

PRODUKSJONSMESSIGE OG KVALITETSMESSIGE ASPEKTER VED TILVIRKNING OG KJØLELAGRING AV BOKNAFISK

Håkon Dahlmo



NORGES FISKERIHØGSKOLE
Universitetet i Tromsø
Tromsø, Norge 2007



Forord

Denne oppgaven markerer slutten på studietilværelsen ved Norges fiskerihøgskole. Disse årene har vært minnerike år, med mye variert innhold både i form av faglige og sosiale sammenhenger. Noe som vil ligge ved lenge er klasseturen til Brasil, der vi sammen hadde mange utrolig artige og fine opplevelser. Toktene ombord på F/F Jan Mayen har vært fine avbrekk fra store aud.

Det er vel på sin plass å takke alle som har vært medvirkende til en vel gjennomført masteroppgave og de som har vært støttende på andre områder under denne prosessen.

Først og fremst en stor takk til min veileder Bjarne Landfald som har stilt opp i stort monn med stort pågangsmot og motivasjon til å gjøre arbeidet både så bra som mulig, og i rett tid. Turen til Spildra sammen var skikkelig fin, og en fin start på mastergradsoppgaven.

En stor takk går også til Ole, Ole og Anders som jeg var heldig å dele hus med i over 2 år, det var virkelige fine år.

Yngvil fortjener også en stor takk for å ha stilt opp for meg med gode innspill underveis i skriveprosessen og gjennomlesing av oppgaven i sluttfasen. Det setter jeg veldig stor pris på.

Sist men ikke minst vil jeg, selv om jeg har bikket det magiske 3-tallet takke mine foreldre, Jon og Karen Elise, som har vært så tolmodig med meg. De har stilt opp med oppløftende oppmuntringer underveis og med økonomiske bidrag som nesten setter lånekassen i skyggen. Tusen takk skal dere ha, så håper jeg at i tiden videre skal klare å stå på egne ben, også økonomisk.

Håkon Dahlmo

Tromsø 15. august 2007

Denne oppgaven er finansiert med støtte fra MARICOM

Sammendrag

Boknafisk er et halvtørket fiskeprodukt, fortrinnsvis av torsk (*Gadus morhua*), som er i ferd med å bli introdusert til restaurantsegmentet og detaljhandelen gjennom firmaet Spindaj. For å avklare en del viktige forhold knyttet til kvaliteten ble det gjennomført forsøk med produksjon og kjølelagring av boknafisk. Under produksjonen ble rotskjært torsk (2-5 kg) hengt på hjell i 12 dager til den nådde en gjennomsnittlig restvekt på 50%. Forskjeller i tørketid til denne grensen mellom den største og den minste fisken ble beregnet til 7-9 dager. I sluttproduktet var det en markert gradient mellom en relativt tørr overflate og en kjerne med liten grad av uttørring. Ved de vedvarende minusgraderne (0°C - ÷7°C) som rådde under tørkingen, ble det ikke observert bakteriell vekst i fisken.

Tre varianter av forbehandling og pakkemetode for porsjonstykkerstykker av boknafisk (ikke-utvannet luftpakket fisk, utvannet luftpakket fisk og utvannet, modifisert atmosfærepakket (30% CO₂/70%N₂) fisk) ble lagret ved 5°C i inntil 10 dager. Mikrobiell kvalitet ble analysert ved totalt kimtall og sulfidproduserende bakterier og kjemisk ved total flyktig nitrogen. Det ble påvist klar hemming i utviklingen av totalt kimtall og sulfidproduserende bakterier hos fisk pakket i modifisert atmosfære sammenlignet med luftpakket. Utvannet, luftpakket fisk hadde det høyeste nivået av totalt kimtall og sulfidproduserende bakterier, mens ikke-utvannet fisk hadde høyere totalt kimtall enn fisk pakket i modifisert atmosfære, men mindre enn utvannet, luftpakket fisk. Holdbarheten til produktene, i forhold til anbefalte grenseverdier for sulfidproduserende bakterier i ferskfisk, var 3-4 dager for utvannet, luftpakket fisk og 6-7 dager for modifisert atmosfærepakket fisk. For ikke-utvannet fisk var det mer usikkert, men totalt kimtall tyder på en holdbarhet i antall dager mellom modifisert atmosfærepakket fisk og utvannet, luftpakket fisk. Klassifisering av 9 bakterieisolater, hvorav 5 var sulfidproduserende, ble gjort fra fisk lagret i 8 dager. Ut fra 16S-rRNA gensekvens viste de dominerende bakteriene på fisk pakket i modifisert atmosfære seg å være *Shewanella putrifaciens*, mens det i luftpakket utvannet fisk etter alt å dømme var et stort innslag av *Psychrobacter ciberius* som sulfidprodusent. *Psychrobacter*-arter er ikke

tidligere rapportert å være sulfidproduserende. Ikke-utvannet fisk syntes ikke-sulfidproduserende *Psychrobacter* og *Pseudomonas* å være dominerende innslag.

1. Innhold

Forord	III
Sammendrag	V
1. Innhold.....	VIII
2. Bakgrunn.....	2
2.1. <i>Boknafisk</i>	3
2.2. <i>Bakteriell nedbryting</i>	4
2.3. <i>Modifisert atmosfærepakking</i>	5
2.4. <i>Sekvensbasert makteriesystematikk</i>	7
3. Material og metode.....	9
3.1. <i>Datainnsamling under henging av fisken</i>	9
3.2. <i>Kjølelagring av boknafisk</i>	10
3.3. <i>Kimtallsbestemmelse</i>	11
3.4. <i>Vanninnhold</i>	13
3.5. <i>Totalt flyktig nitrogen (TVN)</i>	13
3.6. <i>pH-måling</i>	15
3.7. <i>Polymerase chain reaction (PCR)</i>	15
3.8. <i>Sekvensbestemmelse av 16S-ribosomalt RNA-genet</i>	17
3.8.1. Ekstraksjon og rensing av DNA	17
3.8.2. PCR-amplifisering (PCR) av bakterielt 16S-rDNA	18
3.8.3. Gel-elektroforese	19
3.8.4. Saltfelling av positive PCR-prøver	19
3.8.5. Sekvenseringsreaksjon	20
3.8.6. Identifisering av isolatene fra 16 S-rDNA-sekvensen	20
4. Resultater	22
4.1. <i>Produksjon av boknafisk</i>	22
4.1.1. Temperatur og tørking	22
4.1.2. pH-målinger.....	27

