observert i gullfisk (*Carassius auratus*) og diverse antarktiske fiskeslag (Archer & Johnston 1991; Sidell & Hazel 1987). I flere typer Antarktis fisk, samt gullfisk (*Carassius auratus*) ble det også observert mindre og færre mitokondrieklynger. Denne endringen kan antagelig forklares med samme type kuldeindusert reaksjon ved at økt enzymvolum i vev kan reflektere endringen i mitokondrietetthet. (Archer & Johnston 1991; Tyler & Sidell 1984). Det kan se ut som om fisk ved lav sjøtemperatur forbedrer effekten av mitokondriene (Tyler & Sidell 1984).

Langkjedede  $\omega$ -3 fettsyrer som, 20:5 (eikosapentaensyre) og 22:6 (dokosaheksaensyre) er godt anerkjente essensielle fettsyrer i fisk. Dette fordi de er viktige for funksjonen av cellemembraner og produksjonen av de viktige signalmolekylene; eikosanoider (March 1993).

Fettsyresammensetningene inne i membranene i mitokondriene er karakteristiske (Almaida-Pagan et al. 2014), mitokondriemembranens fettsyrer har spesifikke roller

både i funksjon og membranfluiditet (Tocher et al. 2008; Zabelinskii et al. 1999). Histologiske og computertomografi bekrefter at mitokondrier har en rolle i funksjonene til essensielle fettsyrer (Nanton et al. 2007).

Studier på sebrafisk (*Danio rerio*) signaliserer at membraner og membrankomponenter kan være barrierer for essensielle prosesser for å senke hastigheten og/eller stoppe endringer inne i selve mitokondriene. Endringer kan forstyrre mitokondriefunksjonene og cellenes levedyktighet (Almaida-Pagan et al. 2014).

Det skjer forandringer i fettsyrenes sammensetning i mitokondrie membranen da fosfolipidkomplekset i mitokondriene endres og innholdet av mettede fettsyrer øker med alderen. Dette kan også relateres til rask vekst hos fisk (Almaida-Pagan et al. 2014). Endring i fettsyresammensetningen og viskositet i membranene (mettet kontra umettede fettsyrer) er også relatert til temperatur, under homostase funksjonen i cellene (Sinensky 1974). Forandringene i mengde og sammensetning av fosfolipidene er en reaksjon på miljøendringer, og som et svar på dette vil organismens membranfunksjon opprettholdes med endret fettsammensetning for å ivareta fasegrensen mellom krystallinsk og væske. Dette er viktig for å ivareta membranens funksjon som osmotiske barriere i IMM og bevegelsen til kompleksene (bæreproteinene) gjennom membranen (Haest et al. 1969; Steim et al. 1969; Wilson et al. 1970). Denne funksjonen er ekstra viktig i organismer som regulerer temperaturen etter miljøet den lever i (Sinensky 1974), da umettede fettsyrer (f.eks fiskeoljer) har lavere smeltepunkt enn mettede fettsyrer (f.eks rapsolje) (Austreng 1979; Torstensen et al. 2000).

Variasjonen av fettsammensetning er kontinuerlig med veksttemperaturen noe som viser at den er styrt enzymatisk, og ikke er påvirket genetisk (Sinensky 1974).

Ved optimalt fettinnhold vil man kunne få høy vekst og bedre fôrnyttelse basert på mitokondriefunksjonen hos fisken (Eya et al. 2013). Dette gjelder også andre dyrearter; broiler (Bottje et al. 2002; Bottje & Carstens 2009) og malle (Eya et al. 2010).

Høyt innhold av fett i kosten vil kunne gi høyere oksidativ skade og stress (Bloomer et al. 2010; Eya et al. 2013). Fôr med lipidinnhold over unyttelsesgrensen begrenser trolig mitokondriell respirasjon ved at økningen i energiforbruk overstiger energigevinsten, energiforbruket og fettoksidasjonen er således ikke kombinert. Dette fører igjen til



mindre antall mitokondrier i leveren og dårligere energiutnyttelse i kompleks I og II (Eya et al. 2013; Iossa et al. 2003).

## 2. Målet med oppgaven

Hovedmålet med oppgaven var å sammenligne diploid og triploid atlantisk laks (*Salmo salar* L.) på mitokondrie nivå, samt se på karaktertrekk ved hjelp av kvalitetsanalyser.

Et arbeid som kan ha påvirkning for en hel oppdrettsnæring.

Delmål 1: Undersøke om det er forskjell i kvalitet mellom diploid og triploid laks generelt og ved samme sjøtemperatur.

Delmål 2: Undersøke om diploid og triploid laks har forskjellig *rigor*-utvikling, og om den er temperaturavhengig.

Delmål 3: Kartlegge respirasjonsforskjeller mellom diploid og triploid fisk på 5°C, 10°C og 15°C.

Delmål 4: Kartlegge respirasjonsforskjeller på diploid og triploid laks før smoltifisering.

Delmål 5: Se hvilken prepareringsmetode for laks som fungerer best i Oxigrafen.

### 3. Material

#### 3.1 Diploid og Triploid laks

##### Fiskehistorikk

Fisken som ble benyttet i denne oppgaven er fra avlsstammen til AquaGen AS produsert på selskapets stamfiskeanlegg i Hemne kommune, Sør-Trøndelag fylke.

**Tabell 4** viser utvalgt produksjonsinformasjon AquaGen AS medsendte transporten av lakserognene til Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Matre i Matredal Kommune.

Rognproduksjonsdata		
Type laks:	Diploid	Triploid
Batchnummer:	71	78
Strykedato:	18.10.2012	19.10.2012
Opphavsstamme:	AquaGen	AquaGen
Gjennomsnitt temp:	5,8°C	5,8°C
Leveringsdato:	20.12.2012	20.12.2012

*Tabell 4: Både diploide og triploide individ kommer fra samme opphavsstamme. Det er verdt å merke seg at det på både diploide og triploide egg har blitt benyttet likt temperatur-regime fra produsentens side.*

Startfôra startet 5.mars 2013 og vaksinasjon ble utført 19.august 2013 for begge grupper. Begge grupper har som smolt fra den 30.september 2013 gått i hver sine merder på Havforskningsinstituttets sjøanlegg på Smørdalen i Masfjorden kommune til gjennomsnittsvekta på fisken var 1 kg. Mandag 23/6-14 ble rundt 360 fisk transportert med sjøbåten Salma til Matre, en tur på ca. 10 minutter. Fisken ble refordelt i seks 9m<sup>3</sup> kar inne i Miljøhallen der de har gått 57-59 dager før slakting.

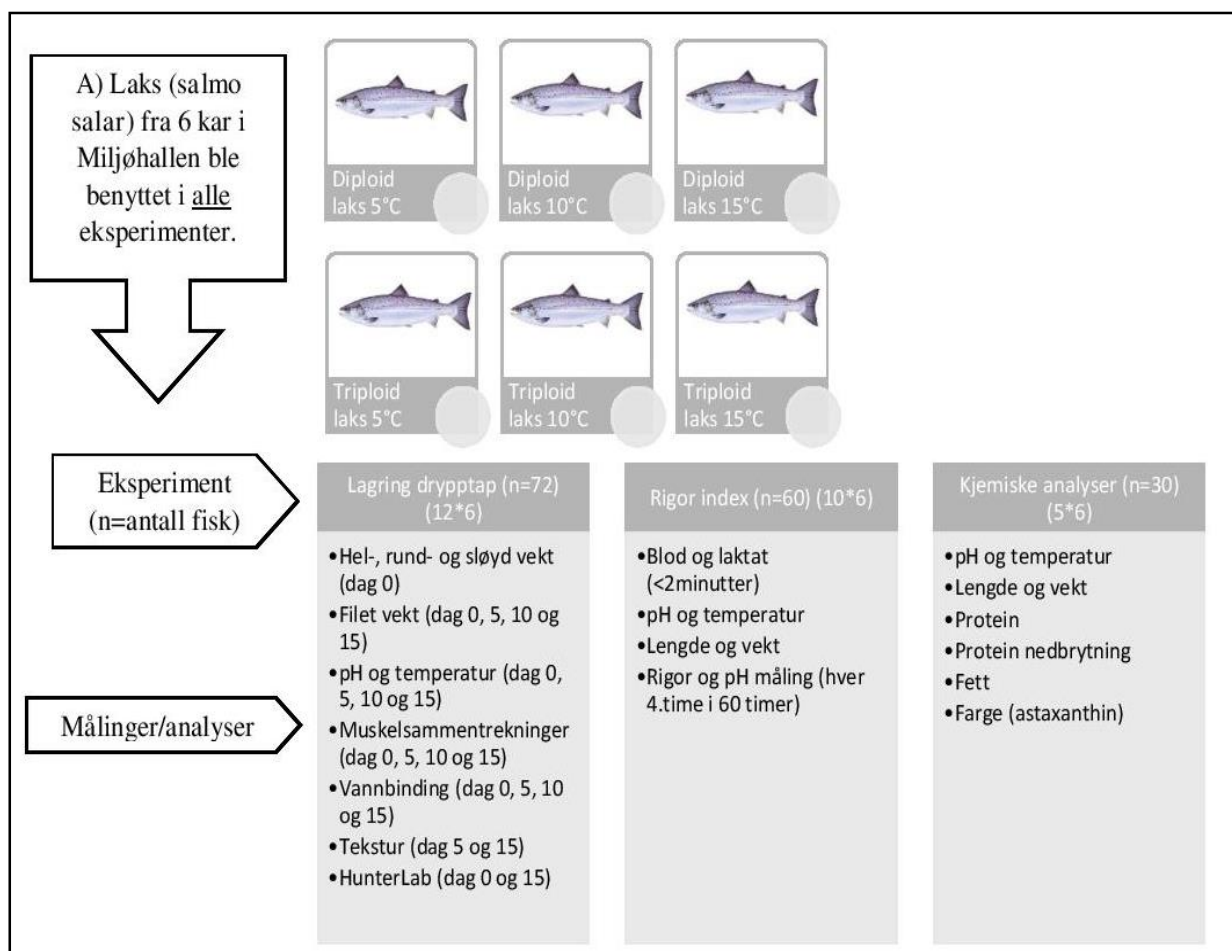
Temperaturgjennomsnittet i karene var fra 24/7-2014 henholdsvis 5°C, 9,9°C og 15°C. Fisken har fått naturlig lysrytme i henhold til årstiden og gått på Skretting Spirit 600, 7mm stor pellets (Protein; 40-43%, Fett; 30-33%, Pigment; 20,30,40,50mg). Ansvarlig røkter kontrollerte at det alltid var overskuddsfôring i samtlige kar. Fisken ble sultet før uttak.

## Generell beskrivelse av fiskematerialet og eksperimentdesign

I august 2014 ble totalt 162 oppdrettede atlantisk laks (50% diploid og 50% triploid) med et standardavvik på  $1,55 \pm 0,34$  kg fanget på Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Matre ( $60^{\circ}52'31''N$   $5^{\circ}35'2''O$ ).

Prøveuttaket hadde en fullstendig faktoriell utforming med seks grupper av laks med forskjellig ploiditet og sjøvannstemperatur.

**Figur 17** viser flytskjema for alle kvalitetsanalyser, kjemiske analyser og rigor-mortis index analyser for denne oppgaven.



Figur 17: Det ble benyttet fisk med to ulike ploiditeter fra seks forskjellige kar med tre forskjellige temperaturregimer. Fisk fra alle kar ble benyttet i samtlige eksperimenter. Det ble gjort forskjellige analyser på ulike tidspunkt basert på hva som var best praktisk gjennomførbart på stasjonen. I hvilken rekkefølge fisken i eksperimentene måtte tas ut på ble nøye forhåndsvurdert for å senke risikoen for å direkte påvirke eksperimentene.

Ytterligere eksperimentmetoder er beskrevet i punkt 4.2 og 4.3.

Atlantisk laks fra alle merder til karakterisering av mitokondrierespirasjon ble fanget fortløpende i etterkant av kvalitetsanalysene og er ikke medregnet i totalt antall fisk, ei heller i flytskjema.

Det er en betydelig variasjon ( $<0,05$ ) på alle målepunkter mellom de analyserte temperatuene 5°C, 10°C og 15°C (Tabell 5).

**Tabell 5** viser fisk materiale; vekt, tilstand faktor, temperatur, muskel pH og laktat i de forskjellige grupper samlet for analyser. Resultatene er vist som gjennomsnitt  $\pm$  SD.

	Diploid 5°C	Triploid 5°C	Diploid 10°C	Triploid 10°C	Diploid 15°C	Triploid 15°C	<i>P-verdi</i>
<i>Hel vekt, kg</i> ( <sup>1</sup> )	1.37 $\pm$ 0.35	1.40 $\pm$ 0.25	1.71 $\pm$ 0.33	1.74 $\pm$ 0.34	1.52 $\pm$ 0.32	1.53 $\pm$ 0.28	$<0,05$
<i>Sløyd vekt (HOG), kg</i> ( <sup>2</sup> )	1.16 $\pm$ 0.33	1.20 $\pm$ 0.16	1.47 $\pm$ 0.37	1.56 $\pm$ 0.28	1.28 $\pm$ 0.30	1.40 $\pm$ 0.23	$<0,05$
<i>K-faktor</i> ( <sup>1</sup> )	1.03 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.06	1.11 $\pm$ 0.08	1.13 $\pm$ 0.23	1,06 $\pm$ 0,07	1,01 $\pm$ 0,08	$<0,05$
<i>Døds-temperatur</i> ( <sup>1</sup> )	6.03 $\pm$ 0.17	6.01 $\pm$ 0.19	11.18 $\pm$ 0.14	11.11 $\pm$ 0.13	15.79 $\pm$ 0,12	15,69 $\pm$ 0,20	$<0,05$
<i>pH</i> ( <sup>1</sup> )	7.31 $\pm$ 0.11	7.34 $\pm$ 0.12	7.22 $\pm$ 0.15	7.24 $\pm$ 0.21	7.16 $\pm$ 0,19	7.20 $\pm$ 0,16	$<0,05$
<i>Laktat</i> ( <sup>3</sup> )	0.88 $\pm$ 0.29	1.06 $\pm$ 0.69	1.74 $\pm$ 0.80	2.14 $\pm$ 1.41	2.52 $\pm$ 1.04	2.62 $\pm$ 1.08	$<0,05$

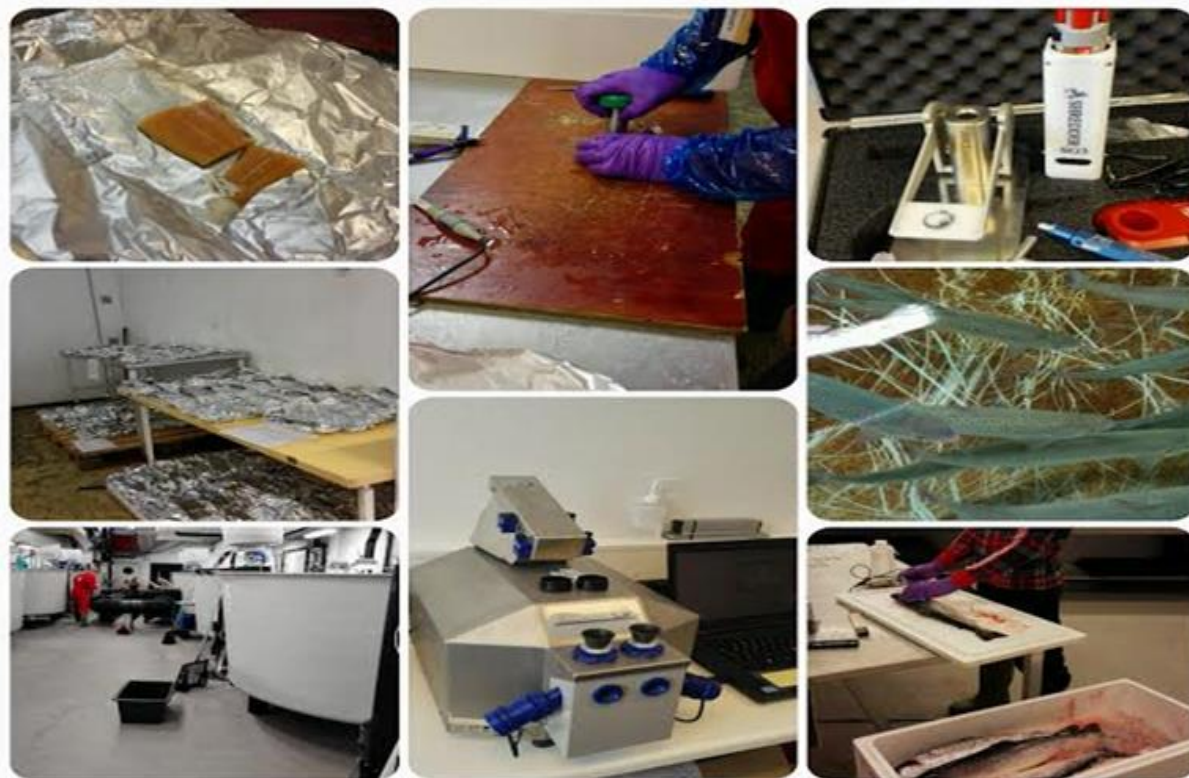
<sup>1</sup>) Gjennomsnittsverdier av 26-27 individer per gruppe, i totalt 162 individer.

<sup>2</sup>) Gjennomsnittsverdier av 12 individer per gruppe, i totalt 72 individer.

<sup>3</sup>) Gjennomsnittsverdier av 5 individer per gruppe, i totalt 30 individer.

Ulike små bokstaver i samme rad indikerer betydelig variasjon ( $P < 0,05$ ) ved enveis ANOVA.

**Figur 18** viser en samling av bilder fra uttaket på Havinstitutet, Matre.



Figur 18: Laksefiletene ble lagt på flatt underlag uten press over seg. Det ble arbeidet på kjørerom i lagringsperioden. Rigorindeks-analysen ble utført på grovkjøkkenet på Matre.

### 3.2 Dødsstivhet – Rigor Mortis

**Tabell 6** Tabellen viser dataprogrammer som er benyttet til rigor-mortis analyser.

Dataprogrammer

Program	Produsent
MiniTab – GLM modell	Cleverbridge AG

*Statistiske analyse av rigor resultater er utført med en signifikans på <0,001 tilsvarende med 99% sikkerhet i dataene.*

**Tabell 7** Tabellen viser forbruksmateriell og produsenten av disse. Brukt under rigor-mortis undersøkelser.

Forbruksmateriell

Forbruksmaterialer	Produsent
BD Plastipak 2ml + BD Microlance 3	Bacton Dickinson S.A.
Havforskningsinstituttets målebrett	Egenprodusert
Rigorvinkelplanke med linjal vann og loddrett	Egenprodusert
Sauetag	Combi Senior, OS Id.

**Tabell 8** Tabellen viser utstyr og produsenten av disse. Brukt under rigor-mortis undersøkelser.

Teknisk utstyr

Utstyr	Produsent
Combi Senior, påsettingstang	OS Id
KERN Kes-T, vekt max 15kg	Kern & Sohn
Lactate Pro 2, laktatmåler	Arkray Factory, Inc, Japan
Mettler Toledo SevenGo Pro, pH & temperatur.	Mettler Toledo International Inc.
Vinkel, 16139	Biltema Norge AS

### 3.3 Kvalitetsforskjeller av diploid og triploid laks ved 5°C, 10°C, 15°C

**Tabell 9** Tabellen viser kjemikalier som er benyttet under kvalitets forsøkene. Kjemikalienavn, kjemisk formel, molvekt g/mol og leverandør + bestillingsnummer.

Kjemikalier

Kjemikalie	Kjemisk formel	Mw, (g/mol)	Leverandør
Aceton	CH <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	58,08	Sigma T 0625
Heksan	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>	86,18	VWR, 1.04373.0500
Kloroform	CHCl <sub>3</sub>	119,38	VWR, 22715.293
Metanol	CH <sub>4</sub> O	32,04	VWR, 20864.320
Nitrogen (Gassform)	N <sub>2</sub>	14	YaraPraxair
Ortofosforsyre	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	96,9872	-

**Tabell 10** Tabellen viser dataprogrammer som er benyttet til analyser på kvalitet.

## Dataprogrammer

Program	Produsent
HunterLab	HunterLab Inc.
EZChrom Elite™ Chromatography Data System	Hitachi High Technologies America Inc.
Tekstur eksponent lys for Win 4.13	Stable Micro Systems, Ltd
MiniTab	Cleverbridge AG

*Statistiske analyse av kvalitets resultater er utført med en signifikans på <0,05 tilsvarende med 95% sikkerhet i dataene.*

**Tabell 11** Tabellen viser forbruksmateriell og produsenten av disse. Brukt under kvalitets undersøkelsene

## Forbruksmateriell

Forbruksmaterialer	Produsent
Dick Ergogrip Semi-Flexibel 18cm	Dick Messer Kochmesser 1905 Premier Plus Nature
Aluminiumsfolie	NorEngros AS
LCGC Certified Amber Glass	Waters (WEEE)
Alu.beger 110ml rund	NorEngros AS

**Tabell 12** Tabellen viser alfabetisk hvilket teknisk utstyr og produsent av disse som er benyttet under kvalitetsforsøkene.

## Teknisk utstyr

Utstyr	Produsent
Canon EOS 1000D, (Speilreflekskamera)	Canon Inc.
Combi Senior, (Påsettingstang)	OS Id
HunterLab, MiniScan XE, (Bærbart spektrofotometer)	HunterLab Inc.
KERN Kes-T, (Vekt max 15kg)	Kern & Sohn
Kubota 1700, (Sentrifuge)	Kubota Corporation, Tokyo
Lactate Pro 2, (Laktatmåler)	Arkray Factory, Inc, Japan
Mettler Toledo SevenGo Pro, (pH måler)	Mettler Toledo International Inc.
Mettler Toledo Excellence XS204, (Vekt)	Mettler Toledo International Inc.
Rotina 420R, (Sentrifuge)	Hettich Lab Technology
Sanyo MDF-U73V, (-86grader fryser)	SANYO E&E Europe BV
Sartorius S213-1S, (Vekt)	Data Weighing Systems, Inc.
Scotsman AC225, (Ismaskin)	Scotsman Ice Machines
Termaks B1053 V, (Varmeskap)	Termaks AS
HPLC-instrument	Agilent Technologies 1100 Series
Tekstur Analyser TA-XT2	SMS., Surrey England
Marlin 46, (Vakuum-maskin)	Henkelman
Ultra Turrax T25	IKA-Werke GmbH & co
Pierce Midell 18780 Reacti-Vap	American Laboratory Trading, Inc.

## 3.4 Mitokondrier

**Tabell 13** Tabellen viser kjemikalier som er benyttet under mitokondrie forsøkene. Kjemikalienavn, kjemisk formel, molvekt [g/mol] og leverandør + bestillingsnummer.

## Kjemikalier

Kjemikalie	Kjemisk formel, (forkortelse)	Mw, (g/mol)	Leverandør
Absolutt Prima Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH, (EtOH)	46,1	Arcus
Adenosin 5' difosfat	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> P <sub>2</sub> K, (ADP)	501,3	Calbiochem 216201
Antimycin A	C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> , (Ama)	540	Sigma A8674
Bovine serum albumin	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> , (BSA)	66000	Sigma A6003
CaK <sub>2</sub> EGTA*	-	-	-
Carbonyl cyanide p-(trifluoro-methoxy) phenyl-hydrazone	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O, (FCCP)	254,2	Sigma C2920
Cytochrome c	C <sub>42</sub> H <sub>54</sub> FeN <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> , (Cyt C)	886,9	Sigma C7752
Dithiothreitol (DTT)	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	154,25	Sigma D0632
D- Sucrose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342,3	Roth 4621.1
Ethylene glycol tetraacetic acid	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> , (EGTA)	380,4	Sigma E3889
Folin-CioCalteu	C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>5</sub> S, (FC)	260,2	Sigma F9252
HEPES	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	238,3	Sigma H7523
Imidazole	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	68,077	Sigma I2399
K <sub>2</sub> EGTA*	-	-	-
Potassium dihydrogen phosphate	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1	Merck 104873
Potassium hydroxide	KOH	56,1	Sigma, P5958
Calcium carbonate	CaCO <sub>3</sub>	100,1	Sigma, C6763
Coppersulfat pentahydrat	CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O	249,68	VWR, 1.02790.0250
Lactobionic acid	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	358,3	Aldrich 153516
L-Glutamate	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>4</sub> Na, (Glu)	169,1	Sigma, G1626
L-Malate	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> , (Mal)	134,1	Sigma M1000
L-Succinate	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O, (Suc)	270,1	Sigma, S2378
Magnesium chloride x 6 H <sub>2</sub> O	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	203,3	Scharlau MA 0036
MES	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S	195,2	Sigma, M0164
Na <sub>2</sub> ATP	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub> x 2Na	551,14	Sigma, A26209
Na <sub>2</sub> Phosphocreatine	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> PNa <sub>2</sub>	255,08	Sigma, P7936
Natrium L-tartrat dibasic dihydrat	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub> x 2H <sub>2</sub> O	230,1	Sigma, 228729
Natrium-dodecyl-sulfat	NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> , (SDS)	288,4	VWR, 33629.266
Sodium hydroxide	NaOH	40,0	VWR, 1.06498.1000
Sodium carbonate	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	106,0	VWR, 27771.290
Rotenone/Isoplavenoid	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub> , (Rot)	394,4	Sigma, R8875
Saponin	C <sub>57</sub> H <sub>90</sub> O <sub>26</sub>	1191,3	Sigma, 47036
Taurin	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S	125,2	Sigma, T0625

\*CaK<sub>2</sub>EGTA = 2,002g CaCO<sub>3</sub> + 100nM varm EGTA (7,608g/200ml) røres ut i 2,4g KOH - juster pH til ca. 7.

\*K<sub>2</sub>EGTA = 100 mM EGTA + 200 mM KOH (oppløse 7,608g EGTA og 2,3g KOH i 200ml H<sub>2</sub>O) - juster pH til ca. 7.



**Tabell 14** Tabellen viser ingrediensene i MiRo5, deres funksjoner i løsningen og konsentrasjon.

Løsninger

Løsning	Ingredienser	Funksjon	Konsentrasjon
MiRo5	EGTA	Binder tungmetaller	0,5mM
	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	Nødvendig for ATPase aktivitet	3mM
	Lactobionic acid	Bevarer vevet i løsningen K <sup>+</sup> kons.	60mM
	Taurin	Stabiliserer biologiske membraner	20mM
	Potassium phosphate monobasic	Fungerer som buffer i løsningen	10mM
	HEPES	Buffer med pKa=7	20mM
	D- Sucrose	Impermeant og oksygen radikaler.	110mM
	BSA, essensiell fettsyre fri	Stabiliserer membranene, binder Ca <sup>2+</sup> og fett.	1g/l

**Tabell 15** Tabellen viser ingrediensene i biops og konsentrasjonen av disse.

Løsning	Ingredienser	Konsentrasjon
Biops	CaK <sub>2</sub> EGTA	2,77mM
	K <sub>2</sub> EGTA	7,23mM
	Na <sub>2</sub> ATP	5,77mM
	MgCl <sub>2</sub> 6 x H <sub>2</sub> O	6,56mM
	Taurine	20mM
	Na <sub>2</sub> Phosphocreatine	15mM
	Imidazole	20mM
	Dithiothreitol (DTT)	0,5mM
	MES	50mM

**Tabell 16** Tabellen viser de ulike ingrediensene og konsentrasjonene til disse i alle reagenser til den modifiserte proteinanalysen av Lowry.

Løsning (Modifisert Lowry)	Ingredienser	Konsentrasjon
Reagens A	Natriumkarbonat (W/v)	2 %
	Natriumhydroksid	0,4 %
	Natrium-dodecyl-sulfat	1 %
	Natriumtartrat	0,16 %
Reagens B	Kobbersulfat pentahydrat	4 %
Reagens C	25ml A tilsettes 0,25ml B	1:100
FC- Reagens	Folin-CioCalteu	Fortynnes 1:1
	Dest.vann	

**Tabell 17** viser dataprogrammer som er benyttet til mitokondrieundersøkelser.

Dataprogrammer

Program	Produsent
Oroboro DataLab 5	Oroboros Instruments Corp.
MiniTab	Cleverbridge AG
BioTek Gen5 TM	Biotek Instruments

*Statistiske analyse av mitokondrie resultater er utført med en signifikans på <0,05 tilsvarende med 95% sikkerhet i dataene.*

**Tabell 18** viser alfabetisk hvilke forbruksmateriell og produsent av disse som er benyttet.

Forbruksmateriell

Forbruksmaterialer	Produsent
BD Falcon rør	BD (Becton, Dickinson and Company)
BD Plastipak 2ml + BD Microlance 3	Bacton Dickinson S.A.
GASTIGHT #1701, Glassprøyte 10µl	Hamilton Company
GASTIGHT #1702, Glassprøyte 25µl	Hamilton Company
GASTIGHT #1705, Glassprøyte 50µl	Hamilton Company
Pinsett 232-0093	VWR International
Pipetter	Thermo Fisher Scientific Inc.
PP-microplate 96-brønner	BioTek
Shredder HRR tubes	Oroboros Instruments Corp.
Skalpell RSGA106.523	VWR International

**Tabell 19** viser alfabetisk hvilket teknisk utstyr og produsent av disse som er benyttet under mitokondrieforskene.

Teknisk utstyr

Utstyr	Produsent
Bosch fryseskap, GSV29VW30	BSH Husholdningsapparater AS
Datamaskin med RS 232 port og/eller USB	Dell/Lenovo
Mettler Toledo Excellence XS204	Mettler Toledo International Inc.
Mikroskop, binoculært Primolab	Jørgen Kruuse A/S
Oroboro Oxygraph-2K	Oroboros Instruments Corp.
Shredder HRR	Oroboros Instruments Corp.
Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader	BioTek
Thermo Scientific Pipette F2	Thermo Fisher Scientific Inc.
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc

## 4. Metode

### 4.1 Dødsstivhet – *Rigor mortis*

#### Uttak av prøvematerialet

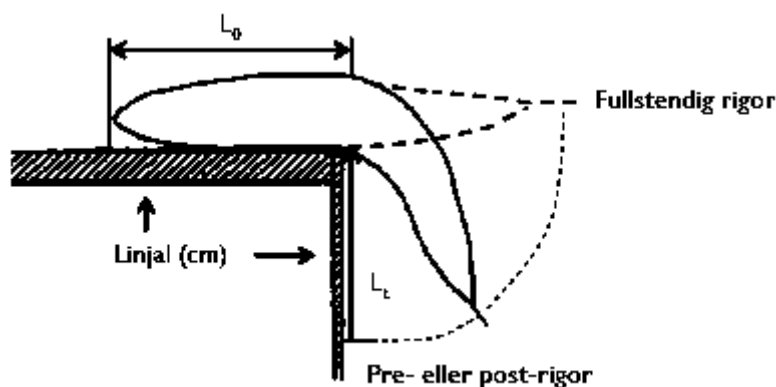
Ti stk. triploid laks og ti stk. diploid laks på 5°C, 10°C og 15°C (n=60) ble enkeltvis avlivet med hodekakk i Miljøhallen på Matre, dødstidspunkt ble notert med 3 minutter intervall mellom individene. Fisken ble deretter fraktet til «Fôrhallen», en transport på ±1 minutt for videre analyser. Uttaket ble utført over tre arbeidsdager basert på temperatur i karene fra lavest til høyest temperatur. Uttaket ble utført mellom klokken 10.00 og 11.00 på formiddagen.

#### Rigorindeks, laktat, pH og temperatur

##### Prinsipp

Forsøket er utført ved bruk av Cuttings metode (hale dropp) (se fig. 17) (Bito et al. 1983). Stress hos laks kan direkte kobles opp mot dødsstivheten, både på hardhet og tid fra død til maks rigor. For å verifisere at fisken ikke var stresset før avlivning, ble det målt laktat-verdier fra blodprøver på de fem første fiskene i hver gruppe. Ved å måle rigorindeksen hos diploid og triploid laks vil man kunne se den reelle tiden det tar fra døden inntreffer til dødsstivheten er på sitt hardeste, og hvor hard den blir. Metodens prinsipp er å måle stivheten. Metoden bygger ikke på analyser med elektriske instrumenter.

**Figur 19** viser billedlig hvordan Cuttings metode ble utført.



Figur 19: Måling av rigor mortis indeks utregnes ved hjelp av formelen  $I_R = ((L_0 - L_1) / L_0) \times 100$ .  $L_0$  indikerer halve fiskens lengde.  $L_1$  indikerer vertikal lengde fra halefinne til bordflate.  $L_1$  ble registrert ved et tidsintervall på 4 timer fra dødstidspunktet til 60 timer etter mortalitetstidspunktet. Naturlig vil det bli lavere  $L_1$  verdi da laksen går inn i rigor-mortis (Sundet et al. 2011 s.24). Nedlastet: 20.10.2014

## Prosedyre

For de fem første fiskene i hvert kar ble det tatt ut blodprøver (BD Plastipak 2ml + BD Microlance 3, Bacton Dickinson S.A.) til laktat (Lactate Pro 2, Arkray Factory, Inc, Japan). Det ble deretter målt pH og temperatur med innstikk i fremre ryggmuskel nær gjellene med (Mettler Toledo SevenGo Pro, Mettler Toledo International Inc.) i alle fisker, samt notert lengde (HI-målebrett) og vekt (KERN Kes-T, Kern & Sohn) før de ble merket med kodet sauetag (Combi Senior, OS Id). *Rigor*-indeksen ble analysert ved å legge halve fisken med hode innover på bordet på en planke med linjal loddrett og vannrett med 90° vinkel ( $L_0$ ) og lese av den vertikale lengden fra halefinne til bordflaten ( $L_t$ ). Det ble benyttet en vinkel (16139, Biltema Norge AS) for ikke å få feilmarginer fra hale til linjal på planken ved avlesning. Forsøket ble gjentatt hver 4.time i totalt 60 timer. Det ble målt pH i fiskekjøttet (Mettler Toledo SevenGo Pro, Mettler Toledo International Inc.) med samme tidsintervall og tilnærmet likt målområde. Fisken ble skånsomt lagt i isoporkasser og toppet med knust is etter hver håndtering. *Rigor*-indeksen ble utregnet slik:  $I_R = ((L_0 - L_t) / L_0) \times 100$  (Bito et al. 1983).

## 4.2 Kvalitetsforskjeller av diploid og triploid laks ved 5°C, 10°C, 15°C

### Uttak av fisk til kvalitetsanalyser

Det var ikke mulig å utføre så mange kvalitetsanalyser som ønskelig i dette forsøket uten å dele opp uttaket av fisk. Uten å dele opp uttaket ville det få både praktiske og fysiske begrensninger for forsøket. Det ble derfor valgt å analysere HunterLab, vannbinding, tørrstoff, skrumping og tekstur av fisk A) og astaxanthin, lipid, protein og proteindenaturering av fisk B).

