

Alternativ produksjon av matjessild

Del 2: NVG-sild

Torstein Skåra, Svein Kristian Stormo, Mats Carlehøg, Per Lea, Asbjørn Gildberg, Flemming Jessen og Henrik Hauch Nielsen





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

Nofima har om lag 400 ansatte.

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

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

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

Bergen:

Kjerreidviken 16
NO-5141 Fyllingsdalen

Sunnalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
Faks: 64 97 03 33
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA

Rapport

	ISBN: 978-82-8296-173-8 (trykt) ISBN: 978-82-8296-174-5 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Alternativ produksjon av matjessild Del 2: NVG sild	<i>Rapportnr.:</i> 13/2014
	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Torstein Skåra, Svein Kristian Stormo, Mats Carlehøg, Per Lea, Asbjørn Gildberg, Flemming Jessen og Henrik Hauch Nielsen	<i>Dato:</i> 21. februar 2014
<i>Avdeling:</i> Prosessteknologi	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 28
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF#900765
<i>Stikkord:</i> Norsk vårgytende sild, matjes, salting	<i>Prosjektnr.:</i> 10239
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> <p>Forsøk med lab-skala produksjon av lettsaltede matjestype-produkter fra Norsk Vårgytende (NVG) sild ble gjennomført i Lødingen og Senjahopen, i henholdsvis september og oktober juni 2013. I tillegg til å modne sild på tradisjonelt vis, hodekappet i saltlake, ble 3 alternative metoder forsøkt: modning av sløyd sild (uten innvoller), modning av filet i lake med slo fra NVG-sild, samt modning av filet i lake tilsatt slo fra nordsjøsildefanget i matjessesongen.</p> <p>Det ble utført sensorisk analyse av alle prøvene fra forsøkene, samt av et kommersielt matjesprodukt. Dessuten ble det utført analyse av enzymaktivitet i laker og muskel, proteomanalyse av råstoff, tradisjonell matjessild og filet i lake tilsatt nordsjøsildefanget.</p> <p>Forsøkene viser at effekten av NVG-slofraksjonen er liten. Analyseresultatene gir betydelig innsikt i ulike faktorerers effekt på produkttegenskapene til matjessild. Både hver for seg og samlet utgjør de et solid grunnlag for videre utvikling av disse produktene.</p>	
<i>English summary/recommendation:</i> <p>This report describes laboratory scale trials with salting of herring; both traditional matjessalting of gibbed herring, as well as salting of gutted herring and fillets in brine with added intestines.</p> <p>Samples from the trials were subjected to sensory analysis and compared to traditional matjes herring. Furthermore measurements of enzymatic activity were performed, and also, for some samples, measurement of changes in the protein fraction by the use of 2-D electrophoresis.</p> <p>The results reveal interesting effects of the different process parameters on the different product characteristics of lightly salted herring.</p>	

Innhold

1	Introduksjon	1
2	Forsøk.....	2
2.1	Materiale og Metoder	2
2.1.1	Råstoff	2
2.1.2	Forsøksvarianter	2
3	Sensorikk	8
3.1	Mål.....	8
3.2	Materiale og metoder	8
3.2.1	Prøver	8
3.2.2	Prøvetilberedning.....	9
3.2.3	Sensorisk bedømmelse.....	9
3.2.4	Statistikk	10
3.3	Resultater	11
3.3.1	Variansanalyse.....	11
3.3.2	Prinsipal komponent analyse (PCA).....	15
3.4	Diskusjon	17
3.5	Konklusjon	17
4	Enzymer	18
4.1	Mål.....	18
4.2	Materiale og metoder	18
4.2.1	Prøveopparbeidelse	19
4.2.2	Substrat	19
4.2.3	Måling av enzymaktivitet	19
4.3	Resultater	20
4.3.1	Screening av aktivitet i sild og i laker	20
4.4	Diskusjon	21
4.5	Konklusjon	21
5	Proteomanalyse	22
5.1	Mål.....	22
5.2	Materiale og metoder	22
5.2.1	Proteomanalyse.....	22
5.2.2	Prøvemateriale og prøve oparbeidelse	22
5.2.3	Proteinbestemmelse	22
5.2.4	To-dimensional gelelektroforese (2DE).....	23
5.3	Resultater og diskusjon.....	23
5.3.1	Sammenligning af proteinprofiler	23
5.4	Konklusjon	25
6	Sammendrag og konklusjon	26
	Litteratur	27

1 Introduksjon

Bedrifter i pelagisk foredlingssektor ønsker å se nærmere på mulighetene for å produsere matjessild på en mer kostnadseffektiv måte, samtidig som en beholder produktets egenskaper med hensyn til smak, tekstur og kvalitet.

I tradisjonell produksjon benyttes hel, rund nordsjøsil der en fjerner gjeller for blant annet å hindre nedgradering av kvaliteten. Silden legges så i kar for modning i cirka 24 timer, og blir deretter fryst og eksportert for videre bearbeiding. Bearbeidingen består i hovedsak i at den fileteres på en særegen måte, pakkes og fryses deretter inn for andre gang. Nå matjessilden når kunden er den oftest filetert slik at den henger sammen i sporden. Hode, innmat, ryggbein er fjernet. Andre bein registreres ikke ved konsum. Enten er de fjernet fysisk eller så er de blitt myke under prosessen.

Etter at man lyktes med å produsere matjeslignende produkter av filet (beskrevet i Rapport Del 1) er det interessant å undersøke hvorvidt det er mulig å overføre metoden til norsk vårgytende (NVG) sild. Hensikten med denne delen av prosjektet er å undersøke mulighetene for produksjon av et matjeslignende produkt med utgangspunktet i filet av NVG-sild. I disse forsøkene vil vi undersøke om NVG-sild med tilsvarende fettinnhold som matjesråstoff, vil gi et lignende produkt enten ved hjelp av egne enzymer – eller ved hjelp av innvollsenzymer fra nordsjøsil fanget i matjessesongen.

Forsøkene er gjennomført av Nofima, i samarbeid med Danmarks Tekniske Universitet (DTU). Rapporten er satt sammen av delrapporter. Derfor er delen om proteomanalyse skrevet på dansk (av DTU).

Prosjektet er finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF).

2 Forsøk

2.1 Materiale og Metoder

Det ble gjennomført 4 ulike typer forsøk (3 gjentak) ved sildeforedlingsanlegg i Lødingen og på Senjahopen:

- Tradisjonell produksjon med hodekappet fisk
- Produksjon av hodekappet, sløyd fisk
- Produksjon av filet i lake – med innvollsrester fra NVG-sild (eget slo)
- Produksjon av filet i lake – med filetavskjærrester fra nordsjøsil (NS slo)

Forsøkene ble utført den 24. og 25. september, og 23. og 24. oktober, av personell fra Nofima med god assistanse og tilrettelegging fra Nergård og Norway Pelagic.

2.1.1 Råstoff

Råstoffet som ble brukt i forsøkene, ble fanget i høstsesongen. En oversikt over fangst-tidspunkt, fartøy og fangstområde, er vist i Tabell 1.

Tabell 1 Fangstdata

Dato	Fartøy	Fangstdato	Fangstområde	Lossing	
				Begynt	Slutt
24.9.13	Olagutt (brønnbåt)	23.9.	0516	23.9. (08:00)	24.9. (16:30)
25.9.13	Olagutt (brønnbåt)	23.9.	0516	23.9. (08:00)	24.9. (16:30)
23.10.13	Tromsbas	22.10.	3410	23.10. (07:00)	24.10. (13:00)
24.10.13	Ligrunn	23.10.	3704	24.10. (15:00)	25.10. (00:45)

Ved mottak ble fangstene vurdert, og fangst og føringsdata registrert. Dessuten ble råstoffet gradert i henhold til bedriftens graderingssystem. En oppsummering av disse opplysningene er gitt i Tabell 2.

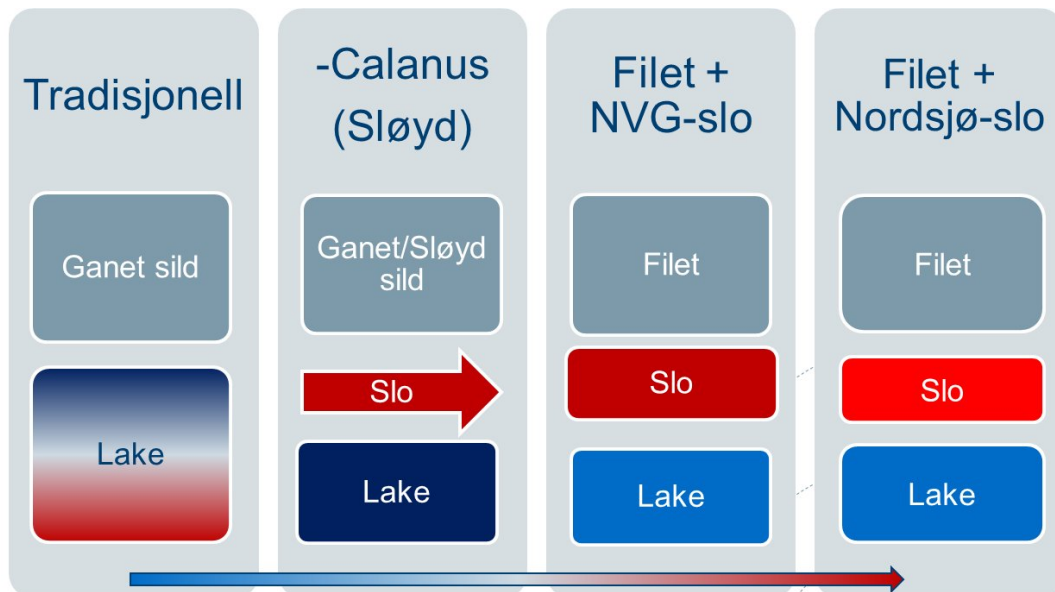
Tabell 2 Råstoffegenskaper

Dato	Fett % (rund)	Fett % (filet)	Temperatur i fisk (°C)		
			I fartøy	Produksjon	Kvalitet*
24.09.13	17,7	20,97	-1,2	-0,6	A
23.10.13		16,94	-1,4		A-
24.10.13		15,88	-1,3		A-

*Se detaljert oversikt over egenskaper i Tabell 3, 5 og 7.

2.1.2 Forsøksvarianter

Forsøkene ble utført i liten skala. Mens en normal batch med matjessild er på 750 kg, ble våre forsøk gjennomført i 1:20 av full skala i 100 liters sildetønner, med 37 kg sild, og tilsvarende justert lakemengde. Det ble produsert 4 ulike varianter som vist i Figur 1.



Figur 1 Skjematisk oversikt over variantene som ble produsert

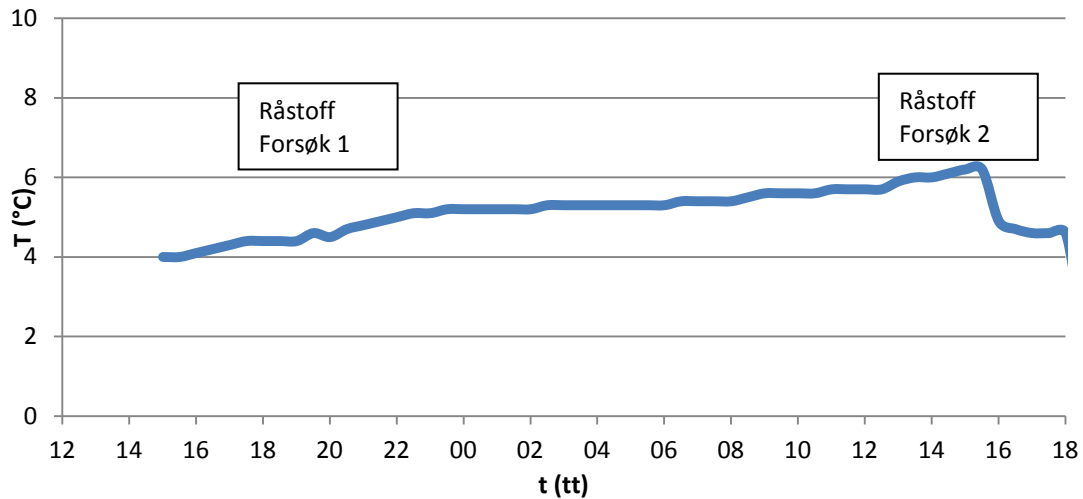
I motsetning til tidligere forsøk, ble sloet i disse forsøkene beholdt i laken under modningen. Dette hadde sammenheng med flere forhold, blant annet mangel på utstyr for å separere slo og lake etter ekstraksjon. Slomengden i noen av forsøkene var dessuten svært liten, slik at det syntes fornuftig å beholde sloet i laken under modningen.