4.1.3. Mikrobielle målinger	28
4.2. <i>Kjølelagring av porsjonspakninger</i>	29
4.2.1. Utvanning	29
4.2.2. Kimtallsbestemmelser	30
4.2.3. TVN og pH	33
4.2.4. Systematisk klassifisering	34
5. Diskusjon.....	36
5.1. <i>Produksjon av boknafisken</i>	36
5.2. <i>Kjølelagring av porsjonspakninger</i>	39
6. Konklusjon.....	43
7. Referanser	44

Forkortelser:

MAP	modifisert atmosfære pakking	Modified atmosphere packaging
SPB	sulfidproduserende bakterier	Sulfur producing bacteria
PCR	polymerase kjedereaksjon	Polymerase chain reaction
TVC	totalt levedyktige enheter	Total viable count
CFU	kolonidannende enheter	Colony forming units
DNA	deoksyribonukleidsyre	Deoxyribonucleic acid
TVN	total flyktig nitrogen	Total volatile nitrogen
TMAO	trimetylaminoksid	Trimetylamin N-oxide
TMA	trimetylamin	Trimethylamine
NFH	Norges fiskerihøgskole	The Norwegian College of Fishery Science

2. Bakgrunn

Innenfor det norske restaurantsegmentet er det en økende interesse for tradisjonelle matretter basert på klippfisk, tørrfisk og boknafisk (Bjørkevoll et al., 2004). Utvannet tørrfisk har vist seg å ha en høy konsentrasjon av bakterier rett etter utvanning, slik at holdbarheten til produktet blir et problem. Denne er kun på rundt 3 døgn i kjøleskap. I vakuumpakning der luften er fjernet, øker holdbarheten til rundt 5-7 dager. Utvanningstiden på tørrfisk er på over en uke, slik at bakterier vil kunne vokse under utvanningen (Bjørkevoll, 2005). Maksimumsgrensen for kimtall av sulfidproduserende bakterier på $5 \cdot 10^6$ colony forming unit (CFU) per gram prøve som anbefales for fersk fisk ser ikke ut til å gjelde for tørrfisk (Bjørkevoll et al., 2004). Utvannet tørrfisk kan imidlertid lukte friskt selv med verdier opp mot 10^8 CFU/g prøve.

Under tørkeprosessen av tørrfisk har det i loins etter 3 ukers tørking blitt målt totalt kimtall på vel 10^6 CFU/g (Pettersen, 2006).

Om man tar i betraktning den omstendelige prosessen med utvanningen av *tørrfiske*, den korte holdbarhetstiden, samt det stadig økende behovet for såkalte gryteklare måltider, vil en kunne tenke seg at dette kan slå positivt ut for boknafisk som produkt, da denne gjennomgår en betydelig kortere produksjons -og utvanningsprosess.

Mål for oppgaven:

- Kjenne til prosessene som knytter seg til tørking av boknafisk.
- Kjenne til bakteriologiske effekter under kjølelagring av boknafisk, herunder totalt kimtal og sulfidproduserende bakterier, samt kjemiske prosesser underveis.
- Klassifisere utvalg av bakterier ved hjelp av polymerase chain reaction (PCR) og kapilærsekvensering.

2.1. Boknafisk

Boknafisk betyr halvtørr fisk, og den lages fortrinnsvis av torsk. Fisken henges til tork om vinteren, enten som sløyd, hodekappet eller som rotskjært. Det siste er en metode hvor man skjærer ut ryggbeinet og splitter fisken opp mot sporden. Dette fører til at fisken får to løse sider som henger sammen i halen (Fiskeriforskning, 1998). Rotskjært boknafisk har en betydelig kortere tørketid ned til 50 % restvekt enn sperret fisk (hel, rensset) (Joensen et al., 1995). Boknafisk er et typisk produkt fra kysten av Nord-Norge, og oppfatningene er ulike om hvordan den skal være. Dette går i all hovedsak ut på om hvorvidt den skal saltes eller ikke, og hvor tørr den skal være (Fiskeriforskning, 1998). Utenfor Norge er produktet stort sett bare kjent på Island og Færøyene. På Færøyene er det vanlig med strøsalting av fisken før henging. Boknafisk på Færøyene anses av lokalbefolkningen å gi best kvalitet når den er hengt ombord på fartøy, slik at den blir tilført endel salt fra sjøsprøyt. Tilvirking av boknafisk står altså overfor en rekke naturgitte ikke-kontrollerbare faktorer: temperatur, regn, fuktighet og vind (Joensen et al., 1995).

Firmaet Spindaj tilvirker boknafisk på Spildra i Kvænangen kommune. Dette er en småskalabedrift som har satset på rotskjært boknafisk. De fisker i all hovedsak råstoffet selv og baserer seg hovedsaklig på linefiske. Spindaj kjøper i enkelte tilfeller også fisk fra lokale fiskere, da som oftest garnfanget torsk.

I en kvalitativ studie blant nordnorske forbrukere blir boknafisk sett på som både hverdagsdagsmat og ved enkelte anledninger som festmåltid. Informantene bruker boknafisk også som et substitutt for ferskfisk (Stene, 2006). Blant utvalgte tørrfiskkjennere i Italia ble boknafisk oppfattet som forskjellig fra tørrfisk, og smaksmessig passer den best inn i den norditalienske mattradisjonen, mens konsistensen passer bedre i sørlige deler av Italia (Østli og Prytz, 1996).