A) 12 triploid laks og 12 diploid laks på 5°C, 10°C og 15°C ble avlivet med hodekakk, veid vekt og målt temperatur, samt pH med innstikk i fremre ryggmuskel nær gjellene med (Mettler Toledo SevenGo Pro, Mettler Toledo International Inc.). Hver enkelt fisk ble deretter merket (Combi Senior, OS Id) og bløgget med gjellekutt for utblødning i 500 liter stort kar med isvann. Etter utblødning ble fiskens rundvekt notert (KERN Kes-T, Kern & Sohn) før sløyning og samt veiing av sløyd fisk (KERN Kes-T, Kern & Sohn). Fiskene ble deretter filetert og på nytt merket (Combi Senior, OS Id) med nye tags. Høyre filet ble fotografert for krympinganalyse. Fem venstrefileter ble analysert med spektrofotometer (MiniScan XE, HunterLab Inc.). Begge filetene ble individuelt veid

(KERN Kes-T, Kern & Sohn) og pakket i aluminiumsfolie for så å bli lagt enkeltvis på bord på kjølerom. Høyrefiletene ble veid hver 5.dag. Venstrefiletene ble benyttet til vannbindingsanalyser, n=4 hver 5. dag og spektrofotometer (MiniScan XE, HunterLab Inc.) på dag 0 og dag 15.

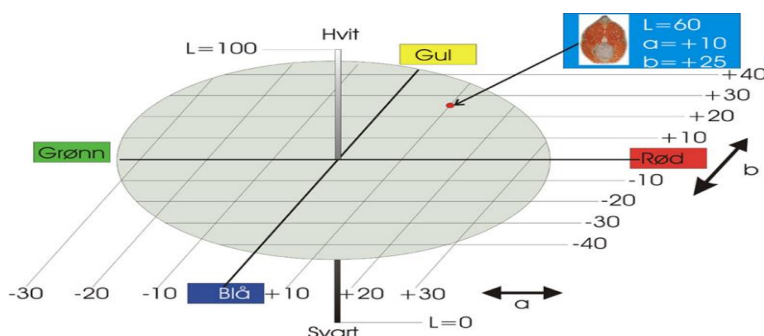
B) 5 triploid laks og 5 diploid laks på 5°C, 10°C og 15°C ble avlivet med hodekakk, veid og målt temperatur, samt pH med innstikk i fremre ryggmuskel nær gjellene med (Mettler Toledo SevenGo Pro, Mettler Toledo International Inc.). Hver enkelt fisk ble deretter merket (Combi Senior, OS Id) og bløgget med gjellekutt for utblødning i 500 liter stort kar med isvann. Etter utblødning, ble fiskens rundvekt notert (KERN Kes-T, Kern & Sohn) før sløying og veing av sløyd fisk (KERN Kes-T, Kern & Sohn). Fiskene ble deretter filetert og det ble skåret norsk kvalitetssnitt (NKS) på høyre filet. Denne ble igjen delt i to og merket + vakuumert (Marlin 46, Henkelman). Høyre NKS ble med en gang fryst på -80°C, dag 0 (Sanyo MDF-U73V, SANYO E&E Europe BV). Venstre filet ble pakket i aluminiumsfolie og lagret på kjølerom i 15 dager før venstre NKS ble skåret ut, delt i to og merket + vakuumert (Marlin 46, Henkelman). Venstre NKS ble fryst på -80°C, dag 15 (Sanyo MDF-U73V, SANYO E&E Europe BV) etter vakuumpakking. Fisken ble senere sendt videre for analysering for fettinnhold, proteininnhold og innhold av astaxanthin på HiST (Høgskolen i Sør-Trøndelag) i Trondheim, samt totalt protein og proteinnedbrytning på Nofima i Stavanger.

#### 4.2.1 Farge

##### **Prinsipp**

For å kunne analysere farge og fargeendringer i laks må man både analysere det totale innholdet av farge (astaxanthin) og de fargenyansene som øyet visuelt kan registrere (HunterLab). HunterLab er paraplynavnet på en rekke instrumenter som kan duplisere hvordan øynene våre ser farger og fargenyanser. HunterLab instrumenter bygger på spektrofotometer teknologi som avleser og omgjør dette til tallverdier som korreleres mot det som menneske faktisk ser (HunterLab 2013/14). Det totale innholdet av astaxanthin ble analysert med en standardisert metode utført fra ekstrahert totalt fett på HPLC-maskin. Maskinen avleser arealet av karotenoider. (Østerlie 2010)

**Figur 20** viser billedlig hvordan HunterLab fargemålings analysemetode fungerer.  $L^*$  viser lyshetsfaktoren,  $a^*$  viser rød/grønn kromatisitet,  $b^*$  viser gul/blå kromatisitet for det analyserte produktet.



*Figur 20: HunterLab skaper et avtrykk (dupliserer) som kan relateres til hvordan vi mennesker oppfatter fargenyansene i et produkt. Nedlastet: 19.2.2015*

## Prosedyre

### HunterLab

Måling av fargenyanser ble utført på (n=5) venstrefileter etter metode beskrevet av (Hunter & Harold 1987) der  $L^*$ =lyshetsfaktoren,  $a^*$ =rød/grønn kromatisitet,  $b^*$ =gul/blå kromatisitet (McDonald & Smith 1995). Analysen ble utført dag 0 og dag 15 *post mortem* med Miniscan fra Hunter™ på definert område på fileten (se fig. 15).



*Figur 21: Her er HunterLab bærbart spektrofotometer avbildet. Øverste del av maskinen (avleserhode) blir lagt ned på måleproduktet. Maskinen registrer lys absorpsjonen forklart i figur 18. (Hentet fra: www.premiercolorscan.com) Nedlastet: 1.2.2015*

### Astaxanthin

Målinger av mengde astaxanthin ble utført av reagensrørene som ga totalt fett i punkt

4.3.3. Astaxanthin ble analysert etter metode beskrevet av (Vecchi et al. 1987) for



bestemmelse av totalt karatenoider i lakseprøvene. Fettet ble løst i 150 $\mu$ l ((heksan:aceton) (86:14)), og nøyaktig 200 $\mu$ l ble overført til (Waters LCGC Certified Amber Glass Screw Neck Vial glass). Samplene ble deretter analysert på en HPLC-maskin (HPLC - High Performance Liquid Chromatography, Agilent Technologies 1100 Series) på kolonne LiChrosorb Si60 -5, 125\*4.0 mm, 5  $\mu$ m, med en flow på 1,0 ml/min. og med en deteksjon på 470nm. HPLC kolonnen ble modifisert med ortofosforsyre (0,1% i CH<sub>3</sub>OH).

*Figur 22: HPLC maskin benyttes for å separere komponentene i en viskøs væske for så å identifisere hver komponent. I denne oppgaven ble fett analysert for tilstedeværelse av karotenoider (astaxanthin) og andre flyktige komponenter (Hentet fra www.antech.ie) Nedlastet: 12.2.2015*

## 4.2.2 Fiskemuskel

### Prinsipp

Ved å analysere fiskemusklene med hjelp av flere forskjellige prosedyrer kan man få en oversikt over de fysiske, kjemiske endringene som skjer med laks under lagring. Mange av prosedyrene henger sammen noe som gjør at mange av analysene kan verifisere hverandre opp mot resultat og teori.

### Prosedyre

#### Vannbinding

WHC av alle venstre fileter ble analysert i dorsal muskelen etter metode beskrevet av (Skipnes et al. 2007). Vannbindingsevne ble målt i duplikater ved hver prøvetaking på dag 5, dag 10 og dag 15 *post-mortem*. Sylinderutstikket (diameter 31mm, høyde 6mm, cirka 5 gram) ble utført på et definert område på fileten.



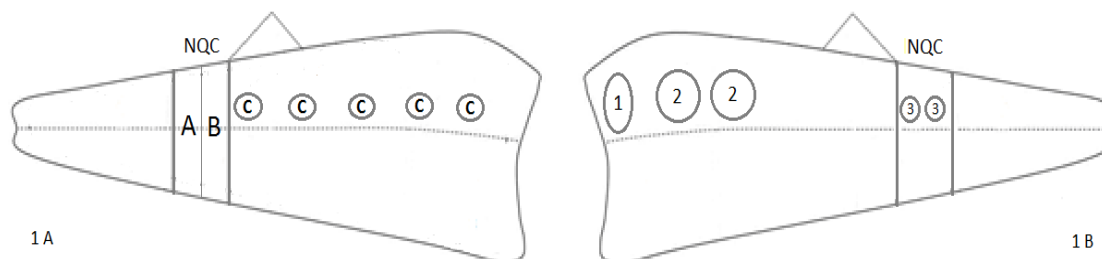
Figur 23: Hettich Rotina 420 ble benyttet for å analysere vannbinding. Metoden som er benyttet baserer seg på at maskinen sentrifugerer oppveid muskelmasse i metallsjaktler i 15 minutter med en hastighet på 15000 runder pr. minutt. Etter programmets slutt ble muskelen veid på nytt. (Hentet fra: [www.hettichlab.com](http://www.hettichlab.com)) Nedlastet: 12.2.2015

#### Drypptap

Væsketap fra både venstre og høyrefiletene ble beregnet som forskjellen i vekt på filetene på dag 0 mot dag 5, dag 10 og dag 15. Filetene ble overflatetørket med tørkepapir, målt pH og temperatur (Mettler Toledo SevenGo Pro, Mettler Toledo International Inc.) før veiing (KERN Kes-T, Kern & Sohn). Vekten ble notert med fire siffrers nøyaktighet. Filetene ble skånsomt pakket tilbake i aluminiumsfolie etter hver analyse. Et gjennomsnitt på venstre og høyre filet ble brukt for statistiske analyser.

$$\text{Drypptap} = \frac{m_0 - m_x}{m_0} \times 100\%, \text{ hvor } m_0 \text{ er filettekt på dag 0 og } m_x \text{ er filettekt på dag X.}$$

**Figur 24** er en skjematisk illustrasjon som visuelt viser de områder på den høyre og venstre fileten som ble benyttet til å utføre de forskjellige analysene.



*A: Astaxanthin og fett ved 0 og 15 dager lagring, B: Protein og proteinnedbrytning, C: Område for fotometrisk analyse av farge (MiniScan XE, HunterLab Inc. 1: Muskel temperatur og pH i løpet av 15 dagers lagring, 2: Vannbinding (WHC), 3: Instrumental tekstur analyser. (Figur: Even F. Skare)*

## Tørrstoff

Totalt tørrstoff utført som beskrevet i (Skipnes et al. 2007). Prøvene ble tørket i tørkeskap (Termaks B1053, VWR International AS) i 24 timer på 110°C, veid øyeblikkelig med (Sartorius S213-1S, Data Weighing Systems, Inc.) og notert med tre siffrers nøyaktighet.

## Muskelsammentrekning

Alle høyre laksefileter ble fotografert med speilreflekskamera (Canon EOS 1000D, Canon Inc.) koblet fast på kamerastativ ved dag 0, dag 5, dag 10 og dag 15. Laksefiletene ble lagt oppå en plastkasse med grønn avfallssekk som bakgrunn. En linjal ble brukt som fast punkt ved hver fotografering. Arealet av fiskefiletene ble utregnet i dataprogrammet; Matlab. Programmet fungerer på den måten at den finner fileten og linjalen på bilde, deretter beregnet analyseprogrammet lengden til den konkrete fileten, og lengden til linjalen i antall piksler og lagrer resultatet i Microsoft Excel regneark. I regnearket blir den kjente lengden av linjalen i centimeter brukt til å beregne lengden til fileten i centimeter. På den måten kunne man sammenligne lengden til filetene fra hvert bilde.



**Figur 25** viser kameraoppsett, den provisoriske platen som fisken ble fotografert på og fotografier fra dag 15,10,5 og 0 som fisken ble fotografert på.



Komplementærfargen til rød (fiskekjøttets farge) er grønn, derfor ble det benyttet en grønn duk for å få bedre kontrast på bildene som forhåpentligvis ga de beste målingene. Det ble brukt en linjal for å ha en gjenstand med lik størrelse på alle bildene på den måten kunne man regne ut muskelsammentrekningene fra dag 0,5,10 og 15. (Hentet fra: eget)

## Tekstur

Instrumental tekstur analyse ble utført ved bruk av Tekstur Analyser TA-XT2 (SMS, Surrey, England) utstyrt med en 30 kg ladet celle. En flat-ende sylinder probe (10 mm diameter, type P/1SP) ble benyttet. Krafttiden ble grafisk fremstilt av dataprogrammet; Tekstur eksponent lys program for Microsoft Windows (Version 4.13, SMS), dataanalysen ble utført av samme program. Analysene ble utført i duplikater (gjennomsnitt verdi ble brukt i dataanalysen) av hver filet 5 og 15 dager *post mortem* (Figur 1B). Motstandskraften (N) ble avlest med en konstant fart på 5 mm sekund<sup>-1</sup>, det er krafta som trengs for å presse sylindere ned 60 % av filetenes tykkelse for å beskrive hardheten.



Figur 26: Tekstur Analyser TA-XT2 maskinen ble tilkoblet PC med programvare for avlesning av areal skapt av maskinens presskraft til 60% av laksemuskulens tykkelse. Skjærkraften har stor betydning for menneskets oppfatning strukturen til næringsmiddelene vi spiser (Hentet fra: [www.texturetechnologies.com](http://www.texturetechnologies.com)). Nedlastet 1.2.2015

### 4.2.3 Kjemisk sammensetning

#### Prinsipp

For å få korrekte resultater knyttet opp mot fettinnhold, proteininnhold, WHC og totalt vanninnhold er det viktig å analysere fiskenes kjemiske sammensetning. Totalt skal de samlede resultatene gi 100%. Kjemisk sammenheng kan også kobles opp mot fôring, fôrtype og forståelsen av fiskens metabolisme. Når man undersøker to forskjellige typer laks er det også interessant å se på om det er forskjeller i mengde protein og deponering av fett. Kjemisk sammensetning er med på å «tegne» det totale bilde fra de fleste andre analyser utført i denne oppgaven.

#### Prosedyre

##### Protein, proteindenaturering og enzymaktivitet

Protein, proteindenaturering og analysering av enzymaktivitet collagenase og cathepsin ble utført etter en modifisert metode beskrevet av (Sovik & Rustad 2006). Analysene ble utført av forsker Line Bach Christensen v/Nofima AS, Stavanger.

##### Lipid

Ekstraksjon av lipider ble utført etter en modifisert utgave av Bligh and Dyer metoden (Bligh 1959), og % totalt lipidinnhold beregnet. Prøvematerialet ble finraspet på rivjern og rundt 2 g prøve ble veid ut (Sartorius S213-1S, Data Weighing Systems, Inc.) og tatt over i sentrifugekopper, og tilsatt 10 ml metanol (MeOH) (Methanol HPLC, VWR) + 4 ml destillert H<sub>2</sub>O. Blandingen ble homogenisert en liten stund før det ble tilsatt 10 ml kloroform (CHCl<sub>3</sub>) (Kloroform, VWR) + 4 ml destillert H<sub>2</sub>O. Blandingen ble homogenisert med en Ultra Turrax T 25 basic. Alle prøver ble sentrifugert (Kubota 1700, Kubota Corporation, Tokyo) ved 9000 rpm i 10 minutter ved 4°C. Alle kimaxrør ble veid før 2 ml av det underste laget (kloroformfasen) ble pipettert ut og overført i kimaxrør. Kimaxrørene med 2 ml kloroform ble avdampet på en varmeblokk (50°C) med tilførsel av N<sub>2</sub>-gass (Pierce modell 18780 Reacti-Vap) i ca. 15 minutter. Kimaxrørene ble direkte etter avdampingen veid med fett. Til slutt ble % lipid av innveid prøve



Figur 27: Pierce Reacti-Vap avdamper med varmeblokk og oppsett for gasstilførsel. I oppgaven ble avdamperen brukt til å dampe bort kloroformfasen i fettprøvene for å beregne totalt fett. Prøvene ble videre brukt til analysering på HPLC (Hentet fra: [www.hitechtrader.com](http://www.hitechtrader.com)). Nedlastet 1.2.2015

beregnet etter formelen:  $\text{g fett/ g prøve} = (\text{g inndampa fett} * \text{totalt volum kloroform} * 100) / (\text{ml inndampa kloroform} * \text{innveid prøve (g)})$  (Bligh 1959).

### 4.3 Mitokondrier

#### Respirasjonskapasitet i mitokondrier

For å kunne analysere respirasjonskapasiteten til mitokondrier og observere evnen for ATP syntese i diploid og triploid laks (*Salmo salar*) i hjerte og rødt muskelvev, ble det benyttet to Oroboro Oxyograf-2K maskiner. (Oroboros Instruments Corp., Innsbruck, Østerrike)

#### Uttak av prøvematerialet

Diploid og triploid laks ble enkeltvis håvet og avlivet med hodekakk. Laksen ble øyeblikkelig lagt i isoporkasse og begravet i knust is. Transporttiden til laboratoriet var  $\pm 2$  minutter.

#### Homogenisering av vev fra hjerte og rød laksemuskel med PBI-Shredder HRR.

#### Prinsipp

For å kunne analysere respirasjonen i mitokondrier i hjerte og rød laksemuskel, må mitokondriene gjøres tilgjengelig, og dette ble gjort ved å benytte en Oroboros PBI-Shredder HRR (Oroboros Instruments Corp., Innsbruck, Østerrike).

Oroboro PBI-Shredder HRR består av to hovedkomponenter inkludert batteri.

Shredderen har et mekanisk homogeniserings system med tre ulike nivå som knuser celleveggene i eukaryote celler, likevel forblir mitokondriene intakt og funksjonelle. At shredderen kan operere på ulike nivå er med på å standardiserer prøvene. Maskinen har egne shredder tubes tilpasset hovedkomponentene. Shredderen er en enkel måte å skånsomt homogenisere forskjellige typer vev, som ved normalt omgivelsestrykk gir høy reproducerbarhet av mitokondrielt utbytte og ivaretar funksjonene i mitokondriene. (Draxl et al. ; Draxl A 2013)

#### Prosedyre

En bit av muskelvevet ble skånsomt skåret opp med skalpell (Skalpell RSGA106.523, VWR International) og lagt på iskaldt aluminiumsbrett. Her ble vevsbiten perfusert ved

hjelp av sprøyte (BD Plastipak 2ml + BD Microlance 3, Bacton Dickinson S.A.) og overført til mikroskop (Binoculært Primolab, Jørgen Kruuse A/S) der muskelfibrene ble hurtig revet fra hverandre og synlig blod fjernet. Overflatefuktighet på muskelvevet ble skånsomt tørket bort med filterpapir og deretter innveid på en finvekt, (Mettler Toledo Excellence XS204, Mettler Toledo International Inc.) vekten ble notert med to siffrers nøyaktighet. Muskelvevet ble plassert i shredder-tubs og deretter tilsatt 500µl respirasjonsvæske (Miro5) før topplokket ble skrudd igjen. Shredderstativet ble lagret i fryser (Bosch GSV29VW30, BSH Husholdningsapparater AS) på – 20°C, og prøvene ble opparbeidet rett etter uttak. Vevet ble shreddet i 10 sekunder på hastighet 1, samt 5 sekunder på hastighet 2 (Oroboros Instruments Corp, Shredder HRR). Homogenatet ble deretter tømt i begerglass sammen med 2,2ml Miro5 og løsningen ble aspirert ved hjelp av mekanisk pipette (Thermo Scientific Pipette F2, Thermo Fisher Scientific Inc.). Deretter ble løsningen tilsatt i et av kammerne i oksyografen. Prosedyren ble utført for fire kammer av gangen i hver operasjon. Alt arbeidet foregikk på is, og utstyret ble også oppbevart på is. Løsningen ble etter respirasjonsanalysen videre pipettert i 25ml BD Falcon rør for analyse av totalt protein i prøvene.

**Figur 28** viser Oroboros PBI-Shredder sitt stativ, den mekaniske shredderen tilkoblet batteri, tubes og verktøy til å åpne/lukke/sette på plass tubsene.



*Figur 28: Systemet baserer seg på homogenisering av vev via spesialtilpassede tubes som har en ru overflate innvendig som risper opp vevet tilsatt Miro5 samtidig som den mekaniske shredderen lager turbulent strømning (vannvirvel) inne i tubsen. Presse på vevet kan justeres med tre forskjellige innstillinger på stativet. Hastigheten på maskinen kan ikke justeres. (Hentet fra: Eget foto)*

## Vevspreparering med Biops med saponin

### Prinsipp

Vevsbehandling med Biops tilsatt Saponin er en godt innarbeidet metode ved mitokondrieanalyser. Metoden går ut på å legge opphakkede vevsbiter i en løsning av Biops tilsatt saponin for å «vaske» bort cellemembraner, og på den måten gi substrater og inhibitorer tilgang til mitokondriene. Saponin er giftig, og det er ønskelig å finne sikrere og ikke minst hurtigere metoder å gjøre mitokondriene tilgjengelige. Behandling av vev med saponin er i denne oppgaven kun utført på punkt 5.5.

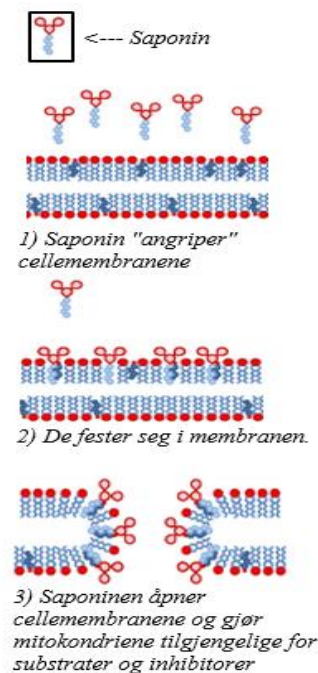
### Prosedyre

En bit av muskelvevet ble skånsomt skåret opp med skalpell (Skalpell RSGA106.523, VWR International) og lagt på iskaldt aluminiumsbrett. Overflatefuktighet på muskelvevet ble skånsomt tørket bort med filterpapir og deretter veid på en finvekt, (Mettler Toledo Excellence XS204, Mettler Toledo International Inc.). Vekten ble notert med to siffrers nøyaktighet og vevsbiten ble lagt oppi et veieskip. Deretter ble muskelvevet tilsatt kjøleskapstemperert BIOPS som nylig var blandet med saponin, og satt i avtrekkskap for 30 minutter. Etter 30 minutter ble muskelvevet overført til kammeret i Oxyografen som på forhånd var fylt med 2,2 ml Miro 5. Prosedyren ble utført for fire kammer av gangen i hver operasjon. Alt arbeidet foregikk på is. Utstyret ble også oppbevart på is. Løsningen ble etter respirasjonsanalysen videre pipettert i 25ml BD Falcon rør for analyse av totalt protein i prøvene.

## Oxyograf

### Prinsipp

OroborO Oxygraph-2K er basert på høyopløselig respirometri. Kammerene i maskinen er spesialkonstruert for å avlese oksygentetthet i prøvemateriale ved hjelp av

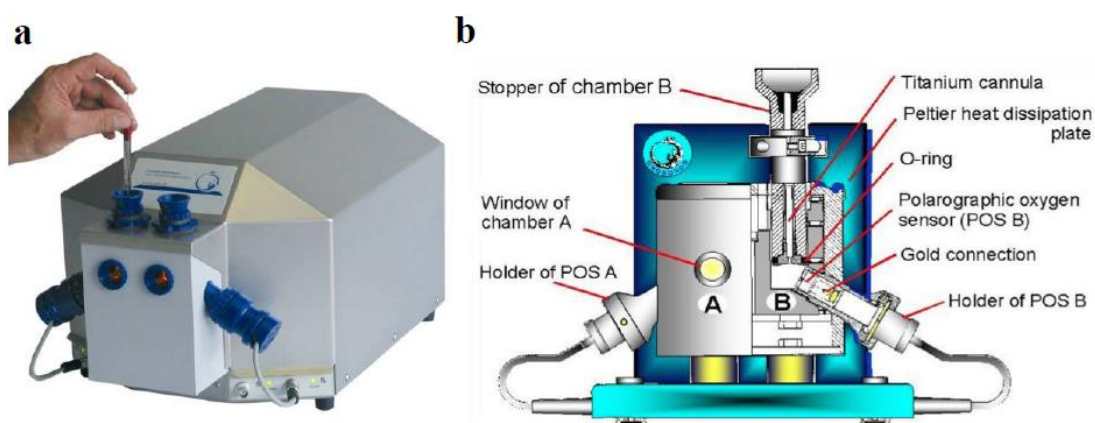


Figur 29: Figuren skal vise funksjonen til 20 ml Biops tilsatt 1,06mg saponin. Saponinen setter seg på YMM og vasker bort membranen for å gjøre mitokondriene tilgjengelige for substrater og inhibitorer som tilsettes i OroborO Oxygraph-2K. Figur hentet fra: (Cabrera-Orozco et al. 2013 kapittel 17) Nedlastet og modifisert: 12.2.2015).



elektrokjemiske sensorer. Maskinen har en temperaturregulert kobberblokk med to separate kammerer som lukkes med stoppere når medium og homogenisert hjerte og/eller rød muskel er tilsatt. Når kammerne er lukket er det kun oksygen fra vevet igjen, naturlig nok vil oksygenkonsentrasjonen synke i større og mindre grad i forhold til hvilke substrater og inhibitorer som tilsettes i kammerene, denne reduksjonen blir brukt for å beregne forbruket av oksygen i mitokondriene. Med Peltier-temperaturkontroll og elektronikk måler maskinen oksygen som en gass oppløst inne i kammerene med hjelp fra polarografiske oksygen sensorer (POS). Maskinen viser kvantitativ oppløsning av oksygenkonsentrasjon og oksygenflux (Gnaiger 2011). Substrater og inhibitorer er mulig å tilsette etter muskelvevet er lagt i kammerne ved hjelp av glassprøyter med ulike volum som tilsettes gjennom en tynn kanal i stopperne (Gastight, Hamilton Company).

**Figur 30** viser Oroboros Oxyograf. Både hvordan den er bygget opp (b) og hvordan den ser ut fra utsiden (a)



*Figur 30: a) Oroboros Oxyograf-2K. Bilde viser tilsetning i kammer A med glassprøyte. Stopperne står i lukket posisjon. POS elektrodene er koblet til blokka på hver sin side. b) Oxyografen sett forfra og inni. Maskinen har to kammerer (A og B) som er plassert over kobberblokken for jevn temperatur. Hvert kammer har en polarografisk oksygensensor (POS) med katode og anode. (Gnaiger 2011) (Hentet fra: Mitochondrial Pathways and Respiratory Control) Nedlastet: 17.9.2014*

### Prosedyre

Oxyografen ble luftkalibrert hver morgen, og hvis det ble analysert laks med høyere eller lavere metabolismetemperatur enn innkalibrert temperatur på maskinen. Dette ble utført ved å ha kun 2 ml Miro 5 i kammerne og stopperne i «åpen» posisjon til flux var  $\pm 0.0$ . Oxyografen ble alltid kjørt på samme temperatur som laksens metabolismetemperatur. Øvrig renhold og vedlikehold ble utført i henhold til Oroboros manualer. Vevet ble krysskjørt i de to oxyografene for enklere å plukke ut run som kunne være unormale.

Protokoll: Reaksjonen ble satt i gang ved tilsetning av 50µl L-Glutamate og 25µl L-Malate før 25µl ADP, 50µl Cytokrom C ,100µl L-Succinate, 10µl FCCP, 10µl Rotenone og til slutt titrering av 10µl+10µl Antimycin A.

Når fluxverdien er stabil over en relativt lang periode, blir neste stoff tilsatt i kammerne ved hjelp av glassprøyter (Gastight, Hamilton Company)

**Tabell 20** Benyttede tilsetninger av substrater og inhibitorer, deres funksjoner i mitokondriene og sluttkonsentrasjon kammerene.

Substrat/ inhibitor	Slutt- konsentrasjon	Funksjon
ADP	50mM	Energi inn i respirasjonen.
Antimycin A	50 µM	Inhiberer elektron flux fra heme bH til Q i complex 3, for å kunne observere ikke mitokondriell respirasjon.
Cytokrom C	50 µM	Tester om vevet er inntakt.
FCCP	0,5 µM	Utkobler ETS fra oksidativ fosforylering.
Glutamate	50 mM	Supplerer Complex 1 med substrat.
Malate	10 mM	Supplerer Complex 1 med substrat.
Rotenone	5µM	Inhiberer elektron flux fra Fs-S senteret til Q krysset i kompleks 1.
Succinate	50 mM	Supplerer Complex 2 med substrat.

*Det ble benyttet åtte forskjellige kjemikalier for å analysere karakteriseringen av mitokondrierespirasjonen hos laks i hjerte og rød muskel. Hvert kjemikaliium har sin egen funksjon.*

**Tabell 21** Opparbeidelse/ingredienser av substrater, avkoblere, inhibitorer og viktige kommentarer.

Løsning (Substrat/Utkobler/Inhibitor)	Ingredienser	Kommentar
L-Glutamate	3,382g/10ml H <sub>2</sub> O	Nøytraliser med 5M KOH, pH sjekk.
L-Malate	536mg/10ml H <sub>2</sub> O	Nøytraliser med 10M KOH, pH sjekk.
L-Succinate disodium salt	2,701g/10ml H <sub>2</sub> O	Sjekk pH, juster til pH 7.0 med 1M HCl.
Cytocrome C	50mg/1ml H <sub>2</sub> O	-
Adenosin 5' difosfat	0,501g/2ml H <sub>2</sub> O	Nøytraliser med 5M KOH, pH sjekk.
Carbonyl cyanide p-(trifluoro-methoxy) phenyl-hydrazone	2,54mg/10ml et.OH	NB!! Veldig giftig.
Antimycin A	11mg/4ml et.OH	NB!! Veldig giftig.
Rotenone	3,94mg/10ml et.OH	Lyssensitiv. NB!! Veldig giftig.

*Det er veldig viktig at pH er riktig justert slik at det ikke ødelegger vevet ved tilsetning i kammerne. Små feil i konsentrasjonen av stoffene vil kunne gjøre stor forskjell i flux ved tilsetning i kammerene. En eventuell feil er svært vanskelig å oppdage. Mange av substratene, utkoblerne og inhibitorne er giftige allerede i små mengder.*

## DataLab

DataLab er datainnsamling og analyseverktøyet til Oroboros Instruments.

Programvarens primærfunksjon er å visualisere oksygenkonsentrasjon, og avlese respirasjonen i vevet ved kjøring i oxyografen. Programvaren er spesielt utviklet for å takle respirometri med høy oppløsning. Programmet ble kjørt via en datamaskin uten tilkobling til internett, og uten andre tilleggsprogram kjørende i bakgrunnen, dette for å hindre bakgrunnsstøy. I tillegg blir det meste av ytelsen fra DataLab selv kjørt i bakgrunnen for ikke å påvirke Oxyografen, noe som gir bedre pålitelighet i resultatet. Ved å merke spesifikke seksjoner i runnet vil programmet utregne gjennomsnittlig flux. (Instruments u.å.) Videre databehandling kan utføres via forhåndsformaterte Microsoft Excel ark og statistikkprogram.

## Proteinanalyse

Bestemmelse av totalt protein i prøvene fra oxyograf kamrene ble utført etter en modifisert utgave av Lowry. (Markwell et al. 1978) Analysene ble utført flere ganger med økende tilsetning av NaOH slik at sluttkonsentrasjonen i prøvene ble i kronologisk rekkefølge 1,3,5 mol lut og deretter mixed på en Vortex mikser. (Vortex Genie 2, Sicientfic Industries, Inc.) Prøvene ble pipettert ut og overført med riktig fortyning til reagensrør med reagens A (2% Natriumkarbonat, 0,4% Natriumhydroksid, 1% Natrium-dodecyl-sulfat, 0,16% Natriumtartrat, VWR+Sigma) som fortyning opptil 3 ml, med to paralleller for hver prøve. Det ble videre tilsatt 3ml reagens C (4% Kobbersulfat pentahydrat, VWR) som er tilsatt reagens A med 1:100 i blandingsforhold, vortex mikset og prøvene oppbevart i romtemperatur i 1 time. Etter en time ble 0,3 ml FC reagens tilsatt med ytterligere 45 minutters stilltilstand. Prøvene, samt stanardkurve (Bovine serum albumin, Sigma) ble avlest på 660nm ved hjelp av platekyvette (PP-microplate 96-brønner, flat bunn) på spektrofotometer. Maskinens dataprogram Gen5™ utførte utregningene. (BioTek Instruments 2014)



## 5. Resultater

### 5.1 Generelle resultater

#### Helvekt

Det var ikke signifikante forskjeller i gjennomsnittsvikt mellom diploid og triploid atlantisk laks (Tabell 22).

**Tabell 22** Gjennomsnittsvikt på diploid og triploid atlantisk laks. Alle fisk i de tre eksperimentene er medregnet (n=161)

Di/tri	N	Gjennomsnittsvikt (kg)	Gruppe	P-verdi
Triploid	81	1,56	A	0,649
Diploid	80	1,55	A	

*Den statistiske beregningen ble gjort med GLM modell (General lineær modell) som viser hoved-effekter.*

Det er signifikante forskjeller i helvekt mot temperatur (Tabell 23). Fisk på 10°C skiller seg ut fra 5°C og 15°C med henholdsvis 330gram og 190gram forskjell i vekt fordel 10°C.

**Tabell 23** Helvekt av fisk ved ulike temperaturer. Alle fisk i de tre eksperimentene er medregnet (n=161).

Temperatur	N	Gjennomsnittsvikt (kg)	Gruppe	P-verdi
5°C	54	1,39	B	<0,05
10°C	54	1,72	A	
15°C	53	1,53	B	

*Den statistiske beregningen ble gjort med Tukey pairwise comparisons sammenligningstest.*

## 5.2 Rigor-utvikling

*Rigor*- utviklingen er senere og mykere hos triploid laks enn hos diploid laks. Tiden det tar før dødsstivheten er på sitt sterkeste er avhengig av individets metabolske temperatur (Tabell 24).

**Tabell 24** *Rigor*-verdien hver fiskegruppe hadde med fire timers mellomrom. De presentert verdiene er et gjennomsnitt av 10 individer per gruppe.

