

Bakterievekst under naturtørrking av tørrfisk

Sammenligning av normal- og mucosovev

Ingebrigt Bjørkevoll, Bjarne Landfald, Marita Holm Ernstsén, Sjúrdur Joensen og Even Tidemann





Nofima er et næringsrettet forsknings-konsern som skal øke konkurranse-kraften for matvareindustrien, herunder akvakulturnæringen, fiskerinæringen og landbruksnæringen. Konsernet omfatter tidligere Akvaforsk, Fiskeriforskning, Matforsk og Norconserv, og har ca. 430 ansatte. Virksomheten er organisert i fire forretningsområder; Marin, Mat, Ingrediens og Marked. Konsernet har hovedkontor i Tromsø og virksomhet i Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Averøy

Hovedkontor Tromsø
Muninbakken 9-13
Postboks 6122
N-9291 Tromsø
Telefon: 77 62 90 00
Telefaks: 77 62 91 00
E-post: nofima@nofima.no

Internett: www.nofima.no



Vi driver forskning, utvikling, nyskaping og kunnskapsoverføring for den nasjonale og internasjonale fiskeri- og havbruksnæringa. Kjerneområdene er avl og genetikk, fôr og ernæring, fiskehelse, bærekraftig og effektiv produksjon samt fangst, slakting og primærprosessering.

Nofima Marin
Muninbakken 9-13
Postboks 6122
N-9291 Tromsø
Telefon: 77 62 90 00
Telefaks: 77 62 91 00
E-post: marin@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Rapport

	<i>ISBN:</i> 978-82-7251-639-9	<i>Rapportnr.:</i> 8/2008	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Tittel:</i> Bakterievekst under naturtørking av tørrfisk. Sammenligning av normal- og mucosovev	<i>Dato:</i> 18. april 2008		
<i>Antall sider og bilag:</i> 14			
<i>Forfatter(e):</i> Ingebrigt Bjørkevoll, Bjarne Landfald (NFH), Marita Holm Ernstsén (NFH), Sjørður Joensen og Even Tidemann	<i>Prosjektnr.:</i> 20276, 20280		
<i>Oppdragsgiver:</i> Norges forskningsråd og Tørrfiskforum	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> 174023/110 / 452012-2		
<i>Tre stikkord:</i> Tørrfisk, modning, mucoso, kvalitetsanalyser			
<i>Sammendrag: (maks 200 ord)</i> Mikroorganismer antas å påvirke utviklingen av lukt og smak i tørrfisk, men det er lite kjent om hvilke organismer som dominerer under tørkeprosessen. Samtidig er mikrobielle forhold også antatt å være essensielle for utviklingen av mucoso, som er en kvalitetsfeil i tørrfisk der deler av fiskemuskelen blir oppløst og slimaktig. Slike partier må skjæres bort under bløttingsprosessen. Denne undersøkelsen tok sikte på å studere og sammenligne bakterieveksten i mucoso-muskel med muskel uten mucoso fra samme fisk. Torsk ble hengt til tørk på Røst og 5 fisk tatt ned i 4 omganger utover i tørkeperioden (etter 19, 32, 46 og 67 dager). Under tørkeprosessen ble det ikke registrert utvikling av mucoso i nevneverdig grad for prøvefisken (kun ved første uttak), men det ble analysert på muskel fra områder der mucoso vanligvis dannes. Kimtallsverdiene stabiliserte seg på rundt 10^7 bakterier per g for alle muskelprøver etter om lag 5 ukers tørking, og høyeste verdier ble målt i prøver tatt fra mucoso-områdene. Av 17 tilfeldige isolater fra begge typer vev ble hele 15 identifisert som <i>Psychrobacter</i> . Denne slekten synes derfor å være et sentralt innslag i floraen i sein fase av tørkingen og kan være nøkkelorganismer både for dannelsen av smak/luftkomponenter og mucoso.			
<i>English summary: (maks 100 ord)</i> Microbial growth is believed to influence on the characteristic smell and taste of stockfish, but may also lead to unwanted quality reduction of the fish, such as mucoso, which is a quality error causing tissue degradation. The aim of this trial was to study microbial changes in stockfish during a natural drying process. Tissue samples were collected during the drying process from areas where mucoso usually occurs and from normal tissue. Bacterial counts levelled off at about 10^7 per g after approximately 32 days of drying, with the highest values in samples from areas of the muscle where mucoso commonly occur. Fifteen out of 17 random isolates were identified as the genus <i>Psychrobacter</i> . The highest values were found in areas where mucoso usually occurs.			

Innhold

1	Innledning	1
1.1	Bakgrunn.....	1
1.2	Prosjektets målsetting	1
2	Gjennomføring av forsøk.....	3
2.1	Vurdering av kvalitet på tørrfisk under industriell tørking	3
2.1.1	Råstoff og tørkeprosedyre	3
2.1.2	Analyser.....	3
3	Resultater.....	6
3.1	Mikrobiologiske analyser.....	8
3.1.1	Kimtallsutvikling	8
3.1.2	Identifisering av bakterieisolater	9
4	Diskusjon	12
5	Konklusjon.....	13
6	Referanser.....	14