Forsøk 1: 24. september

Råstoff

Hel sild og skinnfri filet ble tatt direkte fra produksjonen. Hel sild (n=92) ble veid. Gjennomsnittsvekten var 177 g +/- 43 g. Størrelsen var velegnet til matjes, men variasjonen noe større enn man kunne ønske.

Ettersom bedriften ikke hadde kjølelager eller is, var oppbevaring i et halvfullt kar (500 L) med RSW, den best tilgjengelige løsningen for å kontrollere lagringstemperaturen. Hel sild og vakuumpakkede «ufrosne», vakumpakkede blokker av skinnnet filet ble oppbevart i karene. Temperaturen ble registrert i et av disse karene, som også ble brukt til tining av nordsjøsiltslo. Dermed holdt temperaturen seg jevnt lav (< 6 °C). Mot slutten av lagringen ble det tilsatt isklumper (se temperaturfall mellom kl. 14 og 16). Temperaturen i karet med filet og nordsjøsiltslo er vist i Figur 2.



Figur 2 Temperaturprofil i lagringskaret med filet og nordsjøsiltslo

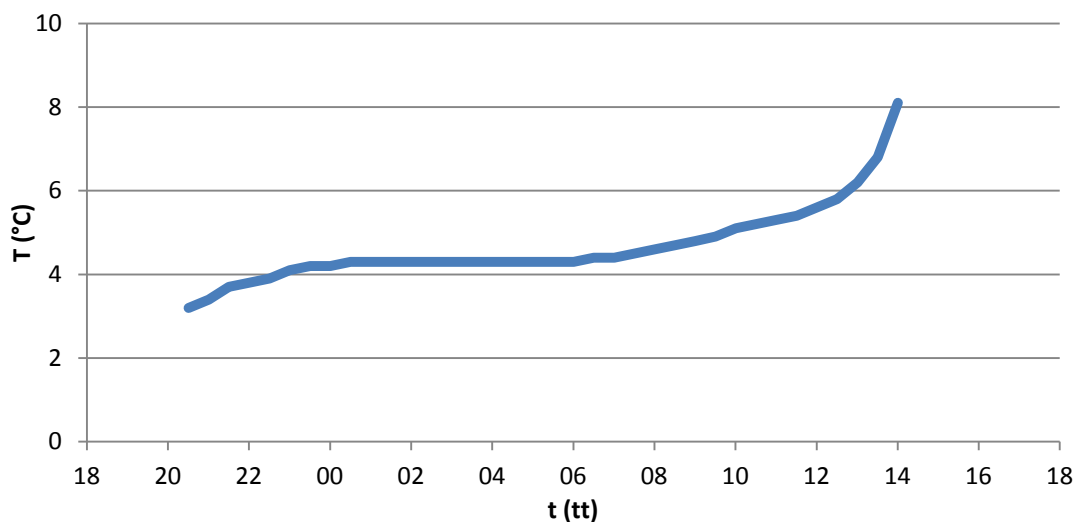
Hodekappet fisk (B) ble lagt direkte i tønner. Dette råstoffet ble dessuten sløyd, og brukt til – Calanus varianten (C). Maskinfileterte, skinnfrie fileter ble lagt i tønner og tilsatt enten lake (7 %) og eget (fra C) slo (D), eller lake med nordsjøsiltsild slo (E). En oversikt er gitt i Tabell 3.

Tabell 3 Oversikt over forsøksvarianter

Forsøksvarianter	Kode	Sild	Lake
Trad matjes	B	37,5 kg hodekappet	7,5 liter 13 % salt
- Calanus	C	37,5 kg hodekappet, sløyd	7,5 liter 13 % salt
NVG- lake	D	37,5 kg skinnfri filet	7,5 liter 13 % salt* (+4.1 kg slo fra C)
Nordsjøsiltsild-lake	E	37,5 kg skinnfri filet	7,5 liter 7 % salt (+ 10 kg slo fra nordsjøsiltsild)

*Skulle ha vært 7 %

Umiddelbart etter tilberedning ble tønnene satt utenfor produksjonslokalet for modning/lagring. Utetemperaturen var < 5 °C. Temperaturen ble registrert i en av tønnene, under hele modningsperioden.



Figur 3 Temperaturprofil i tønna med Trad matjes med lake (13 %)

Forsøk 2: 25. september

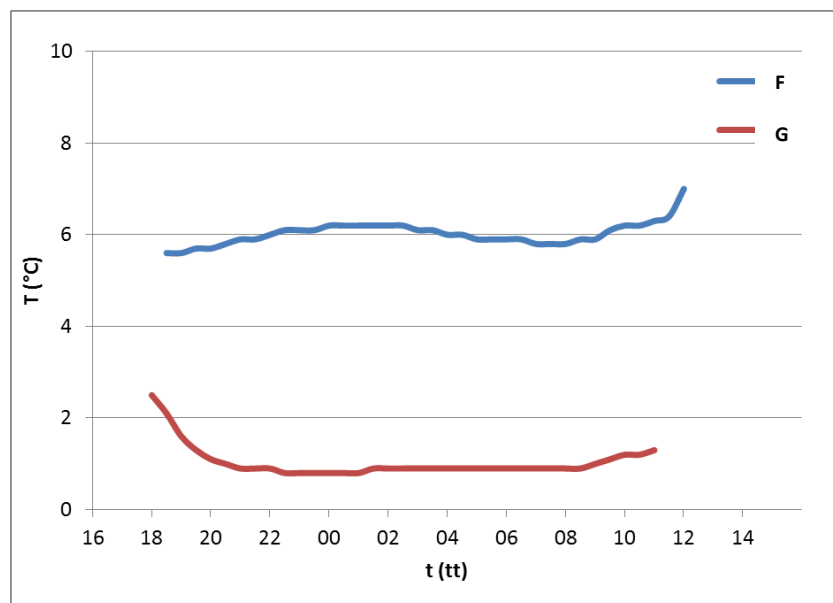
Råstoff

Skinnfrie fileter, produsert den 24. september ble lagt i tønner. En tønne ble tilsatt lake (7 %) (F), og en ble tilsatt lake med nordsjøsiltslo (G). En oversikt er gitt i Tabell 4.

Tabell 4 Oversikt over forsøksvarianter

Forsøksvarianter	Kode	Sild	Lake
Salt- lake	F	37,5 kg skinnfri filet	7,5 liter 7 % salt
nordsjøsiltslo lake	G	37,5 kg skinnfri filet	7,5 liter 7 % salt (+ 10 kg slo fra nordsjøsiltslo)

Temperaturen ble registrert under hele modningsperioden. Temperaturen i tønnene F og G er vist i Figur 4.



Figur 4 Temperaturprofil i tønna med F: Skinnfri filet med lake (5 %, uten slo) og med G: Skinnfri filet med lake og NS slo (delvis frosset)

Forsøk 3: 23. oktober

Råstoff

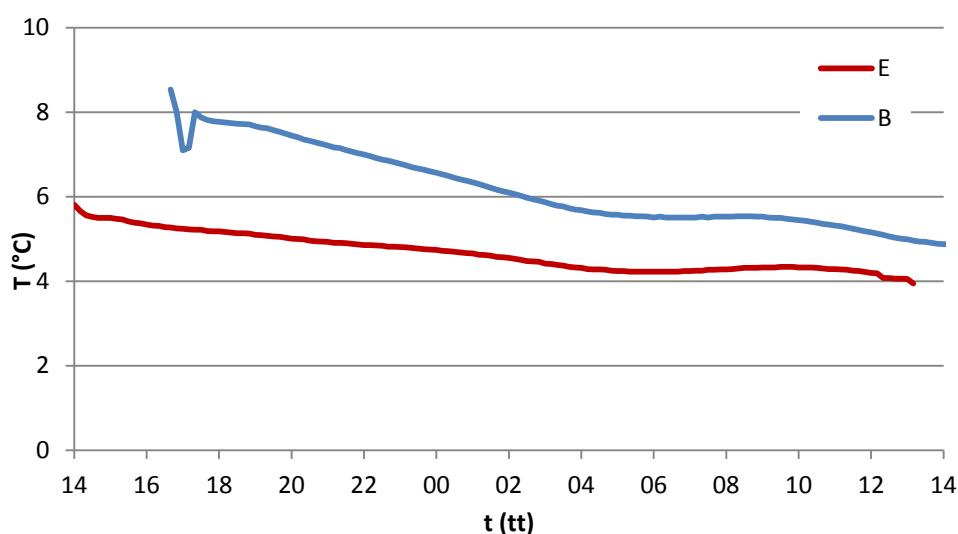
Hel sild og flaps ble tatt direkte fra produksjonen. Gjennomsnittsvekten av hel sild var 383 g +/- 22 g (n=55). Silde anses som større enn man kunne ønske for formålet, men variasjonen var liten. For filetene (flaps) var gjennomsnittsvekten 177 g +/- 20 g.

Hodekappet fisk ble veid og lagt direkte i tønner. Dette råstoffet ble dessuten sløyd, og brukt til – Calanus varianten (C*). Filetene ble maskinfiletert til skinnfrie fileter. Etter veiing ble disse lagt i tønner og tilsatt lake (D*) eller lake med nordsjøsiltslo (E*).

Tabell 5 Oversikt over forsøksvarianter

Forsøksvarianter	Kode	Sild	Lake
Trad matjes	B*	37,5 kg hodekappet	7,5 liter 13 % salt
- Calanus	C*	37,5 kg hodekappet, sløyd	7,5 liter 13 % salt
NVG lake	D*	37,5 kg flaps	7,5 liter 7 % salt (slo fra C*)
Nordsjøsilde -lake	E*	37,5 kg flaps	7,5 liter 7 % salt (+ slo fra nordsjøsilde)

Temperaturen ble registret under hele modningsperioden. En graf som viser temperaturen i to av tønnene, er vist i Figur 5.



Figur 5 Temperaturprofil i ulike forsøktønner (B: Hodekappet, E: Filet + NS slo)

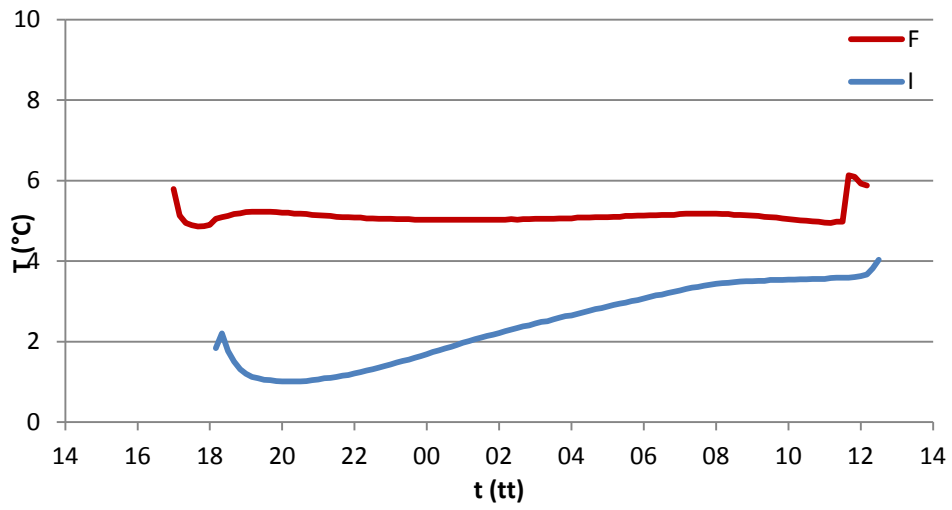
Forsøk 4: 24. oktober

Råstoff til forsøkene ble tatt direkte fra produksjonen. Hodekappet fisk ble veid og lagt direkte i tønner (G*). Dette råstoffet ble dessuten sløyd, og brukt til – Calanus varianten (H*). Filetene ble maskinfileterert til skinnfrie fileter. Etter veiing ble disse lagt i tønner og tilsatt lake (I*) eller lake med nordsjøsilde (J*).