Tid	Diploid 5°C	Triploid 5°C	Diploid 10°C	Triploid 10°C	Diploid 15°C	Triploid 15°C	<i>P</i> - verdi
0	22±3 <sup>bc</sup>	20±4 <sup>c</sup>	26±3 <sup>ab</sup>	24±5 <sup>bc</sup>	29±3 <sup>a</sup>	23±4 <sup>bc</sup>	<0.001
4	18±4 <sup>cd</sup>	14±3 <sup>d</sup>	24±3 <sup>ab</sup>	22±6 <sup>bc</sup>	30±6 <sup>a</sup>	24±5 <sup>ab</sup>	<0.001
8	25±8 <sup>cd</sup>	20±6 <sup>d</sup>	38±9 <sup>abc</sup>	31±15 <sup>bcd</sup>	49±11 <sup>a</sup>	45±22 <sup>ab</sup>	<0.001
12	42±10 <sup>bc</sup>	35±10 <sup>c</sup>	46±6 <sup>abc</sup>	43±12 <sup>bc</sup>	58±16 <sup>ab</sup>	61±18 <sup>a</sup>	<0.001
16	45±6 <sup>b</sup>	43±8 <sup>b</sup>	48±6 <sup>b</sup>	45±14 <sup>b</sup>	77±11 <sup>a</sup>	73±17 <sup>a</sup>	<0.001
20	46±7 <sup>bc</sup>	40±10 <sup>c</sup>	59±12 <sup>b</sup>	50±15 <sup>bc</sup>	88±11 <sup>a</sup>	87±10 <sup>a</sup>	<0.001
24	49±8 <sup>a</sup>	43±12 <sup>a</sup>	72±13 <sup>b</sup>	66±15 <sup>b</sup>	97±3 <sup>a</sup>	90±8 <sup>a</sup>	<0.001
28	59±14 <sup>cd</sup>	50±10 <sup>d</sup>	76±16 <sup>b</sup>	72±13 <sup>bc</sup>	97±3 <sup>a</sup>	92±5 <sup>a</sup>	<0.001
32	69±16 <sup>bc</sup>	59±12 <sup>c</sup>	81±5 <sup>ab</sup>	81±8 <sup>ab</sup>	94±7 <sup>a</sup>	89±8 <sup>a</sup>	<0.001
36	85±16 <sup>ab</sup>	77±10 <sup>b</sup>	82±8 <sup>ab</sup>	72±12 <sup>b</sup>	92±9 <sup>a</sup>	84±11 <sup>ab</sup>	0.004
40	84±8 <sup>a</sup>	79±5 <sup>ab</sup>	76±12 <sup>ab</sup>	67±19 <sup>b</sup>	-	-	0.022
44	76±10 <sup>a</sup>	76±8 <sup>a</sup>	67±15 <sup>a</sup>	61±23 <sup>a</sup>	79±14 <sup>a</sup>	69±12 <sup>a</sup>	0.066
48	68±18 <sup>ab</sup>	69±11 <sup>ab</sup>	55±15 <sup>ab</sup>	50±19 <sup>b</sup>	72±14 <sup>a</sup>	59±15 <sup>ab</sup>	0.013
52	63±11 <sup>a</sup>	63±13 <sup>a</sup>	49±13 <sup>a</sup>	45±18 <sup>a</sup>	60±13 <sup>a</sup>	50±13 <sup>a</sup>	0.014
56	46±13 <sup>ab</sup>	40±8 <sup>ab</sup>	44±13 <sup>ab</sup>	38±11 <sup>b</sup>	54±10 <sup>a</sup>	46±12 <sup>ab</sup>	0.031
60	38±12 <sup>ab</sup>	30±5 <sup>b</sup>	36±8 <sup>b</sup>	32±9 <sup>b</sup>	49±11 <sup>a</sup>	40±7 <sup>ab</sup>	<0.001

Forskjellige små bokstaver i samme rad indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,001$ ) ved en-veis ANOVA.

### Ploiditetsforskjeller i *rigor-mortis* forløp

Det er signifikante forskjeller (<0,001) i *rigor-mortis* forløpet mellom diploid og triploid laks på samtlige undersøkte temperaturer (Tabell 25).

**Tabell 25** De statistisk utregnede verdiene for forskjellen i ploiditet på hvert enkelt temperaturregime, tid og tid mot ploiditet (n=60).

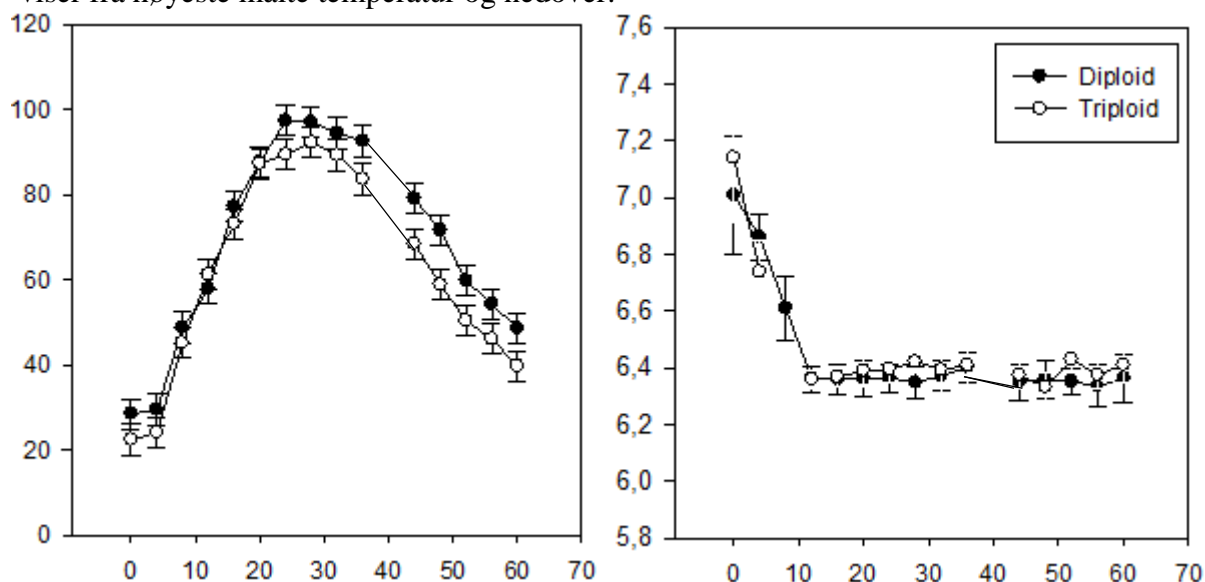
	5°C	10°C	15°C
Vekt kovariant	0,027	Ikke signifikant	0,394
Tid	<0,001	<0,001	<0,001
Ploiditet	<0,001	<0,001	<0,001
TxP	0,861	0,997	0,803

Statistiske analyser utført med GLM-modell (General lineær modell) som viser hoved-effekter.

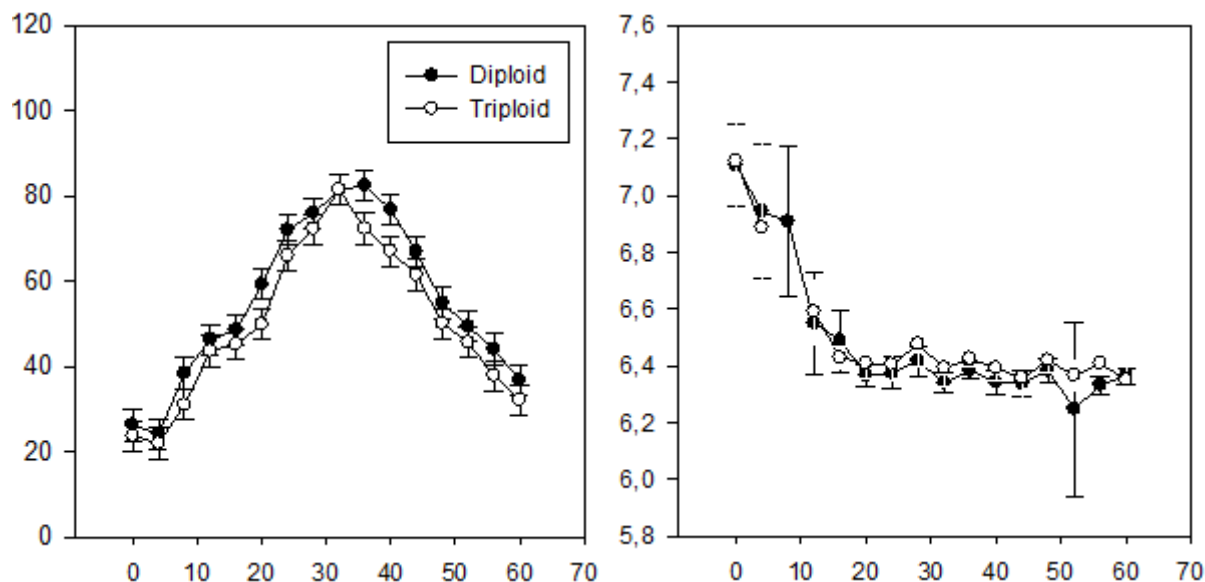
### 5.2.1 Rigor mortis og pH

*Rigor mortis* og pH på hver temperatur med sammenligning mellom diploid og triploid laks viser at diploid laks har kraftigere og lengere dødsstivhet en triploid laks. pH har ingen nominelt høyere verdier. Det er signifikante forskjeller ( $<0,001$ ) i dødsstivheten mellom diploid og triploid laks (*Rigor mortis* og pH 1,2,3).

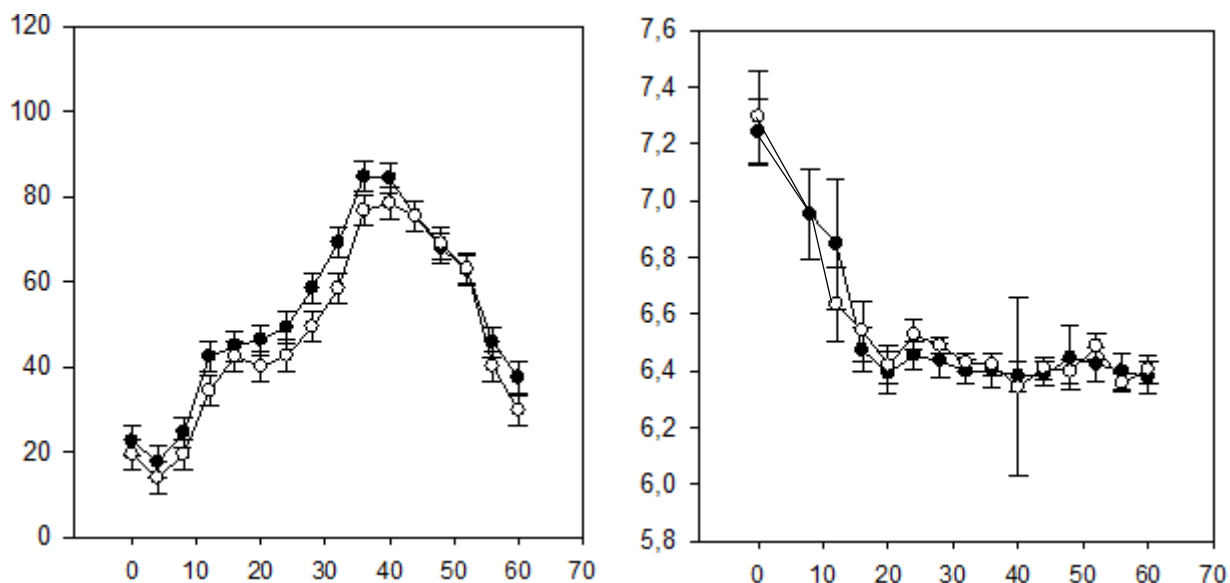
**Rigor mortis og pH 1,2,3** Grafiske fremstillingen av data fra tabell 24. Fremstillingen viser fra høyeste målte temperatur og nedover.



Statistiske analyser utført med GLM-modell (General lineær modell) som viser hoved-effekter.



Statistiske analyser utført med GLM-modell (General lineær modell) som viser hoved-effekter

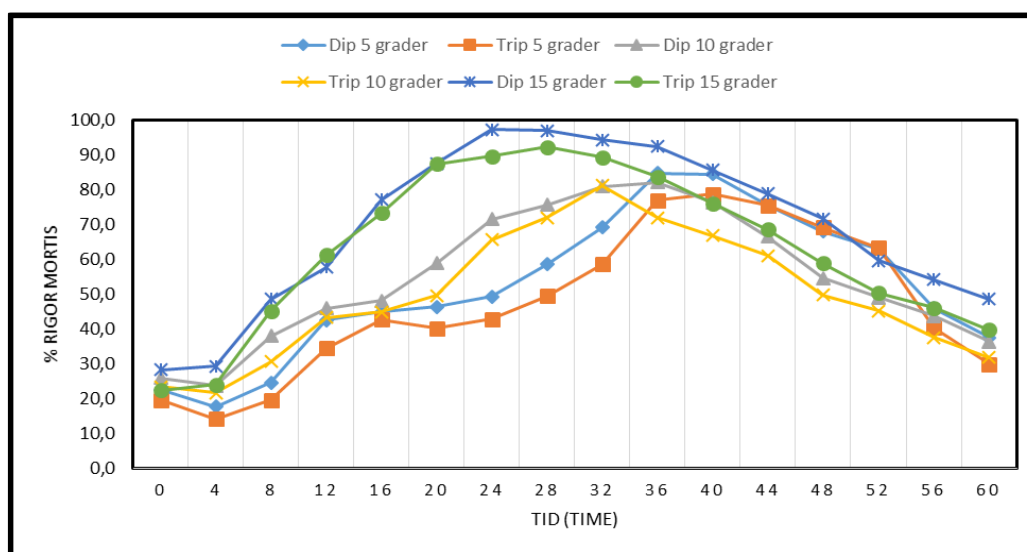


Statistiske analyser utført med GLM-modell (General lineær modell) som viser hoved-effekter

### 5.2.2 Diagramfremvisning samlet alle grupper *rigor mortis* utvikling.

*Rigor mortis* utviklingen mellom diploid og triploid laks viser at diploid laks har kraftigere og lengere dødsstivhet en triploid laks. pH har ingen nominelt høyere verdier. Det er signifikante forskjeller ( $<0,001$ ) i dødsstivheten mellom diploid og triploid laks (Figur 31).

**Figur 31** *Rigor*-indeksen i denne figuren viser hvordan rigor-mortis i diploid og triploid atlantisk laks på henholdsvis 5°C, 10°C og 15°C utvikler seg over en periode på 60 timer med målinger hver 4.time (samlefigur).

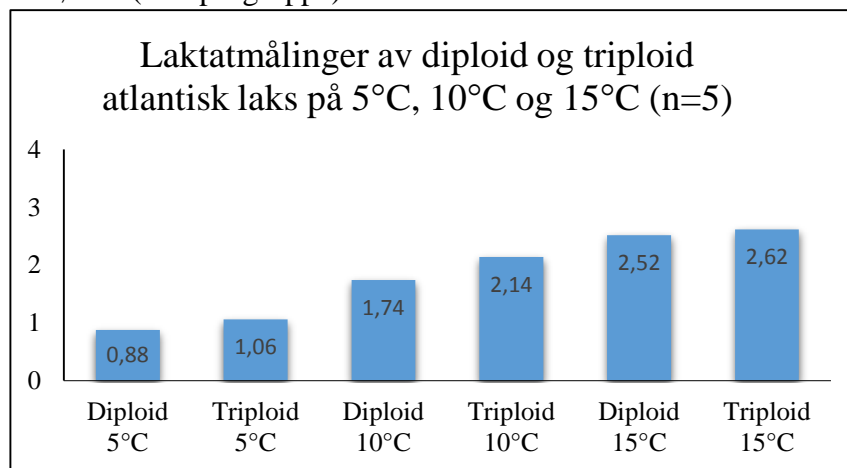


Statistiske analyser utført med GLM-modell (General lineær modell) som viser hoved-effekter

### 5.2.3 Laktatmåling av *rigor-mortis* målte fiskegrupper

Laktatverdiene er økende med temperatur metabolismen. Triploid laks har høyere laktatverdier på samtlige temperaturer. Høyeste gjennomsnittsverdi ble målt hos triploid 15°C med 2,62 mmol/l (Diagram 1).

**Diagram 1** Gjennomsnitt av laktatmålingene av diploid og triploid laks fra *rigor-mortis* forsøket. (n=5 pr. gruppe).



Alle data er gjennomsnittsverdier. Det er utført statistisk analyser for signifikanstest med MiniTab.

### 5.3 Kvalitetsforskjeller på diploid mot triploid laks.

Samletabell for drypptap, muskelsammentrekninger, vannbindingsevne og tørrstoffandel

Det var ingen signifikante forskjeller av noen målte parametere i tabellen av ploiditet mot lik temperatur. Det er nominelt høyere drypptap hos triploid fisk kontra diploid fisk på alle målte temperaturer (Tabell 26).

**Tabell 26** Drypptap %, muskelsammentrekninger %, vannbindingsevne % og tørrstoffandel % med gjennomsnittsverdi og  $\pm$  standardavvik (SD) for hver fiskegruppe og temperatur. Totalt 12 individ pr. gruppe, (n=72).

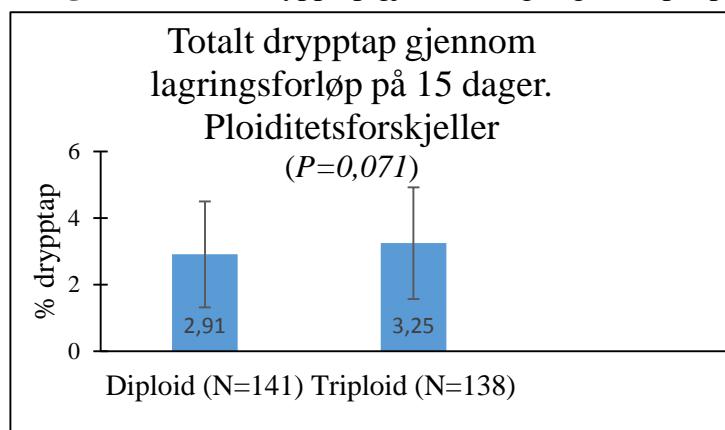
	Diploid 5°C	Triploid 5°C	Diploid 10°C	Triploid 10°C	Diploid 15°C	Triploid 15°C	P- verdi
Drypptap, %	2,7 $\pm$ 1,2ab	2,9 $\pm$ 1,0ab	2,6 $\pm$ 1,4a	3,3 $\pm$ 1,6ab	3,4 $\pm$ 2,0ab	3,6 $\pm$ 2,0b	<0.05
Muskelsammen- trekninger, %	5,2 $\pm$ 2,0ab	4,3 $\pm$ 2,6b	4,6 $\pm$ 2,0b	6,4 $\pm$ 3,3a	4,0 $\pm$ 2,0b	2,0 $\pm$ 2,5c	<0.05
Vannbindingsevnen (WHC), %	90 $\pm$ 3,5a	91 $\pm$ 4,2a	90 $\pm$ 3,3a	91 $\pm$ 4,2a	92,6 $\pm$ 2,8a	92 $\pm$ 3,4a	0.302
Tørrstoff, %	28,5 $\pm$ 2,0b	28,2 $\pm$ 1,3b	32,3 $\pm$ 3,8a	32,5 $\pm$ 2,8a	29 $\pm$ 1,8b	30 $\pm$ 1,7ab	<0.05

Forskjellige små bokstaver i samme rad indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,05$ ) ved en-veis ANOVA.

## Sammenligning av forskjell i drypptap på ploidentetsnivå

Drypptapet mellom diploid og triploid laks er ikke signifikant, men det er nominelt høyere drypptap hos triploide individ uavhengig av metabolsk temperatur på laksen (Diagram 2).

**Diagram 2** Totalt drypptap gjennom lagringsforløpet på 15 dager.



*P*-verdien er 0,071 på totalt 279 vektmålinger. Statistisk analysert ved en-veis ANOVA.

## Tekstur

Det er ingen signifikante forskjeller i fastheten mellom diploid og triploid laks ved samme metabolske temperatur (Tabell 27).

**Tabell 27** Fasthet (Gj.snitt  $\pm$  SD) av *pre-rigor* filetert laks bestemt instrumentalt som kraft (N) på 80% komprimering av fileten høyde.

Dag	Diploid 5°C	Triploid 5°C	Diploid 10°C	Triploid 10°C	Diploid 15°C	Triploid 15°C	<i>P</i> - verdi
5	12,8 $\pm$ 2,0 <sup>b,x</sup>	14,6 $\pm$ 2,6 <sup>ab,x</sup>	11 $\pm$ 1,6 <sup>b,x</sup>	13,7 $\pm$ 1,7 <sup>ab,x</sup>	17,7 $\pm$ 2,3 <sup>a,x</sup>	14,3 $\pm$ 1,6 <sup>ab,x</sup>	<0,05
15	14,3 $\pm$ 2,8 <sup>a,x</sup>	15 $\pm$ 2,8 <sup>a,x</sup>	12,7 $\pm$ 3 <sup>a,x</sup>	13 $\pm$ 2 <sup>a,x</sup>	14 $\pm$ 2 <sup>a,x</sup>	14 $\pm$ 1,3 <sup>a,x</sup>	0,822
<i>P</i> -verdi	0,396	0,848	0,268	0,887	0,057	0,840	

*Forskjellige superscripts (abc) i samme rad indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,05$ ) mellom gruppene, mens forskjellige superscripts (xyz) i samme kolonne indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,05$ ) mellom forskjellig lagringstid.*

## Kjemisk sammensetning

Det er ingen signifikante forskjeller i proteininnhold %, fett %, astaxanthin, totalt karotenoider, lutein og fettsyrer mellom diploid og triploid laks ved samme metabolske temperatur (Tabell 28)

**Tabell 28** Samletabell med alle kjemiske analyser. Protein, Fett, Astaxanthin, totalt karotenoider, lutein og fettsyrer.

	Diploid 5°C	Triploid 5°C	Diploid 10°C	Triploid 10°C	Diploid 15°C	Triploid 15°C	<i>P</i> - verdi
Proteininnhold, % <sup>(1)</sup>	14±5,2 <sup>a</sup>	14±3,2 <sup>a</sup>	12±1,6 <sup>a</sup>	11,6±1,3 <sup>a</sup>	16,3±4,1 <sup>a</sup>	15,4±0,9 <sup>a</sup>	0,075
Fettinnhold, % (2)	2,9±1,5 <sup>a</sup>	5±2,5 <sup>a</sup>	3,4±0,9 <sup>a</sup>	5,1±3,1 <sup>a</sup>	3,7±1,2 <sup>a</sup>	6,8±2,4 <sup>a</sup>	0,062
Astaxanthin, mg/kg <sup>(3)</sup>	3±0,5 <sup>b</sup>	3±0,2 <sup>b</sup>	3,4±0,3 <sup>b</sup>	3,3±0,4 <sup>b</sup>	4,3±0,5 <sup>a</sup>	4,4±0,5 <sup>a</sup>	<0,001
Tot karotenoid, mg/kg <sup>(3)</sup>	3,1±0,5 <sup>b</sup>	3,1±0,2 <sup>b</sup>	3,4±0,3 <sup>b</sup>	3,4±0,4 <sup>b</sup>	4,5±0,5 <sup>a</sup>	4,5±0,5 <sup>a</sup>	<0,001
Lutein, mg/kg <sup>(3)</sup>	0,08±0,02 <sup>c</sup>	0,07±0,01 <sup>c</sup>	0,09±0,01 <sup>c</sup>	0,10±0,02 <sup>bc</sup>	0,12±0,03 <sup>ab</sup>	0,13±0,03 <sup>a</sup>	<0,001
All trans, % <sup>(3)</sup>	93,6±0,8 <sup>a</sup>	92±4,6 <sup>ab</sup>	92,3±0,8 <sup>ab</sup>	92±1,2 <sup>ab</sup>	91±0,9 <sup>b</sup>	92,1±0,7 <sup>ab</sup>	0,114
9-cis, % <sup>(3)</sup>	1,2±0,22 <sup>a</sup>	1,1±0,23 <sup>a</sup>	1,0±0,16 <sup>a</sup>	0,9±0,3 <sup>a</sup>	1,0±0,05 <sup>a</sup>	1,0±0,13 <sup>a</sup>	0,045
13-cis, % <sup>(3)</sup>	5,3±0,7 <sup>d</sup>	5,7±1,3 <sup>cd</sup>	6,8±0,8 <sup>bc</sup>	6,9±1,0 <sup>bc</sup>	8,3±1,0 <sup>a</sup>	7,0±0,7 <sup>b</sup>	<0,001

Forskjellige små bokstaver indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,001$ ) ved en-veis ANOVA.

<sup>(1)</sup> Gjennomsnittlige verdier av 6 individer per gruppe, totalt 36 individer. Samplet dag 0 og 15.

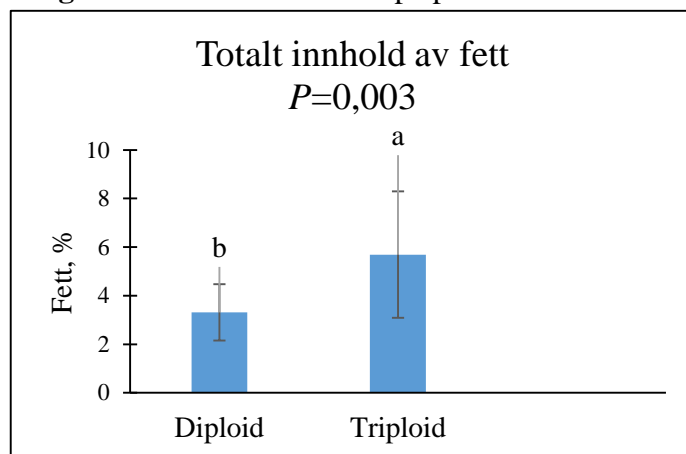
<sup>(2)</sup> Gjennomsnittlige verdier av 5 individer per gruppe, totalt 30 individer. Samplet dag 0.

<sup>(3)</sup> Gjennomsnittlige verdier av 10 individer per gruppe, totalt 60 individer. Samplet dag 0 og 15.

### Ploiditetsforskjellen i totalt fettinnhold samlet

Det er nominelt høyere innhold av fett hos triploid laks. Det er med 97% sikkerhet forskjell i fettdeponeringen mellom diploid og triploid laks uavhengig av metabolsk temperatur (Diagram 3).

**Diagram 3** Totalt fettinnhold på ploiditetsnivå



*P*-verdien er 0,003 på totalt 30 individer. Statistisk analysert ved en-veis ANOVA.

### Cathepsiner og collagenase aktivitet

Det er ingen signifikante forskjeller mellom diploid og triploid laks på cathepsin og collagenase målinger på samme metabolske temperatur. Det er naturlig nok økende mengde cathepsin i musklene etter 15 dager lagring, collagenase verdiene er synkende. De presenterte verdiene er gjennomsnitt på tre individer per gruppe. Prøvetaking på dag 0 og 15 er den samme fileten (Tabell 29).

**Tabell 29** Cathepsin og collagenase aktivitet i individene på dag 0 og 15 i lagringsforsøket.

Parameter	Dag	Diploid 5°C	Triploid 5°C	Diploid 10°C	Triploid 10°C	Diploid 15°C	Triploid 15°C	<i>P</i> - verdi (1)
Cathepsin (mU/g fisk)	0	1,1±0,06 <sup>a,y</sup>	2±0,44 <sup>a,x</sup>	2,2±1,40 <sup>a,x</sup>	1,9±0,11 <sup>a,y</sup>	0,8±0,30 <sup>a,y</sup>	0,9±0,21 <sup>a,y</sup>	0,052
	15	2,9±0,28 <sup>a,x</sup>	2,7±0,25 <sup>a,x</sup>	2,4±0,32 <sup>ab,x</sup>	2,4±0,10 <sup>ab,x</sup>	1,9±0,46 <sup>b,x</sup>	2,1±0,09 <sup>ab,x</sup>	<0,05
	<i>P</i> -verdi <sup>2)</sup>	<0,001	0,071	0,791	0,004	0,025	<0,001	
Collagenase (mU/g fisk)	0	2,0±0,31 <sup>abc,x</sup>	2,8±0,13 <sup>a,x</sup>	2±0,36 <sup>bc,x</sup>	2,7±0,35 <sup>ab,x</sup>	1,9±0,26 <sup>c,x</sup>	2,5±0,19 <sup>abc,x</sup>	<0,05
	15	1,5±0,43 <sup>a,x</sup>	2,0±0,96 <sup>a,x</sup>	1,3±0,24 <sup>a,y</sup>	2,5±0,25 <sup>a,x</sup>	1,2±0,28 <sup>a,y</sup>	1,9±0,85 <sup>a,x</sup>	0,121
	<i>P</i> -verdi <sup>2)</sup>	0,185	0,274	0,042	0,386	0,033	0,340	

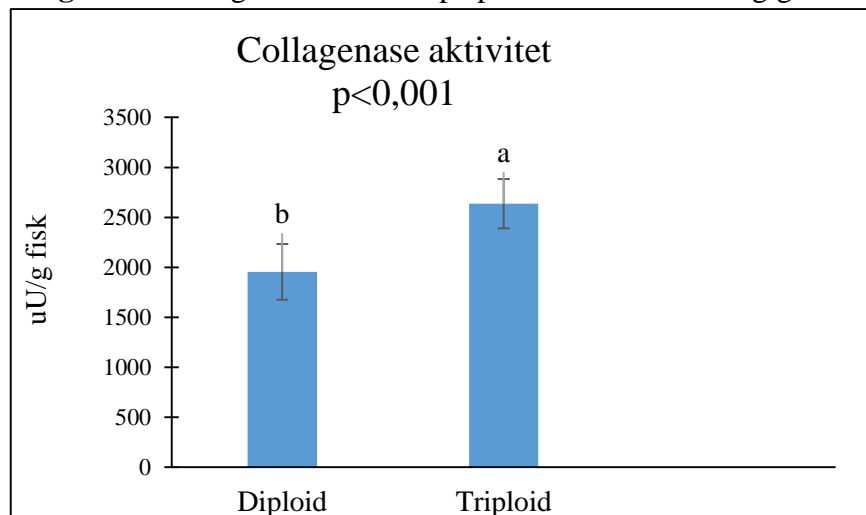
*Betydelig variasjon (P < 0,05) mellom de forskjellige grupper<sup>1)</sup> og dager<sup>2)</sup> ble testet ved enveis variansanalyse og en uavhengig (uparet) t-test, respektivt.*



Ploiditetsforskjellen i collagenase aktivitet samlet

Resultatet fra analysene viser en signifikant forskjell ( $<0,001$ ) i collagenase aktiviteten hos triploid laks i forhold til diploid laks uavhengig av metabolsk temperatur (Diagram 4).

**Diagram 4** Collagenase aktivitet på ploiditetsnivå uavhengig av temperatur



Verdiene er statistisk utregnet gjennomsnittsverdier fra tabell 29 uavhengig av temperatur med en-veis ANOVA.

## HunterLab

Det er ingen signifikante forskjeller mellom diploid og triploid laks på samme metabolske temperatur. Det er heller ingen nevneverdig store forskjeller mellom dag 0 og 15 på L, a\* og b\* verdier. (Tabell 30)

**Tabell 30** Overflate farge, de ulike gruppene samlet for analyser. Resultatene er vist som gjennomsnitt  $\pm$  SD. De presenterte verdiene er et gjennomsnitt på 4-5 individer per gruppe. Prøvetaking på dag 0 og 15 er fra den samme fileten.

	Dag	Diploid 5°C	Triploid 5°C	Diploid 10°C	Triploid 10°C	Diploid 15°C	Triploid 15°C	P-verdi 1)
L	0	53,5 $\pm$ 1,6 <sup>a,x</sup>	53,2 $\pm$ 0,7 <sup>ab,x</sup>	51,3 $\pm$ 1,6 <sup>ab,x</sup>	51,8 $\pm$ 0,7 <sup>ab,x</sup>	50,7 $\pm$ 1,3 <sup>b,x</sup>	51,3 $\pm$ 1,4 <sup>ab,x</sup>	<0,05
	15	52,5 $\pm$ 1,3 <sup>abc,x</sup>	53,2 $\pm$ 1,4 <sup>ab,x</sup>	51,6 $\pm$ 1,1 <sup>bc,x</sup>	54,1 $\pm$ 0,6 <sup>a,y</sup>	51,0 $\pm$ 1,1 <sup>c,x</sup>	52 $\pm$ 0,4 <sup>bc,x</sup>	<0,05
	P-verdi 2)	0,336	0,984	0,757	<0,05	0,986	0,610	
a*	0	19,1 $\pm$ 3,2 <sup>b,x</sup>	20 $\pm$ 1,2 <sup>ab,x</sup>	22,7 $\pm$ 1,3 <sup>a,x</sup>	22 $\pm$ 1,7 <sup>ab,x</sup>	22,6 $\pm$ 1,5 <sup>ab,x</sup>	22,3 $\pm$ 1 <sup>ab,x</sup>	<0,05
	15	20,8 $\pm$ 2,7 <sup>a,x</sup>	20,4 $\pm$ 1,1 <sup>a,x</sup>	22,7 $\pm$ 1,6 <sup>a,x</sup>	20,3 $\pm$ 1,5 <sup>a,x</sup>	23,3 $\pm$ 1,2 <sup>a,x</sup>	23,1 $\pm$ 0,5 <sup>a,x</sup>	<0,05
	P-verdi 2)	0,443	0,678	0,975	0,157	0,432	0,238	
b*	0	23,3 $\pm$ 2,3 <sup>a,x</sup>	23,2 $\pm$ 0,7 <sup>a,x</sup>	25 $\pm$ 1,1 <sup>a,x</sup>	23,5 $\pm$ 1 <sup>a,x</sup>	24 $\pm$ 1 <sup>a,x</sup>	23,6 $\pm$ 1,1 <sup>a,x</sup>	0,264
	15	23 $\pm$ 2,3 <sup>a,x</sup>	22 $\pm$ 0,6 <sup>ab,y</sup>	22,8 $\pm$ 1,3 <sup>ab,y</sup>	20 $\pm$ 1,3 <sup>b,y</sup>	23,3 $\pm$ 0,7 <sup>a,x</sup>	22,6 $\pm$ 0,3 <sup>ab,x</sup>	<0,05
	P-verdi 2)	0,856	<0,05	<0,05	<0,05	0,125	0,125	

Signifikant variasjon ( $P < 0,05$ ) mellom de forskjellige gruppene <sup>1)</sup> og dager <sup>2)</sup> ble testet ved enveis variansanalyse (ANOVA) og en uavhengig (uparet) t-test, respektiv. Forskjellige superscripts (abc) i samme rad indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,05$ ) mellom gruppene, mens forskjellige superscripts (xyz) i samme kolonne indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,05$ ) mellom forskjellig lagringstid.