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Ferdigtørket tørrfisk er lagringsstabil ved at vannaktiviteten er redusert til et nivå der mikrobiell aktivitet forutsettes å være minimal eller helt fraværende. Gjennom det meste av tørkeperioden er det imidlertid tilstrekkelige restmengder av vann i de tykkere delene av fiskemuskelen til at det er grunnlag for mikrobiell vekst. Det er da også vist i forsøk med kunstig tørking (Pettersen 2006) at det etableres relativt høye kimtallsnivåer på ca. 10^8 bakterier per g i fisken under tørkinga og at disse tetthetene holder seg helt fram til produktet er ferdigtørket. Det er nærliggende at denne bakteriefloraen setter sitt preg på det ferdige produktet gjennom dannelse av metabolske produkter med markert lukt og smak fra omsetning av blant annet aminosyrer. I en tidligere undersøkelse er det funnet 87 flyktige komponenter i tørrfisk, hvorav de fleste kan dannes mikrobielt (Solvang og Mjøs, 2007)

Et første steg i å fastslå betydningen av mikrofloraen for utviklingen av de sensoriske egenskapene til tørrfisk vil være å få mer klarhet i om bestemte mikroorganismer er karakteristiske for produktet. Siden mange arter av gjær og sopp har høyere toleranse for lave vannaktivitetsverdier enn bakterier, vil det være av interesse å se på begge disse gruppene av mikrober i en slik sammenheng.

Kvalitetsfeilen mucoso i tørrfisk har de siste 4 år medført et årlig økonomisk tap for tørrfisknæringen på anslagsvis 45-60 millioner kroner fordi mucoso fører til at en stor andel av tørrfiskvolumet (30-40 %) må nedklassifiseres fra prima vare. Mucoso karakteriseres ved at deler av fiskekjøttet går i oppløsning og får en slimaktig konsistens, noe som medfører stort svinn for bløteriene ved at dette området må skjæres bort under utvanning.

Årsaken til at mucoso dannes er ikke klarlagt, men en viktig årsak er værforholdene under tørkingen. Innledende forsøk har vist at hvordan råstoff håndteres og lagres før hending, også kan påvirke graden av mucoso i tørrfisk betydelig.

I to tidligere studier har en forsøkt å danne mucoso i torsk ved å tørke fisk kunstig ved ugunstige tørkeforhold. Dette har vist seg vanskelig. I første forsøk fikk en ikke dannet noe mucoso (Bjørkevoll et al., 2006) på grunn av for rask tørking, mens en i det andre forsøket fikk kraftig oppløsning (for mye nedbrytning) av hele fiskekjøttet (Bjørkevoll et al., 2007). Dermed ble det besluttet å analysere på fisk under naturtørking for å se om denne fisken dannet mucoso under tørkeprosessen.

1.2 Prosjektets målsetting

Den overordnede målsettingen for denne studien var å få mer kunnskap om mikrobielle forhold under naturlig tørking ute i industrien. Vi ønsket her å sammenligne de mikrobielle forholdene i vev som hadde en ønsket tørkeutvikling med vev som viste tegn til utvikling av mucoso. Dersom mucoso ble dannet under forsøket, ville en ha analysedata fra fiskemuskelen når dette skjedde og ikke bare ved avsluttet tørking.. Ved å sammenligne mucoso-muskel og vanlig muskel var målet å avdekke hvilken mikroflora som bidro til den naturlige modningsprosessen i tørrfisk så vel som til utvikling av mucoso.

Dette arbeidet er en del av en felles satsing innen to Forskningsråds finansierte prosjekter; "mucoso i tørrfisk" og "modning og lagring av tørrfisk". Begge har som mål å avklare hvordan mikrobiologisk aktivitet påvirker egenskapene til tørrfisk. Dette er gjort ved å sammenligne vev fra mucoso-områder med normalt vev med hensyn til mikrobiologisk kvalitet. Dermed

oppnås det betydelige synergier ved å samkjøre disse analysene, siden normalt vev fra mucoso-analysene vil brukes til å undersøke sammenhengen mellom mikroorganismer og modning av tørrfisk.

2 Gjennomføring av forsøk

2.1 Vurdering av kvalitet på tørrfisk under industriell tørking

2.1.1 Råstoff og tørkeprosedyre

Til dette forsøket ble 20 torsk fra samme linefangst brukt. Vekten på fisken var 3,5-5,5 kg sløyd hodekappet ved henging og den hadde normalt god kvalitet. Hver fisk ble merket med id-merke og vurdert for blodtømming samt vekt og lengde. Fisken ble hengt til tørk ved GLEA AS på Røst den 23. mars 2007.

2.1.2 Analyser

Om lag hver 14. dag ble 5 fisk tatt ned fra hjell og sendt til Fiskeriforskning med flyfrakt. Frakttiden var under 3 timer fra Røst til Tromsø. Totalt var det 5 uttak, etter 0, 3, 5, 7 og 10 ukers tørking. Uttaksdatoer var 26.03.07 (fersk fisk, 3 døgn på is), 12.04.07 (19 døgn), 25.04 (32 døgn), 09.05.07 (46 døgn) og 30.05.07 (67 døgn).

Fisken ble splittet langs ryggraden og det ble tatt ut 2 muskelprøver fra tykkfisken og 2 fra gattet. Fra tykkfiskmuskelen ble det tatt ut prøver fra området der mucoso vanligvis dannes (muskul som ligger inntil ryggbeinet) og fra vanlig muskel der mucoso sjelden oppstår. Det samme ble gjort for gattområdet der en prøve ble hentet fra mucoso-området og med "friskt" vev hentet fra områder hvor mucoso vanligvis ikke opptrer. Prøvene for mikrobiologiske analyser ble tatt ut ved Fiskeriforskning for så å bli analysert ved Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø. Prøver ble tatt ut samme dag, senest etter å ha stått natten over på kjølerom I tillegg ble pH i muskel målt frem til og med nest siste uttak etter rundt 7 uker. Etter dette var fisken for hard til å få målt pH med stikkelektrode.