Tabell 6 Oversikt over forsøksvarianter

Forsøksvarianter	Kode	Sild	Lake
Trad matjes	G*	37,5 kg hodekappet	7,5 liter 13 % salt
- Calanus	H*	37,5 kg hodekappet, sløyd	7,5 liter 13 % salt
NVG lake	I*	37,5 kg flaps	7,5 liter 7 % salt (slo fra H)
Nordsjøsilde-lake	J*	37,5 kg flaps	7,5 liter 7 % salt (+ slo fra nordsjøsilde)

Temperaturen ble registret under hele modningsperioden. En graf som viser temperaturen i to av tønnene, er vist i Figur 6



Figur 6 Temperaturprofil i ulike forsøksstønner (F: Tradisjonell matjes, I: Filet + nordsjøsiltslo)

3 Sensorikk

Sensorisk analyse, eller sensorikk, er måling av matens egenskaper ved hjelp av menneskets sanser. Ettersom de karakteristika som kjennetegner en matjessild ikke kan måles eller veies, men er satt sammen av en rekke lukt, smak og teksturegenskaper, var det naturlig å bruke dette verktøyet til å vurdere produktene fra de ulike produksjonsmetodene.

Sensorisk analyse av matjessild inngår i noen grad i Kvalitetsindeksmetoden (QIM), som er beskrevet av Lyhs & Schelvis-Smit (2005), men denne er i hovedsak fokusert på kvalitetsnedbrytning og holdbarhet. Gudmundsdottir & Stefansson (1997) har undersøkt effekten av ganing versus sløyging eller filetering for vanlig kryddersild ved hjelp av sensorisk analyse. De fant at både den ganede og den sløyde silda hadde en betydelig moden smak, som de ikke kunne påvise i saltet filet.

Denne rapporten beskriver resultatene fra de analysene av lettsaltede sildeprodukter, produsert fra NVG-sild, høsten 2013.

3.1 Mål

Kartlegge sensorisk profil av nederlandsk matjessild med ulik produksjonsmetode og fangstdato.

3.2 Materiale og metoder

3.2.1 Prøver

Prøvematerialet til den sensoriske analysen ble produsert den 29. og 30. september samt 22. og 23. oktober.

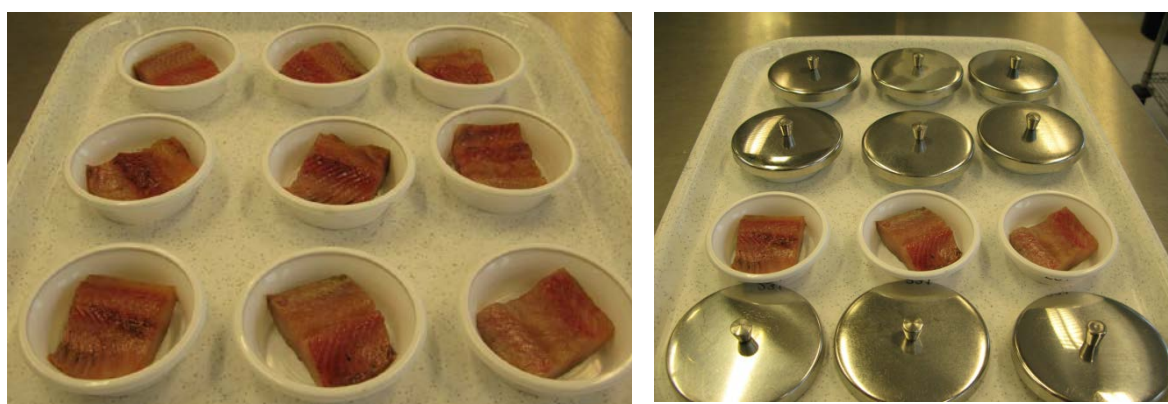
Tabell 7 Oversikt over prøver

Produkt	Gruppering	Lake tilsetning	Dato	Merking
Hodekappet	Hodekappet/sløyd		29.09.13	B
			22.10.13	B*
			23.10.13	G*
Hodekappet – sløyd	Hodekappet/sløyd		29.09.13	C
			22.10.13	C*
			23.10.13	H*
Filet - skinnfri			23.09.13	D
Filet - skinnfri	Filet	Eget slo	22.10.13	D*
Filet - flaps			23.10.13	I*
Filet - skinnfri			29.09.13	E
Filet - skinnfri	Filet	NS slo	22.10.13	E*
Filet - flaps			23.10.13	J*
<i>Filet - skinnfri</i>	<i>Filet</i>		<i>30.09.13</i>	<i>F</i>
<i>Filet - skinnfri</i>		<i>NS slo</i>	<i>30.09.13</i>	<i>G</i>
Kommersielt produkt (matjessild)			15.06.13	Ref

3.2.2 Prøvetilberedning

Analysen ble utført 5.-7. november 2013. Prøvene ble levert i uke 45 og satt på fryserom. Hver prøve var frosset inn i sin lake og vakuumbestemt i poser (hver prøve bestod av 2 poser). Posene ble lagt i et kar med kontinuerlig tilførsel av vann for tining dagen før analyse. Den tinte silden ble oppbevart på is i kjølerom (+ 4 °C) i påvente tilberedning. 5 fisk (10 fileter av skinnfrie fileter) av hel sild ble så filetert på tradisjonell måte. Filetene ble kuttet opp i 2 biter à 4 cm og samlet opp i en plastbakke. Bitene ble tilfeldig lagt opp i kodede plastikkskåler med lokk, 1 bit per dommer, og servert dommerne (Figur 5).

Ved kalibreringen av det sensoriske panelet den 5. november ble Referanse og variant D* benyttet. I hovedforsøket den 6. og 7. november fikk dommerne servert totalt 30 prøver, 15 sorter i 2 gjentak (pose 1 = gjentak 1 og pose 2 = gjentak 2) fordelt på 9 sesjoner. Temperaturen på prøvene ved servering var + 18 °C (± 2 °C). Alle prøver ble randomisert med hensyn til prøve, dommer og pose.



Figur 7 Prøver til sensorisk bedømmelse

3.2.3 Sensorisk bedømmelse

Det ble utført en beskrivende test i henhold til metoden (ISO 13299:2003) Nofimas sensoriske laboratorium er akkreditert for gjennomføring av metoden, og 23 sensoriske egenskaper ble bedømt på en skala fra 1–9 (1=ingen intensitet, 9=tydelig intensitet)

Bedømmelsen ble utført av et trent sensorisk panel bestående av 8 personer.

Sensoriske egenskaper som ble bedømt er beskrevet nedenfor.

Lukt

6 ulike lukteegenskaper ble beskrevet i analysen:

Syrliglukt	Relateres til en frisk, sur-søt lukt.
Metalllukt	Lukt av metall (ferrosulfat).
Sjølukt	Relateres til lukt av frisk, salt sjø.
Fiskeoljelukt	Relateres til lukt av fiskeolje.
Moden lukt	Relateres til en balansert rund lukt av modnet fisk.
Harsk lukt	Relateres til lukt av oksiderte fettstoff (gress, høy, stearin, maling).

Smak

11 ulike smaksegenskaper ble beskrevet i analysen:

Syrligsmak	Relateres til en frisk, sur-søt smak.
Søt smak	Relateres til grunnsmaken søt (sukrose).
Saltsmak	Relateres til grunnsmaken salt (koksalt).
Bittersmak	Relateres til grunnsmaken bitter (koffein).
Umamismak	Relateres til grunnsmaken umami.
Metallsmak	Smak av metall (ferrosulfat).
Sjøsmak	Relateres til smak av frisk, salt sjø.
Fiskeoljesmak	Relateres til smak av fiskeolje.
Emmensmak	En ufrisk/flau/lite aromatisk/kvalmende smak.
Moden smak	Relateres til en balansert rund smak av modnet fisk.
Harsk smak	Styrken av alle harske smaker (gress, høy, stearin, maling).

Tekstur

5 ulike teksturegenskaper ble beskrevet i analysen. I tillegg var 2 parametere som omhandlet forekomst og hardhet av fiskeben i prøvene inkludert.

Saftighet	Overflateteksturell egenskap som beskriver væske absorbert av eller avgitt fra et produkt. Væske avgitt fra prøven, bedømt etter 4–5 tygg.
Hardhet	Relatert til den kraft som må til for å bite gjennom prøven. Bedømmes med jekslene ved 1. bitt.
Mørhet	Relatert til den tid og antall tygginger som er nødvendig for å finfordele prøven klar til svelging.
Fethet	Overflateteksturell egenskap relatert til mengde eller kvalitet på fett i et produkt. En fet, oljeaktig fornemmelse fra prøven i munnen etter 4–5 tygg.
Antall ben	Relateres følelsen av antall ben i prøven under tygging.
Hardhet ben	Mekanisk teksturegenskap relatert til kraft som må til for å bite gjennom benene. Bedømmes ved 1. bitt.

3.2.4 Statistikk

Dataene ble analysert ved hjelp av variansanalyse (ANOVA). ANOVA tester ved hjelp av F-tester om det er signifikante forskjeller mellom gruppene for hver av de sensoriske egenskapene. I denne rapporten betyr signifikant forskjell at det er signifikant forskjell på 5 %-nivå ($p=0,05$). For de egenskapene hvor F-testen er signifikant, utføres i tillegg Tukey's multiple sammenligningstest for å avgjøre hvilke prøver som er forskjellige. Hvis differansen mellom 2 middelværdier er større enn den kritiske verdien testen beregner, betyr det at disse 2 gruppene er signifikant forskjellige.

Resultatene er oppsummert ved hjelp av middelerverdier og p-verdier. Middelerverdiene er et gjennomsnitt av 8 dommere og 2 gjentak/prøve. Dataprogrammene som ble benyttet var Unscrambler® X10.2 (Camo Software AS, Oslo, Norge) og SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

3.3 Resultater

3.3.1 Variansanalyse

Detaljerte resultater fra den sensoriske analysen, med notasjoner fra variansanalysen, er presentert i tabellene som følger:

Lukt

Tabell 8 Resultater fra bedømmelsen av luktegenskapene: Syrlig, Metall, Sjø, Fiskeolje, Moden og Harsk

Prøve	Råstoff	Lake	Lukt					
	Prosess	tilsetn.	Syrlig	Metall	Sjø	Fiskeolje	Moden	Harsk
B	Hodekappet		3,49	4,51	2,68	3,79	3,99 ^a	2,80
B*	Hodekappet		2,81	4,40	2,09	3,84	2,97 ^{ab}	3,16
G*	Hodekappet		2,70	4,64	1,99	4,19	3,37 ^{ab}	4,03
C	Hodekappet - sløyd		2,91	4,34	2,20	3,99	3,16 ^{ab}	3,05
C*	Hodekappet - sløyd		2,93	4,46	1,99	4,33	3,41 ^{ab}	3,25
H*	Hodekappet - sløyd		3,12	4,33	2,09	4,26	3,34 ^{ab}	3,50
D	Filet - skinnfri	Eget slo	3,08	4,09	2,43	4,11	2,77 ^{ab}	2,73
D*	Filet - skinnfri	Eget slo	2,43	4,16	2,21	4,19	2,43 ^b	3,36
I*	Filet - flaps	Eget slo	3,17	3,93	2,42	4,02	2,34 ^b	2,32
E	Filet - skinnfri	NS slo	3,69	3,77	2,81	4,14	2,89 ^{ab}	1,79
E*	Filet - skinnfri	NS slo	2,93	4,04	2,28	4,66	2,63 ^{ab}	2,99
J*	Filet - flaps	NS slo	2,83	4,19	2,29	4,24	2,55 ^b	2,50
F	Filet - skinnfri		3,13	4,14	2,76	4,24	2,14 ^b	2,70
G	Filet - skinnfri	NS slo	2,91	4,14	2,32	3,92	2,82 ^{ab}	2,64
Ref	Matjessild		2,87	4,46	1,99	4,50	3,49 ^{ab}	3,36
p			0,7883	0,0546	0,2454	0,7355	0,0025	0,3408
c			-	-	-	-	1,411	-
	Prosess		Syrlig	Metall	Sjø	Fiskeolje	Moden	Harsk
	Hodekappet/sløyd		2,99	4,45 ^a	2,18	4,07	3,38 ^a	3,30
	Filet		3,02	4,06 ^a	2,44	4,19	2,57 ^a	2,63
	Referanse (matjessild)		2,87	4,46 ^a	1,99	4,50	3,49 ^a	3,36
p			0,9515	0,0194	0,0780	0,3529	0,0046	0,0894
c			-	0,566	-	-	0,949	-

Hvis p-verdien er lavere enn 0,05 er det en signifikant forskjell mellom prøvene på 5 %-nivå for denne egenskapen. Prøver med samme bokstav er ikke signifikant forskjellige. For sammenlikning mellom prosesser for metallukt og moden lukt gir variansanalysen signifikant utslag. Til tross for dette klarer ikke Tukey's test å avsløre hvilke prosesser som er forskjellige.