#### 5.4 Karakterisering av mitokondrierespirasjon i hjerte (*apex cordis* (hjertespiess)) og rød muskel på diploid og triploid laks i sjøvannfasen på 5°C, 10°C, 15°C.

##### 5.4.1 Diploid/triploid laksehjerte på 5°C, 10°C, 15°C.

Det er ingen signifikante forskjeller i mitokondrierespirasjonen hos hjerte i diploid og triploid laks på samme metabolske temperatur. En høyere metabolsk temperatur gir økt mitokondriell respirasjon i hjerte (Tabell 31).

**Tabell 31** Gjennomsnittsverdi og standardavvik (SD) fra tilsatte substrater, inhibitorer, utkoblere i analyserte mitokondrier i ETS for diploid og triploid atlantisk laks i sjøvann på 5°C, 10°C, 15°C

	Diploid 5°C	Triploid 5°C	Diploid 10°C	Triploid 10°C	Diploid 15°C	Triploid 15°C	<i>P</i> - verdi
Glutamate	1,5±0,3c	1,7±0,4bc	2,1±0,5abc	1,9±1,1abc	3,1±0,6a	3±0,8ab	<0,05
Malate	2,1±0,4a	2,5±0,6a	3,3±0,8a	2,9±1,1a	3,7±1,2a	3,8±1a	<0,05
ADP	15,7±5,4ab	14,5±1,3b	22,2±6,1ab	23,9±3,4ab	26,8±8ab	31,4±16,2a	<0,05
CytC	21,6±6,7a	15,4±2,2a	24,3±7a	25,4±5,5a	36,1±1,9a	21,9±11,7a	0,188
Succinate	19,1±5,2b	18,4±0,4b	29±4,9ab	27,2±2,6ab	31,9±9,4ab	37±16a	<0,05
FCCP	15,3±4,7b	15,1±1,5b	22,3±3,4ab	21±2,5ab	23,7±8,9ab	26,9±9a	<0,05
Rotenonee	6,1±3,1a	7,6±5,4a	7,6±1,1a	5,7±2,7a	9,2±3,2a	6,9±2,8a	0,608
RoX	2±1,5a	0,8±0,7a	1,3±0,6a	0,7±0,4a	2±1,2a	1,5±1a	0,173

Forskjellige små bokstaver i samme rad indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,05$ ) ved en-veis ANOVA.

##### 5.4.2 Diploid mot triploid laksehjerte på samme temperaturmetabolisme

Det finnes ingen signifikante forskjeller mellom hjerte i diploid og triploid atlantisk laks i sjøvannsfasen på samme temperaturregime ( $P < 0,05$ ) (Tabell 32).

**Tabell 32** *P*-verdier for tilsatte substrater, inhibitorer, avkoblere i analyserte hjerte mitokondrier i ETS for sammenligning av hjerte i diploid og triploid atlantisk laks mot samme sjøtemperatur.

	Diploid mot triploid 5°C	Diploid mot triploid 10°C	Diploid mot triploid 15°C
Glutamate	0,687	0,715	0,797
Malate	0,239	0,499	0,842
ADP	0,635	0,600	0,579
Succinate	0,769	0,488	0,563
FCCP	0,993	0,500	0,583
Rotenonee	0,600	0,189	0,260
RoX	0,134	0,104	0,450

Statistisk analyse utført med en-veis ANOVA.

### 5.4.3 Metabolsk respons mellom temperaturer uavhengig av ploiditet

Det er tydelig økning i laksehjertes metabolisme ved økt metabolsk temperatur. 5°C utmerker seg og uttrykker betydelig variasjon fra 10°C, 15°C (Tabell 33).

**Tabell 33** Gjennomsnittlige metabolsk respons til laksehjerte på 5°C, 10°C, 15°C uavhengig av ploiditet.

	5°C	10°C	15°C	<i>P-verdi</i>
Glutamate	1,7±0,3b	2±0,8b	3±0,6a	<0,05
Malate	2,3±0,5b	3,1±0,9ab	3,8±1,1a	<0,05
ADP	15,1±3,8b	23,1±4,7ab	29,1±12,3a	<0,05
CytC	18±5,4a	24,7±5,7a	29±10,7a	0,186
Succinate	18,7±3,5b	28,1±3,8a	34,5±12,7a	<0,05
FCCP	15,2±3,3b	21,7±2,9a	25,3±8,6a	<0,05
Rotenone	6,9±4,2a	6,6±2,2a	8,1±3a	0,580
RoX	1,4±1,3a	1±0,6a	1,8±1a	0,281

Forskjellige små bokstaver i samme rad indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,05$ ) ved en-veis ANOVA.

### 5.4.4 Ploiditetsforskjeller i mitokondrierespirasjon for hjerte

Det er signifikant forskjell i restoksygen i laksehjerte mellom ploiditetene jamfør tabell 31 har diploid laksehjerte høyere respiratorisk restoksygen enn triploid ( $P < 0,05$ ) (Tabell 34).

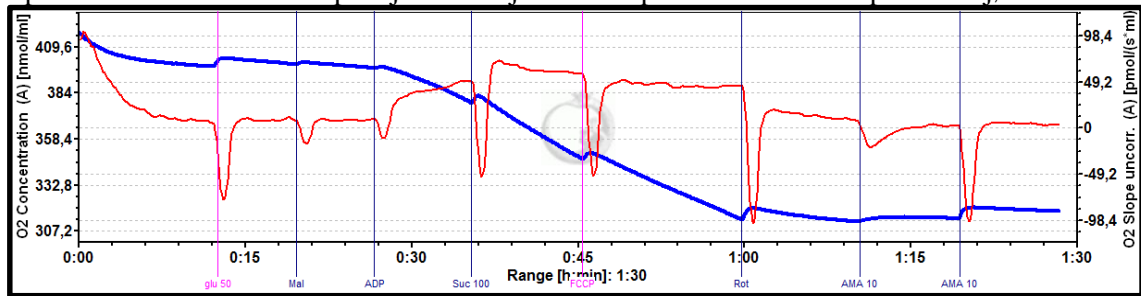
**Tabell 34** *P*-verdier på ploiditetsforskjeller uavhengig av temperatur i laksehjerte.

Ploiditetsforskjeller, laksehjerte	
Glutamate	0,814
Malate	0,907
ADP	0,633
CytC	0,194
Succinate	0,825
FCCP	0,825
Rotenone	0,461
RoX	<0,05

Statistisk analyse utført med en-veis ANOVA.

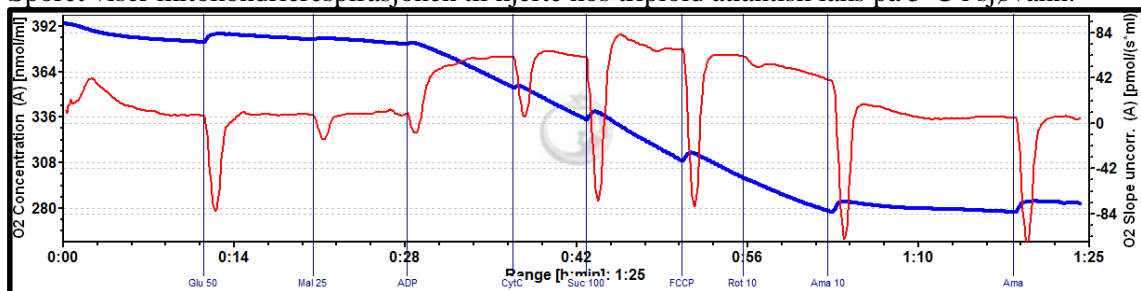
### 5.4.5 Run fra hjerte (*apex cordis*) hos diploid og triploid laks i sjøvann.

Sporet viser mitokondrierespirasjonen til hjerte hos diploid atlantisk laks på 5°C i sjøvann.



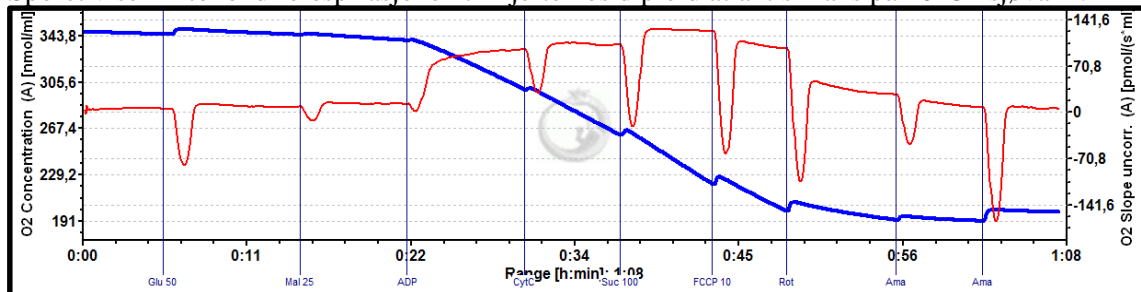
Run 1: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 4,8mg Glu:1,65 Mal:1,7 ADP:9,75 Suc:12,59 FCCP:9,4 Rot:2,66 Ama:1,07 [Flux/mg innveid vev]

Sporet viser mitokondrierespirasjonen til hjerte hos triploid atlantisk laks på 5°C i sjøvann.



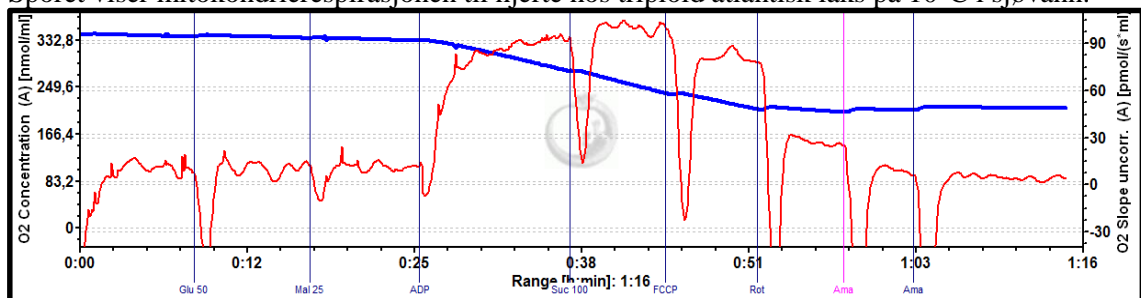
Run 2: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 3,8mg Glu:2,04 Mal:2,18 ADP:15,89 CytC:16,95 Suc:18,49 FCCP:16,55 Rot:12,89 Ama:0,99 [Flux/mg innveid vev]

Sporet viser mitokondrierespirasjonen til hjerte hos diploid atlantisk laks på 10°C i sjøvann.



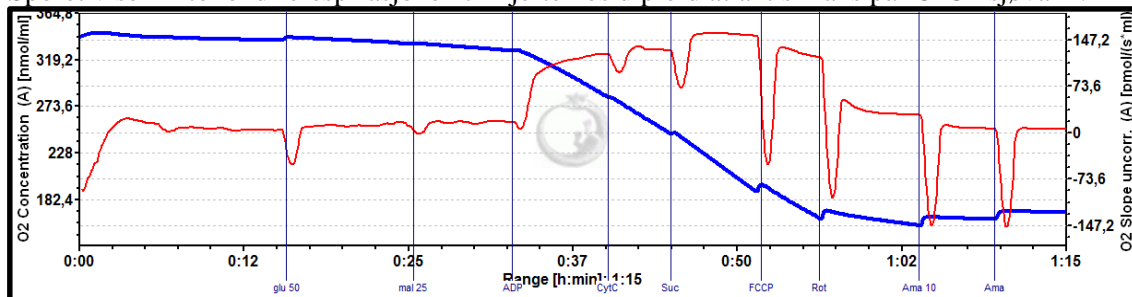
Run 3: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 4,5mg Glu:2,04 Mal:3,04 ADP:20,45 CytC: 23,32 Suc:28,04 FCCP:22,57 Rot:6,84 Ama:1,42 [Flux/mg innveid vev]

Sporet viser mitokondrierespirasjonen til hjerte hos triploid atlantisk laks på 10°C i sjøvann.



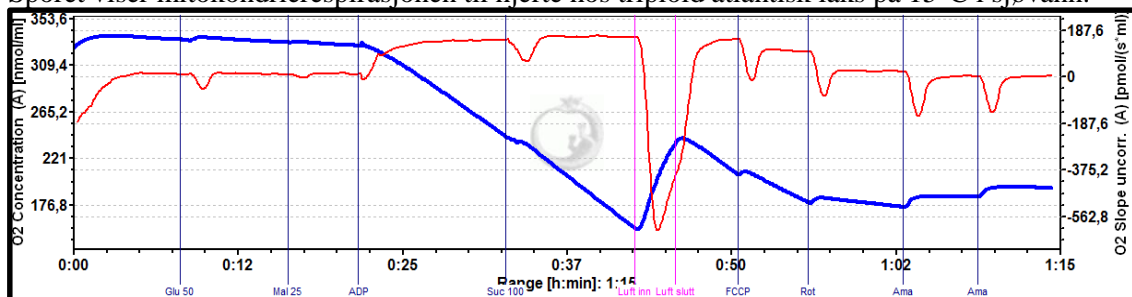
Run 4: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 4mg Glu:3,17 Mal:2,82 ADP:23,05 Suc:25,28 FCCP:20,02 Rot:6,68 Ama:1,13 [Flux/mg innveid vev]

Sporet viser mitokondrierespirasjonen til hjerte hos diploid atlantisk laks på 15°C i sjøvann.



Run 5: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 3,5mg Glu:3,12 Mal:4,65 ADP:34,98 CytC:37,49 Suc:44,67 FCCP:34,87 Rot:8,37 Ama:1,94 [Flux/mg innveid vev]

Sporet viser mitokondrierespirasjonen til hjerte hos triploid atlantisk laks på 15°C i sjøvann.



Run 6: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 3,7mg Glu:3,35 Mal:3,42 ADP:39,41 Suc:43,57 FCCP:28,37 Rot:6,69 Ama:0,61 [Flux/mg innveid våtvekt]

#### 5.4.6 Gjennomsnittsdata diploid/triploid rød muskel 5°C, 10°C, 15°C

Det er signifikante forskjeller i den metabolske responsen mellom rød muskel i diploid og triploid laks 15°C ved ADP og ved avkobling av complex 1 (Tabell 35).

**Tabell 35** Gjennomsnittsverdi og standardavvik (SD) på tilsatte substrater, inhibitorer, utkoblere i analyserte mitokondrier i ETS for rød muskel i diploid og triploid atlantisk laks i sjøvann på 5°C, 10°C, 15°C.

	Diploid 5°C	Triploid 5°C	Diploid 10°C	Triploid 10°C	Diploid 15°C	Triploid 15°C	P- verdi
Glutamate	2,3±0,5a	1,7±1,2a	1,8±0,4a	1,5±0,1a	2,1±0,6a	2,7±0,5a	0,056
Malate	2,4±1a	2,2±0,5a	2,4±0,3a	2±0,3a	2±0,8a	3,1±0,4a	0,064
ADP	11,8±3,5abc	9±3,4c	16,4±1,8a	15,7±1,4ab	9,8±5,7bc	15,4±2,2abc	<0,05
CytC	11±0a	13,3±3,3a	-	18±0a	6,4±0a	20,9±0,6a	0,117
Succinate	12,7±4,5a	11,2±4,5a	16,3±2,2a	16,4±2,3a	10±6,9a	15,4±4,1a	0,119
FCCP	9,5±4,2a	8,2±3,1a	13±1,5a	12,6±1,6a	7,6±5a	12,5±4,2a	0,069
Rotenone	5,4±2,8a	3,4±1,8a	5,8±1a	5,7±0,8a	3,1±1,3a	5,8±1,7a	<0,05
RoX	1,7±0,6a	1,1±0,8a	1,4±0,4a	1,4±0,1a	1,3±0,6a	1,7±1a	0,621

Forskjellige små bokstaver i samme rad indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,05$ ) ved en-veis ANOVA.

### 5.4.7 Diploid mot triploid rød laksemuskel på samme temperaturmetabolisme

Det er signifikante forskjeller mellom malate og rotenone i rød muskel i diploid og triploid atlantisk laks i sjøvannsfasen på 15°C ( $P < 0,05$ ) (Tabell 36).

**Tabell 36**  $P$ -verdier for tilsatte substrater, inhibitorer, utkoblere i analyserte rød muskel mitokondrier i ETS for sammenligning av rød muskel i diploid og triploid atlantisk laks mot samme sjøtemperatur.

	Diploid mot triploid 5°C	Diploid mot triploid 10°C	Diploid mot triploid 15°C
Glutamate	0,313	0,094	0,123
Malate	0,646	0,079	<0,05
ADP	0,248	0,509	0,070
Succinate	0,613	0,940	0,173
FCCP	0,580	0,736	0,128
Rotenone	0,199	0,771	<0,05
RoX	0,209	0,846	0,437

Statistisk utregnet ved en-veis ANOVA

### 5.4.8 Metabolsk respons i rød muskel mellom temperaturer uavhengig av ploiditet

Det er betydelig variasjon mellom ADP-responsen hos rød laksemuskel på 5°C og 10°C. Det samme gjelder glutamate responsen på 10°C og 15°C (Tabell 37).

**Tabell 37** Gjennomsnittlige metabolske responsen til rød laksemuskel på 5°C, 10°C, 15°C uavhengig av ploiditet.

	5°C	10°C	15°C	$P$ -verdi
Glutamate	2±0,9ab	1,6±0,3b	2,4±0,6a	<0,05
Malate	2,3±0,8a	2,2±0,4a	2,6±0,8a	0,550
ADP	10,4±3,5b	16±1,6a	12,6±5ab	<0,05
CytC	12,5±2,7a	18±0	16,1±8,4a	0,699
Succinate	11,9±4,3a	16,3±2,1a	12,7±6,1a	0,080
FCCP	8,9±3,6a	12,8±1,4a	10,1±5,1a	0,066
Rotenone	4,4±2,4a	5,7±0,8a	4,4±2a	0,203
RoX	1,4±0,8a	1,4±0,3a	1,5±0,8a	0,897

Forskjellige små bokstaver i samme rad indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,05$ ) ved en-veis ANOVA.

### 5.4.9 Ploiditetsforskjeller i mitokondrierespirasjon for rød muskel

Det er ingen signifikante forskjeller mellom rød muskel i diploid og triploid uavhengig av temperatur i sjøvann (<0,05) (Tabell 38).

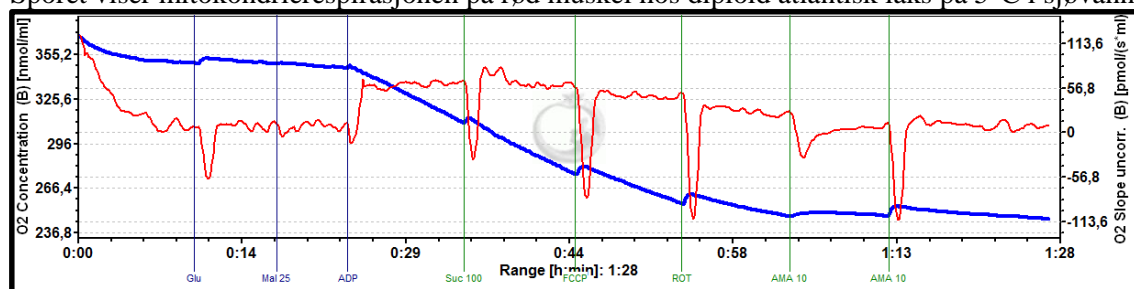
**Tabell 38** P-verdier på ploiditetsforskjeller i rød laksemuskel i sjøvann.

Ploiditetsforskjeller, rødmuskel	
Glutamate	0,676
Malate	0,494
ADP	0,633
CytC	0,051
Succinate	0,449
FCCP	0,453
Rotenone	0,830
RoX	0,757

Statistisk utregnet ved en-veis ANOVA.

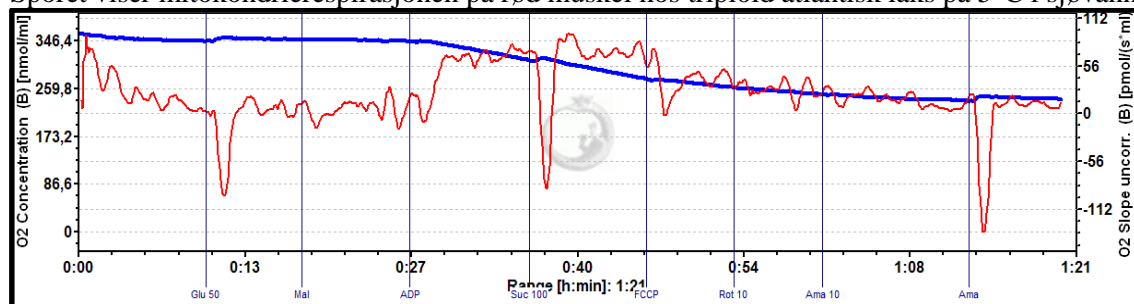
### 5.4.10 Run fra rød muskel hos diploid og triploid laks i sjøvann.

Sporet viser mitokondrierespirasjonen på rød muskel hos diploid atlantisk laks på 5°C i sjøvann.



Run 7: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 5,7mg Glu:1,72 Mal:1,81 ADP:10,99 Suc:10,73 FCCP:8,13 Rot:4,76 Ama:1,60 [Flux/mg innveid våtvekt]

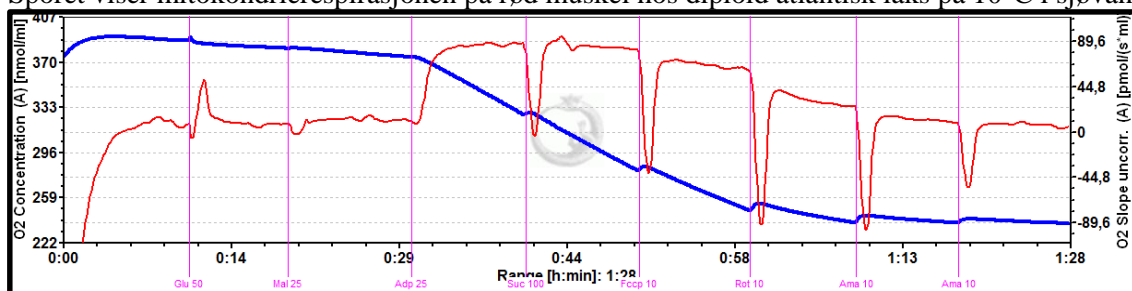
Sporet viser mitokondrierespirasjonen på rød muskel hos triploid atlantisk laks på 5°C i sjøvann.



Run 8: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 5mg Glu:3,66 Mal:2,6 ADP:13,28 Suc:14,06 FCCP:9,48 Rot:5,57 Ama:2,53 [Flux/mg innveid vev]

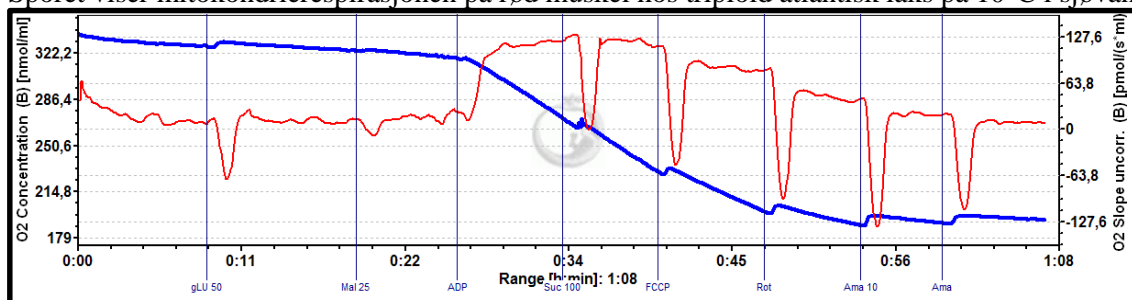


Sporet viser mitokondrierespirasjonen på rød muskel hos diploid atlantisk laks på 10°C i sjøvann.



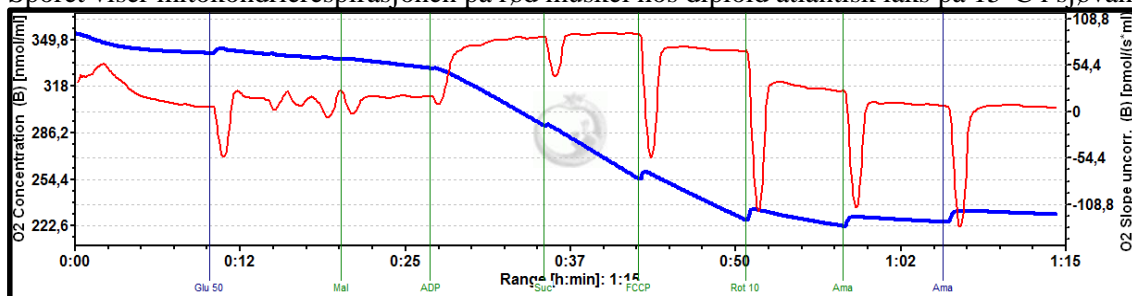
Run 9: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 5,8mg Glu:1,28 Mal:2,19 ADP:14,92 Suc:14,45 FCCP:11,34 Rot:4,99 Ama:2,04 [Flux/mg innveid vev]

Sporet viser mitokondrierespirasjonen på rød muskel hos triploid atlantisk laks på 10°C i sjøvann.



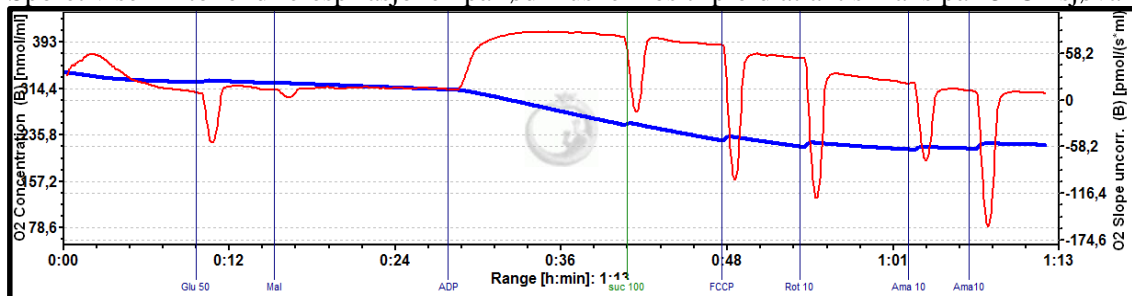
Run 10: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 6,8mg Glu:1,61 Mal:2,4 ADP:17,53 Suc:18,10 FCCP:12,71 Rot:6,25 Ama:1,38 [Flux/mg innveid vev]

Sporet viser mitokondrierespirasjonen på rød muskel hos diploid atlantisk laks på 15°C i sjøvann.



Run 11: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 6,7mg Glu:1,83 Mal:1,34 ADP:11,59 Suc:14,06 FCCP:11,03 Rot:8,65 Ama:1,45 [Flux/mg innveid vev]

Sporet viser mitokondrierespirasjonen på rød muskel hos triploid atlantisk laks på 15°C i sjøvann.

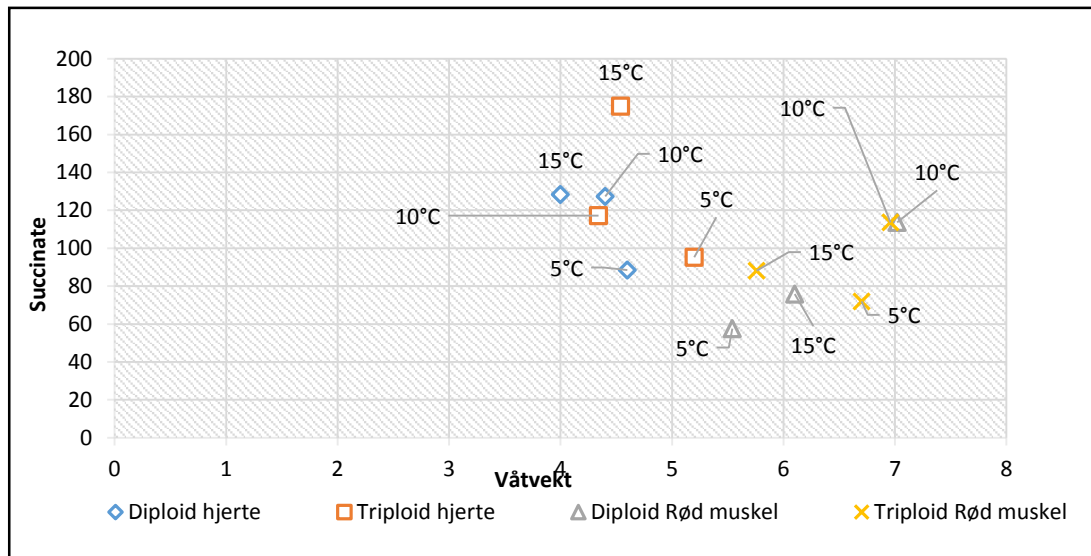


Run 12: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 5,1mg Glu:3,21 Mal:2,95 ADP:16,48 Suc:13,97 FCCP:10,76 Rot:5,29 Ama:2,67 [Flux/mg innveid vev]

### 5.4.11 Innveid våtvekt mot succinate respons, 5°C ,10°C og 15°C. Hjerte og rød muskel

Succinate responsen mot innveid våtvekt viser at mitokondriene er intakte selv om det er noe diffus spredning mellom temperaturene og vev. God respons i forhold til innveid våtvekt forteller at analyseresultatene er til å stole på (Diagram 5).

**Diagram 5** Gjennomsnitt innveid våtvekt mot avlest succinate respons i vevet hos hjerte og rød muskel i diploid og triploid atlantisk laks i sjøvann.



Denne fremstillingen kan vise om vevet responderer godt med mange mitokondrier intakt eller om vevet er dårlig/ødelagt.

## 5.5 Karakterisering av mitokondrierespirasjon i hjerte (*apex cordis*) og rød muskel på diploid og triploid laks i ferskvannsfasen på 4°C.

### 5.5.1 Gjennomsnittsdata diploid/triploid hjerte ferskvann.

Det er ingen store forskjeller mellom diploid og triploid laksehjerte i ferskvann på 4°C, standardavviket er størst der flux responsen også er på sitt høyeste (Tabell 39).

**Tabell 39** Gjennomsnittsverdi og standardavvik (SD) på tilsatte substrater, inhibitorer, utkoblere i analyserte mitokondrier i ETS for hjerte i diploid og triploid atlantisk laks i ferskvann på 4°C.

	Diploid hjerte	Triploid hjerte
Glutamate	1,3±0,3	1,2±0,5
Malate	1,4±0,3	1,4±0,2
ADP	19,8±4,4	22,1±4,3
Succinate	21,3±4,1	24,4±5,1
FCCP	17,7±3,3	19,2±3,8
Rotenone	4,4±1,8	4,7±0,8
RoX	0,8±0,3	0,8±0,0

Statistisk utregnet ved en-veis ANOVA.

### 5.5.2 Ploiditetsforskjeller i mitokondrierespirasjon for hjerte

Det er ingen signifikante ploiditetsforskjeller (<0,05) i hjerte hos laks i ferskvann (Tabell 40).

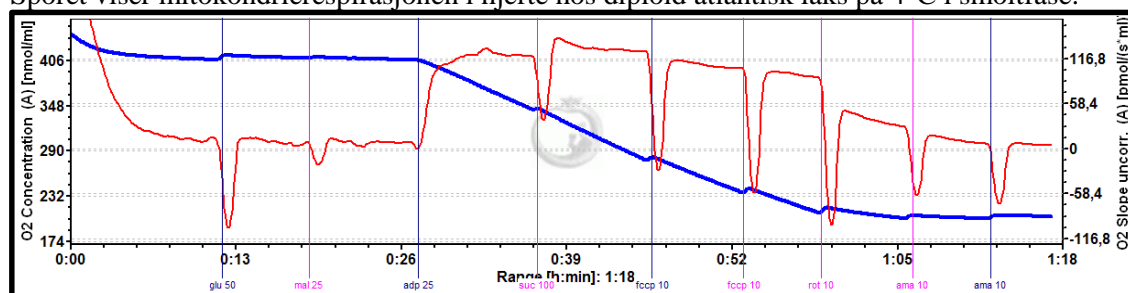
**Tabell 40** P-verdier på ploiditetsforskjeller i laksehjerte i ferskvann.

Ploiditetsforskjeller, laksehjerte	
Glutamate	0,485
Malate	0,747
ADP	0,297
Succinate	0,186
FCCP	0,395
Rotenone	0,672
RoX	0,537

Statistisk utregnet ved en-veis ANOVA.

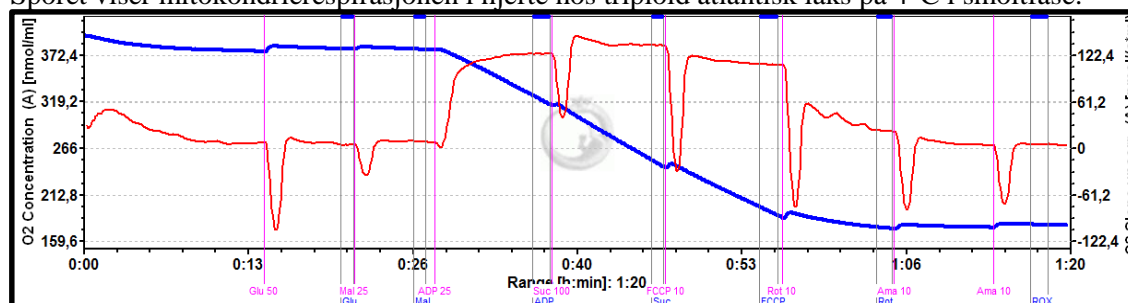
### 5.5.3 Run fra hjerte hos diploid og triploid laks i ferskvann.

Sporet viser mitokondrierespirasjonen i hjerte hos diploid atlantisk laks på 4°C i smoltfase.



Run 13: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 5mg Glu:1 Mal:1,5 ADP:24,2 Suc:25,4 FCCP:21 Rot:6,2 Ama:0,9 [Flux/mg innveid vev]

Sporet viser mitokondrierespirasjonen i hjerte hos triploid atlantisk laks på 4°C i smoltfase.



Run 14: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 6mg Glu:0,8 Mal:1,6 ADP:20,8 Suc:22,6 FCCP:18,4 Rot:3,9 Ama:0,8 [Flux/mg innveid vev]

### 5.5.4 Gjennomsnittsdata diploid/triploid muskel 4°C

Flux responsen er relativt lav for begge ploidetetene i rød muskel i ferskvann på 4°C. ADP responsen ser ut til å skille seg ut (Tabell 41).