2.2. Bakteriell nedbryting

I et globalt perspektiv anslås at så mye som 25 % av all mat går tapt etter høsting på grunn av mikrobiell aktivitet (Gram og Dalgaard, 2002). Bedervelse av mat er et resultat av mikrobiell vekst, og blir påvist ved synlig bakteriell vekst kan påvises lik som slimete bakteriekolonier og sopp, enten pigmentert eller ikke-pigmentert. Totalt antall mikroorganismer og graden av nedbryting er i slike tilfeller tett korrelert. Bedervelse av fisk med tilhørende negativ lukt og smak forårsakes av spesielle typer bakteriell metabolisme, heller enn av antall bakterier som sådan. I denne sammenhengen er det ikke nødvendigvis noen korrelasjon mellom det totale antall bakterier og bedervelsen, siden bare en mindre del av bakteriefloraen deltar i nedbrytingen av næringsmidlet (Gram og Huss, 1996).

Analyser av mikrobiotaen i utvannet tørrfisk har vist at produktet bederves av andre typer bakterier enn de som forringer fersk torsk. For utvannet tørrfisk lagret i 7 dager med tilgang på luft ble det ikke registrert sulfidproduserende bakterier (SPB). Vakuumpakkede loins av utvannet tørrfisk hadde etter 7 dager rundt 1% SPB (Bjørkevoll et al., 2004). Bakteriefloreaen hos levende fisk er forskjellig fra den man finner hos *post-mortem* fisk. Dette skyldes at immunforsvaret som i levende fisk hindrer bakterier å etablere seg, bryter sammen når fisken dør, og bakterier vil kunne trenge inn i fisken. Typiske bakterier i kjølelagret fisk er arter av *Shewanella*, *Pseudomonas* og *Vibrio* som i utgangspunktet finnes blant annet på skinn, gjeller og i tarm. En viktig faktor relatert til fiskemuskelen er den høye *post-mortem* pH (>6,0). De fleste fisk har veldig lite karbohydrater (<0.5%) i muskelvevet, og små mengder av melkesyre er produsert *post-mortem*. Dette har en viktig konsekvens for mikrobiologien i fisk, sammen med andre faktorer som gir den pH-sensitive bedervelsesbakterien *Shewanella putrefaciens* gode vekstvilkår (Gram og Huss, 1996).

2.3. Modifisert atmosfærepakking

Kunnskapen om hvilke forutsetninger som ligger til grunn for mikrobiell aktivitet i fisk har gjort det mulig å utvikle konserveringsmetoder som hindrer vekst av typiske bedervelsesbakterier. Et eksempel på dette er CO₂-pakking av fersk, marin fisk. Dette hemmer respirasjon for bedervelsesbakterier (*Shewanella* og *Pseudomonas*) og burde, i prinsippet, resultere i en dramatisk forlengelse av holdbarhetstiden for produktet. På grunn av tilstedeværelsen av den CO₂-resistente og TMAO-reduserende bakterien *Photobacterium phosphoreum*, vil produktet likevel forringes nesten i samme hastighet som filét pakket uten CO₂. På den annen side drepes *P. phosphoreum* effektivt av eksempelvis gjennom frysing, og lengre holdbarhetstid vil dermed kunne oppnåes for tint fisk (Gram og Dalgaard, 2002).

Prøver av utvannet tørrfisk lagret i 4 måneder ved $\pm 30^{\circ}\text{C}$, og tint ovar natta for pakking i modifisert atmosfære (MAP) før videre lagring på 2-4°C viste i følge Bjørkevoll et al. (2004) ingen økning i holdbarhet i forhold til vakuumpakking av utvannet tørrfisk. Kimtallet hos tørrfisk pakket ved hjelp av MAP var vesentlig høyere enn hos luftlagrede prøver når surhet oppstår. Dette kommer trolig av at CO₂ hemmer spesifikke forråtnelsesbakterier, men ikke det totale bakterieinnholdet.

Hovda et al. (2007) har påvist ulik mikrobiologisk vekst på filét fra oppdrettstorsk pakket i luft og MAP og lagret ved 0 °C i 11 dager. Det ble benyttet polymerase chain reaction,– denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGCA), for å identifisere de ulike bakteriene. Sekvensanalysene viste *Pseudomonas spp.* som den dominerende bakterien i oksygentilsatte atmosfærer mens bedervelsesbakteriene *S. putrefaciens*, *Photobacterium sp.* og *Pseudomonas spp.* dominerte i CO₂:N₂ og luftpakkede prøver. Ved oppdyrking på medium ble sulfidproduserende bakterier en hemming ved pakking i modifisert atmosfære (CO₂:O₂ og CO₂:N₂) i forhold til i luft.

Shewanella putrefaciens er en gram-negativ bakterie, og den aller vanligste bedervelsebakterien ved 0°C (Jorgensen og Huss, 1989). Den er i stand til å nyttiggjøre seg av trimetylaminoksid (TMAO) ved anaerob respirasjon og produsere trimetylamin (TMA), og å produsere H₂S (hydrogensulfid) fra cystein. *S. putrefaciens* har derfor et høyt bedervelsespotensiale i den forstand at den kan produsere disse frastøtende luktkomponentene, men organismen har samtidig en relativt lav bedervelsesaktivitet ved at det kreves et høyt antall organismer for at lukt av TMA og sulfid skal bli fremtredende. (Dalgaard, 1995). TMA bidrar i særlig grad til den karakteristiske lukta av ”dårlig fisk”, og tilhørende uønsket negativ smak (Gram og Dalgaard, 2002).