Av luktegenskapene var det kun moden lukt som var signifikant forskjellig ($p=0,0025$) for prøvene. Hodekappet sild fra forsøk 1 (B) hadde signifikant mer modenlukt enn filet i saltlake (F) fra forsøk med samme råstoff, og filet i eget slo (D* og I*) og flaps i nordsjøsiltslo (J*). For prosesser var $p<0,05$ for både metallukt og moden lukt, men Tukey's test klarte ikke å avsløre hvilke prosesser som var forskjellige.

Smak

Tabell 9 Resultater fra bedømmelsen av følgende smaksegenskaper: Syrlig, Søt, Salt, Bitter, Umami og Metall

Prøve	Råstoff		Smak					
	Prosess	Lake tilsetn.	Syrlig	Søt	Salt	Bitter	Umami	Metall
B	Hodekappet		3,73	3,74 ^a	3,36 ^e	3,89	4,32 ^a	3,88
B*	Hodekappet		3,22	3,20 ^a	3,66 ^{cde}	4,05	3,29 ^{ab}	4,26
G*	Hodekappet		3,08	3,42 ^a	3,53 ^{de}	4,08	3,79 ^{ab}	4,13
C	Hodekappet - sløyd		3,18	3,52 ^a	3,39 ^e	3,94	3,44 ^{ab}	3,88
C*	Hodekappet - sløyd		3,23	3,44 ^a	4,24 ^{bcd}	4,16	3,66 ^{ab}	3,96
H*	Hodekappet - sløyd		3,36	3,58 ^a	3,94 ^{cde}	3,73	3,77 ^{ab}	4,31
D	Filet - skinnfri	Eget slo	3,76	3,16 ^a	4,61 ^{abc}	4,27	3,49 ^{ab}	4,07
D*	Filet - skinnfri	Eget slo	2,96	3,03 ^a	5,39 ^a	4,46	2,93 ^b	3,94
I*	Filet - flaps	Eget slo	3,63	3,02 ^a	5,06 ^{ab}	4,27	3,12 ^{ab}	3,83
E	Filet - skinnfri	NS slo	3,91	3,18 ^a	3,71 ^{cde}	4,48	3,42 ^{ab}	3,69
E*	Filet - skinnfri	NS slo	3,11	3,08 ^a	4,53 ^{abcd}	4,86	3,06 ^b	3,80
J*	Filet - flaps	NS slo	3,17	3,09 ^a	4,29 ^{bcd}	4,09	3,39 ^{ab}	3,74
F	Filet - skinnfri		3,56	3,03 ^a	4,18 ^{bcd}	4,20	3,48 ^{ab}	3,91
G	Filet - skinnfri	NS slo	3,01	3,43 ^a	3,70 ^{cde}	4,43	3,51 ^{ab}	4,04
Ref	Matjessild		3,08	3,60 ^a	3,75 ^{cde}	4,24	3,81 ^{ab}	3,96
p			0,8164	0,0438	<0,0001	0,2519	0,0354	0,5261
c			-	0,856	1,044	-	1,210	-
Prosess			Syrlig	Søt	Salt	Bitter	Umami	Metall
Hodekappet			3,30	3,48 ^{ab}	3,69 ^b	3,98	3,71 ^a	4,07
Filet			3,39	3,13 ^b	4,43 ^a	4,38	3,30 ^a	3,88
Referanse (matjessild)			3,08	3,60 ^a	3,75 ^b	4,24	3,81 ^a	3,96
p			0,7913	0,0041	<0,0001	0,1808	0,0403	0,3086
c			-	0,379	0,492	-	0,705	-

Hvis p-verdien er lavere enn 0,05 er det en signifikant forskjell mellom prøvene på 5 %-nivå for denne egenskapen. Prøver med samme bokstav er ikke signifikant forskjellige. For sammenlikning mellom prøver for søtsmak og mellom prosesser for umamismak gir variansanalysen signifikant utslag. Til tross for dette klarer ikke Tukey's test å avsløre hvilke prosesser som er forskjellige.

Smaksegenskapene syrlig smak, bitter smak, umami- og metall-smak ble ikke bedømt til å være signifikant forskjellig i enkeltprøvene. Søtsmak ga $p < 0,05$ uten at Tukey's test klarte å avsløre hvor forskjellige var. Gruppevis ble referansen bedømt til å være søtere enn Filet.

For saltsmak var det signifikante forskjeller mellom prosessene. Hodekappet og referansen ble bedømt som mindre salt enn filet. Blant enkeltprøvene var det filetene i eget slo som ble bedømt som saltest, og med prøve D* som aller saltest, signifikant saltere enn de fleste andre prøvene, inkludert referansen.

De minst salte prøvene var de hodekappede fra forsøk 1 (Prøve B og C). Imidlertid var det her mye overlapping mellom enkelt prøvene.

Det var en del dommerkommentarer til prøvene. De fleste prøvene, inkludert referansen, hadde kommentarer (2) på at de luktet brygge. Mange ble også oppfattet å avgi en lukt av gummi. Det gjaldt ikke referansen, og det var ingen systematikk med hensyn på behandling.

Tabell 10 Resultater fra bedømmelsen av smakene: Sjø, Fiskeolje, Emmen, Moden og Harsk

Prøve	Råstoff Prosess	Lake tilsetn.	Smak				
			Sjø	Fiskeolje	Emmen	Moden	Harsk
B	Hodekappet		2,71	3,68	1,62	4,99 ^a	2,29
B*	Hodekappet		2,20	4,00	1,39	3,14 ^{bc}	3,24
G*	Hodekappet		2,16	4,18	1,47	3,83 ^{ab}	3,20
C	Hodekappet - sløyd		2,30	3,85	1,65	3,34 ^{bc}	3,06
C*	Hodekappet - sløyd		2,10	4,13	1,16	3,95 ^{ab}	3,08
H*	Hodekappet - sløyd		2,41	4,39	1,29	3,82 ^{ab}	3,31
D	Filet - skinnfri	Eget slo	2,56	3,99	1,01	3,08 ^{bc}	2,27
D*	Filet - skinnfri	Eget slo	2,24	4,11	1,01	2,29 ^c	3,14
I*	Filet - flaps	Eget slo	2,50	3,88	1,09	2,59 ^{bc}	2,08
E	Filet - skinnfri	NS slo	2,67	4,26	1,46	3,41 ^{bc}	1,66
E*	Filet - skinnfri	NS slo	2,09	4,08	1,43	3,21 ^{bc}	2,43
J*	Filet - flaps	NS slo	2,12	4,34	1,19	3,04 ^{bc}	2,16
F	Filet - skinnfri		2,68	4,61	1,11	2,64 ^{bc}	2,63
G	Filet - skinnfri	NS slo	2,40	4,09	1,33	3,39 ^{bc}	2,27
Ref	Matjessild		1,93	4,18	1,81	4,02 ^{ab}	3,06
	p		0,6168	0,6506	0,6624	<0,0001	0,6355
	c		-	-	-	1,438	-
	Prosess		Sjø	Fiskeolje	Emmen	Moden	Harsk
	Hodekappet/sløyd		2,31	4,04	1,43	3,84 ^a	3,03
	Filet		2,41	4,17	1,20	2,96 ^b	2,33
	Referanse (matjessild)		1,93	4,18	1,81	4,02 ^a	3,06
	p		0,3416	0,6430	0,2180	0,0006	0,2430
	c		-	-	-	0,705	-

Hvis p-verdien er lavere en 0,05 er det en signifikant forskjell mellom prøvene på 5 %-nivå for denne egenskapen. Prøver med samme bokstav er ikke signifikant forskjellige.

Smaksegenskapene sjøsmak, fiskeoljesmak, emmensmak og harsksmak ble de ikke bedømt å være signifikant forskjellige for noen av prøvene. For modensmak, derimot, var det signifikante forskjeller. Prøve B ble bedømt som mest moden, om enn ikke signifikant mer moden enn referansen. Ingen av de hodekappede prøvene hadde signifikant mindre modensmak enn referansen. Det hadde imidlertid D* (filet tilsatt eget slo). Ser vi på prosessene, så hadde Filet signifikant mindre moden smak enn både Hodekappet og referansen.

Tekstur

Tabell 11 Resultater fra bedømmelsen av teksturegenskapene: Hardhet, Mørhet, Fethet, Saftighet samt Antall fiskeben og Hardhet på disse

Prøve	Prosess	Lake		Tekstur			Fiskeben	
		tilsetn.	Hardhet	Mørhet	Fethet	Saftighet	Antall	Hardhet
B	Hodekappet		3,36 ^c	6,74 ^a	5,01 ^c	5,31 ^{bcd}	3,64	3,37
B*	Hodekappet		4,56 ^{ab}	5,74 ^{abc}	4,50 ^c	5,02 ^d	3,65	3,67
G*	Hodekappet		4,09 ^{abc}	6,18 ^{abc}	5,09 ^c	5,43 ^{abcd}	4,09	3,78
C	Hodekappet - sløyd		4,03 ^{abc}	6,21 ^{abc}	4,86 ^c	5,03 ^d	4,36	4,45
C*	Hodekappet - sløyd		4,61 ^{ab}	5,74 ^{abc}	4,87 ^c	5,25 ^{cd}	3,97	3,86
H*	Hodekappet - sløyd		4,21 ^{abc}	5,91 ^{abc}	5,16 ^c	5,34 ^{abcd}	3,68	3,82
D	Filet - skinnfri	Eget slo	4,25 ^{abc}	5,80 ^{abc}	4,94 ^c	5,32 ^{abcd}	3,91	3,89
D*	Filet - skinnfri	Eget slo	4,66 ^a	5,61 ^c	4,96 ^c	5,36 ^{abcd}	4,26	4,04
I*	Filet - flaps	Eget slo	4,53 ^{ab}	5,63 ^{bc}	4,86 ^c	5,16 ^d	3,81	3,49
E	Filet - skinnfri	NS slo	3,29 ^c	6,73 ^a	6,04 ^{ab}	6,12 ^{ab}	4,26	3,95
E*	Filet - skinnfri	NS slo	3,97 ^{abc}	6,19 ^{abc}	6,21 ^a	6,17 ^a	4,81	4,36
J*	Filet - flaps	NS slo	4,15 ^{abc}	5,99 ^{abc}	6,09 ^a	5,76 ^{abcd}	4,38	4,20
F	Filet - skinnfri		4,06 ^{abc}	5,89 ^{abc}	4,98 ^c	5,33 ^{abcd}	4,01	3,83
G	Filet - skinnfri	NS slo	3,18 ^c	6,76 ^a	6,26 ^a	6,08 ^{abc}	3,88	3,71
Ref	Matjessild		3,51 ^{bc}	6,72 ^{ab}	5,18 ^{bc}	5,63 ^{abcd}	3,37	3,14
	p		0,0007	0,0008	<0,0001	<0,0001	0,2373	0,1193
	c		1,117	1,097	0,878	0,844	-	-
Prosess			Hardhet	Mørhet	Fethet	Saftighet	Antall (ben)	Hardhet
Hodekappet/sløyd			4,14	6,09 ^b	4,91 ^b	5,23 ^b	3,90	3,82
Filet			4,01	6,08 ^b	5,54 ^a	5,66 ^a	4,16	3,93
Referanse (matjessild)			3,51	6,72 ^a	5,18 ^{ab}	5,63 ^{ab}	3,37	3,14
p			0,0557	0,0438	0,0006	0,0020	0,0759	0,0851
c			-	0,543	0,554	0,423	-	-

Hvis p-verdien er lavere enn 0,05 er det en signifikant forskjell mellom prøvene på 5 %-nivå for denne egenskapen. Prøver med samme bokstav er ikke signifikant forskjellige.