Oppskrifter på medier

To typer agarplater ble benyttet; en med generelt kimtallsmedium for bakterier og en med generelt gjærmedium for isolering av ev. gjær i sein fase av tørkinga.

Kimtallsplater:	- Bacto-trypton	5
(g/l)	- Gjærekstrakt	2,5
	- Glukose	1
	- Agar	15
Gjærplater	- Bacto-pepton	5
(g/l)	- Gjærekstrakt	3
	- Maltekstrakt	3
	- Glukose	10
	- Agar	15
	- Ampicillin	100 mg

Kimtallsanalyser

Fiskeprøver ble finhakket under aseptiske forhold og deretter ble 2 g veid ut og homogenisert manuelt i 18 ml kald steril 0,9 % NaCl i stomacherposer. Fortynningsserier (1:10) i samme saltløsning ble deretter laget.

Volumer på 50 µl av 3 antatt passende fortynningsnivåer ble strøket på agarplatene i duplikat og platene ble inkubert ved 12 °C. Antall kolonier ble talt først etter 1 uke, deretter ble platene sjekket for nye kolonier etter ytterligere 1 og 2 uker. Kimtallet er bestemt ut fra det endelige antall kolonier som kom opp på plater med passende fortynning.

Opparbeidelse av bakterieisolater

Det ble plukket representative kolonier fra de forskjellige prøvevariantene ved samtlige uttak, unntatt det første med helt fersk fisk. Disse ble renyrket på samme type agarplater, karakterisert mht. kolonimorfologi og deretter dyrket i 3 ml flytende medium. Prøver (0,5 ml) av disse kulturene ble tilsatt 0,5 ml 40 % glyserol og frosset ned ved -80°C. Ytterligere 1 ml av kulturene ble spunnet ned i eppendorfrør og pelleten ble frosset ved -80°C for seinere bruk til DNA-basert klassifisering.

Klassifisering av utvalgte isolater

DNA-ekstraksjon:

Tinte bakteriepellets (se ovenfor) ble løst i 50 µl GES (5 M guanidium thiocyanat, 0,1 M EDTA, 0,5 % sarcosyl) og deretter tilsatt 400 µl destillert vann. Etter ekstraksjon med 400 µl fenol:kloroform:isoamylalkohol (25:24:1) og fase-separasjon med sentrifugering ble 200 µl av vannfasen tatt av og tilsatt 20 µl 3 M natriumacetat (pH 5,3) og 400 µl 100 % etanol. Etter henstand i 30 min på is ble utfelt DNA spunnet ned (13 000 rpm, 20 min), pelleten ble vasket i 120 µl 70 % etanol, spunnet ned på nytt (5 min), lufttørket 20 min etter fjerning av supernatanten og løst i 50 µl destillert vann. Konsentrasjon og renhet av DNA-ekstraktene ble bestemt (NanoDrop Technologies) og justert til ønsket nivå for PCR med destillert vann.

PCR:

16S-rRNA-genet ble amplifisert med de to primerne 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) og 1491R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT), som er komplementære med høyt konserverte områder i flankene av dette genet. Rør med 50 µl reaksjonsblandinger inneholdt: 50 ng hver av de to primerne, 1 µl DNA-templat, 0,2 µl DyNAzyme II DNA polymerase (Finnzymes), PCR-buffer (Finnzymes), 10 nmol hver av dNTPs.

Amplifiseringsprogrammet var: 94 °C i 10 min, deretter 30 sykluser á:

94 °C i 30 s

53 °C i 30 s

72 °C i 90 s

Til sist elongeringstrinn ved 72 °C i 7 min og

nedkjøling til 4 °C

Nærvær av PCR-produkt av forventet størrelse på ca. 1500 bp ble verifisert ved gel-elektroforese (1 % agarose i TAE-buffer med 5 µl/100 ml etidumbromid, 250 V, 7 min; Liberty 2 Systems, Biokey American Instruments). Etter saltfelling og vasking av PCR-produktene med natriumacetat/etanol (se ovenfor) og lufttørking, ble de løst i 40 µl destillert

vann og DNA-konsentrasjonen ble bestemt med NanoDrop. Verdiene lå over minstekravet på 5 ng/μl for samtlige prøver. De ble frosset ved -80°C til sekvenseringen ble gjennomført.

Sekvensering:

Rørene for sekvenseringsreaksjonen inneholdt i et totalvolum på 20 μl: 7,5 ng templat (PCR-produkt), 20 ng primer 27F (se ovenfor), sekvenseringsbuffer (Applied Biosystems) og ABI BigDye v. 3.1 (Applied Biosystems).