**Tabell 41** Gjennomsnittsverdi og standardavvik (SD) på tilsatte substrater, inhibitorer, utkoblere i analyserte mitokondrier i ETS for rød muskel i diploid og triploid atlantisk laks i ferskvann

	Diploid muskel	Triploid muskel
Glutamate	1,4±0,3	1,5±0,5
Malate	1,6±0,3	1,7±1,1
ADP	6,6±2,0	9,3±2,7
Succinate	7±3,1	8,3±1,9
FCCP	5,6±1,8	6,7±1,3
Rotenone	2,6±0,6	2,4±1,9
RoX	0,4±0,2	0,7±0,6

Statistisk utregnet ved en-veis ANOVA.

### 5.5.5 Ploiditetsforskjeller i mitokondrierespirasjon for rød muskel

Det er signifikante ploide forskjeller i ADP-responsen i rød muskel fordel triploid laks i smoltfasen ( $<0,05$ ) (Tabell 42).

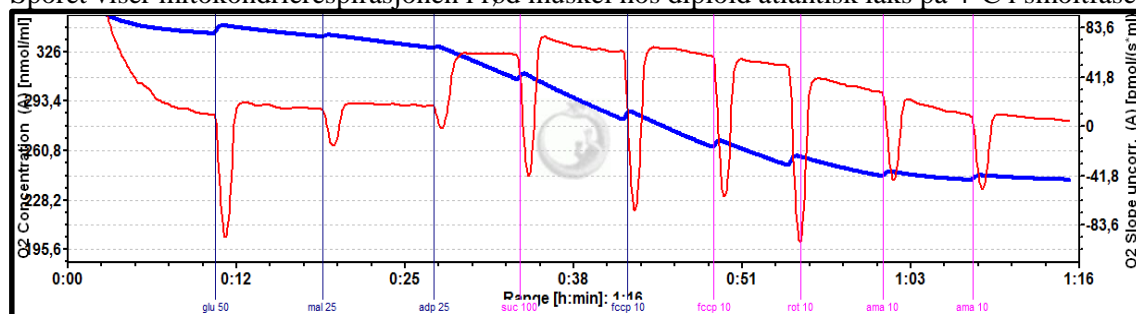
**Tabell 42** P-verdier på ploiditetsforskjeller i rød laksemuskel i ferskvann

Ploiditetsforskjeller, rødmuskel	
Glutamate	0,740
Malate	0,665
ADP	$<0,05$
Succinate	0,239
FCCP	0,121
Rotenone	0,721
RoX	0,265

Statistisk utregnet ved en-veis ANOVA

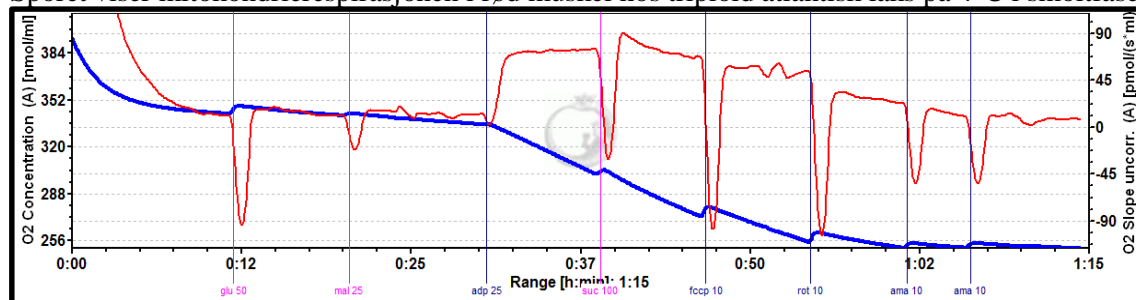
### 5.5.6 Run fra rød muskel hos diploid og triploid laks i ferskvann.

Sporet viser mitokondrierespirasjonen i rød muskel hos diploid atlantisk laks på 4°C i smoltfase.



Run 15: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 9,7mg Glu:1,6 Mal:1,9 ADP:6,3 Suc:6,6 FCCP:5,4 Rot:3,2 Ama:0,5 [Flux/mg innveid vev]

Sporet viser mitokondrierespirasjonen i rød muskel hos triploid atlantisk laks på 4°C i smoltfase.

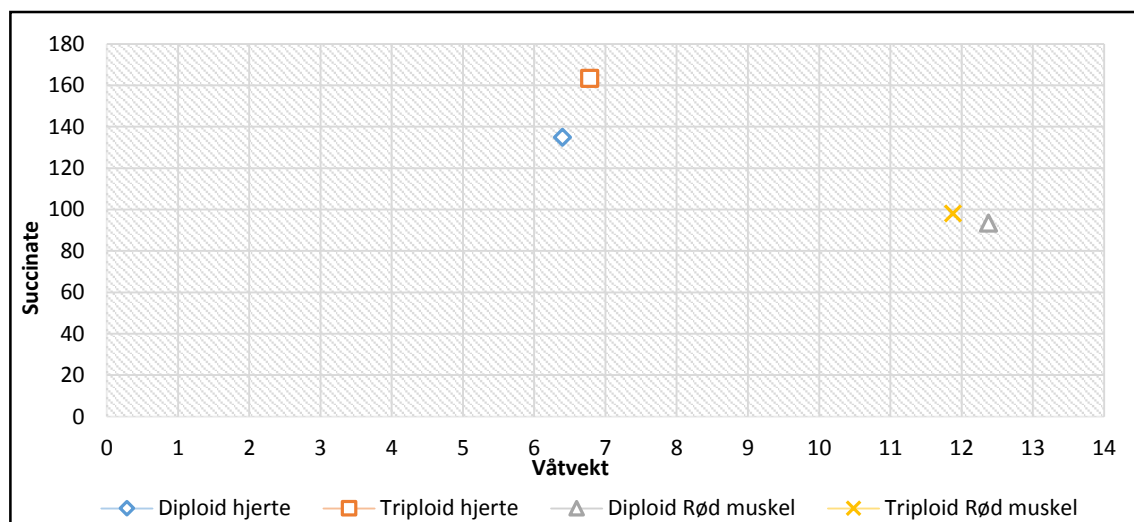


Run 16: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 10,6mg Glu:1 Mal:1,1 ADP:7 Suc:6,4 FCCP:5,4 Rot:2,2 Ama:0,7 [Flux/mg innveid vev]

### 5.5.7 Innveid våtvekt mot succinate respons, hjerte og rød muskel.

Succinate responsen mot innveid våtvekt viser at mitokondriene er intakte selv om det er noe diffus spredning mellom temperaturene og vev. God respons i forhold til innveid våtvekt forteller at analyseresultatene er til å stole på (Diagram 6).

**Diagram 6** Gjennomsnitt innveid våtvekt mot avlest succinate respons i vevet hos hjerte og rød muskel i diploid og triploid atlantisk laks i ferskvann.



Denne fremstillingen kan vise om vevet responderer godt med mange mitokondrier intakt eller om vevet er dårlig/ødelagt.

## 5.6 Sammenligning av Shredder vs. Biops med standardavvik

### 5.6.1 Shredder mot biops på 1,5mg, 3mg, 4,5mg og 6mg innveid vev.

Det er signifikant forskjell mellom Shredder og Biops på 1,5 mg innveid vekt, samt i malate respons på 4,5 mg innveid vekt og RoX respons på 3 mg innveid vekt (Tabell 43).

**Tabell 43** Gjennomsnittlig flux verdi for alle substrater, inhibitorer og avkoblere med metode Shredder og Biops på mg innveid våtvekt med forskjellig mengde analysert prøve.

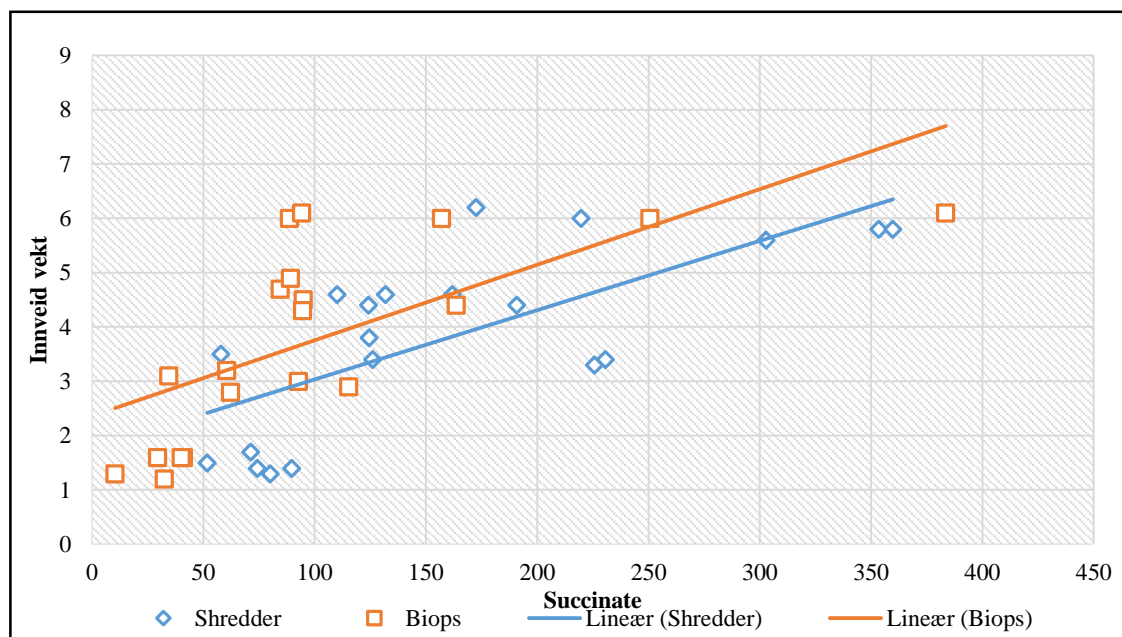
	Innveid våtvekt (mg)	Shredder	Biops	<i>P-verdi</i>
Glutamate	1,5	4,4±0,9a	3,1±1,4a	0,116
	3	3,9±1,1a	3,7±2,2a	0,882
	4,5	2,7±0,7a	2,1±0,3a	0,106
	6	2,5±0,3a	2,3±1,1a	0,739
Malate	1,5	6±1,4a	4,9±1,5a	0,262
	3	4,3±1,3a	6,1±2,5a	0,195
	4,5	3,3±0,5b	4,3±0,6a	<0,05
	6	4±0,7a	4,8±1a	0,175
ADP	1,5	40,7±7,1a	17,3±8,5b	<0,05
	3	35,4±18,2a	22,5±10,3a	0,204
	4,5	26,5±5,3a	20,5±6a	0,132
	6	42,7±15,4a	28,4±19a	0,228
Succinate	1,5	51,1±12,7a	20,8±7,9b	<0,05
	3	44,5±22,9a	24,6±11a	0,117
	4,5	31,9±7,6a	23,3±8a	0,119
	6	48,3±15,3a	32,2±20,3a	0,195
FCCP	1,5	50,3±11a	20,19±9,4b	<0,05
	3	45,2±23,6a	23,70±12,6a	0,111
	4,5	30,6±7,2a	21,4±9,3a	0,119
	6	46,8±14,7a	33,6±22a	0,295
Rotenone	1,5	18±3,2a	9,9±7,2a	0,052
	3	11,8±6a	13±4,3a	0,731
	4,5	10,3±1,6a	11,1±1,8a	0,456
	6	14,6±5,9a	12,7±2,9a	0,529
RoX	1,5	5,8±2,6a	6,4±1,5a	0,684
	3	2,4±0,7b	5,2±0,9a	<0,05
	4,5	1,9±0,7a	2,5±0,5a	0,184
	6	2±5,5b	2,8±0,6a	0,036

Forskjellige små bokstaver i samme rad indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,05$ ) ved en-veis ANOVA.

### 5.6.2 Innveid våtvekt (vev) mot succinate-respons. Shredder og Biops metoder.

Shredder har mindre spredning i datapunkter (lineær) og har nominelt høyere succinate respons enn Biops. Shredder har betydelig bedre respons ved lavere innveid vev enn Biops (Diagram 7).

**Diagram 7** Succinate respons mot innveid vev med Shredder og Biops metode på fire forskjellige vektclasser; 1,5mg – 3mg – 4,5mg – 6mg vev.



God respons i forhold til innveid våtvekt forteller at analyseresultatene er til å stole på og kan gi en indikasjon på hvilken metode som er best.

### 5.6.3 Shredder mot Biops

Det er signifikant forskjell ( $<0,05$ ) i ADP, cyt C, succinate og FCCP respons fordel opparbeidelse av mitokondrielle prøver med shredder mot biops (Tabell 44).

**Tabell 44** Gjennomsnittlig fluxverdi for alle substrater, inhibitorer og avkoblere med metode Shredder og Biops på mg innveid våtvekt uavhengig av mengde innveid vev.

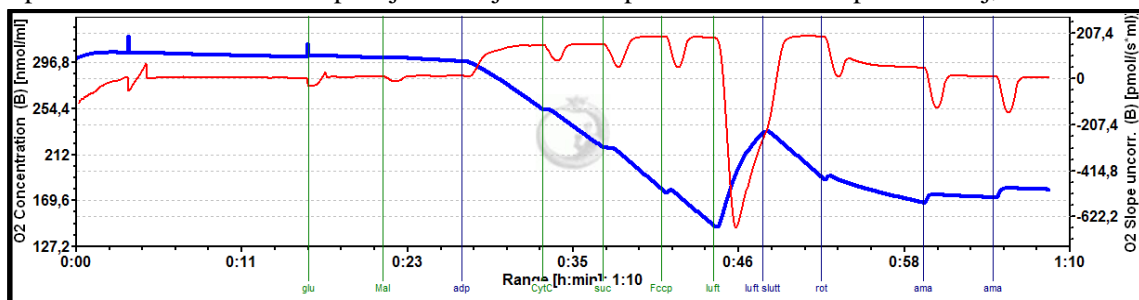
	Shredder	Biops	P-verdi
Glutamate	3,4±1,1a	2,8±1,5a	0,176
Malate	4,4±1,4a	5±1,6a	0,205
ADP	36,3±13,3a	22,2±11,8b	<0,05
CytC	41,2±11a	21,5±8,5b	<0,05
Succinate	44±16,2a	25,2±12,6b	<0,05
FCCP	43,2±16,1a	24,7±14,2b	<0,05
Rotenone	13,6±5,1a	11,7±4,3b	0,194
RoX	3±2,1a	4,2±1,9a	0,060

Forskjellige små bokstaver i samme rad indikerer en betydelig variasjon ( $P < 0,05$ ) ved en-veis ANOVA.



### 5.6.4 Run med Shredder PSI-HRR som permabiliseringsmetode

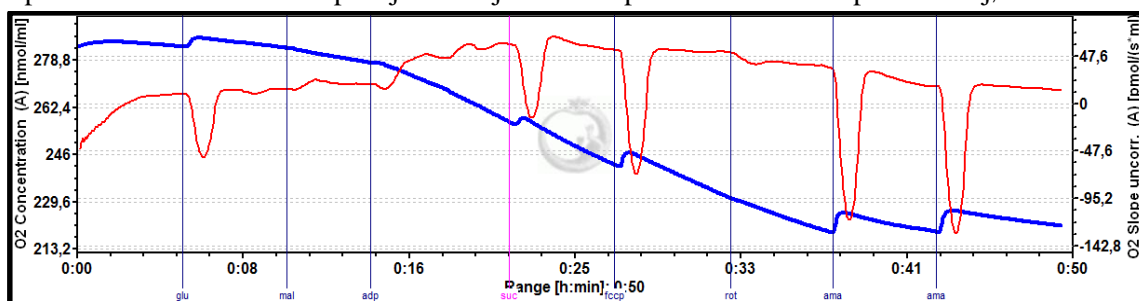
Sporet viser mitokondrierespirasjonen i hjerte hos diploid atlantisk laks på 15°C i sjøvann.



Run 17: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 4,4mg  
Glu:1,95 Mal:2,93 ADP:33,91 CytC:35,36 Suc:43,36 FCCP:42,54 Rot:11,95 Ama:1,66 [Flux/mg innveid vev]

### 5.6.5 Run med Biobs<sup>m</sup>/Saponin som permabiliseringsmetode

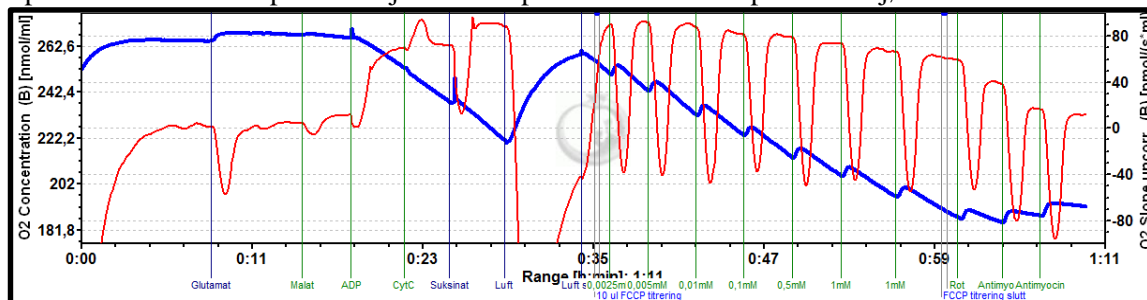
Sporet viser mitokondrierespirasjonen i hjerte hos diploid atlantisk laks på 15°C i sjøvann.



Run 18: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)] Verdier: Våtvekt 3,2mg  
Glu:4,04 Mal:6,15 ADP:16,45 Suc:18,35 FCCP:16,47 Rot:12,2 Ama:4,45 [Flux/mg innveid vev]

### 5.7 Titrering av Carbonyl cyanide p-(trifluoro-methoxy) phenyl-hydrazone

Sporet viser FCCP responsen i hjerte hos diploid atlantisk laks på 15°C i sjøvann.



Run 19: Blå linje markerer oksygenkonsentrasjon [nmol/ml] i kammeret. Rød linje viser flux-verdien i kammeret (Vevets reaksjon på substrat/inhibitor/utkoblere) [pmol(s\*ml)]

Flux-verdiene blir lavere for hver gang det tilsettes mer FCCP noe som kan indikere at kjemikalet har inhiberende effekt ved tilsetning av høye konsentrasjoner i elektrontransportkjeden hos laks [Flux/mg innveid vev] (Tabell 45)

**Tabell 45** Flux ved titrering fra lav til høy konsentrasjon av FCCP

FCCP 10µl 0,0025mM	FCCP 10µl 0,0050mM	FCCP 10µl 0,01mM	FCCP 10µl 0,1mM	FCCP 10µl 0,5mM	FCCP 10µl 1,0mM	FCCP 10µl 1,0mM
30,9	30	27,2	26,5	24,5	22,2	20,1

## 6. Diskusjon

### 6.1 Diploid og triploid laks (generelt)

Lakseprodusenter har siden midten av 2000-tallet og frem til i dag fått tatt del i en formidabel økonomisk opptur som har gjort stat, bedrifter og enkeltpersoner rike på laks i norske fjorder. Produksjonsutviklingen har i samme periode vært enorm. Presset på oppdrettsselskapene om å levere høy produksjonskvalitet og produktkvalitet er stor. Jakten på den perfekte oppdrettslaksen har pågått lenge og ønske om å oppdrette laks med lik kvalitet er stor. Det er av den grunn et paradoks at diskusjonene rundt bruk av triploid laks først og fremst handler om rømmingsproblematikken og ikke hvilken ploiditet som totalt sett er kvalitetsmessig best. Det skal være unødvendig å opplyse om at Norge ikke har monopol på oppdrett. Antageligvis er det ingen eksportører av norsk laks som ønsker at produktkvaliteten skal gå på bekostning av økonomisk kvalitet fordi vi ikke lenger produserer det forbrukeren mener (Rørtveit u.å.) er verdens beste oppdrettslaks.

Forskjellene i kvalitet på diploid kontra triploid laks er som resultatene viser små, men ikke helt uten interesse. Spesielt gjelder dette det genetiske aspektet. Hvordan kan det ha seg at fisk med samme mor og far har såpass stor forskjell i fettdeponering i fiskemuskelen og antageligvis type fett ved å øke med ett sett kromosom i cellen? Et kromosomsett som vi faktisk ikke vet om inngår i fiskens DNA tråd. Det eneste vi vet er at det gjøres en kromosom seleksjon i sammensmeltningsstadiet som har betydning for genetisk variasjon. Uavhengig av dette er jeg overbevist om at antall kromosom i cellen har betydning. En forskningsartikkel nylig publisert i Nature (Smemo et al. 2014) viser at en del av et kromosom som ble liggende tett inntil et annet kromosom «slo på» og uttrykte det andre kromosomet i en spesifikk DNA-sekvens. Hvis det generelt finnes dominante kromosom, vil antall kromosom i laks og en «riktig» avlslinje ha stor betydning for oppdrettsnæringen. En konsekvens av økt mengde kromosom kan være at vi får stor kvalitetsmessig spredning (genetisk variasjon) på den totale biomassen i slaktet triploid laks der det faktisk kan være små forskjeller i avlslinjene.

Det er hevet over enhver tvil at klarsignalet for bruk av steril laks i Troms og Finnmark har et temperaturaspekt med seg. Triploid laks er beskrevet som fordelaktig fremfor diploid laks i et vekstperspektiv i områder med relativt lave sjøtemperaturer i vekstsesong. Forsøket utført i denne oppgaven ga ingen direkte temperaturfordel til

triploid laks, forsøket viser laks på 10°C generelt vokser signifikant bedre enn laks på både 5°C og 15°C uavhengig av ploiditet. Ettersom begge karene på 15°C inneholdt fisk som antatt skulle være større kan man ikke utelukke en inhibering av vekst, basert på at laksen selv ikke kunne justere sin egen metabolske temperatur. Karene med fisk på 15°C sto på hver sin rekke, og gjennomsnittsvekten er sammenfallende lik. Det er med andre ord ikke ploiditetene til dyrene i dette forsøket som har hatt størst betydning for veksten eller således mangel på vekst.

Rømning er som tidligere nevnt en av hovedgrunnene til at triploid laks blir omtalt som redningen for villaksen. Det er uttrykt bekymring for genetisk innkrysning mellom oppdrettet laks og villaks på bakgrunn av miljøhensyn i mange år (McGinnity et al. 2003). Det er lyst tvil om oppdrett er miljømessig bærekraftig og riktig utnyttelse av havet når menneskelig selekterte gener fra oppdrett kan ha mulighet til å krysse seg inn blant villfisk (Piferrer et al. 2009).

Vedtaket for de grønne lisensene i Troms og Finnmark baserer seg tydelig på triploid laks som miljøtiltak. Når departementer i Norge lytter til sterke miljøorganisasjoner, og flere forskningsrapporter viser at triploid laks er fordelaktig å oppdrette nord i Norge, er det kanskje ikke overraskende at vi i denne lisensrunden starter med produksjon av triploid laks i storskala.

I en rømningssituasjon vil triploid laks isolert sett kun utgjøre en eneste forskjell fra dagens oppdrett av laksefisk, innkrysning. Den vil ikke hindre smittepress fra oppdrettsfisk til villfisk, heller ikke endre lusebilde i dagens næring. Selv om returandelen av triploid laks er lavere enn diploide individ (Cotter et al. 2000) kan rømt triploid hanlaks teoretisk utkonkurrere den diploide hanlaksen i elvene slik de gjør i kar, da med 0 avkom som resultat (Fjellidal et al. 2014). Det er viktig å presisere at triploide lakseindivid ikke vokser raskere sammenlignet med diploide laks i naturen (Cotter et al. 2000) noe som er hevdet på bakgrunn av steriliteten.

Følelsesbasert fiskevelferd er omdiskutert (Rose 2007; Sneddon 2009), kjeve og skjelettdeformasjoner som har vært et utstrakt problem i triploid laks (Fjellidal & Hansen 2010; Jungalwalla 1991; Leclercq et al. 2011; Lijalad & Powell 2009; McGeachy et al. 1996; O'Flynn et al. 1997; Powell et al. 2009; Sadler et al. 2001; Sutterlin et al. 1987) og kan pr. definisjon gå under denne kategorien. Triploid fisk har også hatt flere andre mindre velferdsproblemer (Fraser et al. 2013; Sadler et al. 2001). Det ser nå ut som

løsningsen på deformasjoner nærmer seg (Fraser et al. 2015; Sambraus et al. 2014). Funksjonsbasert dyrevelferd kan strengt tatt ikke behandles ulikt fra fjøs til hav. Det bør juridisk ikke være mulig, og på bakgrunn av dette bør diploid og triploid laks sammenlignes likt i et dyrevelferdsaspekt.

## 6.2 Rigor-mortis

Alle funksjonene i *rigor mortis* er enda ikke forklart tilstrekkelig (Lynum & Rustad 2005 s.83), verken alle funksjoner i selve dødsstivheten, eller hva som utløser prosessen igjen, og i hvilken grad proteasene Cathepsin L & B, calpain og collagenaser er med på nedbrytingen av muskelstrukturene (Lynum & Rustad 2005 s.83; Marsh 1977; Østvik 1991 s.19-21).

*Rigor-mortis* resultatene i denne oppgaven er fremvist i tre ulike figurer som viser forløpet (5,2 – 5,2,2) figurene er særegne på sine spesielle måter som forklarer forskjellene bedre enn kun ved bruk av en figur. Derfor ble det av den grunn valgt å ha med alle tre fremstillingene.

Det er en generell «enighet» om at stivheten av selve dødsstivheten skyldes reaksjonen mellom aktin og myosin, og ettersom disse bindingene ikke kan løses opp igjen på grunn av mangel på ATP forblir de i låst posisjon (Bendall 1951). Det finnes også flere andre hypoteser på *rigor-mortis* uten at de er vitenskapelig anerkjent.

Et annet moment rundt *rigor-mortis* utviklingen hos fisk er kvalitetsaspektet. Oppdrettsnæringen ser en fordel med å ha forsiktig og lang rigorutvikling. *Rigor* er et av de mest fremtredende og sikre kvalitetstegnene laks har. Primærkundene og sluttforbrukerne setter pris på fisk i *rigor* ettersom de da kan være sikre på å få en fersk kvalitetsvare. Forbrukerens holdning til kvalitet på fersk fisk vil med sikkerhet ikke avta med tiden.

Resultatet av Cuttings metode i denne oppgaven tyder på at *rigor mortis* utviklingen inn i dødsstivheten er temperaturavhengig. Reaksjonshastigheten er stigende med temperatur og signifikant forskjellig mellom gruppene ved generell lineær modell som statistisk modell. Andre studier har også bevist temperaturens innvirkning på *rigor mortis* momentet i beinfisk (Arimoto et al. 1991; Bito et al. 1983; Sigholt et al. 1997). Hvis man hadde holdt fisken ved samme temperatur som den metabolske temperaturen til fiskene gjennom samtlige 60 timer, og ikke lagt fisken på is ville man antagelig ha

observert samme reaksjonsmønster ut av *rigor mortis*. Denne antagelsen baserer seg på at alle autolytiske reaksjoner er like uavhengig av fisk og ploiditet.

Triploid laks har en lavere *rigor*-verdi sammenlignet med diploid laks. Det er signifikant forskjeller på samtlige temperatur-regimer ( $P < 0,001$ ).

Hvilke prosesser skjer inne i cellene kan påvirke dødsstivheten?

Etter døden vil katabolske reaksjoner dominere. Mitokondriene går fra aerob respirasjon til anaerob respirasjon med påfølgende produksjon av 2 laktat per pyruvat molekyl. Tidligere studier har vist at *post mortem* reaksjoner øker antall molekyler innenfor muskelcellene (Slinde u.å). Dette forklares med glykogen  $\rightarrow$  2 melkesyre, samt en rekke andre reaksjoner som også gir opphav til små molekyler. Økningen av molekyler i cellene vil påvirke det osmotiske trykket ( $\pi = cRT$ ) og vann strømmer inn for å utligne trykket. Dette forklarer hvorfor endringene i ATP, Warner Bratzler, spenning og sammentrekninger ikke følger direkte målinger av muskelstivheten av *rigor mortis* (Slinde u.å). Dominoeffekten av dette får cellenes semipermeable membran til å slippe vann inn, men ikke ut og cellen blir stiv. Denne teorien ble første gang diskutert i 2004 da morfologiske studier viste endringer i cellestørrelse før, i og etter *rigor mortis* (Balevik 2004).

Med en slik teori er resultatsammenligningen mellom en diploid og triploid celle i denne oppgaven en meget god modell. En celle som er større vil bruke lengre tid på å utligne det osmotiske trykket og fylle cellene med væske. En funksjon av årsak/virkning kommer godt frem i denne studien. Ettersom triploid celle er ca. 30% større kan man forklare langsommere og mykere *rigor mortis* forløp hos triploid laks (fig. 32). Forskjellen i *rigor*-forløp hos de ulike ploiditetene kan mulig være enda større jamfør laktatmålingene i punkt 5.2.3.

Teorien forklarer også lakseslakterienes problem med raskt og hardt *rigor*-forløp i sommerhalvåret der det er høyere sjøtemperaturer og av den grunn vil diffusjonshastigheten til muskulært vann inn i cellene øke. Ikke minst vil økt anaerob aktivitet i laks knyttet opp mot stress før slaktning gi økt molekylantall allerede før døden, og av den grunn vil fisken få kortere *pre-rigor* forløp uavhengig av ploiditet.

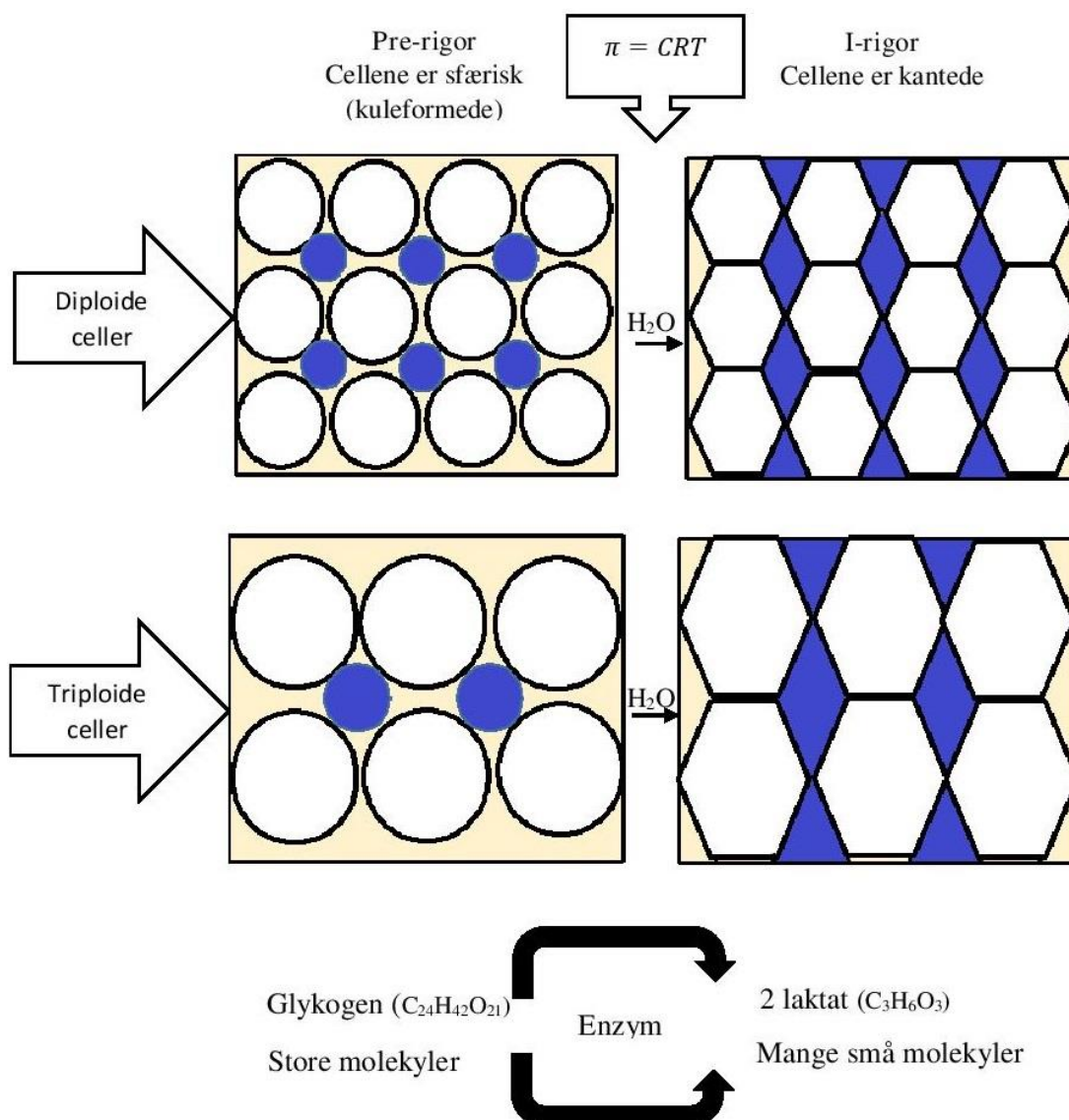
Temperaturstyrte autolytiske reaksjoner vil innen rimelig tid begynne å bryte ned cellevegger som således vil gi mindre oppbunnet vann. Muskelkontraksjonene som er

forårsaket av aktomyosin forårsaker antagelig ytterligere press på cellene. Oppdagelsen i dette forsøket med muskelsammentrekningene i filetene korrelerte med drypptapet gir klare indikasjoner på økende press vil kunne føre til at cellene sprekke lettere. En forutsetning for dette er at den framsatte teorien stemmer, da antageligvis mindre plass mellom muskelsegmentene kan presse ubundet vann ut av fileten. Cellemembranenes lipidsammensetning kan også ha betydning for fleksibiliteten til cellene og hvor raskt de sprekker.

Av den grunn vil triploid fisk teoretisk «renne» raskere ut av *rigor* sammenlignet med diploid fisk ved samme temperatur. Igjen en faktor av årsak/virkning.

Når dette er sagt finnes det lite relevante data fra forskning som tar for seg kalsium frigiving, enzym inaktivering, ATP produksjon og ATP reserver sammen med studier på *rigor-mortis*. I tillegg kan andre stoffskifteprodukter (metabolitter) som ikke er analysert i denne oppgaven kanskje forklare resultatforskjellene i *rigor*. De mitokondrielle analysene viser ingen signifikante forskjeller (tabell 38) i ATP-responsen mellom diploid og triploid laks i sjøfasen fra rød muskel. Dette tyder på at evnen til å produsere ATP er lik mellom ploiditetene noe som taler for den osmoserelaterte *rigor* teorien.