Resultatene viser at prøvene fra forsøk 3 (B*, C* og D*) var blant de hardeste. Dette gjelder imidlertid ikke for E*, som var tilsatt nordsjøsiltslo. E* er imidlertid ikke signifikant mindre hard enn B*, C* og D*. Men B (Hodekappet), E og G (Skinnfri filet tilsatt NS slo), fra forsøk 1 og 2 er signifikant mindre hard enn B*, C* og D*. Referansen ble bedømt til å være noe (men ikke signifikant) hardere enn B, E og G, men kun signifikant mindre hard enn D*.

B (Hodekappet), E og G (Skinnfri filet tilsatt NS slo), fra forsøk 1 og 2, ble også bedømt til å være de møreste, sammen med referansen. Den minst møre prøven var D* (filet i eget slo).

Filetene som ble bedømt som fetest var behandlet med nordsjøsiltslo. Disse er ikke signifikant fetere enn referansen, men signifikant fetere enn nesten alle de resterende prøvene. Dette er påfallende ettersom de er laget av samme råstoff (med samme fettinnhold) som de andre prøvene. Det kan ha sammenheng med at det ytterste sjiktet på fileten et brutt ned, slik at fett frigjøres og blir liggende som en hinne på overflaten, og dermed bidrar til at prøvene oppleves som fete.

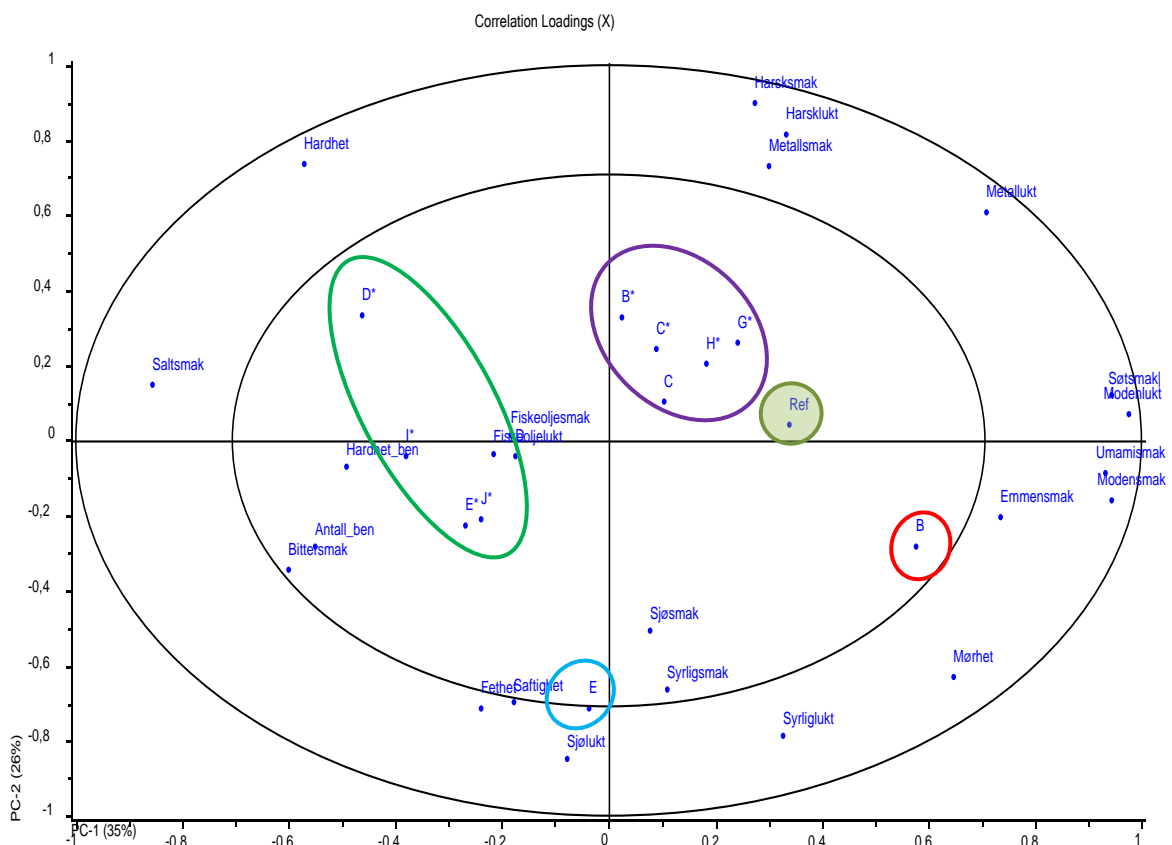
Filetene som var behandlet med nordsjøsilddlo ble også bedømt som saftigst. Blant de minst saftige var B* (Hodekappet) og C (Hodekappet – sløyd). Disse var signifikant mindre saftige enn de først nevnte, men ingen av prøvene skilte seg signifikant fra referansen.

Flere dommere kommenterte at prøver som var tilsatt nordsjøsildd-enzym var «slimete» og eller «glatte/oljete».

3.3.2 Prinsippal komponent analyse (PCA)

PCA ser på alle egenskaper samtidig og viser totalbildet av dataene. Egenskapene i nærheten av en prøve beskriver hva som er typisk for denne prøven.

Ettersom råstoffet som ble brukt den 30. september var filetert dagen før og i og med at vi ikke hadde hel sild tilgjengelig kunne vi ikke lage et fullstendig forsøksoppsett denne dagen. Derfor ble resultatene fra den 30. september holdt utenfor PCA-data-analysen.



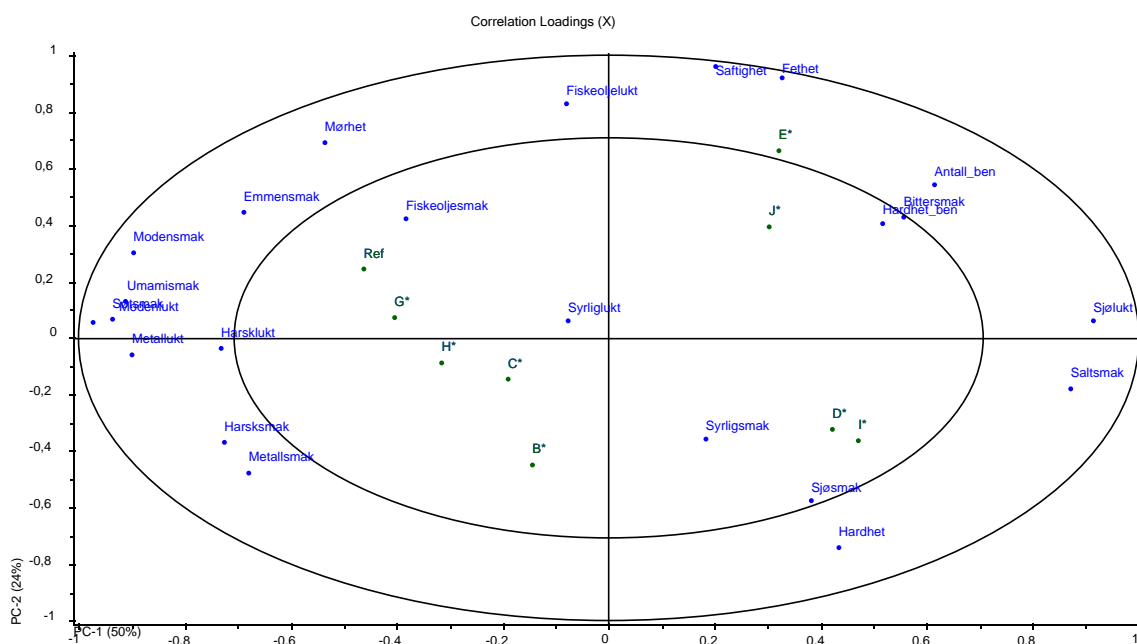
Figur 8 PCA-plot over prøver fra 3 forsøk, relatert til sensoriske egenskaper

Resultatene av prinsipalkomponent analysen og data fra 23. september, samt fra 22. og 23. oktober (Figur 8) viser at 35 % av variasjonen forklares langs PC1 som viser de viktigste forskjellene og 26 % av variasjonen forklares langs PC2 som viser de nest viktigste forskjellene. (Vær oppmerksom på at skalaer ikke bør tolkes direkte. Figuren illustrerer kun forholdet mellom prøver og egenskaper.)

Figuren viser en gruppering av hodekappet og hodekappet/sløyd (C, B*, C*, G*, H*). Disse ser ut til å ha mindre saltsmak og mer modensmak enn filet (D*, E*, I*, J*), men mindre modensmak enn referansen. To av prøvene fra forsøk 1 (22. september) skiller seg veldig mye fra resten; sløyd sild (oppfattes å ha mer modensmak og å være mørere enn Referansen. Mens fileten tilsatt nordsjøsiltslo i laken (E) oppfattes desidert fetest og mørest.

På tross av at forsøk 3 og 4 skilte seg fra hverandre ved at det i forsøk 3 ble brukt (manuelt) skinnert fileten, mens det i forsøk 4 ble brukt flaps, viste den initiale dataanalysen (over), at disse to variantene skilte seg mindre fra hverandre enn fra prøvene fra forsøk 1. Variansanalysen ble derfor foretatt på nytt, med data kun fra forsøk 3 og 4, i tillegg til referansen. Men den ga ingen ytterligere informasjon.

Resultatet av en prinsipalkomponentanalyse på det samme utvalget av prøver er vist i Figur 9.



Figur 9 PCA-plot over prøver fra 2 forsøk med NVG-sild, relatert til sensoriske egenskaper

Plottet viser stort sett den samme grupperingen som figur 8. Men vi ser en tydeligere separasjon av fileter fra laker med eget slo versus prøver med lake tilsatt nordsjøsiltslo. Mens prøver med eget slo (D*, I*) karakteriseres av sjøsma og hardhet, er saftighet og fetthet karakteristikk som preger fileter i nordsjøsiltslake.

3.4 Diskusjon

Som nevnt så skilte råstoffet som ble brukt i forsøk 1 og 2 seg vesentlig fra det råstoffet som ble brukt i forsøk 3 og 4. Først og fremst når det gjelder størrelse. Silda i forsøk 3 og 4 var mer enn dobbelt så stor som den som ble brukt i forsøk 1 og 2. Mest sannsynlig var sistnevnte også en kystsild, og ikke NVG. Den var dessuten låssatt i 3 døgn før den ble ilandført, og dermed var tarminnholdet svært begrenset. Denne silda oppnådde en smaksprofil som var ganske nær matjessild når den ble modnet hodekappet. Flere av filetproduktene av kystsilda skilte seg imidlertid betydelig, både fra matjessild og fra de produktene som ble laget av NVG-sild.