Reaksjonsbetingelser: 94 °C i 2 min, deretter 35 sykluser á:
 94 °C i 10 s
 53 °C i 10 s
 60 °C i 4 min
 Til sist nedkjøling til 4 °C

Produktene ble saltfelt med natriumacetat/etanol, lufttørket og løst i 20 μl formamid. Sekvensen ble bestemt i en kapillær-sekvensator av merket ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Klassifisering ved databasesøk:

Dataene fra den primære avlesningen fra sekvensatoren (elektroferogrammet) ble overført til programmet BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) for vurdering av kvaliteten på sekvensen. Ble denne funnet tilfredsstillende ved at det var få eller ingen baser med usikker identitet, ble hoveddelen av sekvensen (oftest ca. 500 bp) kopiert og lagret som tekstfil. Denne sekvensen ble benyttet til klassifisering via det web-baserte programmet RDP Classifier (Wang et al. 2007) ved The Ribosome Database Project II; (<http://rdp.cme.msu.edu>). Dette er et "konservativt" søkeverktøy ved at den kun relaterer 16S-rDNA-sekvensene til etablerte tpestammer av bakterier og kun gir identitet ned til slektsnivå. Bare de sekvensene som ga slektstilørighet med >99 % konfidens er inkludert i Resultater.

Fylogenetisk analyse:

Sekvensinformasjonen ble videre benyttet til å rekonstruere et fylogenetisk tre (det evolusjonære slektskapsforholdet), der isolatsekvensene ble relatert til de bakterieartene som viste nærmest slektskap ut fra databasesøket. Programmet ClustalX (Thompson et al. 1997) ble benyttet. Dette retter inn baseposisjonene i sekvensene i forhold til hverandre (alignment) og rekonstruerer deretter det fylogenetisk treet ut fra den evolusjonære avstanden mellom sekvensene ved bruk av "neighbor-joining"-algoritmen.

3 Resultater

Torsk hengt på hjell ble etter 3, 5, 7 og 10 ukers tørking tatt ned og sendt til Fiskeriforskning for analyse. Etter vurdering av mucoso i gatt og rygg, ble det tatt ut prøver til mikrobiologisk analyse og pH.

Vurdering av mucoso og måling av pH Tabell 1 viser vekt og lengde før henging på fisken som inngikk i forsøket.

Tabell 1 Råstoffvekt (sløyd hodekappet) og lengde på fisk før henging på hjell. Fisk merket A, B, C eller D ble analysert etter henholdsvis 3, 5, 7 og 10 ukers tørking.

Fisk nr	Vekt (kg)	Lengde (cm)	Fisk nr	Vekt (kg)	Lengde (cm)
A1	4,686	75	C1	6,060	76
A2	4,302	80	C2	6,430	80
A3	5,901	84	C3	4,974	80
A4	5,460	82	C4	4,894	75
A5	4,534	76	C5	4,070	79
B1	4,704	79	D1	4,374	75
B2	4,632	79	D2	4,384	77
B3	4,046	79	D3	5,070	78
B4	4,366	78	D4	5,538	76
B5	4,480	76	D5	3,564	73

Vanninnholdet i fisken var 80,9 % før henging, eller 4,24 kg vann pr kg tørrstoff. (Gjennomsnitt av seks analyser).

Ved uttaket etter 3 uker ble det skjært fileter ut av alle 5 fisk ved bruk av sterilteknikk. Fisken hadde tørket en del, men var fortsatt fuktig og lett å skjære filet av. Vanninnholdet i kjernen ble målt til 79,1 % som tilsvarer at 10 % av vannet i kjernen var fjernet. Nyrevevet og ryggbeinet var fortsatt fuktig. Spesielt A1 og A2 hadde antydning til mucoso i både gatt og tykkfisk (i mucoso-området). Fisk A3, A4 og A5 hadde noe svakere tegn til mucoso enn A1 og A2. pH-verdien ble målt i tykkfisken på begge filetene til hver fisk (vist i Tabell 2).

Tabell 2 *pH-verdi i tykkfiskmuskelen på begge fileter fra hver fisk ved uttak etter 3 ukers tørking.*

Fisk nr	Filet 1	Filet 2
A1	7,07	7,12
A2	7,08	7,01
A3	7,10	7,06
A4	7,38	7,39
A5	7,26	7,27

Også for uttaket etter 5 uker ble pH målt i begge fileter (Filet 1 og filet 2) fra hver fisk. pH-verdiene lå fra 7,0 til 7,7. for dette uttaket ble det ikke registrert tydelige tegn til mucoso for noen av fiskene. Vanninnholdet i kjernen var fortsatt høyt, 80,3 %.

Tabell 3 *pH-verdi i tykkfiskmuskelen på begge fileter fra hver fisk ved uttak etter 5 ukers tørking.*

Fisk nr	Filet 1	Filet 2
B1	6,99	7,02
B2	7,57	7,72
B3	7,26	7,37
B4	6,97	6,96
B5	7,10	7,29

Ved uttaket etter 7 uker var fisken for tørr til at den kunne skjæres opp (fileteres) med kniv. Fisken ble delt i to langs ryggbeinet med båndsg. Ved dette uttaket var det ikke synlige tegn til mucoso for noen av fiskene. Unntaket var fisk C2 som hadde en litt oppløst og bløt muskelkonsistens sammenlignet med de andre fiskene. pH lå fra i underkant av 6,9 til ca 7,3 for tykkfiskmuskelen. Vanninnholdet bak ryggbeinet var sunket til 74 %. Dette er et vanninnhold som fortsatt gir rom for mikrobiell aktivitet. For muskelen ved gattfinnen, et område der det kan dannes mucoso, ble det målt en enhet høyere pH, 7,8 til 8,3. Dette området var også betydelig tørrere enn muskelen i tykkfisken.