Total flyktig nitrogen (TVN) består i hovedsak av TMA og ammoniakk (NH₃), og særlig økning i TMA fører til en økning i TVN i en tidlig fase av bakteriell forringelse av fisken. Kvalitetsforskrift for fisk og fiskeprodukter av 1996 opererer med en grenseverdi (snittverdi av prøver) for TMA på 3 mg N/100g i ferskfisk. For tørket/fullsaltet fisk gjelder 10 mg N/100g for TMA og 35 mg N/100 g for TVN (Lovdata.no, 1996). Sammenlignet med mikrobiologiske metoder, hvor det tar tid å få frem resultatene, er kjemiske analyser betydelig raskere, men enkelte kjemiske forbindelser er ikke tilstede i målbare konsentrasjonene tilstede før nært opp til at forringelsen av produktet er et faktum (Gram og Dalgaard, 2002).

Tabell 2-1: Retningslinjer for FAST-test fra Colifast.

Timer til fargeforandring gult → svart	SPB/g	Retningslinjer for kvalitet
3-6	> 5 000 000	dårlig
7-10	500 000 - 5 000 000	marginal
11-12	1000 - 500 000	god
>12	< 1000	veldig god

Colifast AS har utarbeidet et kommersielt test-kit for å kunne kvalitetssjekke fersk fisk ut fra nivået av sulfidproduserende bakterier (Skjerdal et al., 2004). Deres FAST-test går i korthet ut på å inkubere en fiskeprøve i flytende medium og måle antall timer det tar før mediet får fargeomslag fra gult til svart. Den svarte fargen skyldes, på lik linje med de svarte koloniene på jernagarmediet, sulfidproduserende

bakterier (SPB). Colifast har i samarbeid med Fiskeriforskning AS utarbeidet en tabell som viser sammenhengen mellom timer ved FAST-testen, SPB-kimantall som bestemt i denne oppgaven og en kvalitativ gradering av ferskheten på fisken (Tabell 2-1).

2.4. Sekvensbasert bakteriesystematikk

Fra renkulturer av mikroorganismer kan man ved å bruke polymerase kjedereaksjon (PCR) amplifisere genet som koder for 16S ribosomalt RNA fra DNA-genomet. Ved å bruke primere som er komplementære til deler av det aktuelle genet man ønsker å sekvensere, vil man ved hjelp av små mengder cellematerial få store mengder DNA-produkt for sekvensering, uavhengig av bakteriens systematiske tilhørighet. Etter sekvensering sitter man igjen med en sekvensdata-fil som må analyseres videre i en datamaskin. Ved hjelp av en sekvens-editor kan man se på kvaliteten og styrken av sekvensen. Starten av sekvensen vil inneholde endel uønsket støy i det området hvor primeren virker, og mot slutten av sekvensen vil det bli endel åpne felter der bestemmelsen vil være upresis. Under analyse av prøven klippes starten og slutten av sekvensen bort, slik at det som er igjen i sekvensen er av god kvalitet. Sekvensen kan nå mates inn i et program som benytter seg av algoritmer for å bestemme slektsforholdet. To utbredte algoritmer er *distance* og *parsimony*. Distance fungerer slik at hvert punkt i ulike sekvenser sammenlignes, og forskjellen mellom sekvensene danner en evolusjonell distanse mellom sekvensene. Parsimony benytter seg av antagelsen om at en minimal mengde av sekvensforandring er nødvendig for å kunne skille to avstamminger fra en felles stamfar som har skjedd under deres evolusjonelle utvikling. Disse to metodene benytter to ulike algoritmer, slik at de endelige slektstreene vil ha enkelte ulikheter seg imellom. Ingen av disse slektstreene vil gi en fasit på de evolusjonsmessige forholdene mellom ulike organismer, men de kan begge anses som nære antagelser til deres opprinnelige avstamning. Gjennom dataanalyser er det avdekket såkalte signatursekvenser, korte oligonukleotider som

er unike hos visse grupper av organismer. Gjennom å kjenne til disse signatursekvensene kan organismer lettere plassere etter deres rette avstamning. Bakterier vil i dette slektstreet danne en egen gren fra en felles stamfar som deles med Arker og Eukariote celler (Madigan et al., 2003).

3. Material og metode.

3.1. *Datainnsamling under henging av fisken*

Henging av Torsk (*Gadus morhua*) for produksjon av boknafisk ble gjennomført hos firmaet Spindaj lokalisert på Spildra i Kvænangsfjorden i perioden 23. oktober til 6. november 2006. Partiet med torsk for denne studien ble hengt den 23.



Figur 3-1: Tørring av fisk på hjell.

oktober og var tatt med garn røktet samme dag, etter å ha blitt satt to dager tidligere. Fisken var sløyd og hodekappet, rotskjært ved at fisken var splittet i to og ryggbeinet var fjernet til bakerste ryggfinne. Bukhinna på fisken ble også fjernet, og siste gjenværende rest av blod fra den gjenværende av ryggfinner ble også klemte ut og vasket vekk ved hjelp av vann og skrubb. For å hindre nedfall av fisken fra hjellen ble det bundet tau foran de

bakerste ryggfinnerne. Vekten på fisken lå på mellom 2 og 5 kg (gjennomsnitt 2,96 kg).

Det ble montert to temperaturloggere (*Testo 174 Logger*) på hver side av hjellen som målte temperaturen hver time gjennom hele forsøket. Det ble gjennomført veiing av fisken på dag 0, 4, 6, 8, 10 og 12. Uttak for mikrobielle analyser ble gjort på dag 0, 4, 8 og 12. Det ble også frosset ned fileter fra fiskene på dag 0, 4, 8, 10 og 12 for senere analyser av vanninnhold og pH-verdi ved Norges fiskerihøgskole (NFH).

3.2. Kjølelagring av boknafisk



Figur 3-3: Utvanning av boknafisk i stamp.