At NVG-filetene som er behandlet med nordsjøsildslo konsekvent bedømmes til å ha mer fethet er påfallende ettersom de er laget av samme råstoff som de andre prøvene. Det var imidlertid en effekt som også kunne observeres for nordsjøsild behandlet med enzymer. Det kan ha sammenheng med at det ytterste sjiktet på fileten et brutt ned, slik at fett frigjøres og blir liggende som en hinne på overflaten, og dermed bidrar til at prøvene oppleves som fete.

Til forskjell fra tidligere forsøk er slo-fraksjonen til stede i laken under modningen. Det kan ha gitt seg utslag i de sensoriske egenskapene. Vi ser flere dommerkommentarer enn det vi så i forsøk med nordsjøsild. De prøvene som har tilsatt nordsjøsildslo, har flest kommentarer. Det kan også ha sammenheng med at sloet ble tint under ikke alltid like kontrollerte betingelser. I forsøk 2 var det nok tint i flere timer før bruk, og autolysen (nedbrytningen) i fraksjonen kan ha tilført uønskede komponenter til laken og dermed produktene.

3.5 Konklusjon

Det ble brukt to ulike typer råstoff til forsøkene. Kystsilda, som ble brukt til forsøk 1 og 2, var nærmest i størrelse til den silda som normalt brukes til matjessild. Denne silda oppnådde en smaksprofil som var ganske nær matjessild når den ble modnet på tilsvarende måte (hodekappet). Filetproduktene skilte seg imidlertid betydelig, både fra matjessild og fra de produktene som ble laget av NVG-sild.

NVG-silda var feit, men betydelig større enn den som normalt brukes til matjes. Den sensoriske analysen indikerer at Hodekappet/sløyd gir de prøvene som ligner mest på matjessild, med hensyn til modensmak og teksturegenskaper. Tilsats av enzymer fra nordsjøsild medfører en lignende effekt på NVG-sild som den man kunne observere for nordsjøsild; filetene blir mørere og oppleves feitere. Men for øvrig indikerte den sensoriske bedømmelsen at de skilte seg ganske mye fra matjessild.

Det kan synes som om tilstedeværelsen av innvollsfraksjonen (nordsjøsildslo spesielt) ikke var spesielt gunstig. Det er blant annet utslag på bittersmak som kan ha sammenheng med dette. Men også kommentarer til flere av disse prøvene tilsier at denne prosessendringen kan ha negativ effekt på lukt og smak.

4 Enzymer

Sildemodning er et komplisert samspill mellom kjemiske og enzymatiske reaksjoner. Ytre faktorer som salting, temperatur og mekanisk påvirkning, vil også ha stor betydning for sluttproduktets kvalitet. Det er likevel klart at aktivitet av proteolytiske enzymer i råstoff og lake vil ha spesielt stor betydning for kvaliteten.

Proteinet i muskel kan deles inn i tre hovedgrupper; myofibrillprotein (cirka 80 %), bindevevsprotein (cirka 2 %) og sarkoplasma protein (cirka 20 %). De to første gruppene gir muskelen strukturell styrke, og enzymatisk nedbrytning av disse proteinene vil være avgjørende for kvaliteten av det modnede produktet.

Det som finnes av tilgjengelig studier på endringer under salting av sild, er stort sett utført på salteprosesser med høyere saltkonsentrasjoner, og over lengre tid enn hva som er tilfelle for matjessild (Olsen & Skara, 1997; Schubring & Oehlschläger, 1997; Stefansson *et al.*, 2000). Også enzymer som kan tenkes å forårsake noen av endringene under salte- og modningsprosessen, er studert (Engvang & Nielsen, 2000; Nielsen & Nielsen, 2002). Et viktig element i salteprosesser, er opptak av salt og vann. Prosessmessig påvirkes begge komponenter av faktorer som temperatur, fettinnhold i fileten, skinn, filetering (Birkeland *et al.*, 2005). Men også smaksmessig har disse komponentene stor betydning.

Det er grunn til å tro at det vil være fordelaktig med betydelig nedbrytning av bindevevsprotein uten at for mye myofibrillprotein blir brutt ned. Dermed kan sluttproduktet få en "myk" struktur uten at for mye muskelprotein går tapt.

4.1 Mål

Med utgangspunkt i problemstillingene nevnt i introduksjonen var det en rekke spørsmål relatert til enzymaktivitet, som vi søkte å finne svar på.

Hva skjer med NVG-sild når den legges i lake på tilsvarende måte som nordsjø-sild til matjesproduksjon? Dersom det skjer enzymatiske endringer som påvirker de sensoriske egenskapene, i hvor stor grad er disse forårsaket av tilstedeværelsen av innvollsenzymer?

4.2 Materiale og metoder

Det er foretatt enzymmålinger som forteller noe om aktiviteten i forhold til nedbrytning av muskel og bindevevsproteiner i råstoffer og laker som er benyttet ved framstilling av matjessild. For å påvise aktivitet som kan bryte ned henholdsvis bindevev og myofibrillproteiner, er det brukt gelatin fra torskeskinn og myofibrillproteiner fra torskemuskel. Mens myofibrillproteinet langt på vei vil være nativt (udenaturert), er gelatinet en denaturert form av det native kollagenet som finnes i frisk muskelstruktur. Dermed kan man ikke ukritisk hevde at en høy aktivitet målt mot gelatin nødvendigvis trenger å bety en høy aktivitet mot intakte bindevevsstrukturer i muskelen. I en studie med begrenset omfang, slik som dette, vil det likevel være nyttig å se på nedbrytning av gelatin, fordi den i alle fall er en god indikasjon på aktiviteter som kan bryte ned fiskens bindevev.

Ettersom dette er del 2 av arbeidet som startet med studier av nordsjøsil, ble det både ved opparbeidelse og måling lagt vekt på at betingelsene skulle være mest mulig like de betingelser som ble benyttet ved forsøk utført med matjessild høsten 2012. Prøver fra forsøk 3 og 4 er analysert. Prøver fra forsøk 1 og 2 er utelatt blant annet på grunn av manglende temperaturkontroll på råstoff og modningsprosess, og fordi ekstra arbeid knyttet til enkeltanalyser i del 1 medførte begrensede ressurser til del 2.

4.2.1 Prøveoppbeidelse

Fileter og laker fra NVG-sild ble mottatt som frosne prøver i oktober 2013. Fileter ble tatt ut, enten før prosess (Råstoff) eller etter endt prosess i tønna – etter 18–24 timer. Alle lakeprøvene ble tatt ut etter endt prosess i tønna. Prøvene ble frosset inn umiddelbart etter uttak og lagret ved -25 °C. De ble tint ved cirka 3 °C i cirka 24 timer. Homogeniseringen ble foretatt med kjøttkvern. Fra homogenisatet ble 100 g prøve suspendert i 400 ml destillert vann ved cirka 10 °C og rørt en time før sentrifugering (40 min, 7000xg, cirka 4 °C). Supernatantprøver ble fryselagret ved -25 °C inntil enzymmålinger ble utført.

4.2.2 Substrat

Det finnes en rekke kunstig framstilte substrater for bestemmelse av enzym-aktivitet. Og det finnes standard-substrater som for eksempel bovin serum albumin, basert på en komponent fra storfe-blod. Til dette forsøket ble det imidlertid brukt substrater fra torsk. Både bindevev og muskelproteiner skiller seg noe fra dem man finner i sild, men ettersom man hadde gode rutiner og lang erfaring med akkurat disse substratene, ble dette vurdert som den beste løsningen.

Bindevev (Gelatin)

Etter mange vasketrinn ble gelatin ekstrahert fra torskeskinn under svakt sure betingelser ved cirka 55 °C, i hovedsak slik som beskrevet av Gudmundsson & Hafsteinsson (1997). Etter ekstraksjonen ble løsningen filtrert, salter ble fjernet ved en to-trinns ionebytterprosedyre før den ble inndampet og tørket ved cirka 40 °C (Arnesen & Gildberg, 2007). Ett kg torskeskinn gir cirka 100 g tørt, rensert gelatin. Framstilling av enzymsubstrat skjer ved at 8 % tørt gelatin svelles over natt ved 10 °C og løses opp under røring og oppvarming til 40–50 °C. Substratprøver fryselagres og løses opp ved 25 °C rett før bruk.

Myofibrillprotein

Myofibrillprotein ble ekstrahert fra torskemuskel i 0,45 M KCl, dialysert og frysetørket som beskrevet av Hjelmeland & Raa (1980). Substratgel blir framstilt på is rett før enzymmåling ved at 8 % tørt myofibrillprotein svelles i kaldt vann. Substrat, 0,25 g, ble veid ut i inkubasjonsrør og tilsatt 0,5 ml Johnson-Lindsay-buffer (pH 7,0) rett før inkubasjon med enzymekstrakt (0,25 ml).

4.2.3 Måling av enzymaktivitet

Enzymaktiviteter ved pH 7 ble målt i fortyninger av lake og i oppmalte sildefileter. Hver filetprøve besto av 3 fileter som ble tint over natt ved cirka 5 °C og malt i kjøttkvern ($\Phi=4$ mm). Hundre g fiskemasse ble tilsatt 400 ml kaldt vann og satt til røring en time ved 10 °C før sentrifugering (40 min, 7000 x g). Supernatantprøver ble fryselagret ved -25 °C inntil enzymmålinger ble utført.

Alle enzymprøver ble inkubert en time ved 25 °C, før reaksjonene ble stanset ved tilsats av tri klor eddiksyre (TCA). Sluttkonsentrasjon av TCA i prøver inkubert med myofibrillprotein var 5 %, mens gelatininkubasjonene ble stanset med 10 % TCA (gelatin er løselig i 5 % TCA.). Mer detaljert beskrivelse er gitt i Gildberg & Raa (1983). Aktiviteter ble beregnet ut fra frigitt folin positivt materiale fra substratene (Barrett, 1972) og angitt som $\mu\text{mol Tyr ekv./g(ml) hr}$.

4.3 Resultater

4.3.1 Screening av aktivitet i sild og i laker

Tabell 12 viser resultatene fra proteasemålinger utført med sildefileter og lake som enzymkilder.

Tabell 12 Proteaseaktivitet målt ved nøytral pH i filetprøver av sild og lake målt mot myofibrillprotein og gelatin fra torsk ($\mu\text{mol Tyr ekv./g} \times \text{time}$).

Kode	Råstoff	Prosess	Lake tilsetn.	Muskel		Lake	
				Myofibrill protein	Gelatin	Myofibrill protein	Gelatin
A*	Råstoff			0	203,6		
F*	Råstoff			0	384,5		
B*	Hodekappet			0,17	55,3	0	41,6
G*	Hodekappet			0	4,3	0,06	57,5
C*	Hodekappet - sløyd			0,41	73,4	0,43	89,5
H*	Hodekappet - sløyd			0	86,2	0,06	51,8
D*	Filet - skinnfri		eget slo	0	170,8	0,48	121,7
I*	Filet - flaps		eget slo	0	1,1	0,15	15,5
E*	Filet - skinnfri		nordsjøsiltslo	0	57,4	58,14	2656,6
J*	Filet - flaps		nordsjøsiltslo	0	22,7	34,21	1692,1

Ved måling mot myofibrill protein ble det stort sett oppnådd gode paralleller, men med unntak av i lakene E* og J*, ble det målt lav- eller ingen aktivitet i prøvene. Ettersom myofibrill substratet ikke foreligger som oppløsning, men som «slurry»/suspensjon, er dette målesystemet mindre følsomt enn målinger mot oppløst gelatin. Det bør derfor her ikke legges særlig vekt på de laveste måleverdiene.

Målinger mot gelatin gir større utslag, men her var det ofte stort avvik mellom paralleller. Der store avvik oppsto, ble det gjort opp til to gjentak, og oppgitt måleverdi i tabell er resultat oppnådd i måling med best samsvar mellom parallele prøver. Det er uvisst hva som er årsak til disse variasjonene, men det antas å ha sammenheng med at TCA har svak evne til å felle gelatin sammenlignet med evnen til å felle andre proteiner.