Tabell 4 *pH-verdi i tykkfiskmuskelen på begge fileter fra hver fisk ved uttak etter 7 ukers tørking. pH ble også målt i muskel ved gattfinnen.*

Fisk nr	Filet 1	Filet 2	Område ved gattfinnen
C1	7,05	6,86	7,81
C2	6,93	7,08	7,96
C3	7,26	7,28	7,77
C4	7,33	7,29	8,23
C5	7,36	7,27	8,29

Det siste uttaket ble gjort etter 10 ukers tørking på hjell. Fisken var nå ganske tørr og minnet mye om en vanlig tørrfisk. 90 % av vannet var fjernet (beregnet ut fra vektendring). Vanninnholdet i kjernen ble ikke målt). Her ble fisken delt opp med båndsg. I kjernen var fisken fortsatt noe fuktig, men den var for hard til at det kunne måles pH. For de andre uttakene ble dette gjort med en pH-elektrode som ble stukket inn i fiskemuskelen.

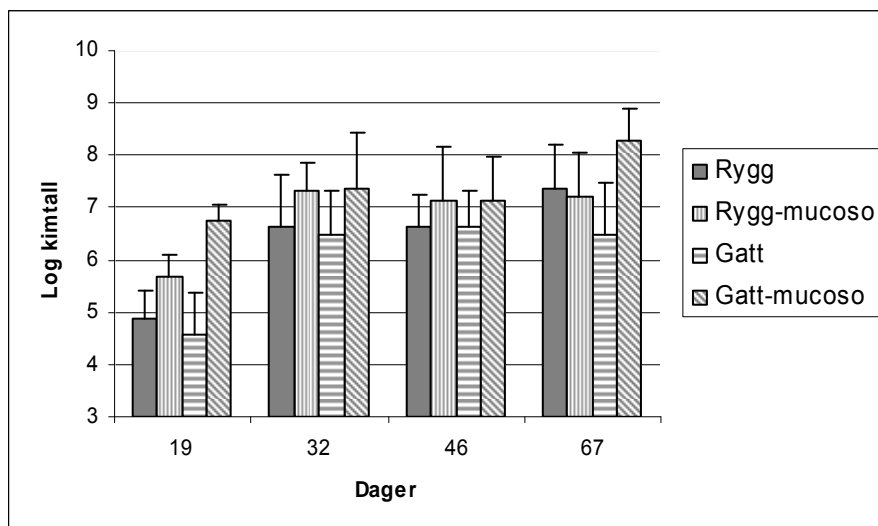
Fisk D1, D2 og D5 virket tørre og hadde ingen tegn til mucoso. Fisk D3 og D4 hadde en noe mer oppløst muskelkonsistens, spesielt D3 som hadde tydelig oppløst muskel og luktet mer surt enn de andre fiskene som hadde en lukt som ble dominert av ammoniakk.

Ut fra den svake dannelsen av mucoso som ble registrert også for stor fisk gjennom hele uttaket, ser det ut til at fisken har tørket godt i forsøksperioden som var fra slutten av mars til slutten av mai. Dette bekreftes av bedriften hvor fisken ble hengt. Været hadde vært godt med lave temperaturer og lite nedbør gjennom størstedelen av denne perioden.

3.1 Mikrobiologiske analyser

3.1.1 Kimtallsutvikling

Figur 1 viser log₁₀ av kimtallsverdiene for prøvene som ble tatt ut 12. april, 25. april, 9. mai og 30. mai, dvs. 19, 32, 46 og 67 dager inn i tørkeforsøket. Kimtallene ved forsøksstart (dag 1) var vesentlig lavere (<3 log-enheter) og er ikke inkludert.



Figur 1 Bakterietutviklingen hos torsk under tørking på hjell, angitt som log₁₀ av kimtall. Hver søyle angir middelvei ± standardavvik av 5 fisk, og de forskjellige søylene representerer forskjellige vevsprøver fra de samme fiskene.

For samtlige typer vev ble det målt lavest kimtall ved første uttak etter 19 døgn, mens verdiene syntes å flate ut f.o.m. dag 32. Videre var det en tendens til høyere kimtall i mucoso-områder enn i ikke mucoso-områder, med et lite unntak for siste uttaksdag, da ryggprøvene hadde samme nivå for begge typer vevsprøver. Forskjellene gjaldt i særlig grad gattprøvene, der bakterietallet i mucosovev ble funnet å være 16x høyere (Tabell 5). Mucosovev fra gatt hadde også høyere kimtall enn mucosovev fra rygg, selv om forholdet var det motsatte for "friskt" vev. Statistisk testing av disse forskjellene vha. Student t-test bekreftet en meget signifikant forskjell i kimtall mellom mucoso og ikke-mucoso for gattprøvene, mens nullhypotesen (ingen forskjell) ikke kunne avvises på 5 % -nivå for den tilsvarende sammenligningen av ryggprøver eller for rygg versus gatt for mucoso-prøver. Også for disse forskjellene var imidlertid tendensene klare.

Tabell 5 Forholdet mellom kimtallsverdier (ikke log-transformert) i forskjellige typer vevsprøver og resultat av testing av nullhypoteser (=ingen forskjell mellom prøvene) med Student t-test. Den statistiske sammenligningen er basert på log-verdiene gitt i figur 1.