Til kjølelagringsforsøket ble det benyttet skinn og beinfri boknafisk fra Spindaj, levert til Vertshuset Skarven. Fisken var i forhold til fisken fra tørkeforsøket ytterligere trimmet, der sporen og restene av ryggbeinet var fjernet, slik at den fremstod som en renskåret filét. Boknafisken var fra fryst tilstand satt på kjølerom over natta og deretter fraktet til NFH hvor den ble fordelt på to grupper, veid og merket. Den ene gruppen ble lagt i en stamp med vann for utvanning og satt på kjølerom ved 5 °C i 6 timer (Figur 3-3). Den andre gruppen ble også kjølt i det samme tidsrommet men ikke utvannet. Totalt ble 21 fisk utvannet og 18 fisk ikke utvannet. Etter utvanning ble boknafisken veid igjen, kuttet opp i porsjonsstykker og deretter fraktet til Skarven for pakking i vakuumeringsmaskin (Reetray 25, Reepack, Italia). Det var den tykkeste delen av filéten ble som ble kuttet opp i porsjonsstykker. Fisken ble pakket i bakker på 15 cm x 30 cm bakker (Figur 3-2), og hver av bakkene inneholdt 3 fiskestykker som representerte uttaket for en dag. Boknafisken ble pakket i modifisert atmosfære (MAP) med 30 % CO₂ og 70 % N og i luft. I begge tilfeller ble det etablert et svakt undertrykk. Dette for å sikre at



Figur 3-2: Boknafisk i bakker klar for pakking i vakuumeringsmaskin.

pakningene ikke hadde tatt inn luft før de skulle åpnes. Den utvannede boknafisken ble pakket både i modifisert atmosfære (MAP) og luft, mens ikke-utvannet boknafisk kun ble pakket i luft. All pakket fisk ble deretter satt på kjølelager ved +5 °C ved NFH. Den utvannede boknafisken hadde uttak på dag 1, 2, 3, 4, 6, 8 og 10, mens ikke-utvannet hadde uttak på dag 2, 3, 4,

6, 8 og 10. For den utvannede fisken ble stykker fra samme fisk pakket ned for uttak på samme dag, både MAP- og luftpakning.

3.3. *Kimtallsbestemmelse*

For å kunne påvise sulfidproduserende bakterier på fisken ble det benyttet jernagar med L-cystein (NMKL, 2003). Følgende oppskrift ble brukt:

Jernagar grunnmedium:

• Pepton	20 g
• Lab Lemco pulver	3 g
• Gjærekstrakt	3 g
• Jerncitrat	0,3 g
• Natriumthiosulfat	0,3 g
• Natriumklorid	5 g
• Agar	15 g
• Destillert vann	1000 ml

L-cystein løsning:

• L-cystein hydrokloride monohydrat	4 g
• Destillert vann	100 ml

Ingrediensene fra grunnmediet ble blandet sammen i en E-kolbe på 1500 ml under omrøring slik at de bedre skulle løse seg i blandingen. Grunnmediet ble pH-justert til 8,2 før autoklaving i 15 min og deretter avkjølt til ca. 45 °C, før 10 ml av L-cysteinløsningen ble tilsatt grunnmediet ved hjelp av steril filtersprøyte.

Muskelprøver ble skåret på tvers av den tykkeste delen av fileten ved hjelp av sterilteknikk. To paralleller av fiskeprøvene ble tatt ut fra hver filet. Prøvene var lagret på is under hele prosessen. Tykkelsen på muskelprøven var 0,5 -1,0 cm .

Prøven ble overført til veieskip hvor den ble snittet opp i mindre biter med skalpell. Deretter ble 5 g veid ut, overført til stomacherposer og tilsatt 45 ml nedkjølt peptonvann (1:10 fortynning). Peptonvann bestod av 8,5 g natriumklorid og 1 g Bacto-peptone i 1000 ml destillert vann. Dette ble så autoklavert i 15 min. Blandingen ble homogenisert i stomacherposer i ca. 2 min for hånd. Homogenatet ble videre fortynnet 1:10, 1:10² og 1:10³ i peptonvann i sterile 1,5 ml eppendorf-rør. 50 µl ble pipettert fra eppendorf-rørene til petriskåler med jernagarmedium tilsatt L-cystein og strøket ut. Fortynningsseriene fra kjølelagring i porsjonspakninger ble på dag 6 forlenget til 1:10⁴ – 1:10⁶ og på dag 8 og 10 enda ett trinn 1:10⁵ – 1:10⁷. Petriskålene ble inkubert i romtemperatur i 3 dager før antall kolonier ble telt på skåler med passende fortynning. Svarte kolonier ble telt som H₂S-produserende bakterier (SPB) mens også ikke-svarte kolonier ble telt for å beregne totalt aerobt kimtall (TVC). Utrekningen av colony forming units (CFU) per gram ble fortrinnsvis gjort fra skåler som inneholdt mellom 20 – 200 kolonier.

Det ble foretatt mikrobiologiske prøver på dag 0, 4, 8 og 12 av fisken under tørkingen og på dag 1, 2, 3, 4, 6, 8 og 10 ved kjølelagring av porsjonspakninger.

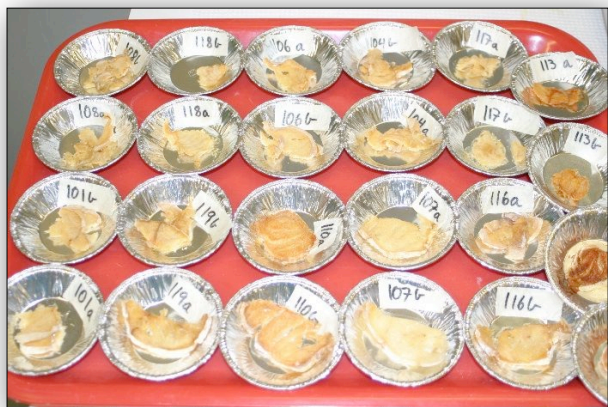
Tabell 3-1: Oversikt over uttak til kimtallsbestemmelse for tørking og kjølelagring.