Størst aktivitet ble målt i laker tilsatt nordsjøsiltslo, og det var her godt samsvar mellom aktiviteter målt mot myofibrillprotein og gelatin. Dette viser at slo-proteasene som finnes her (trypsin, chymotrypsin etc.) bryter ned både nativt muskelprotein og denaturert kollagen (gelatin). Det ble ikke målt spesielt høye aktiviteter i tilsvarende filetprøver. Det var råstoffprøvene (A* og F*) som ga høyest aktivitet mot gelatin. Dette skyldes trolig aktivitet til forskjellige muskelkatepsiner. Av de modnede filetene ser det ut til at filet D* inneholder mest gelatinspaltende aktivitet, men det ble ikke påvist aktivitet mot myofibrillprotein i denne fileten.

4.4 Diskusjon

Enzymaktiviteten i forhold til myofibrillprotein og gelatin i råstoff av nordsjøsil, og i ferdig produkt (matjessild) er vist i Tabell 13.

Tabell 13 Enzymaktiviteter i matjesråstoff (sløyd fisk) filet, og matjes produkt (ganet fisk) filet - angitt som $\mu\text{mol Tyr ekv./g time}$ ($n = 5$)

Prøve	Muskel	
	Myofibrill protein	Gelatin
Råstoff	0,05±0,07	133±125
Ganet (matjes)	0,16±0,37	299±220

Av Tabell 13 ser vi at nivåene av enzymaktivitet målt i forhold til myofibrillprotein og gelatin i filet av råstoff og produkt, ikke skiller seg vesentlig fra det som ble målt i NVG-sild. Bortsett fra at, til forskjell fra at man i NVG-sild observerte at aktiviteten avtok i løpet av prosessen, ser man i matjessild at aktiviteten øker, både i forhold til myofibrillprotein og i forhold til gelatin. Variasjonen er imidlertid stor, og prøvematerialet begrenset, så vi kan ikke si at forskjellen er signifikant.

Tabell 14 Enzymaktiviteter i lake fra produksjon av matjes fra nordsjøsil - angitt som $\mu\text{mol Tyr ekv./g time}$ ($n = 2$)

Prøve	Lake	
	Myofibrill protein	Gelatin
Ganet (matjes)	2,6±1,2	731±593
Ganet –sløyd	1,3±1,0	1179±1034
Filet med nordsjøsilslø	36,0±1,4	2455±219

Tabell 14 viser resultatene av målt enzymaktivitet i lake fra forsøk med nordsjøsil. Det er interessant å merke seg at enzymaktiviteten er generelt høyere enn i laker fra NVG-sild. Både i lake med ganet og sløyd sil, men Laken med tilsatt nordsjøsilslø viser om lag tilsvarende nivåer som det man så i de forsøkene med nordsjøsil i «kunstig» lake. Det kan indikere at ekstraksjonen i disse forsøkene ga en lake med tilsvarende enzymaktivitet, som laken med tilsatt (frosset/tint) avskjær/innvoller av nordsjøsil.

4.5 Konklusjon

En vesentlig forskjell mellom nordsjøsil fra matjessesongen og NVG-silda som inngikk i disse forsøkene er at mens målt enzym-aktivitet i filet øker i nordsjøsilda i løpet av modningsperioden, så avtar den i NVG-silda. Enzymaktiviteten i forhold til myofibrillprotein og gelatin er stort sett lavere i både muskel og lake av NVG-sild enn tilsvarende målinger gjort på nordsjøsil.

Laken som var tilsatt nordsjøsilslø viste enzymaktivitet som var i samme størrelsesorden som i lake hvor enzymene var ekstrahert fra en mengde slo (beskrevet i del 1). Dette kan indikere at innfrysing av slofraksjon fra nordsjøsil i sesongen, kan være en god måte å skaffe seg tilgang på enzymer til modifikasjon av smak og tekstur i sildefilet.

5 Proteomanalyse

5.1 Mål

Med udgangspunkt i projektets problemstillinger søgte vi også svar på yderligere spørgsmål, med henblik på at kunne optimere en lage. En optimeret lage definerer vi som en lage, hvor den biomolekylære sammensætning (herunder enzymerne) er således sammensat, at produktet efter modning kommer til at ligne den traditionelle matjes sild. For at opnå det, er det nødvendigt at kende de processer som er vigtige for matjes modningen. Et væsentligt spørgsmål er derfor: Hvilke proteinforandringer sker der i fileten under modningsprocessen?

5.2 Materiale og metoder

For at klarlægge de proteinforandringer der sker i fileten under modningsprocessen har vi valgt at udføre proteomanalyser (2D-gelanalyser), som fortæller noget om hvordan muskelproteinerne er blevet påvirket under matjes fremstillingen.

5.2.1 Proteomanalyse

Resultatet af en proteomanalysen består af en proteinprofil, som viser en prøves forskellige proteiner adskilt efter ladning og størrelse. For en given prøve udgør en sådan proteinprofil en slags fingeraftryk, som kan sammenlignes mellem forskellige prøver og benyttes til at undersøge, hvilke processer der under forskellige modninger er forskellige og hvilke som ligner hinanden.

5.2.2 Prøvemateriale og prøve oparbejdelse

Vacuumpakkede frosne NVG-sild blev modtaget fra Nofima, Stavanger den 29 oktober 2013. Der indgik 3 koder: Kode A: NVG råstoff; Kode B: Hovedkappet NVG; Kode E: NVG-filet tilsat lage med nordsjøsild slo + afskær. Sildene blev opbevaret ved -80 °C indtil analyse. Efter optøning blev der udtaget muskelstykker lige under rygfinnen og muskelstykkerne blev lagret i prøverør ved -80 °C indtil analyse.

Fra de frosne muskelstykker blev der udskåret og afvejet 200 mg muskel som omgående blev homogeniseret (Polytron PT 1200, KINEMATICA) i 2 ml buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ved 0 °C. Der blev homogeniseret 3 gange 30 s med 30 s pause mellem homogeniseringerne.

Homogenatet blev centrifugeret med 11.200 g i 20 min ved 3 °C hvorefter supernatanten blev taget fra og frosset (-80 °C) indtil analyse.

5.2.3 Proteinbestemmelse

Prøvernes proteinindhold blev bestemt ved Lowry metoden (Lowry *et al.*, 1951) i en udgave modificeret af Peterson (1977) og efter TCA fældning som beskrevet af Kaplan & Pedersen (1989).

5.2.4 To-dimensional gelelektroforese (2DE)

På baggrund af prøvernes proteinkoncentrationer blev der fældet (TCA) en proteinmængde så der kunne benyttes 1000 µg protein til elektroforesen. Det fældede protein blev opløst i 8 M urea, 2 M thiourea, 50 mM DTT, 1,5 % CHAPS, 2 % Pharmalyt 3-10, og 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) og påsat en Immobiline Drystrips gel (GE Healthcare, 18 cm, pl 4-7) til elektroforetisk adskillelse af proteinerne i første dimension (1D). Efter denne elektroforese blev 1D-gelen ekvibreret i 2 x 20 min i 6 M urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8,8) 30 % (w/v) glycerol og 2 % SDS med henholdsvis 1% (w/v) DTT, og 4,5% iodoacetamide. 1D-gelen blev herefter lagt ovenpå en SDS-polyacrylamidgel (12 %) og proteinerne blev nu elektroforetisk adskilt i anden dimensions (2D).

Efter elektroforesen blev proteinerne fixeret og farvet med colloid Coomassie Brilliant Blue (Rabilloud & Charmont, 2000). 2D-gelen blev herefter fotograferet (CCD kamera) og billederne blev analyseret ved hjælp af programmet Progenesis SameSpots (version 4.5, Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK)

En mere detaljeret beskrivelse af den benyttede 2DE procedure findes i Wulff et al (2012).

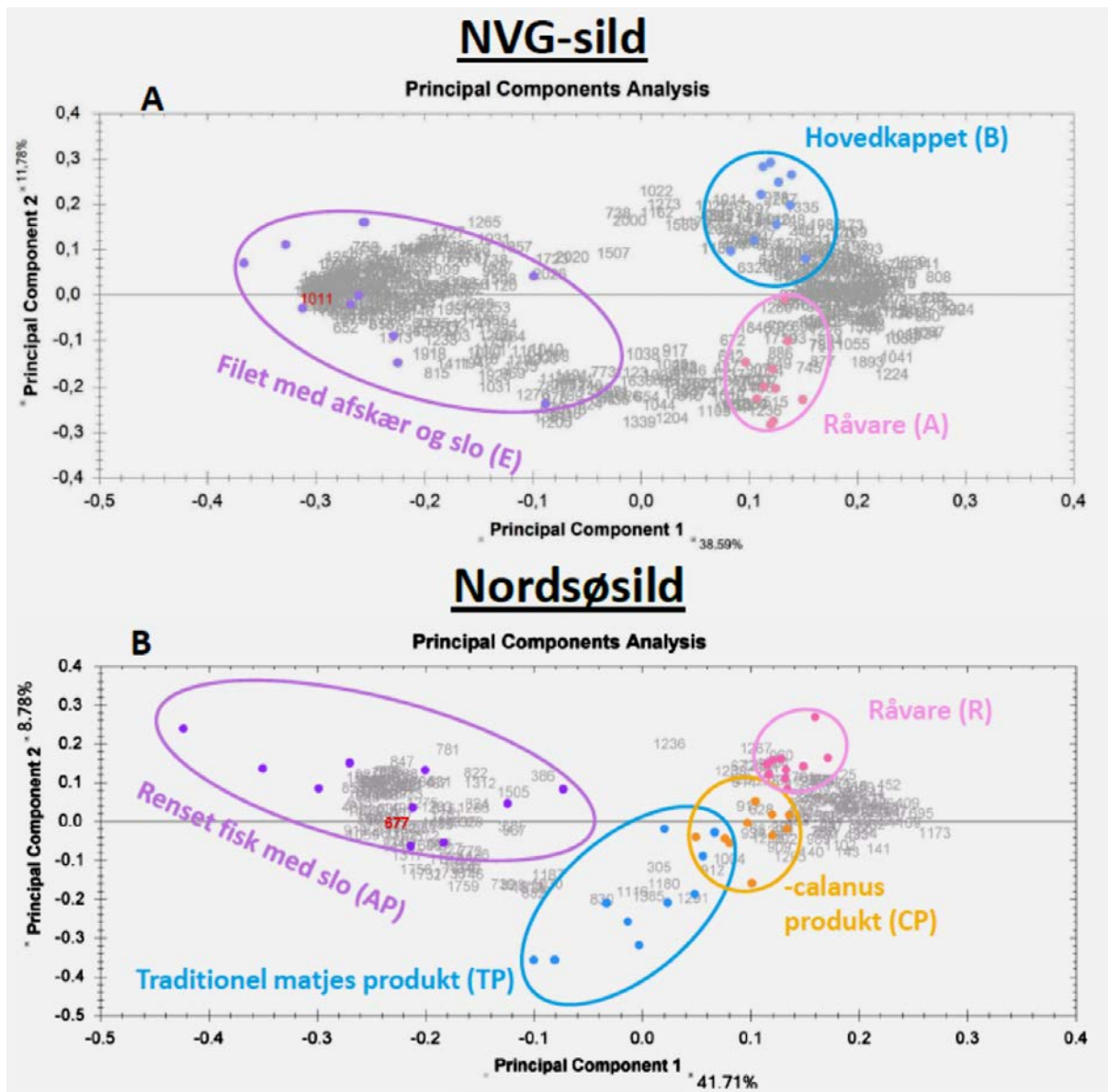
5.3 Resultater og diskussion

Med henblik på at finde proteinforandringer der sker i sildemusklens under modningsprocessen blev proteomanalysen (2D-gelelektroforese) anvendt på 10 fisk fra hver af koderne, altså i alt 30 fisk. Der er eksempler på færdige 2D-geler i den tidligere rapport.