	Kimtall-ratio	Signifikansnivå (%) (t-test)
Rygg, mucoso vs. ikke-mucoso	2,9	7,7
Gatt, mucoso vs. ikke-mucoso	16,1	0,0
Rygg mucoso vs gatt mucoso	0,4	10,2
Rygg vs. gatt (ikke-mucoso)	2,2	20,4

Utstryk av fortytningsserier på gjærplatene førte ikke til påvisning av gjærceller ved noen av uttakene. På den annen side kom det opp betydelige antall ampicillin-resistente bakterier på disse platene. Høyeste antall var 6×10^7 i en enkeltprøve fra siste uttaksdag. Dette utgjorde opp mot 10 % av totalt bakterietall i denne prøven. Forekomsten av ampicillin-resistente bakterier varierte imidlertid sterkt mellom enkeltprøver og viste ingen systematikk mht. mucoso/ikke-mucoso eller tørketid.

3.1.2 Identifisering av bakterieisolater

Det ble plukket representative kolonier for frysekonservering (totalt 86) fra alle prøveuttak unntatt det ved forsøksstart. De 19 stammene som ble tatt ut for 16S rDNA-basert klassifisering skrev seg alle fra siste halvdel av tørkeperioden, med relativt få (5) fra dag 46 og de fleste (14) fra dag 67 (Tabell 6). Dette utvalget ble plukket med sikte på å få en representativ dekning av kategoriene av fiskeprøver – ikke for å få en bredest mulig dekning av de forskjellige kolonitypene som kunne observeres. Det kan derfor sees som et randomisert utvalg som avspeiler den tallmessige fordelingen av bakterietyper i prøvematerialet.

Tabell 6 Antall isolater fra ordinære kimtallsplater som ble plukket for reindyrking og frysekonservering i de forskjellige prøve-kategoriene. Kolonna i kursiv gir antall kolonier som ble plukket fra ampicillin-holdige plater (kun dag 19-prøver) og tallene i parentes for dag 46 og 67 gir antallet som ble tatt ut for 16S rDNA-basert klassifisering.

	Tidspunkt prøveuttak (dag)				
	19	32	46	67	
Rygg	5	1	3	5 (2)	4 (4)
Rygg, mucoso	5	5	4	6 (-)	5 (4)
Gatt	5	3	2	6 (1)	5 (4)
Gatt, mucoso	3	5	7	5 (2)	2 (2)
Sum	18	14	16	22 (5)	16 (14)

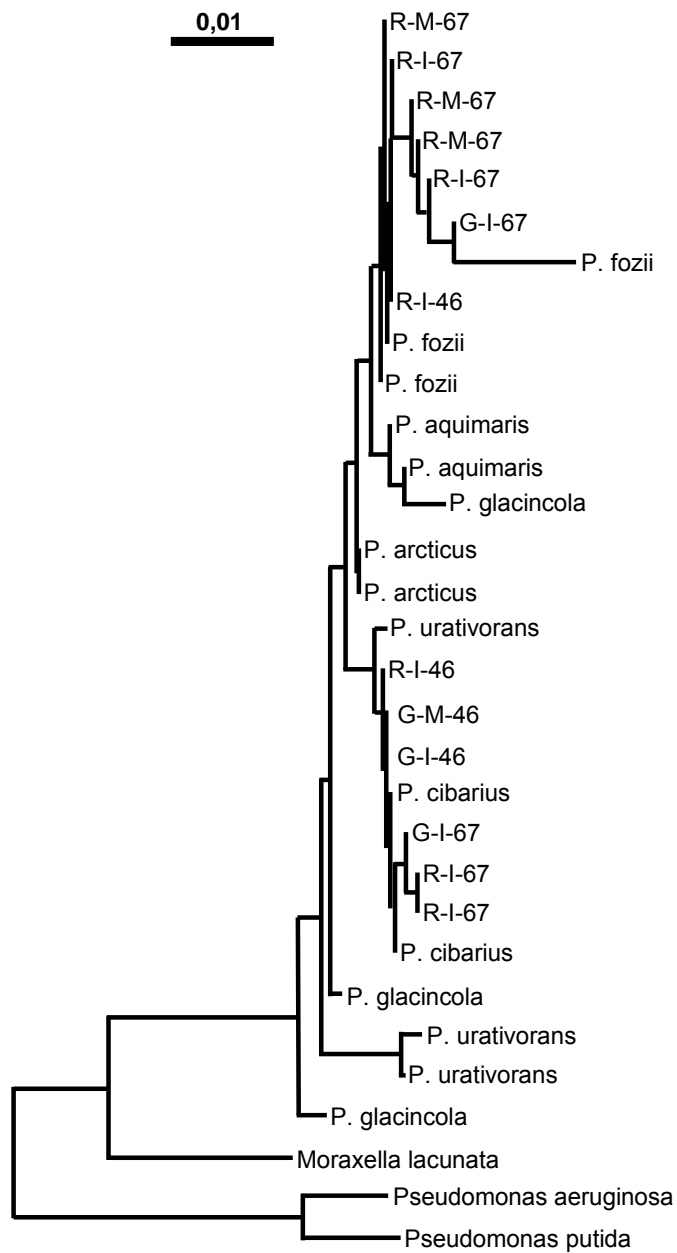
Alle 19 stammer ga PCR-produkt i tilfredsstillende mengde for sekvensering ved oppformering av 16S-rRNA-genet. Det ble gjort to sekvenseringer av hvert av preparatene. To sekvenser var av for dårlig kvalitet ved begge forsøk til å benyttes, mens det ut fra de 17 øvrige kunne fastslås en slektsidentitet med 100 % konfidens ut fra Classifier-programmet. Med kun to unntak viste sekvensene seg å skrive seg fra bakterier innen slekten *Psychrobacter*. Unntakene var to isolater fra gatt med mucoso-preg. Det ene (dag 46) ble med 100 % konfidens klassifisert som en *Pseudomonas*, det andre (dag 67) som en gram-positiv bakterie av slekten *Arthrobacter*.