Behandling	Mikrobiologiske prøver	Uttaksdager
Tørking	Fisk fra hjell	Dag 0, 4, 8 og 12
Kjølelagring	Ikke-utvannet luftlagret	Dag 2, 3, 4, 6, 8 og 10
	Utvannet luftlagret	Dag 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10
	Utvannet modifisert atmosfære (MAP)	Dag 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10

3.4. Vanninnhold

Vanninnholdet ble målt på beinfri, renskåret filet uten skinn. Det ble skåret en

skive på tvers av den tykkeste delen av filéten på 0,5 - 1 cm. Vekten på prøvene før tørking var 5-7 g for fiskene fra Spildra og 10-20 g for fisk fra Skarven. Vekten av prøvene etter tørking i ovn ved 105 °C i 24 og 48 timer ble så bestemt (Figur 3-4). Vanninnholdet ble deretter beregnet som det prosentvise forholdet mellom vekttapet og utgangsvekten.



Figur 3-4: Vanninnholdprøver etter 24 timer i 105 °C.

3.5. Totalt flyktig nitrogen (TVN)

Flyktige nitrogenforbindelser (N-forbindelser) ble dampdestillert fra en basisk løsning over i fortennet borsyre, og deretter titrert (Titronic basic, Schott instruments, Tyskland) med saltsyre frem til fargeomslag fra grønt til rødt. Kjeltec System 1002 Destilling Unit ble benyttet i dampdestillasjonen.

Følgende oppskrift for borsyreløsning ble fulgt:

- 0,1 % metylrødt indikator (0,1 g metylrødt løst i 100 ml destillert vann)
- 0,1 % bromkresolgrønt indikator (0,1 g bromkresolgrønt løst i 100 ml destillert vann)
- 80 g borsyre løst opp i 1500 ml destillert vann i en E-kolbe på 2000 ml.

E-kolben med borsyreløsning ble varmet opp under omrøring slik at borsyren løste seg lettere opp i vannet. 20 ml 0,1% bromkresolgrønt og 14 ml 0,1% metylrødt ble deretter tilsatt. Løsningen ble titrert til omslag til klar grønnfarge

med 38,5 ml 1M NaOH. Den ble deretter tilsatt destillert vann til 2000 ml-merket på E-kolben.



Figur 3-5: HCl titreres i fortynnet borsyreløsning til fargeomslag fra grønt til rosa.

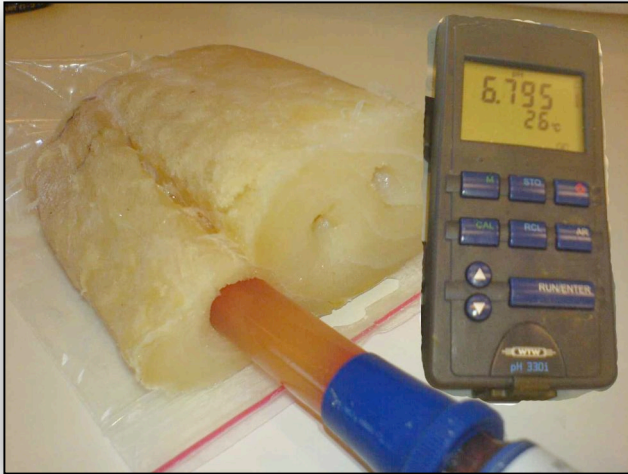
Skiver skåret på tvers av den tykkeste delen av filéten ble homogenisert i blender (Braun, Type 4191, Spania) og 10 g ble overført til veiepapir. Prøven ble overført til Kjeldahl destillasjonsrør sammen med veiepapiret. Dette ble så tilsatt 50 ml destillert vann. Destillasjonsrøret ble tildekket med parafilm og ristet. 3 ml rensed parafin og 1 g MgO ble tilsatt destillasjonsrøret, som nå ble koblet til destillasjonsenheten. 10 ml med borsyreløsning ble overført til 250 ml E-kolbe og satt inn i destillasjonsenheten. Destilleringen foregikk i 6 min fra vanndamp kom inn i destillasjonsrøret. Destillatet i E-kolben ble videre titrert med 0,1 M HCl til det ble fargeomslag fra

grønt til rosa (Figur 3-5). Det ble gjort to paralleller av hver av prøvene.

Blindprøve ble laget ved å benytte alle de ovennevnte ingrediensene med unntak av fiskefiléten. For å kontrollere påliteligheten av mengdebestemmelsene, ble en kjent mengde flyktig N titrert ved samme metode. 0,1364 g trimetylamminhydroklorid ble tilsatt en E-kolbe og 100 ml destillert vann ble tilsatt. Denne løsningen inneholdt 20,0 mg N/100 g. Ved å erstatte fiskeprøven på 10 g med 10 ml av denne løsningen, ville man ved destillering kunne påvise om all flyktig nitrogen blir gjenfunnet. Resultatet av denne analysen var 19,5 mg N/100 ml, det vil si at 98 % av alt flyktig nitrogen ble gjenfunnet. Prøvene fra de ulike dagene var for hver av fiskene pakket i egne ziplock-poser. Prøvene kom fra fryst tilstand ved -20°C og ble lagt på is frem til de ble homogeniserte.

3.6. pH-måling

pH-målinger ble utført på tinte filéter ved hjelp av stikk-pH-meter (WTW 330/set-1) som ble stukket inn i filéten på fiskeprøvene. Det ble i alt gjort 3 målinger på hver av filéten. pH-meteret ble kalibrert i buffer med pH 4,01 og 7.00. Dette ble også gjort underveis ved ca. hver 30. måling. Sonden på pH-meteret ble skylt i destillert vann mellom hver ny fisk som ble målt.