5.3.1 Sammenligning af proteinprofiler

Proteinprofilerne fra de 30 2D-geler blev sammenlignet ved hjælp af billedanalyse. I Figur 10A ses resultatet af en principal komponent analyse (PCA), som viser hvilke prøver der ligner hinanden i forhold til proteinpletter. Det ses tydeligt at prøverne grupperes i relation til de 3 koder. Der er størst forskel mellem fileterne med slo fra Nordsøsild, som er placeret helt til venstre i plottet og de to andre grupper (råvaren og de hovedkappede), som begge ligger til højre i PCA-plottet.

En sammenligning af dette resultat med den første undersøgelse, hvor der blev benyttet Nordsøsild (se Figur 10B), viser tydeligt et nærmest et ens resultat, hvor det "Filet med slo (AP)" også lå helt i venstre side af plottet mens "Råvaren (R)" lå helt til højre.

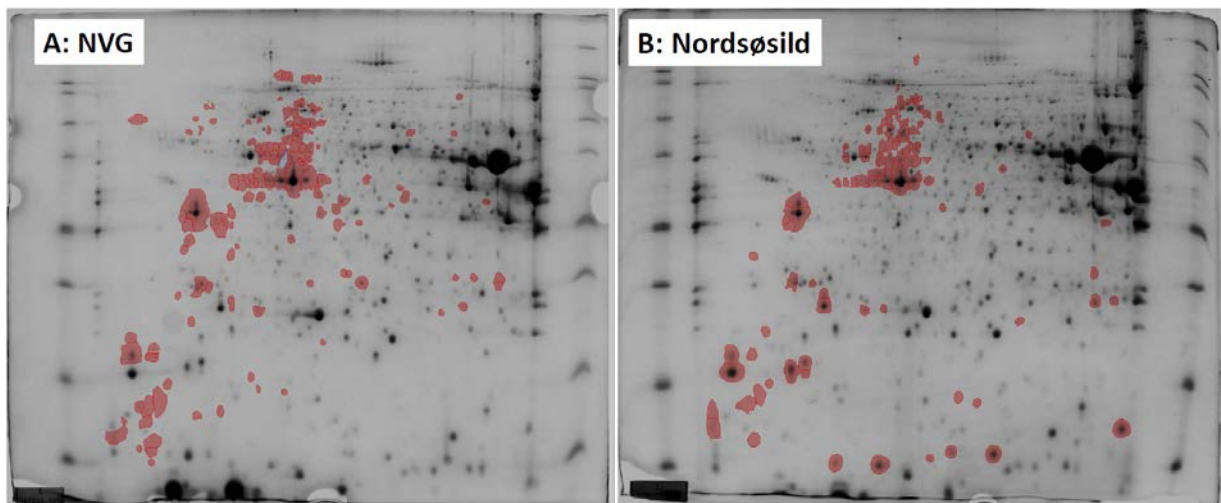


Figur 10 *Principal komponent analyser af 2D-gel data. Placeringen i plottet af de enkelte sildeprøver (A = NVG-sildene; B = Nordsø-sildene) er angivet med massivt farvede symboler, mens de diffuse grå tal angiver proteinpletterne fra 2D-gelene som er høj signifikante ($p < 0,01$) i en ANOVA der sammenligner koderne.*

Ved derefter at se på hvilke af proteinpletterne i 2D-gelene der er årsag til forskellene mellem råvaren og de modnede sild, henholdsvis NVG og Nordsø-sild, er det tydeligt at det i stor udstrækning er de samme proteiner, som i de to sildestammer er involveret i modningsprocessen (se Figur 11). I Figur 11A ses (markeret med rødt) de proteiner som øges under modningen af NVG-sildene i en lage med slo fra Nordsø-sild, mens de markerede proteiner i Figur 11B er dem der øges i Nordsø-sild under modningen i kunstig lage.

Da ca. 40 af de markerede proteiner i Figur 11 også stiger i mængde i den traditionelle matjes i forhold til råvaren (se forrige rapport), kan det antages, at de processer som sker i både NVG-sild og Nordsø-sild i de respektive lager hænger sammen med de processer, der foregår under fremstillingen af en traditionel matjes. Det vil således være muligt at benytte 2D-gelanalysen som værktøj til at

finde proteinmarkører, der ved en hurtig-analyse vil kunne benyttes til at kontrollere og optimere modningsprocessen i forhold til tid, temperatur og lagesammensætning.



Figur 11 Proteiner (markeret med rødt) i 2D-gel som øges i mængde under modning af NVG-sild (A) med lage af Nordsøsil slo og modning af Nordsøsil (B) med kunstig lage.

5.4 Konklusion

Proteomanalysen udgør et godt værktøj til undersøgelse af hvordan forskellige modninger (lager) og råvarer påvirkes under proceduren. Et væsentligt resultat af denne undersøgelse er at de forandringer som sker i silden under modningen i stor udstrækning er ens i både NVG-sild og Nordsøsil.

Analysene identificerer desuden flere unike proteiner (markører) som er forbundet med de ulike prosessene. Disse vil efterfølgende kunne relateres til smaks og teksturegenskaber, og muligens anvendes som indikatorer på modningsprocessen.

6 Sammendrag og konklusjon

Det ble utført 4 ulike typer forsøk med lab-skala produksjon (37,5 kg/batch) av matjes-type-produkter fra kystsild og NVG-sild ved sildeforedlingsanlegg i Lødingen og Senjahopen. Til forsøkene ble det brukt råstoff som ikke ble ansett til å være av "matjesråstoff" kvalitet. Først og fremst ved at det ikke var nordsjø-sild. Dessuten på grunn av manglende raudåte i tarmen. I tillegg til å modne sild på tradisjonelt vis, ganet eller hodekappet i saltlake, ble 3 alternative metoder forsøkt: modning av sløyd sild (uten innvoller), modning av fileten i lake tilsatt (egne) innvollsensymer, samt modning av fileten i lake tilsatt filetavskjær med innvollsensymer fra nordsjø-sild.

Det ble utført sensorisk analyse av alle prøvene fra forsøkene, samt av et kommersielt matjesprodukt som var produsert i samme tidsrom som prøvene. Den sensoriske analysen skiller klart mellom de ulike forsøksvariantene. Kystsilda, som ble brukt til forsøk 1 og 2, var nærmest i størrelse til den silda som normalt brukes til matjessild. Denne silda oppnådde en smaksprofil som var ganske nær matjessild når den ble modnet på tilsvarende måte (hodekappet). Filetproduktene skilte seg imidlertid betydelig, både fra matjessild og fra de produktene som ble laget av NVG-sild.

NVG-silda var feit, men betydelig større enn den som normalt brukes til matjes. Den sensoriske analysen indikerer at Hodekappet/sløyd gir de prøvene som ligner mest på matjessild, med hensyn til modensmak og teksturegenskaper. Tilsatt av enzymer fra nordsjø-sild medfører en lignende effekt på NVG-sild som den man kunne observere for nordsjø-sild; filetene blir mørere og oppleves feitere. Men for øvrig indikerte den sensoriske bedømmelsen at de skilte seg ganske mye fra matjessild.

Analysene av enzymaktivitet indikerte høy aktivitet av myofibrill-nedbrytende enzymer i den laken med tilsatt nordsjø-sildslo. En vesentlig forskjell mellom nordsjø-sild fra matjessesongen og NVG-silda som inngikk i disse forsøkene er at mens målt enzym-aktivitet i fileten øker i nordsjø-silda i løpet av modningsperioden, så avtar den i NVG-silda. Enzymaktiviteten i forhold til myofibrillprotein og gelatin er stort sett lavere i både muskel og lake av NVG-sild enn tilsvarende målinger gjort på nordsjø-sild.

Laken som var tilsatt nordsjø-sildslo viste enzymaktivitet som var i samme størrelsesorden som i lake hvor enzymene var ekstrahert fra en mengde slo (beskrevet i del 1). Dette kan indikere at innfrysing av slofraksjon fra nordsjø-sild i matjessesongen, kan være en god måte å skaffe seg tilgang på enzymer til modifikasjon av smak og tekstur i sildefilet.

Også proteomanalysen skilte klart mellom forsøksvariantene. Analyseresultatene viser at denne analysen er et godt verktøy til å undersøke hvordan forskjellige modninger (laker) og råvarer påvirkes under prosessen. Laken med nordsjø-sildslo har en effekt på NVG-sildens muskelproteiner som ligner effekten på nordsjø-sild. Analysene identifiserer dessuten flere unike proteiner (markører) som er forbundet med de ulike prosessene. Disse vil i et påfølgende arbeid kunne relateres til smaks og teksturegenskaper, og muligens anvendes som indikatorer på modningsprosessen.

Litteratur

- Arnesen, J.A. & A. Gildberg (2007). Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology*, **98**:1, 53–57.
- Barrett, A.J. (1972). Lysosomal enzymes. In J.T. Dingle (Ed.), *Lysosomes – A Laboratory Handbook*, (pp. 46–135). Amsterdam: North Holland Publishing Company.
- Birkeland, S., M. Sivertsvik, H.H. Nielsen & T. Skåra (2005). Effects of brining conditions on weight gain of herring (*Clupea harengus*) fillets. *Journal of Food Science*, **70**: 7, pp. E418–424.
- Engvang, K. & H.H. Nielsen (2000). In situ activity of chymotrypsin in sugar-salted herring during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, pp. 1277–1283.
- Gildberg, A. & J. Raa (1983). Purification and Characterization of Pepsins from the Arctic Fish Capelin (*Mallotus villosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology*, **75**:3, pp. 337–342.
- Gudmundsdottir, G. & G. Stefansson (1997). Sensory and Chemical Changes in Spice-salted Herring as Affected by Handling. *Journal of Food Science*, **62**:4, pp. 894–897.
- Gudmundsson, M. & H. Hafsteinsson (1997). Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *Journal of Food Science*, **62**:1, pp. 37–39.
- Hjelmeland, K. & J. Raa (1980). Fish tissue degradation by trypsin type enzymes. In J. J. Connell (Ed.), Papers presented at the Jubilee Conference of the Torry Research Station Aberdeen, Scotland. 23–27 July 1979 (Ed.) *Advances in Fish Science and Technology* (pp. 456–459). Farnham, Surrey, England: Fishing News Books Ltd.
- Kaplan, R.S. & P.L. Pedersen (1989). Sensitive protein assay in presence of high-levels of lipid. *Methods in Enzymology*, **172**, pp. 393–399.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randell (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, pp. 265–275.
- Lyhs, U. & R. Schelvis-Smit (2005). Development of a Quality Index Method (QIM) for Maatjes Herring Stored in Air and Under Modified Atmosphere. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **14**:2, pp. 63–76.
- Nielsen, L.B. & H.H. Nielsen (2002). Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology*, **128**, pp. 351–363.
- Olsen, S.O. & T. Skåra (1997). Chemical changes during ripening of North Sea herring. In J. Luten, T. Børresen & J. Oehlenschläger (Eds.). *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality*, **38** (pp. 305–318). Noorwijkerhout, The Netherlands: Elsevier.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, **83**:2, pp. 346–356.
- Rabilloud, T. & S. Charmont (2000). Detection of proteins on two-dimensional electrophoresis gels. In T. Rabilloud (Ed.). *Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*, (pp. 107–126). Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Schubring, R. & J. Oehlenschläger (1997). Comparison of the ripening process in salted Baltic and North Sea herring as measured by instrumental and sensory methods. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **205**:2, pp. 89–92.
- Stefansson, G., H.H. Nielsen, T. Skåra, R. Schubring, J. Oehlenschläger, L. Luten, S. Derrick & G. Gudmundsdottir (2000). Frozen herring as raw material for spice-salting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**:9, pp. 1319–1324.

Wulff, T., A. Jokumsen, P. Hojrup & F. Jessen (2012). Time-dependent changes in protein expression in rainbow trout muscle following hypoxia. *Journal of Proteomics*, **75**:8, pp. 2342–2351.