**Figur 32** viser enkelt (Balevik 2004) sine morfologiske observasjoner i diploid laks, antagelsen av hvordan triploide celler oppfører seg i *rigor* og den osmose relaterte *rigor*-teorien som foreligger.



*Figur 32: Det er antatt at triploide celler bruker lengere tid på å fylles opp med vann da de er større sammenlignet med diploide celler. Presset som triploide celler skaper antas også å være større jamfør korrelasjonen mellom muskelsammentrekningsdata og drypptap i denne oppgaven. Når cellene til slutt sprekker vil væske i triploide celler antageligvis renne raskere ut da mengde væske i cellene er større. (Figur: egen)*

Det er registrert nominelt høyere andel drypptap, men tilnærmet lik tørrstoffandel hos triploid laks kontra diploid i denne oppgaven (tabell 26). Dette er en tendens som er med på å underbygge celledoer. Når disse resultatene blir lagt til grunn og ettersom det anslagsvis er 10% færre muskelfibre per enhet tverrsnittsareal i triploide enn i diploide fisk (Suresh & Sheehan 1998) kan det tyde på en mulig funksjon av væskeslipp og celledoer.



### 6.3 Kvalitetsforskjeller

En sammenfatning av resultatene viser først og fremst kvalitetsmessige likheter mellom diploid og triploid laks. Videre kan man ta ut noen enkelte kvalitetsparametere som gir indikasjoner på små ploide forskjeller. Analyser med ploide tendenser følger temperaturskalaen godt. Høyere verdier samsvarer med antatt temperaturfunksjon.

Fettdeponeringen hos triploid laks ser ut til å være nominelt høyere enn hos diploid laks uavhengig av temperatur. Etersom oppgaven har tatt for seg energimetabolismen fra de samme fiskegruppene som kvalitetsanalysene, kan teorien om generelt dårligere metabolisme hos triploid laks utelukkes. Dette kan tyde på at det ikke er like stort behov for fett i fôret til triploid laks da både diploid og triploid fisk i forsøket har fått samme mengde energi. Dette kan i beste fall bety noe økonomisk for fôrselskap og røkter. Mitokondrieanalysen viste signifikant større restoksygenverdier totalt sett hos diploid laks noe som kan bety at diploid laks deponerer mer flerumettete fettsyrer sammenlignet med triploid laks.

Et annet moment når det kommer til fettinnholdet i laks, er betydningen det har for pigmentdeponeringen i laksemuskelen (Bjerkeng, B et al. 1997; Bjerkeng, B et al. 1999; Bjerkeng, Bjørn et al. 1999; Clark et al. 2000; Einen & Roem 1997; Nickell & Bromage 1998). Mengde fett i tarmen hos anadrom fisker påvirker opptaket av astaxanthin i tarmcellene. Etersom det er påvist en lineær økning i fordøyeligheten av astaxanthin med fettinnholdet i fôret (Choubert et al. 1991; Torrissen et al. 1990), og all fisken i dette forsøket har fått fôr fra samme batch settes det spørsmålstejn med triploid laks sin opptaksgrense for astaxanthin. Økt fettprosent hos triploider og likt astaxanthin innhold sammenlignet med diploider samsvarer ikke med tidligere analyseresultater. I tidligere forskning har triploid ørret hatt bedre muskelpigment enn diploid ørret (Choubert & Blanc 1989), noe som heller ikke samsvarer med dette forsøkets resultater. En mulig forklaring kan være at triploid laks har hurtigere fettopptak fra tarmen enn diploid laks og av den grunn har færre miceller i tarmen. Færre fettdråper i tarmen vil på den måten få konsekvenser for opptaket av karotenoider. Fargemålingene samsvarer med astaxanthin resultatene. Verdiene er like mellom temperatur og ploiditet.

Triploid laks har signifikant høyere ( $<0,001$ ) enzymverdier av collagenaser enn diploid laks. Etersom collagenaser er med på nedbrytning av peptidbindingene i muskelfibrene (collagen) kan dette indikere dårligere muskelkvalitet *post mortem* hos laksefisk med

triploid status. En sammenheng mellom økt fettvev og høyere collagenaseverdier kan ikke utelukkes. Videre kan dette ha påvirkning for holdbarhet og forbrukerens opplevelse av kvalitet knyttet til laksefilet. Tiden det tar fra slakteriet til forbruker vil ha betydning. Spesielt negativt er dette for eksportdelen av lakseindustrien. Ettersom enzymverdien av collagenase er høyere hos triploid laks enn hos diploid laks kan det spekuleres i om dette skyldes endret omsetningshastighet av collagenmolekyl i cellene. Dette kan være en direkte konsekvens og utfordring som større cellevolum kan utgjøre på kvaliteten.

Muskelsammentrekning korrelerer med drypptap, vi kan sette kraften av muskelsammentrekningene opp mot antagelsen om cellens enzymatiske kollaps. Selv om tørrstoffandelen varierer litt i forhold til temperatur, er det ikke forskjell i ploiditet. Ettersom triploide celler er færre i rent antall, men større i volum antas det en økning i løst vann gjennom lagringsforløpet hos triploid laks. Resultatene underbygger en mulighet for større drypptap korrelerer med veksthastigheten laksen har, og viser at antatt økt størrelse på muskelfibre kan være medvirkende til det nominelt høyere væskeslippet hos triploid laks. Dette kan også relateres til drypp hos atlantisk laks uavhengig av ploiditet i og rett etter vekstsesong (Mørkøre et al. 2010).

#### 6.4 Mitokondrier/respirasjon

Karakteriseringen av respirasjonen er isolert sett interessant for diploid og triploid atlantisk laks alene, men ettersom fisken i oppgaven har samme far og mor, er det også interessant å se om triploidisering gir økt eller nedsatt respirasjon. Det er viktig å poengtere at alle respirasjonsvurderinger i denne oppgaven baserer seg på innveid våtvekt.

Ettersom cellene er større, vil det være et volum potensiale for økt antall mitokondrier i triploid laks. Det er ingen indikasjon av økt mitokondrietetthet i resultatene, vi kan heller ikke utelukke dette helt. Det er antagelig flere mitokondrielle funksjoner som enda ikke er oppdaget. Ettersom flere marine arter kan endre mitokondrievolum og tetthet gjør denne oppgavens resultater svært spennende for videre forskning (Archer & Johnston 1991; Egginton & Sidell 1989; Tyler & Sidell 1984). Analysene viser økende standardavvik spesielt på hjerte, men også på rød muskel med økende metabolsk temperatur i sjøvann. Dette er igjen med på å styrke mistanken om fiskens mulighet til justering av mitokondriemetabolismen er reell på bakgrunn av årstid og merdens

oppholdssted gjennom årssyklusen. Forsøksdyrenes manglende mulighet til å justere kroppstemperaturen slik som de kan i dagens oppdrettsmerder er med på å sikre bedre mitokondrielt analysegrunnlag. Hvis denne teorien stemmer vil cellestørrelse være ubetydelig i forhold til laksens ideelle temperaturintervall. Dette tyder på at mitokondriene naturlig nok er med på å gi optimal vekst hos laks med en sjøvannstemperatur mellom 10°C-14°C.

Det er teoretisk umulig at flux responsen fra FCCP skal være lavere enn responsen etter tilsetning av succinate jamfør kjørt protokoll. Akkurat dette var resultatet i alle kjørte vev som er analysert. Både (Heidler J 2014 s.7, tabell 4.2, FCCP) og (Gnaiger 2012 s.56, tabell A2.1) henviser til bruk av 1mM sterk FCCP-løsning. For å finne en eventuell feilkilde ble mediet laget på nytt og testet på musehjerte mot laksehjerte. Responsen i musehjerte indikerte at løsningen var god, men ga fortsatt ingen respons i laks. Titrering av fortynnede løsninger av FCCP (Run 19) med start på 10µl 0,0025mM til 10µl 1mM viste at tilsetning av FCCP i laksevev er lik succinate responsen ved god oksygentilgang i kammeret. Lavere oksygenkonsentrasjon med ytterligere tilsetning av FCCP ga inhibering (run 19, tabell 45). En O<sub>2</sub> konsentrasjon over 200 nmol/ml ved hver tilsetning utelukker hypoksi i analysert vev. Dette tyder på at elektrontransportkjeden hos laks kjører på fullt når kompleksene danner normalt antall H<sup>+</sup> ioner i kjeden. Mitokondriene ser ut til å være utrolig godt koblet. Det har ikke vært mulig å få avkoblet mitokondriene i laksen som er analysert i denne oppgaven.

Akkurat avkoblingen, og reaksjonsverdiene fra vevet Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenyl-hydrazone har gitt i oxyografen har skapt mye hodebry og ekstra arbeid. Jeg kan komme på tre årsaker eller forklaringer til dette utrolige, og ikke minst fascinerende funnet:

1. Energi effektiviteten til atlantisk laks er mye bedre enn i andre dyr?
2. Gode gener og godt arbeid med avl på atlantisk laks har gitt lav førfaktor og økt energiutnyttelsen til det maksimale på kun 40 år /11 generasjoner.
3. Utkobling av ETS i analysene av mitokondrierespirasjon har vært mislykket med FCCP. Analysen har en følgefeil som ikke er oppdaget eller unøyaktighet under

førsøket kan være medvirkende årsak, eller at FCCP ikke fungerer som en avkobler i laksens ATP-synthase.

Energieffektiviteten hos dyr kan trolig kobles opp mot overlevelse fra ett evolusjonistisk ståsted og dyrets størrelse. Det er utført flere energieffektive forsøk på landdyr og fugler (Nagy 1987; Rolfe & Brown 1997) og fisk (Azevedo et al. 1998; Mann 1965; Winfree & Stickney 1981) uten at denne teorien er drøftet nevneverdig.

Dårlig tilgang på mat gjennom millioner av år kan ha gitt laks en generelt god energiutnyttelse som den gjennom endring av gen og evolusjonært fleksible uttrykk har valgt å ta med i arvematerialet (genotypisk uttrykk). Disse sekvensene i avlsmaterialet kan ytterligere ha blitt uttrykt gjennom norsk akvakulturs avlsstrategi på 1970 og 1980-tallet. Det er ikke rent tilfeldig at atlantisk laks er ca. 20 millioner år gammel.

Det kan faktisk være så enkelt at andre avkoblere vil være bedre for mitokondrielle analyser av laksefisk enn det FCCP har vist seg å være. ETS skal være mulig å avkoble, og her må andre avkoblere testes.

Fluxlinjen ved tilsetning av rotenone virker å være gjennomgående brattere og resultatet varierer når succinate responsen subtraheres på ADP-responsen i forhold til flux verdien i rotenone responsen. Det er nok betydelig nedsatt oksidativ kapasitet hos laks når complex I er satt ut av spill. Når complex I er satt ut av spill vil forbruket av gjenværende succinate øke for å reparere det intracellulære vevet som er ødelagt samtidig som ATP produksjonen som complex II danner ivaretas. Dette forklarer varierende succinate respons i målingene og mindre stabil flux.

Jeg mener alle de drøftede funnene i mitokondrierespirasjonen kan ha betydning for videre oppdrett og forskning. Herunder kan det nevnes den direkte påvirkningen mitokondriene har på katabolske prosesser, hjerteproblematikk, fôrproblematikk, sykdom og forurensing.

Respiratorisk restoksygen i diploid laks var signifikant høyere ( $<0,05$ ) enn hos triploid laks uavhengig av temperatur (tabell 34). Målinger av respiratorisk restoksygen er svært lite diskutert i relevant litteratur enda, og forskning på respiratorisk harskning har kommet svært kort. Respiratorisk harskning kan kort forklart ha med hvorfor og

hvordan vi viser aldringstegn. Nøkkelen til evig skjønnhet *ante-mortem* ligger antagelig her.

Målingene av restoksygen (tabell 34) må ses i sammenheng med målingene av totalt mengde fett i diploid og triploid laks. Vevets bruk av respiratorisk restoksygen skyldes reaksjon av dobbeltbindingene i forskjellige forbindelser for eksempel i flerumettede fettsyrer (aldehyd til syrer). Dette vil da si at triploid laks deponerer og/eller danner mer mettede fettsyrer fra kosten, antagelige palmitinsyre ( $C_{16}H_{32}O_2$ ) som er den mettede fettsyren som det er størst andel av i laks. Fettsyresammensetningen som laksen i oppdrett tar opp via fôret påvirker fosfolipidene og de metabolske prosessene er dokumentert tidligere (Ruyter et al. 2000a; Ruyter et al. 2000b), men forskjellen i deponering fra diploid til triploid laks er aldri dokumentert før. Resultatet av dette vil ikke ha noe å si for sluttforbrukerens inntak av mettet fett fra laks, men kan ha betydning for fiskehelsen til oppdrettslaks i fremtiden.

Forsøk med overdrevet store mengder  $\omega$ -3 fettsyrer i fiskefôret ga dårlig  $\omega$ -3 styring (Erdal et al. 1991; Waagbø, Rune et al. 1993), og deponeringen av  $\omega$ -3 er bedre hos fisk som fikk rikelig  $\omega$ -6 i kosten (Seierstad et al. 2005). Det kan se ut som laksen prøver å tilnærme seg «standard» fettsyresammensetning på egen hånd og at laksens ønskede mengde  $\omega$ -3 mot  $\omega$ -6 relatert til immunforsvar og fluiditet i cellemembranene er temperaturavhengig (Salte et al. 1988; Waagbø, R et al. 1993).

Uavhengig av dette er det hevet over enhver tvil at høyt innhold av fett i fôret og fiskens begrensede mosjon i merdene kan føre til dårlig reproduksjon av mitokondrier, økt mitokondriedød og herav også dårligere respirasjon.

Om dette kan relateres til dårligere vekst hos laksegruppene på 15°C i vårt forsøk er ikke verifisert. Uansett kan ikke laktatmålinger, ei heller andre mulig målbare påvirkninger utelukke dette. Forskjellige fettsyrer kan være med på å forandre mitokondriemembranpotensialet (dos Santos et al. 2013), noe som er svært interessant i forhold til dagens fettsyresammensetning i laksefôr. Det bør forskes mer på riktig balansering av fettsyresammensetning i IMM hos fisk.

Synlige og smaksmessige modifikasjoner i lipid-råstoffet til laksefôr har i for lang tid blitt unnskyldt med liten tilgang på fiskeolje og mel. I tillegg har prisaspektet på oljer rundt ekvatorial området kontra marine oljer har gjort det fordelaktig for leverandørene

å øke andel planteoljer i fôret uten å se helheten til individet helt ned til mitokondrienivå. Her kan fiskeindustrien ha tatt en enkel snarvei for ytterligere vekst som snart kan vise seg å bli en gedigen omvei. Fytosteroler fra planteoljer har nå nylig også vist seg å ha negativ effekt på livsviktige organer (fettlever) og generell kvalitet på laksen (Larsson et al. 2012; Liland et al. 2013; Mørkøre 2012).

Økt sykdomsbilde og dårligere immunforsvar hos oppdrettsfisk kan relateres til byggesteinene fisken får via fôret (Waagbø, R et al. 1993) som igjen påvirker sluttforbrukers helse (Seierstad et al. 2005). Dagens oppdrettsnæring sliter mer flere sykdommer som fører til høyere dødelighet i merdene og ikke minst mindre fortjeneste for oppdrettsselskapene.

«Hjertesprekk» eller bedre kjent som Cardiomyopatisyndrom (CMS) er en slik sykdom. Det er identifisert et virus (Finstad et al. 2014; Haugland et al. 2011) som forårsaker sykdommen (Rodger et al. 2013), men det er også gjort patologiske funn som indikerer at sykdommen kan være kronisk og utvikler seg i vekstperioden (Kongtorp 2006). Disse observasjonene er svært spennende i forhold til min antagelse om at andelen sykdommer i akvakulturnæringen er mer mitokondrielt styrt enn mange andre vil mene. Jeg vil påstå at CMS kan være en konsekvens av feil fettsyresammensetning i cellemembranene som gjør seg gjeldende ved fiskens naturlige temperaturstyrte endringer i cellevolum til laks. De kan rett og slett ha blitt for stive og gjøre at viruset fungerer som en katalysator. At hoveddelen av dødeligheten skjer ved temperaturendringsperioder og at oftest stor laks blir rammet, styrker mistanken.

På bakgrunn av triploid laks sin mangel på seksuell modning er det teoretisk forventet at steril fisk har større vekstrate, da energiforbruket som egentlig er beregnet på gonadal utvikling i stedet kan gå til vekst (Tiwary et al. 2004). ADP-responsen i triploid fisk viser høyere energipotensial sammenlignet med diploid ( $P < 0,05$ ) i ferskvannsfase, mens energiforbruket ikke var betydelig forskjellig i sjøvannsfasen. En overhengende teori forteller oss at diploid fisk vil vokse mer i vår/sommer halvåret enn triploid laks da vekstspurten for modning naturlig oppstår (Cotter et al. 2002). Basert på respirasjonsanalyser og med tanke på slaktetidspunktet i oppgaven er denne teorien noe svekket. Det er ikke statistisk signifikant forskjell i størrelse mellom diploid og triploid slaktefisk, hverken i dette forsøket ei heller i mange andre forsøk (Benfey & Sutterlin 1984a; Cotter et al. 2002; McGeachy et al. 1996). Anadrom triploid fisk vokser

dårligere i sjøvannfasen enn diploide (Galbreath, Peter F & Thorgaard, Gary H 1997; McGeachy et al. 1996). Selv om det ikke ble statistisk målt, ble det under uttaket i ferskvann observert at triploid smolt var større enn diploid smolt, og dette stemmer godt med andres observasjoner (Galbreath & Thorgaard 1995; Galbreath, P. F. & Thorgaard, G. H. 1997).

Reduksjonen av aerob celleånding med påfølgende mindre appetitt og lavere vekstrate hos triploid fisk er godt dokumentert, men da over denne oppgavens høyeste sjøtemperatur (Bernier et al. 2004; Hansen et al. 2015; Ojolick et al. 1995; Verhille 2013). Triploid fisk har trolig behov for høyere O<sub>2</sub> konsentrasjoner i varmt vann (Atkins & Benfey 2008) da bæreevnen antagelig er redusert (Bernier et al. 2004; Graham et al. 1985) noe som ikke er bevist i denne oppgaven.

Det er ingenting som tyder på at den metabolske raten er påvirket av ploiditet.

#### 6.4.1 Vevsprepareringsmetoder Shredder mot Biops<sup>m</sup>/saponin

Shredder metoden er helt klart en enklere metode enn mekanisk separering av fiberbunter i biopsi med saponin fordi metoden er både tidsmessig raskere å utføre og det trengs ingen ytterligere kjemikalier for å gjøre mitokondriene tilgjengelige for avlesning.

Dette er en av flere perspektiver som har satt ramme for metodetestingen. En enklere og ikke minst bedre metode for å permabilisere mitokondrier vil trolig være stimulerende for å økt forskning knyttet opp mot mitokondrielle sykdommer og mitokondriell forskning knyttet til genetikk.

Det er svært få publiserte artikler med bruk av Shredder, enda færre sammenligninger av prepareringsmetode. Studier på menneskelig skjelettmuskulatur viser at Shredder er fordelaktig. Shredder permabilisering ga økt utslag på maksimal respiratoriske kapasitet (Larsen et al. 2014). I ørret hjerte og lever ble det konkludert med at mekanisk separering og permabilisering av vev var to like gode metoder (Velasco et al. 2012).

Resultatmessig er det en tydelig nominelt høyere andel respiratorisk restoksygen i vevet ved Biops preparering enn Shredder. Membranene i fisk har en stor andel polymettet fett som vil gjøre utslag på respiratorisk restoksygen. Dette kan tyde på at Shredder er en mer skånsom metode fordi den kun bryter ned cellemembranene mens Biops<sup>m</sup>/Saponin bryter ned alle membraner.

Responsen i vevet er signifikant bedre med prepareringsmetoden Shredder på (ADP, succinate og FCCP-respons ( $>0,001$ ) (tabell 44) samlet sett. En direkte årsak antas å være tidsaspektet fra fisken blir dekapitert til vevet er klart for analyse i Oxyografen. Bruk av kjemikalier for å gjøre mitokondriene tilgjengelige kan gi store feilmarginer på hvor mye vev som faktisk er tilgjengelig ved analysering. Metodene skiller seg også ut på hvor skånsomt opparbeidelsen av analysevevet er. Det er tydelig at mengde vev har betydning da mindre milligram vev har bedre succinaterespons med Shredder sammenlignet med Biops. Spesielt tydelig er dette ved 1,5mg innveid vev der det er signifikant forskjell i mitokondriell respons (tabell 43).

Shredder er produktutviklet for bruk ved liten vevsmengde, og det er godt dokumentert i denne oppgaven at prepareringsutstyret fungerer godt på svært små mengder vev fra laks. Det er ingenting som tilsier at Biops<sup>m</sup>/saponin er å foretrekke fremfor Shredder. I dette ligger det helse, miljø og sikkerhet aspekt, samt effektivitet og kvalitative resultater til grunn for vurderingen. Shredderutstyret bør likevel kontinuerlig videreutvikles da flere komponenter har forbedringspotensialet.

#### 6.4.2 Totalt innveid protein (Proteinanalyse)

Innveid protein er essensielt å få analysert når det gjelder å stadfeste hvor mye protein som ga aktivitet i vevet. ETS er i alle mitokondrier bygd opp på fire store proteinkomplekser og proteininnholdet i mitokondrieanalyser kan gi svar på hvor god aktivitet det er totalt sett i muskelvevet i forhold til vevets reaksjon i Oxyografen.

Det var på forhånd antatt at vevet som blir til en klump i oxyografen var vanskelig å løse. Test forsøk og gjentatte forsøk på vevsmaterialet som hadde blitt kjørt i oxyografen var nyttesløse. Det ble forsøkt å løse vevsklumpen i den resterende 2ml væsken ved oppvarming til kroppstemperatur med påfølgende sentrifugering. Med 1M lutløsning, 3M lutløsning, 5M lutløsning og sentrifugering. Alle målingene ga varierende verdier og matematisk ukorrekte resultater med modifisert Lowry som metode.

Selv om det ble satt fokus på å få med seg alt gjenværende væske i kammerne fra Oxyografen og vevsklumpen, ble med ned i plastrørene hver gang kan gjennomgående unøyaktighet i pipetteringen og et stort antall pipetteringer være hovedgrunnen til de dårlige målingene, uten at dette er verifisert. Ettersom innveid protein ikke kunne analyseres, ble det valgt å dele flux på innveid vev og vurdere succinate responsen opp



mot mengde innveid vev i resultatene. Dette indikerer om såkalte «kjøringer» er gode i forhold til avlest respons i DataLab, men selvfølgelig er det en større feilmargin med slike målinger enn når flux blir delt på analysert protein. Dette kommer tydelig frem i diagram 5 og 6, succinate responsen følger ikke stigende metabolsk temperatur. Det ser ut som om diagrammene viser maksimal succinate respons i vevene på den bestemte metabolske temperaturen i laks da temperaturene ligger som tett cluster.

### 6.5 Avsluttende totalvurdering

Ut i fra det som har kommet frem i disse forsøkene, vil jeg si at det hadde vært svært interessant å studere nærmere den osmoseregulerende *rigor-mortis* teorien. Det var uventet at ploiditet kan ha noe å si for *rigor* forløpet. Det er mange statistiske modeller som kan benyttes i analyse av *rigor* forløp, som igjen kan gi forskjellige resultater. Jeg har valgt generell lineær modell. I tillegg viser TxP (tabell 25) intraksjonsledd (produkt av to ulike variabler) ingen signifikans. Interaksjonsleddet vil kunne ta opp i seg ikke linearitet. Basert på det faktum av at jeg mener det er en årsak/virkning ved at *rigor*-indeksen i 3 av 3 tilfeller er høyere hos diploid kontra triploid laks, og at det i tillegg fra før eksisterer en teori om *rigor-mortis* som samsvarer med oppgavens resultater mener jeg de kausale relasjonene i *rigor* bør gå foran store statistiske utredninger.

Etter min mening er mitokondriedelen av oppgaven det som har fasinert mest. Det er bare så synd innveid proteinmengde ikke var mulig å få analysert.

Det faktum av at FCCP ikke fungerer som avkobler hos mitokondrier i laks er spennende, og noe jeg virkelig skulle ønske jeg kunnet forsket videre på. Det bør forskes nærmere på om det er andre avkoblere som fungerer eller om mitokondriene faktisk er så godt koblet som mine resultater viser.

ADP responsen til triploid atlantisk laks i ferskvann ga flere spørsmål enn svar i denne oppgaven, mye på grunn av oppgavens omfang. Ferskvannsfasen er helt klart en vekstfase som kan effektiviseres ytterligere ved hjelp av mitokondriell forskning og gi triploid laks et vekstforsprang fremfor diploid atlantisk laks.

Når det gjelder sammenligning av diploid mot triploid atlantisk laks, kan jeg ikke med resultatene som grunnlag hverken se store fordeler eller ulemper med bruk av triploid laks som supplement eller fullverdig oppdrettsfisk kontra diploid fisk. Spesielt på lokaliteter med en snitt temperatur rundt 10°C på årsbasis.

Det vil bli spennende å følge med næringen fremover. Vil triploid laks kunne bli brukt til å "fiske" inn lisenser for oppdrettsselskapene? Eller vil den sterile laksen også bli benyttet der rammevilkårene er formulert annerledes, og der det ikke er økonomisk lønnsomt å velge triploid fremfor diploid atlantisk laks.

## 7. Konklusjon

### 7.1 Rigor-mortis

*Rigor-mortis* analysene som er utført i denne oppgaven sammen med tidligere utførte histologimålinger og teorien som er basert på ATP-mangel og nedsatt muskelfiberavslapping, viser tydelig at den anaerobe respirasjonen i cellene etter døden starter to parallelle og uavhengige reaksjoner. Den irreversible muskelsammentrekningen som skjer ved mangel på ATP mellom aktin og myosin kan ikke forklare *rigor-mortis* fullt ut. Derimot kan molekylær oppkonsentrasjon som et resultat av laktatproduksjon og muskelvevets osmoseregulering forklare *rigor-mortis* forløpet. Om reaksjonene jobber i samspill er ukjent. Resultatene viser tydelig at graden av *rigor*, og tiden det tar fra dødstidspunktet til høyest *rigor*-indeks kan deles inn etter fiskens metabolske temperatur fra 5°C til 15°C. Basert på kausalitet og oppgavens benyttede statistiske modeller kan det virke som ploiditet påvirker *rigor-mortis* da det i denne oppgaven viser seg at økt cellestørrelse gir mykere og senere *rigor* inngang.

### 7.2 Kvalitetsforskjeller

Det konkluderes med at det er ingen markante kvalitetsforskjeller mellom diploid og triploid laks.

- 1) Det er nominelt høyere drypptap hos triploid laks.
- 2) Collagenaseaktiviteten er signifikant høyere ( $<0,05$ ) i triploid laks enn i diploid laks.
- 3) Triploid laks har høyere fettdeponering enn diploid laks.
- 4) Mengden astaxanthin er lik. HunterLab verifiserer likt fargebilde hos diploid og triploid laks.

Fra et kvalitetsaspekt har det ingen stor betydning om man benytter diploid eller triploid laks i norsk akvakultur.

### 7.3 Mitokondrier

Det er relativt små forskjeller i mitokondrierespirasjonen mellom diploid og triploid atlantisk laks. Triploid laks har signifikant større ADP respons i rød muskel før smoltifisering, noe som muligens kan knyttes opp mot større biomasse på triploid fisk i denne vekstfasen av oppdrettssyklusen. Dette må undersøkes ytterligere for å verifisere resultatet fra denne oppgaven.

Mitokondriene i laks er godt koblet. Analysene viser at  $H^+$ -ionene som dannes over protongradienten i ETS i forsøkets samlede laksefisker ser alle ut til å være med på å danne ATP. Det har i denne oppgaven ikke vært mulig å avkoble ATP-syntesen med FCCP.

Det er ingen grunn til å benytte Biobs<sup>m</sup>/Saponin fremfor Shredder som permabiliseringsmetode på laksevev. Shredder er totalt sett en like god til bedre metode og ikke minst skånsommere metode for å gjøre mitokondriene tilgjengelige for substrater i Oxyografen.

## Referanser

- Albarracín, W., Sánchez, I. C., Grau, R. & Barat, J. M. (2011). Salt in food processing; usage and reduction: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 46 (7): 1329-1336.
- Alberts, B. (2014). *Essential cell biology*. New York: Garland Science. XXIII, s.726
- Allendorf, F. W. & Thorgaard, G. H. (1984). Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes. I: *Evolutionary genetics of fishes*, s. 1-53: Springer.
- Almaida-Pagan, P. F., Lucas-Sanchez, A. & Tocher, D. R. (2014). Changes in mitochondrial membrane composition and oxidative status during rapid growth, maturation and aging in zebrafish, *Danio rerio*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841 (7): 1003-1011.
- Altimiras, J., Axelsoon, M., Claireaux, G., Lefrancois, C., Mercier, C. & Farrell, A. (2002). Cardiorespiratory status of triploid brown trout during swimming at two acclimation temperatures. *Journal of Fish Biology*, 60 (1): 102-116.
- Altukhov, Y. P., Salmenkova, E. A. & Omelchenko, V. T. (2008). *Salmonid fishes: population biology, genetics and management*: John Wiley & Sons.
- Ando, M., Toyohara, H., Shimizu, Y. & Sakaguchi, M. (1991). Post-mortem tenderization of fish muscle proceeds independently of resolution of rigor mortis. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 (6): 1165-1169.
- AquaGen. (2014). *Steril laks*. aquagen.no. Tilgjengelig fra: <http://aquagen.no/produkter/lakserogn/produktoversikt-og-dokumentasjon/steril-laks/>.
- Archer, S. D. & Johnston, I. A. (1991). Density of cristae and distribution of mitochondria in the slow muscle fibers of Antarctic fish. *Physiological zoology*: 242-258.
- Arimoto, T., Gang, X. & Matsushita, Y. (1991). Muscle-contraction time of captured walleye pollock *Theragra chalcogramma*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 (7): 1225-1228.
- Aschehoug og Gyldendals store norske leksikon. (2005). *Istid – kvartærtidens istider i Norge*, b. 7. Oslo: Kunnskapsforlaget.
- Atkins, M. E. & Benfey, T. J. (2008). Effect of acclimation temperature on routine metabolic rate in triploid salmonids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 149 (2): 157-161.
- Aursand, M., Bleivik, B., Rainuzzo, J. R., Leif, J. & Mohr, V. (1994). Lipid distribution and composition of commercially farmed atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 64 (2): 239-248.
- Austreng, E. (1979). *Fett og protein i fôr til laksefisk: VI. Fordøyelighet og fôrutnyttelse hos regn bueaure (Salmo gairdneri, Richardson) ved ulikt fettinnhold i fôret*.

- Azevedo, P. A., Young Cho, C., Leeson, S. & Bureau, D. P. (1998). Effects of feeding level and water temperature on growth, nutrient and energy utilization and waste outputs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Living Resources*, 11 (04): 227-238.
- Balevik, S. B. (2004). *Slaktetemperaturens innvirkning på drypptap og muskelforkorting i filet fra oppdrettet Atlantisk laks (Salmo salar L.) og hvite muskelfibrer sin morfologi før og under rigor*. Bergen: [S.B. Balevik].
- Behnke, R. J. (1992). Native trout of western North America. *American Fisheries Society monograph (USA)*. no. 6.
- Bendall, J. (1951). The shortening of rabbit muscles during rigor mortis: its relation to the breakdown of adenosine triphosphate and creatine phosphate and to muscular contraction. *The Journal of physiology*, 114 (1-2): 71-88.
- Bendall, J. R. (1973). Post mortem changes in muscle. In *The structure and function of muscle*. (Ed. Bourne G. H.) Academic Press. New York & London 2: 243-309.
- Benfey, T. J. & Sutterlin, A. M. (1984a). Growth and gonadal development in triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41 (9): 1387-1392.
- Benfey, T. J. & Sutterlin, A. M. (1984b). Triploidy induced by heat shock and hydrostatic pressure in landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 36 (4): 359-367.
- Benfey, T. J. (1999). The physiology and behaviour of triploid fishes. *Reviews in Fisheries Science* 7: 39-67.
- Benfey, T. J. (2001). Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick, Canada. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 58 (2): 525-529.
- Berg, E. W. & Dyrnes, U. (1997). *Sensorisk analyse*. Oslo: Universitetsforl. s. 208.
- Bernier, N. J., Brauner, C. J., Heath, J. W. & Randall, D. J. (2004). Oxygen and carbon dioxide transport during sustained exercise in diploid and triploid chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61 (9): 1797-1805.
- BioMar. (2014). *BioMar først med før til triploid laks*: BioMar AS.
- BioTek Instruments, I. (2014). *Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader*: BioTek. Tilgjengelig fra: [http://www.biotek.com/products/microplate\\_detection/synergyht\\_multimode\\_microplate\\_reader.html](http://www.biotek.com/products/microplate_detection/synergyht_multimode_microplate_reader.html).
- Bioteknologirådet. (2010). *Arv og genetikk*. <http://www.bioteknologiradet.no>: Bioteknologirådet. Tilgjengelig fra: <http://www.bioteknologiradet.no/temaer/arv-og-genetikk/> (lest 4.1.2015).