Som det går fram av Tabell 7, ble det påvist *Psychrobacter* i samtlige typer vev, både "friskt" og mucoso-preget og ved begge de to siste prøveuttakene. Samtlige sekvenserte isolater fra ryggprøvene var *Psychrobacter*, mens forekomsten i gatt-prøvene var litt mindre entydig fordi de to ikke-*Psychrobacter*-stammene og de to stammene som ikke ga tilfredsstillende sekvens alle skrev seg fra gattprøver. Der flere *Psychrobacter*-isolater er påvist fra samme type prøve, skriver disse seg fra forskjellige fisk. Det må derfor kunne konkluderes at ved dette hengingsforsøket var det en generell dominans av *Psychrobacter* i den siste delen av tørkeperioden.

For å få mer innblikk i graden av innbyrdes beslektethet mellom isolatene og disses slektskap til kjente arter av *Psychrobacter*, ble det gjort en fylogenetisk analyse, dvs. rekonstruert et evolusjonært "slektstre" på grunnlag av 16S-rDNA-sekvensene. Kun 13 isolater som hadde sekvenser av god kvalitet med lengde på ca. 500 basepar ble inkludert i analysen. To arter av *Pseudomonas*, en art av *Moraxella* og seks arter (15 sekvenser) av *Psychrobacter* ble lastet ned fra sekvensdatabasen GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) og inkludert i analysen sammen med isolatene. Som det framgår av Figur 2, er tilhørigheten av isolatene til *Psychrobacter* utvilsom, men sekvensinformasjonen var ikke tilstrekkelig til å kunne klassifisere på artsnivå med noen grad av pålitelighet. Heller ikke de innhentede artssekvensene framsto som monofyletiske grupper i denne analysen, noe som var spesielt markant for de tre *P. glacincola*-sekvensene. Sikker artsbestemmelse (eventuelt konklusjon om at noen representere nye *Psychrobacter*-arter) ville krevd mer omfattende genetiske analyser og i tillegg klassiske taksonomiske tester som lå utenfor omfanget av denne studien. Heller ikke var det noen entydig tendens til at isolatene grupperte seg ut fra kategori – som mucoso versus ikke-mucoso, rygg versus gatt eller ut fra dato – selv om en svak tendens til gruppering av isolat-sekvensene i to atskilte "cluster" kunne observeres.

Tabell 7 Fordelingen av de påviste *Psychrobacter*-stammene mellom kategorier av prøver.

Vev	Mucoso	Antall isolater	
		Dag 46	Dag 67
Rygg	-	2	4
Rygg	+	-	4
Gatt	-	1	2
Gatt	+	1	1



Figur 2 Slektskap mellom *Psychrobacter*-isolatene og seks *Psychrobacter*-arter ut fra sammenligning av homologe sekvensområder på ca. 500 basepar av 16S-rRNA-genet. Isolatene er kodet ved at R = ryggprøve, G = gattprøve for 1. bokstav; M = mucoso, I = ikke-mucoso for 2. bokstav; tallet angir antall tørkedøgn før prøveuttak.

4 Diskusjon

Helhetsinntrykket med hensyn til utviklingen i kimtall er i god overensstemmelse med Pettersen (2006), som fant middelveier på ca. $5 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ etter 3 ukers tørking og stabiliserte verdier i overkant av 10^8 g^{-1} ved uke 5 og uke 8. Ved vårt forsøk lå nivåene gjennomgående noe lavere, med verdier omkring 10^5 g^{-1} etter 19 døgn og i området $3 \times 10^6 - 2,5 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$ f.o.m. dag 32. Unntaket var gattprøver med tegn til mucoso, som hadde verdier på samme nivå som Pettersen (2006) påviste ved dag 19 og dag 67. Forskjellene i kimtall mellom forsøkene er som forventet fordi fisken i dette forsøket ble naturtørket, mens fisken i forsøkene til Pettersen ble tørket under ugunstige forhold (forhøyet temperatur og luftfuktighet) i en industritørke. Antakelsen om at tørkeresistent gjær kunne etablere seg i betydelig antall i fisken etter at a_w -verdien var sunket ned mot sluttnivået på vel 0,8, ble ikke bekreftet, i det plater med gjærmedium tilsatt antibiotika kun ga oppvekst av antibiotikaresistente bakterier.

Selv om lagringsforholdene var gode under dette forsøket og få fisk hadde klare tendenser til mucoso, understøtter kimtallsanalysene at fenomenet er knyttet til forhøya bakterietall. Siden \pm mucoso-prøvene ble hentet fra det samme utvalget av fisk, gir disse analysene betydelig sterkere holdepunkter for at det var mest bakterier i mucoso-områdene enn om forskjellige tilfeldige fisk av de to kategoriene var blitt sammenlignet.