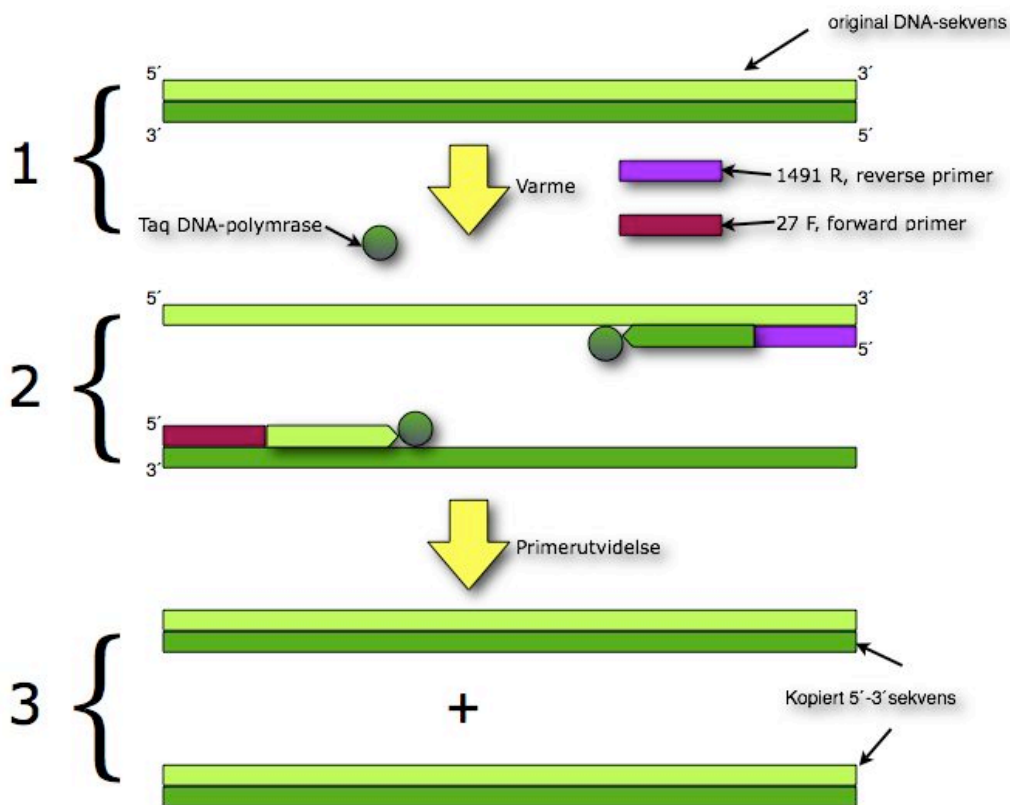
Figur 3-6: Filét av fisk med pH-sonde.
Innfelt i bildet er pH-meteret.

3.7. Polymerase chain reaction (PCR)

PCR, eller polymerase chain reaction, benytter seg av et varmestabilt enzym fra DNA-polymerasen som er isolert fra den termofile *Thermus aquaticus* (Madigan et al., 2003). Dette enzymet kalles Taq polymerase og brukt i automatiseringen av den repeterende reaksjonen i PCR, som oppformere spesifikke DNA-sekvenser. For at Taq-polymerase skal kunne oppformere DNA-sekvenser kreves det 2 oligonuklotid-primere. For at PCR skal kunne fungere må primerene ha komplementære sekvenser med det genet som skal identifiseres. Programmet brukt i 3.8.2 kan illustrere følgende reaksjon i Figur 3-7:

1. Varme tilføres slik at DNA-sekvensen som skal oppformeres denatureres. Det er nå to oppsplittede 3' - 5'-sekvenser

2. To oligonukleotid-primere (27F og 1491R) blir bundet på hver sin flanke av DNA-sekvensen blir satt sammen på et syntetisert oligonukleotid og tilsatt i store mengder. Taq DNA-polymerasen bygger så ut primerene ved å binde seg til den oppsplittede 3'-5'-sekvensen. Under nedkjøling vil overskuddet av primere relativt til antall DNA-sekvenser sikre en herding til en primer og ikke til DNA-sekvensene.
3. Taq DNA-polymerase har nå kopiert 5'-3'-sekvensen med den originale 3'-5'-sekvensen som mal. Resultatet er to identiske DNA-sekvenser. Ved repetere punkt 1-3 vil antall DNA-sekvenser på nytt fordobles.



Figur 3-7: Polymerase chain reaction (PCR) for amplifisering av spesifikke DNA-sekvenser. Figuren er modifisert fra Brock biology of microorganisms, tenth edition, figur 10.45 (Madigan et al., 2003).

3.8. *Sekvensbestemmelse av 16S-ribosomalt RNA-genet*

3.8.1. Ekstraksjon og rensing av DNA

Representative bakteriekolonier fra dag 8 av kjølelagringen ble renyrket videre på jernagarmedium og deretter overført til flytende medium (Tryptic Soy Broth, Difco, USA) og inkubert ved 12 grader i to døgn. 50 µl flytende kultur ble overført til eppendorf-rør og spunnet ned ved 13.200 rpm i 1 min. Supernatant ble fjernet og pelleten ble løst i 50 µl GES (5 M guanidium thiocyanat, 100 mM EDTA, 0,5% sarcosyl) og det ble tilsatt 400 µl destillert vann. 400 µl fenol:kloroform: isoamylalkohol 25:24:1 (Sigma) ble tilsatt i avtrekksskap. Eppendorf-rørene ble ristet, inkubert på benk i 2 min og siden sentrifugert (Eppendorf Centrifuge 5417 R, Tyskland) i 3 min ved 13.200 rpm. Etter sentrifugeringen var det dannet tre faser i eppendorfrørene. Den nederste fasen bestod av fenol:kloroform, den midterste fasen var organisk utfelt materiale og den øverste vannfasen inneholdt DNA. Det ble overført 200 µl fra vannfasen til nytt eppendorf-rør, og tilsatt 20 µl 3 M natriumacetat (NaOAc)(pH 5,3) og 400 µl 100% etanol. Røret ble vendt noen ganger før det ble satt på is i 30 min. Eppendorf-rørene ble så spunnet i sentrifuge i 20 min ved 13.200 rpm. Ved plassering av rørene i sentrifugen var det viktig å sette alle rørene likt slik at pellets ble dannet på samme plass for samtlige rør. Dette for at fjerning av supernatant skulle være enklere. Pelletene ble vasket i 120 µl 70 % etanol og rørene sentrifugert ved 13.200 rpm i 5 min. Supernatantene ble så fjernet ved hjelp av pipette og rørene ble lufttørket i åpen stilling i ca. 20 min, slik at all væske var fordampet. Rørene ble så tilsatt 50 µl destillert vann og satt i kjøleskap for lagring frem til PCR-amplifisering.