- Bito, M., Yamada, K., Mikumo, Y. & Amano, K. (1983). Studies on rigor mortis of fish. I. difference in the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified cutting's method. *Bulletin-Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*.
- Bito, M. (1986). The influence of freshness of the fish, freezing temperature, thawing rate and thawing temperature on thaw rigor. *Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research Laboratory (Japan)*.
- Bjerkeng, B., Følling, M., Lagocki, S., Storebakken, T., Olli, J. J. & Alsted, N. (1997). Bioavailability of all-E-astaxanthin and Z-isomers of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 157 (1): 63-82.
- Bjerkeng, B., Refstie, S., Fjalestad, K., Storebakken, T., Rødbotten, M. & Roem, A. (1997). Quality parameters of the flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary fat content and full-fat soybean meal as a partial substitute for fish meal in the diet. *Aquaculture*, 157 (3): 297-309.
- Bjerkeng, B., Hamre, K., Hatlen, B. & Wathne, E. (1999). Astaxanthin deposition in fillets of Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed two dietary levels of astaxanthin in combination with three levels of  $\alpha$ -tocopheryl acetate. *Aquaculture research*, 30 (9): 637-646.
- Bjerkeng, B., Hatlen, B. & Wathne, E. (1999). Deposition of astaxanthin in fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with herring, capelin, sandeel, or Peruvian high PUFA oils. *Aquaculture*, 180 (3): 307-319.
- Bjerkeng, B. (2000). Carotenoid pigmentation of salmonid fishes-recent progress. *Avances en nutrición acuícola V. Memorias del V simposium internacional de nutrición acuícola*: 19-22.
- Bjørnevik, M., Espe, M., Beattie, C., Nortvedt, R. & Kiessling, A. (2004). Temporal variation in muscle fibre area, gaping, texture, colour and collagen in triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84 (6): 530-540.
- Bligh, E. G. a. D. W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917 Modifisert av Halvorsen J. SINTEF Fiskeri og havbruk.
- Bloomer, R. J., Kabir, M. M., Marshall, K. E., Canale, R. E. & Farney, T. M. (2010). Postprandial oxidative stress in response to dextrose and lipid meals of differing size. *Lipids Health Dis*, 9 (1): 79.
- Bonnet, S., Haffray, P., Blanc, J. M., Vallée, F., Vauchez, C., Fauré, A. & Fauconneau, B. (1999). Genetic variation in growth parameters until commercial size in diploid and triploid freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and seawater brown trout (*Salmo trutta*). *Aquaculture*, 173 (1): 359-375.
- Bottje, W., Iqbal, M., Tang, Z., Cawthon, D., Okimoto, R., Wing, T. & Cooper, M. (2002). Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. *Poultry science*, 81 (4): 546-555.

- Bottje, W. & Carstens, G. (2009). Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. *Journal of animal science*, 87 (14 suppl): E48-E63.
- Brekke, J. A. S., Even. (2012). Kva laks er det som egentleg sym rundt i elvane våre? I: 010-2012, R. (red.): CapMare AS. 25
- Bremner, H. (1999). Gaping in fish flesh. *Extracellular matrix of fish and shellfish*.
- British Broadcasting Corporation. (2014a). *Biology > Genetics and adaptation > Maintaining water balance > Osmoregulation in fish*. Tilgjengelig fra: [www.bbc.co.uk](http://www.bbc.co.uk).
- British Broadcasting Corporation. (2014b). *Geography --> Glacial landscapes and processes --> Glaciation*. Tilgjengelig fra: [http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/geography/glacial\\_landscapes/glaciation\\_rev1.shtml](http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/geography/glacial_landscapes/glaciation_rev1.shtml) (lest 18.2.2015).
- British Broadcasting Corporation. (2015). *History of life on Earth --> Miocene epoch*. BBC Nature. Tilgjengelig fra: [http://www.bbc.co.uk/nature/history\\_of\\_the\\_earth/Miocene](http://www.bbc.co.uk/nature/history_of_the_earth/Miocene) (lest 18.2.2015).
- Britton, G. (1995). Carotenoids today and challenges for the future. *Carotenoids*, 1: 13-26.
- Brunner, P. C., Douglas, M. R., Osinov, A., Wilson, C. C. & Bernatchez, L. (2001). Holarctic phylogeography of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences. *evolution*, 55 (3): 573-586.
- Buroker, N. E., Hershberger, W. & Chew, K. (1979). Population genetics of the family Ostreidae. II. Interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Marine Biology*, 54 (2): 171-184.
- Cabrera-Orozco, A., Jiménez-Martínez, C. & Dávila-Ortiz, G. (2013). *Soybean: Non-Nutritional Factors and Their Biological Functionality*: INTECH Open Access Publisher.
- Campbell, M. K. & Farrell, S. O. (2015). *Biochemistry*. Stamford: Cengage Learning.
- Cappeln, G. & Jessen, F. (2001). Glycolysis and ATP degradation in cod (*Gadus morhua*) at subzero temperatures in relation to thaw rigor. *LWT-Food Science and Technology*, 34 (2): 81-88.
- Cepeda, R., Chou, E., Bracho, G. & Haard, N. (1990). An immunological method for measuring collagen degradation in the muscle of fish. *Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability*, 487: 506.
- Choubert, G. & Blanc, J. (1989). Dynamics of dietary canthaxanthin utilization in sexually maturing female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) compared to triploids. *Aquaculture*, 83 (3): 359-366.
- Choubert, G., de la Noüe, J. & Blanc, J.-M. (1991). Apparent digestibility of canthaxanthin in rainbow trout: effect of dietary fat level, antibiotics and number of pyloric caeca. *Aquaculture*, 99 (3): 323-329.



- Choubert, G., Blanc, J. M. & Vallée, F. (1997). Colour measurement, using the CIELCH colour space, of muscle of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed astaxanthin: effects of family, ploidy, sex, and location of reading. *Aquaculture Research*, 28 (1): 15-22.
- Christiansen, R., Lie, O. & Torrissen, O. (1995). Growth and survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed different dietary levels of astaxanthin. First-feeding fry. *Aquaculture Nutrition*, 1 (3): 189-198.
- Clark, R. M., Yao, L., She, L. & Furr, H. C. (2000). A comparison of lycopene and astaxanthin absorption from corn oil and olive oil emulsions. *Lipids*, 35 (7): 803-806.
- Concollato, A., Parisi, G., Olsen, R. E., Kvamme, B. O., Slinde, E. & Zotte, A. D. (2014). Effect of carbon monoxide for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) slaughtering on stress response and fillet shelf life. *Aquaculture*, 433: 13-18.
- Cotter, D., O'Donovan, V., O'Maoileidigh, N., Rogan, G., Roche, N. & Wilkins, N. P. (2000). An evaluation of the use of triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in minimising the impact of escaped farmed salmon on wild populations. *Aquaculture*, 186 (1-2): 61-75.
- Cotter, D., O'Donovan, V., Drumm, A., Roche, N., Ling, E. N. & Wilkins, N. P. (2002). Comparison of freshwater and marine performances of all-female diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 33 (1): 43-53.
- Cuezva, J. M., Ostronoff, L. K., Ricart, J., de Heredia, M. L., Di Liegro, C. M. & Izquierdo, J. M. (1997). Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 29 (4): 365-377.
- Currie, R. & Wolfe, F. (1979). Relationship between pH fall and initiation of isotonic contraction in postmortem beef muscle. *Canadian Journal of Animal Science*, 59 (4): 639-647.
- Dahl, H. A. (2008). *Mest om muskel: essensiell muskelbiologi*. Oslo: Cappelen akademisk.
- Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides, and proteins. Food science and technology - New York - Marcel Dekker-: 321-430.
- Danzmann, R. G., Davidson, E. A., Ferguson, M. M., Gharbi, K., Koop, B. F., Hoyheim, B., Lien, S., Lubieniecki, K. P., Moghadam, H. K., Park, J., et al. (2008). Distribution of ancestral proto-Actinopterygian chromosome arms within the genomes of 4R-derivative salmonid fishes (Rainbow trout and Atlantic salmon). *Bmc Genomics*, 9.
- Dawson-Coates, J., Chase, J., Funk, V., Booy, M., Haines, L., Falkenberg, C., Whitaker, D., Olafson, R. & Pearson, T. (2003). The relationship between flesh quality and numbers of *Kudoa* thrysites plasmodia and spores in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases*, 26 (8): 451-459.
- Delbarre-Ladrat, C., Cheret, 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.

- Devlin, R. H. (1993). Sequence of sockeye salmon type 1 and 2 growth hormone genes and the relationship of rainbow trout with Atlantic and Pacific salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50 (8): 1738-1748.
- Dos Santos, R. S., Martins Pecanha, F. L. & da-Silva, W. S. (2013). Functional characterization of an uncoupling protein in goldfish white skeletal muscle. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 45 (3): 243-251.
- Draxl, A., Eigentler, A. & Gnaiger, E. Auxiliary HRR-Tools.
- Draxl A, E. A., Gnaiger E. (2013). PBI-Shredder HRR-Set: preparation of tissue homogenates for diagnosis of mitochondrial respiratory function. *Mitochondr Physiol Network* 17.02(03): 1-9.
- Egginton, S. & Sidell, B. D. (1989). Thermal acclimation induces adaptive changes in subcellular structure of fish skeletal muscle. *Am. J. Physiol*, 256 (1): R1-R9.
- Einen, O. & Roem, A. (1997). Dietary protein/energy ratios for Atlantic salmon in relation to fish size: growth, feed utilization and slaughter quality. *Aquaculture Nutrition*, 3 (2): 115-126.
- Einen, O. & Skrede, G. (1998). Quality characteristics in raw and smoked fillets of Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed high-energy diets. *Aquaculture Nutrition*, 4 (2): 99-108.
- 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.
- Einen, O., Waagan, B. & Thomassen, M. S. (1998). Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*): I. Effects on weight loss, body shape, slaughter- and fillet-yield, proximate and fatty acid composition. *Aquaculture*, 166 (1): 85-104.
- 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): 149-169.
- Elvevoll, E., Sørensen, N., Østerud, B., Ofstad, R. & Martinez, I. (1996). Processing of marine foods. *Meat science*, 43: 265-275.
- Enríquez, J. A., Fernández-Silva, P., Garrido-Pérez, N., López-Pérez, M. J., Pérez-Martos, A. & Montoya, J. (1999). Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone. *Molecular and cellular biology*, 19 (1): 657-670.
- Erdal, J. I., Evensen, Ø., Kaurstad, O. K., Lillehaug, A., Solbakken, R. & Thorud, K. (1991). Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture*, 98 (4): 363-379.
- Erikson, U. & Misimi, E. (2008). Atlantic salmon skin and fillet color changes effected by perimortem handling stress, *rigor mortis*, and ice storage. *Journal of Food Science*, 73 (2): C50-C59.

- 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): 489-504.
- Evans, D. H. (1980). Osmotic and ionic regulation by freshwater and marine fishes. I: *Environmental physiology of fishes*, s. 93-122: Springer.
- Eya, J. C., Ashame, M. F. & Pomeroy, C. F. (2010). Influence of diet on mitochondrial complex activity in channel catfish. *North American Journal of Aquaculture*, 72 (3): 225-236.
- Eya, J. C., Ashame, M. F. & Pomeroy, C. F. (2011). Association of mitochondrial function with feed efficiency in rainbow trout: Diets and family effects. *Aquaculture*, 321 (1): 71-84.
- Eya, J. C., Ashame, M. F., Pomeroy, C. F., Manning, B. B. & Peterson, B. C. (2012). Genetic variation in feed consumption, growth, nutrient utilization efficiency and mitochondrial function within a farmed population of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 163 (2): 211-220.
- Eya, J. C., Yossa, R., Ashame, M. F., Pomeroy, C. F. & Gannam, A. L. (2013). Effects of dietary lipid levels on growth, feed utilization and mitochondrial function in low- and high-feed efficient families of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 416: 119-128.
- Finstad, A. G., Hedger, R., Jonsson, B., Forseth, T., Ugedal, O., Sundt-Hansen, L. E. B. & Diserud, O. H. (2010). *Laks i framtidens klima: Kunnskapsoppsummering og scenario med vekt på temperatur og vannføring*, b. 646. Trondheim: Norsk institutt for naturforskning.
- Finstad, Ø. W., Dahle, M. K., Lindholm, T. H., Nyman, I. B., Løvoll, M., Wallace, C., Olsen, C. M., Storset, A. K. & Rimstad, E. (2014). Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes. *Veterinary research*, 45 (1): 1-13.
- Fiskeridirektoratet. (2014a). *Henvendelse ang. grønne konsesjoner og triploid laks - saksnummer 14/14809*: Rådgiver i Fiskeridirektoratet Lene Kristin Røyrane-Løtvedt.
- Fiskeridirektoratet. (2014b). *Oppdaterte rømmingstall*. Tilgjengelig fra: <http://www.fiskeridir.no/statistikk/akvakultur/oppdaterte-roemmingstall>.
- Fjelldal, P., Hansen, T., Breck, O., Ørnsrud, R., Lock, E. J., Waagbø, R., Wargelius, A. & Eckhard Witten, P. (2012). Vertebral deformities in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)—etiology and pathology. *Journal of Applied Ichthyology*, 28 (3): 433-440.
- Fjelldal, P. G. & Hansen, T. (2010). Vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) underyearling smolts. *Aquaculture*, 309 (1): 131-136.
- Fjelldal, P. G., Wennevik, V., Fleming, I. A., Hansen, T. & Glover, K. A. (2014). Triploid (sterile) farmed Atlantic salmon males attempt to spawn with wild females. *Aquaculture Environment Interactions*, 5 (2): 155-162.

- Folkestad, A., Rørvik, K. A., Kolstad, K. & Mørkøre, T. (2008). Growth rates of individual farmed Atlantic salmon *Salmo salar* L. influence the texture of raw and smoked fillets. *Aquaculture Research*, 39 (3): 329-332.
- Foskett, J. K., Bern, H., Machen, T. & Conner, M. (1983). Chloride cells and the hormonal control of teleost fish osmoregulation. *Journal of experimental Biology*, 106 (1): 255-281.
- Foss, P., Storebakken, T., Schiedt, K., Liaaen-Jensen, S., Austreng, E. & Streiff, K. (1984). Carotenoids in diets for salmonids: I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture*, 41 (3): 213-226.
- Framstad, E. (2006). *Effekter av klimaendringer på økosystemer og biologisk mangfold*, b. nr 2006-2. Trondheim: Direktoratet for naturforvaltning.
- Francis, F. (1995). Quality as influenced by color. *Food quality and preference*, 6 (3): 149-155.
- Fraser, T. W., Fjellidal, P. G., Hansen, T. & Mayer, I. (2012). Welfare considerations of triploid fish. *Reviews in Fisheries Science*, 20 (4): 192-211.
- Fraser, T. W., Hansen, T., Skjæraasen, J. E., Mayer, I., Sambraus, F. & Fjellidal, P. G. (2013). The effect of triploidy on the culture performance, deformity prevalence, and heart morphology in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 416: 255-264.
- Fraser, T. W. K., Hansen, T., Fleming, M. S. & Fjellidal, P. G. (2015). The prevalence of vertebral deformities is increased with higher egg incubation temperatures and triploidy in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 38 (1): 75-89.
- Friedland, K. D., Hansen, L. P., Dunkley, D. A. & MacLean, J. C. (2000). Linkage between ocean climate, post-smolt growth, and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the North Sea area. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 57 (2): 419-429.
- Fuerst, R. (1972). Evolution by gene duplication - ohno,S. *Social Biology*, 19 (1): 89-90.
- Galbreath, P. F. & Thorgaard, G. H. (1995). Saltwater performance of all-female triploid Atlantic salmon. *Aquaculture*, 138 (1-4): 77-85.
- Galbreath, P. F. & Thorgaard, G. H. (1997). Saltwater performance of triploid Atlantic salmon *Salmo salar* L x brown trout *Salmo trutta* L hybrids. *Aquaculture Research*, 28 (1): 1-8.
- Garvin, D. A. (1984). What does product quality really mean. *Sloan management review*, 26 (1).
- Gilbey, J., Verspoor, E., McLay, A. & Houlihan, D. (2004). A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animal genetics*, 35 (2): 98-105.
- Gildberg, A. (1988). Aspartic proteinases in fishes and aquatic invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 91 (3): 425-435.

- Gjedrem, T. (1975). *Oppdrett av laksefisk (fisk som husdyr): Forelesninger ved Norges landbrukshøgskole*. Ås: Landbruksbokhandelen.
- Gjedrem, T., Gjoen, H. M. & Gjerde, B. (1991). Genetic origin of Norwegian farmed Atlantic salmon. *Aquaculture*, 98 (1-3): 41-50.
- Gjedrem, T. (1995). *Genetikk og avlslære for akvakultur*. [Oslo] Landbruksforl.
- Gjerde, B., Simianer, H. & Refstie, T. (1994). Estimates of genetic and phenotypic parameters for body weight, growth rate and sexual maturity in Atlantic salmon. *Livestock Production Science*, 38 (2): 133-143.
- Glover, K. A., Pertoldi, C., Besnier, F., Wennevik, V., Kent, M. & Skaala, O. (2013). Atlantic salmon populations invaded by farmed escapees: quantifying genetic introgression with a Bayesian approach and SNPs. *Bmc Genetics*.
- Gnaiger, E. (2009). Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41 (10): 1837-1845.
- Gnaiger, E. (2011). The Oxygraph for High - Resolution Respirometry (HRR). *Mitochondrial Physiology Network 0 6.01: 1 - 18*.
- Gnaiger, E. (2012). *Mitochondrial Pathways and Respiratory Control*. 3rd utg.: Oroboro Instruments Corp. - MiPNet Publications 2012.
- Graham, M. S., Fletcher, G. L. & Benfey, T. J. (1985). Effect of triploidy on blood oxygen content of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 50 (1): 133-139.
- Grant, W. S., Teel, D. J., Kobayashi, T. & Schmitt, C. (1984). Biochemical population genetics of Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) and comparison with Atlantic halibut (*H. hippoglossus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41 (7): 1083-1088.
- Grazi, E., Magri, E., Schwienbacher, C. & Trombetta, G. (1996). A Model Relating Protein Osmotic Pressure to the Stiffness of the Cross-Bridge Components and the Contractile Force of Skeletal Muscle. *European Journal of Biochemistry*, 241 (1): 25-31.
- Haard, N. F. (1992). Control of chemical - composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*, 25 (4): 289-307.
- Haest, C., De Gier, J. & Van Deenen, L. (1969). Changes in the chemical and the barrier properties of the membrane lipids of *E. coli* by variation of the temperature of growth. *Chemistry and physics of lipids*, 3 (4): 413-417.
- Hall, G. M. & Ahmad, N. (1997). Surimi and fish-mince products. I: *Fish processing technology*, s. 74-92: Springer.
- Hansen, L. P. & Windsor, M. L. (2006). Interactions between Aquaculture and Wild Stocks of Atlantic Salmon and other Diadromous Fish Species: Science and Management, Challenges and Solutions An introduction by the Conveners. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 63 (7): 1159-1161.

- Hansen, T. (2012). *Oppdrett av steril fisk*, b. nr. 18-2012. Bergen: Havforskningsinstituttet.
- Hansen, T. J., Olsen, R. E., Stien, L., Oppedal, F., Torgersen, T., Breck, O., Remen, M., Vågseth, T. & Fjellidal, P. G. (2015). Effect of water oxygen level on performance of diploid and triploid Atlantic salmon post-smolts reared at high temperature. *Aquaculture*, 435: 354-360.
- Hartmann, N., Reichwald, K., Wittig, I., Drose, S., Schmeisser, S., Luck, C., Hahn, C., Graf, M., Gausmann, U., Terzibasi, E., et al. (2011). Mitochondrial DNA copy number and function decrease with age in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell*, 10 (5): 824-831.
- Harvey, R. A. & Ferrier, D. R. (2011). *Biochemistry*. Philadelphia, Pa.: Wolter Kluwer.
- Hatae, K., Tobimatsu, A., Takeyama, M. & Matsumoto, J. (1986). Contribution of the connective tissues on the texture difference of various fish species. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Haugland, Ø., Mikalsen, A. B., Nilsen, P., Lindmo, K., Thu, B. J., Eliassen, T. M., Roos, N., Rode, M. & Evensen, Ø. (2011). Cardiomyopathy syndrome of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is caused by a double-stranded RNA virus of the Totiviridae family. *Journal of virology*, 85 (11): 5275-5286.
- Heggberget, T. G. (1992). *Smoltifisering hos laksefisk*, b. 031. Ås: Instituttet.
- Heidler J, F.-A. M., Fasching M, Gnaiger E,. (2014). Selected media and chemicals for respirometry with mitochondrial preparations. *Mitochondrial Physiology Network 03.02: 1-9 (2014)*.
- Henmi, H., Iwata, T., Hata, M. & Hata, M. (1987). Studies on the carotenoids in the muscle of salmon I. Intracellular distribution of carotenoids in the muscle.
- Hovland, E. (2014). *Over den leiken ville han rå: norsk havbruksnærings historie*, b. B. 5. Bergen: Fagbokforl.
- 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.
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R. & Buttemer, W. A. (2007). Life and death: Metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological Reviews*, 87 (4): 1175-1213.
- Hultin, H. O. (1984). Postmortem biochemistry of meat and fish. *Journal of Chemical Education*, 61 (4): 289.
- Hultmann, L. & Rustad, T. (2004). Iced storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*)—effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *Food Chemistry*, 87 (1): 31-41.
- Hunter, R. & Harold, R. (1987). *The Measurement of Appearance*, Hunter Associates Laboratory. Inc., Reston, VA.

- HunterLab. (2013/14). *Measure COLOR the way your EYE sees it*: HunterLab Inc.  
Tilgjengelig fra: <http://www.hunterlab.com/>.
- Huntingford, F. A., Adams, C., Braithwaite, V., Kadri, S., Pottinger, T., Sandøe, P. & Turnbull, J. (2006). Current issues in fish welfare. *Journal of fish biology*, 68 (2): 332-372.
- Huntingford, F. A. & Kadri, S. (2008). Welfare and fish. *Fish welfare*: 19-31.
- Hutchinson, P. (1997). Interactions between salmon culture and wild stocks of Atlantic salmon: the scientific and management issues. Proceedings of an ICES/NASCO symposium held in Bath, England, 18-22 April 1997. *ICES Journal of Marine Science (United Kingdom)*.
- Hyndman, C., Kieffer, J. & Benfey, T. (2003). Physiology and survival of triploid brook trout following exhaustive exercise in warm water. *Aquaculture*, 221 (1): 629-643.
- ICES General Secretary. (1991, 11.-15- mars). *Report of the study group on genetic risks to Atlantic salmon stocks*.
- Instruments, O. (u.å.). *Oxygraph-2k: DatLab Software: OROBOROS High-Resolution Respirometry*. Tilgjengelig fra: <http://www.orooboros.at/index.php?id=datlab>.
- Iossa, S., Lionetti, L., Mollica, M. P., Crescenzo, R., Botta, M., Barletta, A. & Liverini, G. (2003). Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *British Journal of Nutrition*, 90 (5): 953-960.
- Johansen, R., Needham, J., Colquhoun, D., Poppe, T. & Smith, A. (2006). Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *Laboratory animals*, 40 (4): 323-340.
- Johnston, I., Strugnell, G., McCracken, M. L. & Johnstone, R. (1999). Muscle growth and development in normal-sex-ratio and all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology*, 202 (15): 1991-2016.
- Johnston, I. A., Alderson, R., Sandham, C., Dingwall, A., Mitchell, D., Selkirk, C., Nickell, D., Baker, R., Robertson, B. & Whyte, D. (2000). Muscle fibre density in relation to the colour and texture of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 189 (3): 335-349.
- Johnston, I. A. (2001). Genetic and environmental determinants of muscle growth patterns. *Fish physiology*, 18: 141-186.
- Johnston, I. A., Manthri, S., Alderson, R., Campbell, P., Mitchell, D., Whyte, D., Dingwall, A., Nickell, D., Selkirk, C. & Robertson, B. (2002). Effects of dietary protein level on muscle cellularity and flesh quality in Atlantic salmon with particular reference to gaping. *Aquaculture*, 210 (1): 259-283.
- Jonsson, B. & Jonsson, N. (2011). Smolts and Smolting. I: *Ecology of Atlantic Salmon and Brown Trout*, s. 211-245: Springer.

- Jungalwalla, P. (1991). Production of non-maturing Atlantic salmon in Tasmania. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1789: 47-71.
- Khan, A. (1977). Some factors causing variation in the texture of similar muscles from comparable animals. *Meat science*, 1 (3): 169-176.
- 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 CO<sub>2</sub> anaesthesia. *Aquaculture*, 236 (1): 645-657.
- Klima- og miljødepartementet. (1993). *Lov om framstilling og bruk av genmodifiserte organismer m.m. (genteknologiloven)*. lovdata.no.
- Kolstad, K., Grisdale-Helland, B. & Gjerde, B. (2004). Family differences in feed efficiency in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 241 (1): 169-177.
- Koltai, E., Hart, N., Taylor, A. W., Goto, S., Ngo, J. K., Davies, K. J. & Radak, Z. (2012). Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 303 (2): R127-R134.
- Kong, F., Tang, J., Rasco, B. & Crapo, C. (2007). Kinetics of salmon quality changes during thermal processing. *Journal of Food Engineering*, 83 (4): 510-520.
- Kongtorp, R. T. (2006). *Kardiomyopatisyndrom (CMS) i Norge*, b. 2-2006. Oslo: Veterinærinstituttet.
- Koteng, D. F. (1992). *Norsk laks*. [Bergen]: [Fiskerinæringens landsforening].
- Kryvi, H. & Totland, G. K. (1997). *Fiskeanatomi*. Kristiansand: Høyskoleforl.
- Kumano, Y. & Seki, N. (1993). Changes in alpha-connectin content during storage of iced, frozen, and thawed fish muscles. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Larsen, S., Kraunsøe, R., Gram, M., Gnaiger, E., Helge, J. W. & Dela, F. (2014). The best approach: Homogenization or manual permeabilization of human skeletal muscle fibers for respirometry? *Analytical biochemistry*, 446: 64-68.
- 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.
- Lavety, J., Afolabi, O. & Love, R. (1988). The connective tissues of fish. *International Journal of Food Science & Technology*, 23 (1): 23-30.
- Leclercq, E., Taylor, J., Fison, D., Fjellidal, P. G., Diez-Padrisa, M., Hansen, T. & Migaud, H. (2011). Comparative seawater performance and deformity prevalence in out-of-season diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158 (1): 116-125.



- Lehninger, A., Nelson, D. & Cox, M. (1993). Principles of biochemistry, 1993. Worth, New York: 631-632.
- Lengnick-Hall, C. A. (1996). Customer contributions to quality: A different view of the customer-oriented firm. *Academy of Management Review*, 21 (3): 791-824.
- Lerfall, J. (2011). *The effect of pancreas disease and salting conditions on the quality of raw and cold-smoked Atlantic salmon (Salmo salar L.)*, b. 2011:07. Ås: Universitetet for miljø- og biovitenskap, UMB. 1 b.
- Lerfall, J., Roth, B., Skare, E. F., Henriksen, A., Betten, T., Dziatkowiak-Stefaniak, M. A. & Rotabakk, B. T. (2015). Pre-mortem stress and the subsequent effect on flesh quality of pre-rigor filleted Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during ice storage. *Food chemistry*, 175: 157-165.
- Lie, Ø. (2001). Flesh quality—the role of nutrition. *Aquaculture Research*, 32 (s1): 341-348.
- Lijalad, M. & Powell, M. D. (2009). Effects of lower jaw deformity on swimming performance and recovery from exhaustive exercise in triploid and diploid Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 290 (1): 145-154.
- Liland, N. S., Espe, M., Rosenlund, G., Waagbø, R., Hjelle, J. I., Lie, Ø., Fontanillas, R. & Torstensen, B. E. (2013). High levels of dietary phytosterols affect lipid metabolism and increase liver and plasma TAG in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*, 110 (11): 1958-1967.
- Love, R. M. (1988). The food fishes: their intrinsic variation and practical implications.
- Lynum, L. (1999). *Fisk og fiskeprodukter*. Oslo: Yrkeslitteratur.
- Lynum, L. & Rustad, T. (2005). *Fisk som råstoff: holdbarhet og kvalitetssikring*. Trondheim: Tapir.
- Ma, L. B. & Yamanaka, H. (1991). Studies on thaw-rigor in red sea bream and carp muscles. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 (7): 1365-1368.
- Ma, L. B., Yamanaka, H., Ushio, H. & Watabe, S. (1992). Studies on the mechanism of thaw rigor in carp. *Bulletin - Japanese society of scientific fisheries*, 58: 1535-1535.
- MacNaughtan, A. F. (1978). A histological study of post mortem changes in the skeletal muscle of the fowl (*Gallus domesticus*). I. The muscle fibres. *Journal of anatomy*, 125 (Pt 3): 461.
- Maetz, J., Payan, P. & De Renzis, G. (1976). Controversial aspects of ionic uptake in freshwater animals. *Perspectives in experimental biology*, 1: 77-92.
- Mann, K. (1965). Energy transformations by a population of fish in the River Thames. *The Journal of Animal Ecology*: 253-275.
- March, B. (1993). Essential fatty acids in fish physiology. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 71 (9): 684-689.

- Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L. & Tolbert, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*, 87 (1): 206-210.
- Marsh, B. (1953). Shortening and extensibility in rigor mortis. *Biochimica et biophysica acta*, 12 (1): 478-479.
- Marsh, B. (1977). The Basis of Quality in Muscle Foods, The basis of tenderness in muscle foods. *Journal of Food Science*, 42 (2): 295-297.
- Mazeaud, M. M., Mazeaud, F. & Donaldson, E. M. (1977). Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106 (3): 201-212.
- McCormick, S. D. & Saunders, R. L. (1987). *Preparatory physiological adaptations for marine life of salmonids: osmoregulation, growth, and metabolism*. Am. Fish. Soc. Symp. 1-229.
- McDonald, R. & Smith, K. J. (1995). CIE94-a new colour-difference formula\*. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, 111 (12): 376-379.
- McGeachy, S., O'Flynn, F., Benfey, T. & Friars, G. (1996). Seawater performance of triploid Atlantic salmon in New Brunswick aquaculture. Bulletin - Aquaculture association of Canada: 24-28.
- McGinnity, P., Prodöhl, P., Ferguson, A., Hynes, R., ó Maoiléidigh, N., Baker, N., Cotter, D., O'Hea, B., Cooke, D. & Rogan, G. (2003). Fitness reduction and potential extinction of wild populations of Atlantic salmon, *Salmo salar*, as a result of interactions with escaped farm salmon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270 (1532): 2443-2450.
- McPhail, J. (1997). The origin and speciation of *Oncorhynchus* revisited. I: *Pacific Salmon & their Ecosystems*, s. 29-38: Springer.
- Mills, D. (1991). *Ecology and management of Atlantic salmon*: Springer.
- Moen, T., Hoyheim, B., Munck, H. & Gomez-Raya, L. (2004). A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. *Animal genetics*, 35 (2): 81-92.
- Moran, J., Whitaker, D. & Kent, M. (1999). A review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. *Aquaculture*, 172 (1): 163-196.
- 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): 145-157.
- Mørkøre, T. (2008). *Tekstur i oppdrettslaks: kunnskapsstatus og forhold som bidrar til fastere filet*. Trondheim.

- Mørkøre, T., Mazo T, P. I., Tahirovic, V. & Einen, O. (2008). Impact of starvation and handling stress on rigor development and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 277 (3): 231-238.
- Mørkøre, T., Rødbotten, M., Vogt, G., Fjæra, S. O., Kristiansen, I. Ø. & Manseth, E. (2010). Relevance of season and nucleotide catabolism on changes in fillet quality during chilled storage of raw Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food chemistry*, 119 (4): 1417-1425.
- Mørkøre, T. (2012, 14.5.2012). *Fôrets betydning for laksens helsetilstand, kvalitet og næringsverdi som mat for mennesker*. FHF- samling verdikjede laks.
- Mørkøre, T. (2014). *Kvalitetsaspekter hos laks som matvare ved endret fettsyresammensetning*, b. 19/2014. Tromsø: Nofima.
- Nagata, T. (2006). Electron microscopic radioautographic study on protein synthesis in hepatocyte mitochondria of aging mice. *The Scientific World Journal*, 6: 1583-1598.
- Nagy, K. A. (1987). Field metabolic rate and food requirement scaling in mammals and birds. *Ecological monographs*: 112-128.
- Nanton, D. A., Vegusdal, A., Rørå, A. M. B., Ruyter, B., Baeverfjord, G. & Torstensen, B. E. (2007). Muscle lipid storage pattern, composition, and adipocyte distribution in different parts of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed fish oil and vegetable oil. *Aquaculture*, 265 (1-4): 230-243.
- Navarro, A. & Boveris, A. (2004). Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287 (5): R1244-R1249.
- Nickell, D. & Bromage, N. R. (1998). The effect of dietary lipid level on variation of flesh pigmentation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 161 (1): 237-251.
- Norges Sjømatråd. (2014). *2014 ble et jubelår for norsk sjømateksport*. Globalt laksemarked, 1. [www.seafood.no](http://www.seafood.no): Norges Sjømatråd.
- Norris, A. T., Bradley, D. G. & Cunningham, E. P. (1999). Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture*, 180 (3-4): 247-264.
- Nærings- og fiskeridepartementet. (2008). *Forskrift om drift av akvakulturanlegg (akvakulturdriftsforskriften)*. lovdata.no.
- Nærings- og fiskeridepartementet. (2013). *Forskrift om tildeling av løyve til havbruk med matfisk av laks, aure og regnbogeaure i sjøvatn i 2013*. lovdata.no.
- Nærings- og fiskeridepartementet. (2014). *Vedtak om grønne laksekonsesjoner Gruppe A (Troms og Finnmark) opprettholdes*. Viken, T. (red.). regjeringen.no: 1. Solberg regjeringen.
- Nævdal, G. (2003). *Muligheter og problemer knyttet til avlsarbeid på aktuelle marine arter i oppdrett*. [Oslo]: Norges forskningsråd, Området for bioproduksjon og foredling.

- Nørby, J. G. (2000). The origin and the meaning of the little p in pH. *Trends in Biochemical Sciences*, 25 (1): 36-37.
- O'Flynn, F., McGeachy, S., Friars, G., Benfey, T. & Bailey, J. (1997). Comparisons of cultured triploid and diploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 54 (6): 1160-1165.
- Ofstad, R., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R. L. & Hermansson, A.-M. (1995). Liquid-holding capacity and structural changes in comminuted salmon (*Salmo salar*) muscle as influenced by pH, salt and temperature. *LWT-Food Science and Technology*, 28 (3): 329-339.
- Ojolick, E., Cusack, R., Benfey, T. & Kerr, S. (1995). Survival and growth of all-female diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at chronic high temperature. *Aquaculture*, 131 (3): 177-187.
- Olsson, G. B., Olsen, R. L. & Ofstad, R. (2003). Post-mortem structural characteristics and water-holding capacity in Atlantic halibut muscle. *LWT-Food Science and Technology*, 36 (1): 125-133.
- Oppedal, F., Taranger, G. L. & Hansen, T. (2003). Growth performance and sexual maturation in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater tanks exposed to continuous light or simulated natural photoperiod. *Aquaculture*, 215 (1): 145-162.
- Oroboros\_Bioblast. (2014). *O2k-mitochondrial preparations* <http://wiki.oroboros.at>: Oroboros Instrument Inc. Tilgjengelig fra: [http://wiki.oroboros.at/index.php/O2k-mitochondrial\\_preparations](http://wiki.oroboros.at/index.php/O2k-mitochondrial_preparations) (lest 26.1.2015).
- Pandian, T. J. & Koteeswaran, R. (1998). Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia*, 384: 167-243.
- Payan, P., Girard, J. & Mayer-Gostan, N. (1984). Branchial ion movements in teleosts: the roles of respiratory and chloride cells. *Fish physiology*, 10 (Part B): 39-63.
- Pecinová, A., Drahotá, Z., Nůsková, H., Pecina, P. & Houštěk, J. (2011). Evaluation of basic mitochondrial functions using rat tissue homogenates. *Mitochondrion*, 11 (5): 722-728.
- Pedersen, B. (2014). *Reaksjonshastighet*. . SNL: I Store norske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/reaksjonshastighet>. (lest 06.01.2015).
- Picard, M., Taivassalo, T., Ritchie, D., Wright, K. J., Thomas, M. M., Romestaing, C. & Hepple, R. T. (2011). Mitochondrial structure and function are disrupted by standard isolation methods. *PloS one*, 6 (3): e18317.
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J.-C., Flajšhans, M., Haffray, P. & Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293 (3): 125-156.
- Pogson, G. H. & Mesa, K. A. (2004). Positive Darwinian selection at the pantophysin (Pan I) locus in marine gadid fishes. *Molecular Biology and Evolution*, 21 (1): 65-75.