16S rDNA-analysen av bakterieisolater viste at 15 av 17 isolater kunne klassifiseres som *Psychrobacter*. Det ser dermed ut til at representanter for denne slekten formerte seg særlig effektivt i tørkende fisk og overlevde godt selv når vannaktiviteten sank under det nivået som tillot vekst. Tidligere studier viser at disse bakteriene dominerer i utvannet klippfisk, der de ble antatt å skrive seg fra råstoffet, ikke fra kontaminering under produksjonen. (Bjørkevoll et al., 2003). Dahlmo (2007) viste at *Psychrobacter*-arter også var framtrepende i utvannet og ikke-utvannet boknafisk som ble holdt kjølt etter foregående fryselagring. *Psychrobacter*-slekten hører under familien *Moraxellaceae* og ordenen *Pseudomonadales* (som *Pseudomonas*) Denne bakterien synes derfor å være særlig vel tilpasset det mikrobielle miljøet som eksisterer i tørkende fisk i form av proteinrikt substrat med lav vannaktivitet, og studiene nevnt ovenfor, tyder også på at den har god evne til å ta opp igjen veksten når det tørka råstoffet blir vannet ut og lagret kjølt.

Dette arbeidet var ikke innrettet mot å avklare hvorvidt bakteriefloraen bidrar til den karakteristiske lukta og smaken hos tørrfisk. Den klare dominansen av en enkelt bakterieslekt indikerer imidlertid at *Psychrobacter*-isolatene kan være særlig interessante for videre studier i den retningen. En eventuell bekreftelse av *Psychrobacter*-dominans også i de resterende 67 isolatene som ikke ble klassifisert i denne omgangen, måtte naturlig følges opp med studier av utvalgte isolater. Forsøk på imitering av vekstforhold i tørrfisk og en videre kartlegging av flyktige metabolske produkter under disse betingelsene ville stå sentralt.

Om *Psychrobacter*-arter også er et hovedinnslag i mucosovev er noe mer uavklart, siden de ikke var like åpenbart dominerende i mucoso-prøvene. En viktig indikator på bidrag til mucoso-dannelse er trolig om bakteriene produserer og skiller ut proteaser som kan bryte ned omliggende muskelstruktur. Tester med sikte på å avdekke proteaseaktivitet ville derfor også være en sentral målsetting for videre studier av disse isolatene.

5 Konklusjon

I dette forsøket var hensikten å studere den mikrobielle utviklingen under naturtørking av torsk generelt og i forhold til utviklingen av mucoso spesielt. Det ble dessverre kun registrert begrenset grad av mucoso i noen få fisk i dette forsøket, noe som medførte at en ikke med sikkerhet fikk analysert direkte på mucoso når den ble dannet. Analysene av muskel viste generelt et høyt kimtall under tørking, og i områder der mucoso gjerne blir dannet, ble det registrert et høyere bakterieinnhold enn der mucoso vanligvis ikke dannes. Dette understøtter teorien om at mucoso kommer av bakteriell nedbrytning gjennom en høyere mikrobiell aktivitet over lengre tid i mucoso-områdene enn i vanlig muskel.

Karakterisering av bakterieisolater viste at *Psychrobacter* var den dominerende bakterietypen under tørkingen i dette forsøket. I den grad mikroorganismer influerer på lukt- og smaksutviklingen i tørrfisk, synes det derfor nærliggende at denne bakterieslekten spiller en nøkkelrolle. Dersom dette er tilfelle, vil det være mulig å påvirke lukt og smaksintensitet gjennom å tilpasse tørkebetingelsene. Tørketiden kan for eksempel reduseres ved å fjerne svømmeblæren før tørking. Dette kan være gunstig også med hensyn til utvikling av mucoso, som i stor grad synes å være et "stor fisk" problem".

Hvorvidt enkelte av de isolerte *Psychrobacter*-stammene også kan bidra til nedbrytning av fiskemuskel til mucoso ved utskillelse av proteaser, må undersøkes gjennom nærmere mikrobiologiske og biokjemiske analyser.

6 Referanser

- Solvang, M. og Mjøs, S.A. (2007) Flyktige komponenter i tørrfisk (konfidensiell).
- Bjørkevoll, I., Olsen, R. L. and Skjerdal, O. T. (2003) Origin and spoilage potential of the microbiota dominating genus *Psychrobacter* in sterile rehydrated salt-cured and dried salt-cured cod (*Gadus morhua*). *International Journal of Food Microbiology*, 84:175-187.
- Bjørkevoll, I., Sørensen, N. K., Gildberg, A., Eilertsen, G. og Joensen, S. (2006). Innledende studie av kvalitetsfeilen mucoso i tørrfisk. Fiskeriforskningsrapport nr 13/2006
- Bjørkevoll, I., Tobiassen, T., Joensen, S. og Lorentsen, G. (2007). Utvikling av mucoso og bakterievekst i tørrfisk under ugunstige tørkeforhold. Fiskeriforskningsrapport nr 18/2007
- Dahlmo, H. (2007) Produksjonsmessige og kvalitetsmessige aspekter ved tilvirkning og kjølelagring av boknafisk. Mastergradsoppgave, Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø, august 2007
- Pettersen, M. (2006) Mikrobiologiske aspekter under tørking og utvanning av tørrfisk. Mastergradsoppgave, Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø, mai 2006.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25:4876-4882.



ISBN 978 82-7251-639-9
ISSN 1890-579X