- Pollak, J. K. & Sutton, R. (1980). The differentiation of animal mitochondria during development. *Trends in Biochemical Sciences*, 5 (1): 23-27.
- Powell, J., White, I., Guy, D. & Brotherstone, S. (2008). Genetic parameters of production traits in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 274 (2): 225-231.
- Powell, M. D., Jones, M. A. & Ljalad, M. (2009). Effects of skeletal deformities on swimming performance and recovery from exhaustive exercise in triploid Atlantic salmon. *Diseases of aquatic organisms*, 85 (1): 59.
- Ramsden, S. D., Brinkmann, H., Hawryshyn, C. W. & Taylor, J. S. (2003). Mitogenomics and the sister of Salmonidae. *Trends in Ecology & Evolution*, 18 (12): 607-610.
- Rawson, P. D. & Hilbish, T. J. (1995). Evolutionary relationships among the male and female mitochondrial DNA lineages in the *Mytilus edulis* species complex. *Molecular Biology and Evolution*, 12 (5): 893-901.
- Rise, M. L., von Schalburg, K. R., Brown, G. D., Mawer, M. A., Devlin, R. H., Kuipers, N., Busby, M., Beetz-Sargent, M., Alberto, R. & Gibbs, A. R. (2004). Development and application of a salmonid EST database and cDNA microarray: data mining and interspecific hybridization characteristics. *Genome Research*, 14 (3): 478-490.
- Rodger, H., McCleary, S. & Ruane, N. (2013). Clinical cardiomyopathy syndrome in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of fish diseases*.
- Rolfe, D. & Brown, G. C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological reviews*, 77 (3): 731-758.
- Rose, J. D. (2007). Anthropomorphism and 'mental welfare' of fishes. *Diseases of aquatic organisms*, 75 (2): 139-154.
- Roth, B., Slinde, E. & Arildsen, J. (2006). *Pre or post mortem* muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). The effect on *rigor mortis* and the physical properties of flesh. *Aquaculture*, 257 (1): 504-510.
- Roth, B., Nortvedt, R., Slinde, E., Foss, A., Grimsbø, E. & Stien, L. H. (2010). Electrical stimulation of Atlantic salmon muscle and the effect on flesh quality. *Aquaculture*, 301 (1): 85-90.
- Ruyter, B., Rosjo, C., Einen, O. & Thomassen, M. (2000a). Essential fatty acids in Atlantic salmon: effects of increasing dietary doses of n-6 and n-3 fatty acids on growth, survival and fatty acid composition of liver, blood and carcass. *Aquaculture Nutrition*, 6 (2): 119-128.
- Ruyter, B., Rosjo, C., Einen, O. & Thomassen, M. (2000b). Essential fatty acids in Atlantic salmon: time course of changes in fatty acid composition of liver, blood and carcass induced by a diet deficient in n-3 and n-6 fatty acids. *Aquaculture Nutrition*, 6 (2): 109-118.
- Rørtveit, A. W. (u.å.). *Laksens posisjon hos forbruker*. seafood.no: Norges sjømatråd.

- Sadler, J., Pankhurst, P. & King, H. (2001). High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 198 (3): 369-386.
- Saks, V. A., Veksler, V. I., Kuznetsov, A. V., Kay, L., Sikk, P., Tiivel, T., Tranqui, L., Olivares, J., Winkler, K. & Wiedemann, F. (1998). Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. I: *Bioenergetics of the Cell: Quantitative Aspects*, s. 81-100: Springer.
- Salte, R., Thomassen, M. & Wold, K. (1988). Do high levels of dietary polyunsaturated fatty acids (EPA/DHA) prevent diseases associated with membrane degeneration in farmed Atlantic salmon at low water temperatures. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*, 8: 63-66.
- Sambraus, F., Fjellidal, G., Fleming, M., Hansen, T. & Fraser, T. (2014). *The effect of incubation temperature on heart and skeletal deformities in triploid Atlantic salmon*. Havbruk i samfunnet.
- Sand, O., Sjaastad, Ø. V., Haug, E., Bjålie, J. G. & Toverud, K. C. (2006). *Menneskekroppen: fysiologi og anatomi*. Oslo: Gyldendal akademisk.
- Schiedt, K. & Liaaen-Jensen, S. (1995). Isolation and analysis. *Carotenoids*, 1: 81-108.
- Seierstad, S., Seljeflot, I., Johansen, O., Hansen, R., Haugen, M., Rosenlund, G., Frøyland, L. & Arnesen, H. (2005). Dietary intake of differently fed salmon; the influence on markers of human atherosclerosis. *European journal of clinical investigation*, 35 (1): 52-59.
- Shearer, K., Åsgård, T., Andorsdóttir, G. & Aas, G. (1994). Whole body elemental and proximate composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during the life cycle. *Journal of Fish Biology*, 44 (5): 785-797.
- Shearer, K. D. (1994). Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture*, 119 (1): 63-88.
- Sidell, B. D. & Hazel, J. R. (1987). Temperature affects the diffusion of small molecules through cytosol of fish muscle. *Journal of Experimental Biology*, 129 (1): 191-203.
- 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.
- Sigurgisladóttir, S., Ø Torrissen, O., Lie, Ø., Thomassen, M. & Hafsteinsson, H. (1997). Salmon quality: Methods to determine the quality parameters. *Reviews in Fisheries Science*, 5 (3): 223-252.
- Sigurgisladóttir, S., Sigurdardóttir, M. S., Ingvarsdóttir, H., Torrissen, O. J. & Hafsteinsson, H. (2001). Microstructure and texture of fresh and smoked Atlantic salmon, *Salmo salar* L., filets from fish reared and slaughtered under different conditions. *Aquaculture research*, 32 (1): 1-10.

- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71 (2): 522-525.
- Skilbrei, O., Svåstad, T., Bøthun, G. & Vølstad, J. H. (2011). *Evaluering av datagrunnlaget 2006-2009 for estimering av andel rømt oppdrettslaks i gytebestanden i norske elver*.
- Skipnes, D., Ostby, M. L. & Hendrickx, M. E. (2007). A method for characterising cook loss and water holding capacity in heat treated cod (*Gadus morhua*) muscle. *Journal of Food Engineering*, 80 (4): 1078-1085.
- Skrede, G. & Storebakken, T. (1986). Instrumental colour analysis of farmed and wild Atlantic salmon when raw, baked and smoked. *Aquaculture*, 53 (3): 279-286.
- Slinde, E., Roth, B., Balevik, S. B., Suontama, J., Stien, L. & Kiessling, A. (u.å). The influence of intracellular osmolarity on *rigor mortis*.
- Small, S. A. & Benfey, T. J. (1987). Cell size in triploid salmon. *Journal of Experimental Zoology*, 241 (3): 339-342.
- Smemo, S., Tena, J. J., Kim, K.-H., Gamazon, E. R., Sakabe, N. J., Gómez-Marín, C., Aneas, I., Credidio, F. L., Sobreira, D. R. & Wasserman, N. F. (2014). Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*, 507 (7492): 371-375.
- Sneddon, L. U. (2009). Pain perception in fish: Indicators and endpoints. *ILAR journal*, 50 (4): 338-342.
- Sovik, S. L. & Rustad, T. (2006). Effect of season and fishing ground on the activity of cathepsin B and collagenase in by-products from cod species. *LWT-Food Science and Technology*, 39 (1): 43-53.
- Statistisk sentralbyrå. (2013). *Akvakultur, 2013, endelige tall*: SSB (Statistics Norway). Tilgjengelig fra: <https://ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett>.
- Statistisk sentralbyrå. (2014). *Elvefiske etter laks, sjøaure og sjørøye*. ssb.no. Tilgjengelig fra: <http://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/elvefiske> (lest 18.2.2015).
- Stearley, R. (1992). Historical ecology of Salmoninae, with special reference to *Oncorhynchus*. *Systematics, historical ecology, and North American freshwater fishes*: 622-658.
- Steim, J. M., Tourtellotte, M. E., Reinert, J. C., McElhaney, R. N. & Rader, R. L. (1969). Calorimetric evidence for the liquid-crystalline state of lipids in a biomembrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 63 (1): 104-109.
- Stien, A., Svenning, M.-A., Ottersen, G. & Loeng, H. (2010). *Effekter på økosystemer og biologisk mangfold: klimaendringer i norsk Arktis : NorACIA delutredning 3*, b. no. 133. Tromsø: Instituttet.
- Stillwell, E. & Benfey, T. (1997). The critical swimming velocity of diploid and triploid brook trout. *Journal of fish biology*, 51 (3): 650-653.

- Store Norske Leksikon. (2009). Cellen. I: *Store Norske Leksikon*. Tilgjengelig fra: <https://sml.sn1.no/cellen> (lest 15.11.2014).
- Strasburg, G., Xiong, Y. & Chiang, W. (2008). Physiology and chemistry of edible muscle tissues. Food science and technology - New York - Marcel Dekker-, 169: 923.
- Sundet, J. H., Røttingen, I., Ottersen, G., Mangor-Jensen, A., Hauge, M., Fossum, P., Agnalt, A.-L. & Sunnset, B. H. (2011). *Havforskningsrapporten 2011: ressurser, miljø og akvakultur på kysten og i havet*, b. 1-2011. Bergen: Instituttet.
- Suresh, A. & Sheehan, R. (1998). Muscle fibre growth dynamics in diploid and triploid rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 52 (3): 570-587.
- Sutterlin, A. M., Holder, J. & Benfey, T. J. (1987). Early survival rates and subsequent morphological abnormalities in landlocked, anadromous and hybrid (landlocked × anadromous) diploid and triploid Atlantic salmon. *Aquaculture*, 64 (2): 157-164.
- Sørensen, S. P. L. (1909). Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen.
- Taranger, G. L. & Albretsen, J. (2014). *Risikovurdering norsk fiskeoppdrett 2013*, b. 2-2014. Bergen: Instituttet.
- Tave, D. (1993). Growth of triploid and diploid bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis*. *Journal of Applied Aquaculture*, 2 (2): 13-26.
- Taylor, J., Preston, A. C., Guy, D. & Migaud, H. (2011). Ploidy effects on hatchery survival, deformities, and performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 315 (1): 61-68.
- Taylor, J. F., Sambraus, F., Mota-Velasco, J., Guy, D. R., Hamilton, A., Hunter, D., Corrigan, D. & Migaud, H. (2013). Ploidy and family effects on Atlantic salmon (*Salmo salar*) growth, deformity and harvest quality during a full commercial production cycle. *Aquaculture*, 410: 41-50.
- Thodesen, J., Grisdale-Helland, B., Helland, S. J. & Gjerde, B. (1999). Feed intake, growth and feed utilization of offspring from wild and selected Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 180 (3): 237-246.
- Thodesen, J., Gjerde, B., Grisdale-Helland, B. & Storebakken, T. (2001a). Genetic variation in feed intake, growth and feed utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 194 (3): 273-281.
- Thodesen, J., Storebakken, T., Shearer, K. D., Rye, M., Bjerkeng, B. & Gjerde, B. (2001b). Genetic variation in mineral absorption of large Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in seawater. *Aquaculture*, 194 (3): 263-271.
- Thomas, P., Pankhurst, N. & Bremner, H. (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.



- Thorgaard, G. H. (1983). Chromosome set manipulation and sex control in fish. *Fish physiology*, 9 (Part B): 405-434.
- Tiwary, B. K., Kirubagaran, R. & Ray, A. K. (2004). The biology of triploid fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14 (4): 391-402.
- Tocher, D. R., Bendiksen, E. A., Campbell, P. J. & Bell, J. G. (2008). The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish. *Aquaculture*, 280 (1-4): 21-34.
- Torrissen, O., Hardy, R., Shearer, K., Scott, T. & Stone, F. (1990). Effects of dietary canthaxanthin level and lipid level on apparent digestibility coefficients for canthaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 88 (3): 351-362.
- Torrissen, O., 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.
- Torrissen, O. J. & Naevdal, G. (1988). Pigmentation of salmonids—variation in flesh carotenoids of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 68 (4): 305-310.
- Torstensen, B. E., Lie, Ø. & Frøyland, L. (2000). Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)—effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids*, 35 (6): 653-664.
- Tsuchiya, H., Kita, S. & Seki, N. (1992). Postmortem changes in alpha-actinin and connectin in carp and rainbow trout muscles. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Tyler, S. & Sidell, B. D. (1984). Changes in mitochondrial distribution and diffusion distances in muscle of goldfish upon acclimation to warm and cold temperatures. *Journal of Experimental Zoology*, 232 (1): 1-9.
- Van Buskirk, J. & Schmidt, B. R. (2000). Predator-induced phenotypic plasticity in larval newts: Trade-offs, selection, and variation in nature. *Ecology*, 81 (11): 3009-3028.
- Vecchi, M., Glinz, E., Meduna, V. & Schiedt, K. (1987). HPLC separation and determination of astacene, semiastacene, astaxanthin, and other keto-carotenoids. *Journal of High Resolution Chromatography*, 10 (6): 348-351.
- 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.
- Velasco, C., Draxl, A., Wiethuchter, A., Eigentler, A. & Gnaiger, E. (2012). Mitochondrial respiration in permeabilized fibres versus homogenate from trout heart and liver. *Mitochondrial Physiology Network*, 17: 1-12.
- Verhille, C. E. (2013). Oxygen supply in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its ecological impacts: an investigation of poor triploid performance.

- Vieira, V. L., 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: S100-S109.
- Volff, J. (2005). Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 94 (3): 280-294.
- Waagbø, R., Sandnes, K., Lie, Ø. & Nilsen, E. (1993). Health aspects of dietary lipid sources and vitamin E in Atlantic salmon (*Salmo salar*). I. Erythrocyte total lipid fatty acid composition, haematology and humoral immune response. *Fiskidir. Skr. Ser. Ernaer*, 6: 47-61.
- Waagbø, R., Sandnes, K., Torrissen, O. J., Sandvin, A. & Lie, Ø. (1993). Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three levels of N-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E. *Food Chemistry*, 46 (4): 361-366.
- Waples, R. S., Pess, G. R. & Beechie, T. (2008). Evolutionary history of Pacific salmon in dynamic environments. *Evolutionary Applications*, 1 (2): 189-206.
- Whitaker, D. & Kent, M. L. (1991). Myxosporean *Kudoa thyrssites*: a cause of soft flesh in farm-reared Atlantic salmon. *Journal of aquatic animal health*, 3 (4): 291-294.
- Widmaier, E. P., Raff, H. & Strang, K. T. (2014). *Vander's human physiology: the mechanisms of body function*. New York: McGraw-Hill. XXIV, 707
- Wild, V., Simianer, H., Gjølven, H.-M. & Gjerde, B. (1994). Genetic parameters and genotype × environment interaction for early sexual maturity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 128 (1): 51-65.
- Wilson, G., Rose, S. P. & Fox, C. F. (1970). The effect of membrane lipid unsaturation on glycoside transport. *Biochemical and biophysical research communications*, 38 (4): 617-623.
- Winfree, R. A. & Stickney, R. R. (1981). Effects of dietary protein and energy on growth, feed conversion efficiency and body composition of *Tilapia aurea*. *The Journal of nutrition*, 111 (6): 1001-1012.
- Yaffe, M. P. (1999). Dynamic mitochondria. *Nature cell biology*, 1 (6): E149-E150.
- Zabelinskii, S. A., Chebotareva, M. A., Kostkin, V. B. & Krivchenko, A. I. (1999). Phospholipids and their fatty acids in mitochondria, synaptosomes and myelin from the liver and brain of trout and rat: a new view on the role of fatty acids in membranes. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 124 (2): 187-193.
- Zhivotovsky, L. A., Gharrett, A., McGregor, A., Glubokovsky, M. & Feldman, M. W. (1994). Gene differentiation in Pacific salmon (*Oncorhynchus* sp.): facts and models with reference to pink salmon (*O. gorbuscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51 (S1): 223-232.
- Østerlie, M. (2010). Utvikling av metode for analyse av pigment i muskel hos laksefisk. <http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=573044>.

Østvik, S. O. (1991). *Rigor mortis; produksjon av fisk: hvordan rigor mortis-forløpet hos laks og torsk fisk virker inn på sluttproduktene kvalitet*. Tromsø: [S. O. Østvik].

## Appendix 1


Forespørsel fra journalist Anders Furuset i IntraFish Media

Triploid laks



Innboks x




 **Anders Hannemose Furuset** <anders.furuset@...> 02.12.2014 ☆  
til meg ▾

Hei, via innsyn i offentlige postlister ser jeg at du skriver masteroppgave om grønne konsesjoner og triploid laks. Stemmer det? Kan vi ta en prat om dette - det kan være av interesse av oss å dekke redaksjonelt.

Mvh.

Anders Furuset  
Journalist  
IntraFish Media  
Tlf.: [+ 47 932 56 140](tel:+4793256140)

 **Pål Rune Hasli** <paal.rune.hasli@gmail.com> 03.12.2014 ☆  
til Erik, Anders ▾

Hei. Det medfører riktighet at jeg og en medstudent skriver hver vår masteroppgave på NMBU der vi har sammenlignet kvalitetsforskjeller på diploid og triploid laks. Vi er klar over at forsøkene våres er av interesse fra flere hold. Oppgaven har innleveringsfrist 15.mai 2015 og alle data i oppgaven vil være offentlig tilgjengelig fra denne datoen. Du er hjertelig velkommen til å dekke resultatene redaksjonelt når den tid kommer.

Mvh  
Pål Rune Hasli  
Tlf: 98824863

2. desember 2014 kl. 14.44 skrev Anders Hannemose Furuset  
<[anders.furuset@intrafish.no](mailto:anders.furuset@intrafish.no)>:

...

## Appendix 2

Kronikk i Norsk fiskeoppdretts juni nummer.

Hvor mye gener tror du det er i laks?

*Uten å fornærme hverken forskere innen genetikkk eller biologer generelt, må vi kunne si at vi faktisk ikke vet helt sikkert hvor mange gener den atlantiske laksen har. Et dypdykk inn i evolusjonen til den atlantiske laksen gjennom to biologisk rettede masteroppgaver på Norges – miljø og biovitenskapelige universitet (NMBU) har vi sett nærmere på laksens evolusjonære historie. Oppgavenes formål var å se på energimetabolisme, samt kvalitetsforskjeller mellom diploid og triploid laks basert på de vedtatte «grønne» A konsesjonene i Troms og Finnmark, hvor spørsmålet om økt antall kromosomer kan ha en betydning. Vi skal derfor prøve å gi svar på spørsmål som; Hva er triploid laks, hvordan blir den triploid, hvorfor ønsker norske oppdrettsselskaper å triploidisere og problemer knyttet til dette.*

Nå tenker du sikkert at dette er enda en søvnnig kronikk skrevet av to hovedfagsstudenter som har levd inne i sin egen boble så alt for lenge. Kanskje har du aldeles rett i det, men hvis du altså er en av de ytterst få som har alle svarene på det genetiske dilemmaet norsk akvakultur har viklet seg inn i, kan du droppe å lese [her](#). For oss andre kan en kort historie om nesten alt av de ørsmå endringene evolusjonen og det genetiske mangfoldet i laksen vi nå vet, være en interessant refleksjon, nå som «de grønne» konsesjonene har blitt en realitet.

Vi ble første gang introdusert for begrepet triploid atlantisk laks høsten 2013 da vi fant felles hovedveileder til avsluttende masteroppgaver ved Norges miljø- og biovitenskapelige Universitet (NMBU), Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. Triploidisering av atlantisk laks er blitt «hot» igjen på bakgrunn av de såkalte «grønne A konsesjonene» i Nord-Norge. I 12 av 20 konsesjoner baseres det på bruk av såkalt steril laks. Med god hjelp fra fagfolk utenfor universitetet ble det formet to masteroppgaver som skulle undersøke kvalitetsforskjeller og energimetabolisme hos diploid og triploid atlantisk laks fra samme avlsstamme.

**Hva er triploid atlantisk laks (*Salmo salar* L.)?**

For hva er egentlig en diploid atlantisk laks og mer spesielt; hva er en triploid atlantisk laks? Ingen av oss hadde verken lest oss opp på laks, fisket villaks i elv, eller hatt interesser i oppdrettsnæringen. Og det eneste vi hadde hørt om kromosomer fra før, var mennesker med

feil kromosomoppsetning får Downs syndrom, en triploidisering av kromosom 21. Har triploid laks samme nedsatt funksjonsevne eller gir hel kromosomsettøkning andre ulemper/fordeler? Vi ble nysgjerrige.

Vi tok fatt på arbeidsoppgavene i den tro at vi nå gjør jobben, får resultatene og leverer oppgavene. Slik skulle det overhode ikke bli takket være energiske veiledere som stilte to nye spørsmål, da vi spurte om svaret på et. Før vi i det hele tatt hadde fått noen som helst resultater tok nysgjerrigheten overhånd, noe som ledet oss helt ned til evolusjon av slekten *Salmo* i epoken Miocen for cirka 20 millioner år siden.

Polyploiditet er hos dyr svært sjeldent, men noen spesielle arter har skapt seg denne fordelene. Dette gjelder f.eks. øgler, gullfisk, frosker og ikke minst flere arter i laksefamilien. Blant blomsterplanter og planter som gir oss mat er derimot polyploiditet svært utbredt. Mange velkjente ville og dyrkede planter er faktisk polyploide. Kanskje løvetannens over hundre kromosomsett har betydning for dens gode tilpasningsevne? Den er overalt, og på sitt beste akkurat nå. I grunnskolen lærer man at mennesker er diploide individer med 46 kromosomer ( $2 \cdot 23$  kromosomer), altså 2 kopier av hvert kromosom (unntatt kjønnsceller som er haploide). Så enkelt er det ikke for den atlantiske laksen. Den enkleste og oftest brukte forklaringen er at diploid laks (vanlig oppdrettslaks) har to kopier av hvert kromosom ( $2 \cdot 29 = 58$  kromosomer) og triploid laks har tre kopier av hvert kromosom. Det at atlantisk laks i dag regnes som diploid er en forenklet virkelighet, noe som vi skal utdype senere.

**Tabell 1** gir en oversikt over ploiditeter og ordforklaringer som vil kunne hjelpe deg å forstå det du nå skal få lese. Kromosomene er genmaterialet til hver enkelt celle i en organisme. Antall kromosomoppsetninger i en celle kan variere fra art til art. Dette kalles ploiditet.

Ploiditet	Antall kromosomoppsetning	Eksempel
Haploid	$n=1$	Kjønnsceller
Diploid	$n=2$	Pattedyrceller
Triploid	$n=3$	Diverse frukt
Tetraploid	$n=4$	Potet, bomull
Pentaploid	$n=5$	Tresorter
Heksaploid	$n=6$	Brødhvete
Octaploid	$n=8$	Jordbær
Decaploid	$n=10$	Acipenser (Stør familien)
Dodecaploid	$n=12$	Noen typer frosker
Polyploid	$n > 2$	-
Autotriploid	Diploid og haploid formering (Zygoten $n=3$ )	-
Autotetraploid	Dobler egne (like) kromosomer $n=2 \times 2$	-
Pseudotetraploid	"Uekte", "falsk" tetraploid fisk der kromosomantallet varierer på individnivå.	

**Laksens evolusjon**

Stamfaren til de laksefiskene som i dag lever både i merd og i elv var tilsynelatende tetraploide (4 kopier av hvert kromosom). For mellom 65-95 millioner år siden doblet fisk i *Salmonidae* familien sine to kromosomsett og ble autotetraploid. Antageligvis skjedde dette fra naturens side for at arten skulle klare å overleve. Ved å doble like kromosom øker sjansen for at kromosomene som fisken behøver for å tilpasse seg uttrykkes og kombinasjonsmulighetene naturlig nok blir mangedoblet. Dagens atlantiske laks anslåes å være 0-15% tetraploid («feilduplisert»).

Som et resultat av dette har laks flere kromosomarmar og dobbelt så mye deoksyribonukleinsyre (DNA) enn andre nært beslektede familier. Dette gjør *Salmonidae* slekten mer evolusjonær fleksibel enn andre arter, og derfor kan kromosomtallet i Atlantisk laks også variere uavhengig av antall kromosom kopieringer. I dag refereres det til 29 kromosom i hvert kromosomsett for den diploide nordeuropeiske laksen, altså 58 kromosom totalt. Andre kilder opererer med at den diploide atlantisk laksen i dag har mellom 54-60 kromosom. Antagelig har triploid atlantisk laks 81-90 kromosomer i cellen. Hvor mange av «de ekstra» kromosomene som er i funksjon i den triploide laksen vet vi enda ikke. Triploid laks inneholder i tillegg til økt kromosomoppsettning også 1,3-1,7 ganger mer DNA i cellekjernen kalt nukleært DNA. Stor spredning i mengde nukleært DNA tyder på at den pseudotetraploide variasjonen også den dag i dag må være stor.

Laksen har et komplisert arvemateriale. Deler av genomet i laks er fortsatt tetraploid, hvor det i dag skjer en konstant rediploidisering for å komme ned igjen til diploid status. Om vi får rene diploide individ i neste generasjon eller om 300 nye generasjoner vet vi ingenting om. Det at laks har det desidert største genomet og med en ekstra genomduplisering bak seg, byr det på mange utfordringer når genetikerne skal kartlegge arvemateriale.

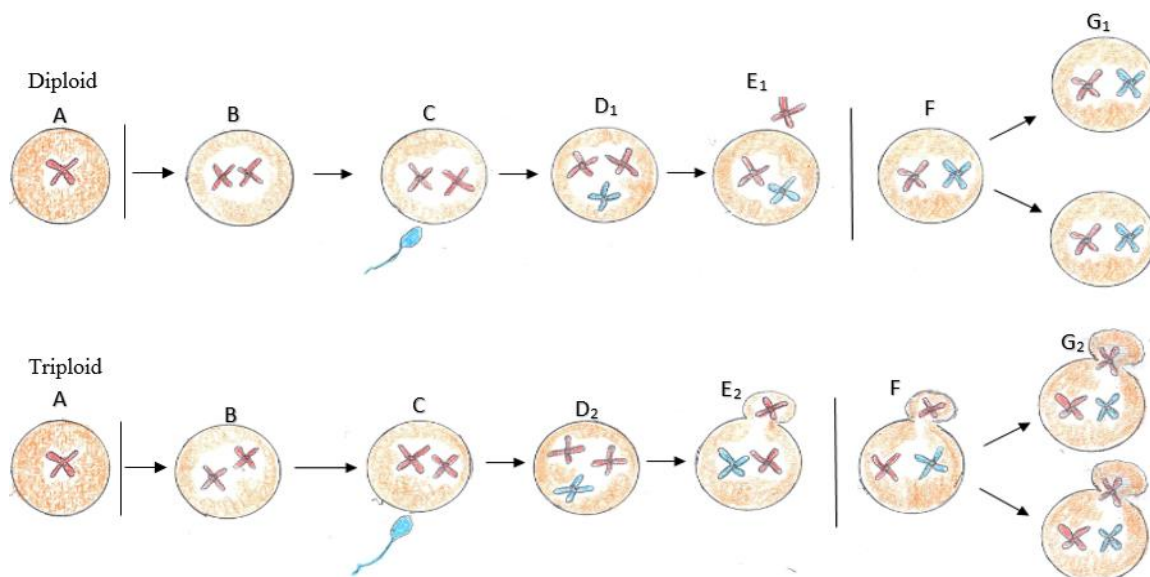
Det vi vet helt sikkert er at dagens oppdrettslaks er 11.generasjon mot den ville atlantiske laksens som er rundt 250 000 generasjoner. Hvor mye har vi mennesker faktisk klart å røre rundt med genene til laksen? Uten å ta noe som helst parti i den evigvarende krangelen mellom interessene fra oppdrett og interessene fra vill laks, så er det merkelig at naturens egne genetiske antenner ikke er mere diskutert, og ikke minst satt i et evolusjonært perspektiv.

### Hvordan blir laks triploid?

Nå som vi har lagt bak oss den evolusjonære delen for å kunne forstå forskjellen mellom diploid og triploid laks er det på tide å forklare hvordan 1 haploid celle + 1 haploid celle blir til et individ på 3 kromosomsett basert på trykkbehandling. Hvordan naturen klarte dette for millioner av år siden kan vi veldig lite om. Antagelig er naturens «lek» med kromosomer mer utbredt enn vi kan forestille oss, selv i dag. Nylig har laksens genom blitt sekvensert, som gjør selektering av egenskaper enda mer spesifikt og vil åpne nye dører i avlsarbeidet.

Vi mennesker har gjennom prøving og feiling funnet vår måte å triploidisere. I fisk har vi hatt en metode som er beskrevet så langt tilbake som år 1943. Med dagens teknologi blir det brukt konstant trykkbehandling for å oppnå triploide individ. Dette skjer ved 655 bar trykk når de befruktede lakseeggene er 300-350 minuttgrader gamle.

**Figur 1** forklarer prosessen fra første modningsdeling hos hunnlaksens egg (meiosen), frem til første kromosomkopiering (mitose) og celledeling hos diploid og triploid laks. Figuren er forenklet med «X og X» i egget som symboliserer kromosomsett, og baserer seg på andre tegninger og fagrelaterte artikler. Figuren er beskrevet i detalj til tross for at dette ikke er helt forstått enda.



A) Hunnlaksens egg sammen med et kromosomsett før meiosen inntreffer. I meiosen også kalt reduksjonsdeling deler kromosomet seg til to kromosom i hunnlaksens egg der hvert kromosomsett deler antall kromosom mellom seg (f.eks  $58/2=29$ ).



B) Hunnlaksens kjønnselle. Ubefruktet egg med to kromosomsett etter modningsdeling (meiose). Det ene kromosomsett blir ikke en del av det nye individet etter befruktning. Denne hendelsen har betydning for genetisk variasjon i populasjonen fra mor.

C) Hannlaksens kjønnselle på vei inn i egget. Egget blir befruktet (fertilisert).

D<sub>1+2</sub>) Lakseeget er befruktet og det er tre kromosomsett inne i egget. Det er tre kromosomsett inne i cellen for øyeblikket.

E<sub>1</sub>) Et kromosomsett fra mor blir selektert bort for å oppnå balansert antall kromosomer i egget og av den grunn blir dyttet ut. Cellen blir diploid. E<sub>2</sub>) Et kromosomsett fra mor blir selektert bort for å oppnå balansert antall kromosom i egget og blir av den grunn forsøkt dyttet ut av egget. Trykkbehandlingen hindrer det ene morkromosomsettet å forlate egget. Cellen forblir triploid.

F) Meitose stadiet. Celledeling med kopiering av likt antall kromosomantall.

G<sub>1</sub>) Første celledeling er foretatt. En diploid laks er skapt. G<sub>2</sub>) Første celledeling er foretatt. En triploid laks er skapt og cellen forblir cirka 30% større enn en diploid celle.

### **Hvorfor er det ønskelig for norske oppdrettsselskaper å triploidisere laks?**

Det er to svar på akkurat det spørsmålet. For det første er det viktig for norsk akvakultur at genmaterialet til et godt innarbeidet avlsprogram ikke blir solgt som fertiliserte egg med kjøpers mulighet for videre avlsfremgang (selv om vi allerede har solgt arvegullet fra Ås til Erich Wesjohann Group GmbH (EW Group) i Tyskland).

Det andre svaret og det mest diskuterte spørsmålet i dagens oppdrettsnæring; rømt oppdrettsfisk sin mulighet til å krysse seg inn i villaksstammer. På den andre siden må vi være klar over at vi også kan få problemer med triploide individer på rømmen i norske farvann.

### **Problemer knyttet til produksjon av triploid fisk**

Bruk av triploid fisk har vært diskutert flere ganger tidligere i norsk fiskeoppdrett, men pga. utfordringer av ulik karakter har det ikke vært aktuelt å innføre dette i Norge, selv om andre land i verden produserer triploid fisk. Takket være godt forskningsarbeid fra blant annet forskere fra Havforskningsinstituttet, har det resultert i ny kunnskap som gjør at det nå blir kommersiell oppdrett på denne «nye» arten. (Flere tar til ordet for at oppdrettet triploid laks må karakteriseres som egen art).

Uavhengig av dette har vi flere ubesvarte spørsmål til benyttelse av triploid laks knyttet opp mot; velferd, vaksinasjon, sykdom, adferd og forbrukeraspekt. Det retoriske spørsmålet alle kritikere alltid stiller: Vet vi nok om triploid laks og er det godt nok dokumentert? Ofte blir alle svar skyldig.

Uavhengig av dette ha vi satt spørsmåltegn om vi kjenner hele det genetiske aspektet triploid laks fører med seg. Atlantisk laks er en evolusjonært «sleip» fisk. Den evolusjonære tidslinjen til laksefamilien kan umulig være skapt på rene tilfeldigheter. Den har nok tilpasset seg for å kunne overleve. Satt i perspektiv er gjennomsnittlig levealder på en art på vår blå planet, 4 millioner år.

En konsekvens av økt mengde kromosom kan være at vi får større kvalitetsmessig spredning (genetisk variasjon) på den totale biomassen i norsk laks, der det faktisk kan være små forskjeller i avlslinjene. Forsøk viser at triploid laks kan gjøre det like bra og bedre enn diploid laks under optimale forhold. Hvilken retning norsk havbruk velger vil tiden vise, hvor flere instanser skal ha et ord med i laget. Uansett, økonomien får normalt det siste ordet.

Vi lever i herrens år 2015, og vi vet ikke helt sikkert hvor mange gener den atlantiske laksen faktisk har.

Skrevet av Even Flønes Skare og Pål Rune Hasli

*(Bekreftet på trykk i juni nummeret den 7.5.2015 av Pål Mugaas Jensen, redaktør i Norsk Fiskeoppdrett/Kyst.no.)*



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)