3.8.2.PCR-amplifisering (PCR) av bakterielt 16S-rDNA

Mengden DNA i prøvene ble bestemt ved at 1,5 µl ble pipettert ut på NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ND-1000 Spectrophotometer, USA). Prøvene måtte også være tilstrekkelig rene med hensyn på DNA. Hvis konsentrasjonen var under 10 ng/µl krevde prøven videre rensing. I forhold til mengden ng/µl i hver av prøvene ble de fortynnet i destillert vann slik at konsentrasjonen ble ca. 50 ng/µl.

Ved PCR-amplifisering (Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 2700, Japan) ble det benyttet PCR-rør tilsatt 43 µl Milli-Q-vann (autoklavert), 5 µl 10x buffer, 1 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl forward primer (27F (3'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-5'), 100 ng/µl)(medProbe), 0,5 µl reverse primer (1491R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 100 ng/µl) og 0,2 µl Taq DNA-polymerase og 1 µl rensed DNA. Det ble i tillegg laget en negativ kontroll med alle ingrediensene, unntatt rensed DNA. Det ble brukt følgende program ved amplifiseringen:

1. 94 °C i 10 min,
2. 30 sykluser à
 - 94 °C i 30 sek
 - 53 °C i 30 sek
 - 72 °C i 90 sek
3. Til sist et elongerinstrinn ved 72 °C på 7 min og nedkjøling til 4 °C.

Prøvene ble satt i kjøleskap ved 4 °C for oppbevaring frem til verifisering av PCR-produkt ved elektroforese.

3.8.3. Gel-elektroforese

For å verifisere at PCR-reaksjonen ga produkt av forventet størrelse ble det kjørt elektroforese i en agarose-gel. 0,8 g agarose (Multi ABgarose) og 80 ml TAE-buffer (40 mM Tris-acetat, 1mM EDTA) ble blandet i E-kolbe og kokt opp i mikrobølgeovn. Etter nedkjøling til ca. 50 °C ble 4 µl ethidium bromid tilsatt E-kolben, og blandingen ble helt over i elektroforese-kar (Liberty 2 Systems, Biokey American Instrument, USA) og plassert i avtrekkskap. Elektroforesekaret var påmontert to stykk kammer, slik at 2x15 brønner ble dannet i gelen. Etter ca. 30 min var agarosen stivnet. TAE-buffer ble tilsatt elektroforese-karet på anode- og katodesiden, mens det i det midterste kammeret ble tilsatt destillert vann. Det ble pipettert ut 7 µl prøve blandet med 1 µl loading buffer i til brønnene i gelen. En størrelsesstandard (Ladder) ble tilsatt i to brønner for å estimere lengdene på PCR-produktet. Karet ble så koblet til en strømkilde (250 V, 137 mA, 34 W) i 7 min. Gelen ble fotografert i UV-lys (Gene Genius Bio Imaging system, Syngene) og positive prøver åpenbarte seg som lyse, fluoriserende bånd på mørk bakgrunn med estimert sekvenslengde på ca. 1500 basepar (bp).

3.8.4. Saltfelling av positive PCR-prøver

For at prøvene skulle kunne sekvenseres videre, var det nødvendig med saltfelling av de positive PCR-prøvene. I eppendorfrør ble det tilsatt 35 µl PCR-produkt, 70 µl 95 % EtOH og 3,5 µl 3 M NaOAc (pH 5,2). Blandingene ble kjørt raskt i vortex (VWR internasjonal, VWR 1719, Tyskland), spunnet i sentrifuge og inkubert på is i 30 min. Deretter ble rørene sentrifugert i 20 min ved 13.200 rpm. Supernatanten ble fjernet, pelleten vasket med 100 µl 70 % EtOH og deretter sentrifugert på ny i 5 min ved 13.200 rpm. Supernatant ble fjernet enda en gang og pellet ble tørket ved romtemperatur til all væsken var fordampet. Pelleten ble løst i 40 µl autoklavert Milli-Q-vann tilsatt ved hjelp av pipettespiss med filter. Prøvene ble så satt i kjøleskap ved 4 °C.

3.8.5.Sekvenseringsreaksjon

DNA-måling med NanoDrop ble utført på de positive PCR-prøvene. Prøver med konsentrasjon under 5 ng/ μ l var her i faresonen. En av prøvene hadde verdien 3,25 ng/ μ l, men ble likevel tatt med i analysene. Prøvene ble overført til PCR-rør og fortynnet i Milli-Q-vann til konsentrasjonen 5 ng/ μ l. Det ble tilsatt 6,5 μ l sekvenseringsbuffer (Applied Biosystems), 1,5 μ l sekvenseringsmix 3.1 (Applied Biosystems) og 2 μ l 27F primer (10 ng/ μ l) i PCR-rørene. Reaksjonen ble kjørt ved hjelp av følgende program:

1. 94 °C i 2 min
2. 35 sykluser à
 - 94 °C i 10 sekunder
 - 53 °C i 10 sekunder
 - 60 °C i 4 min
 - 4 °C i ∞

Prøvene ble deretter saltfelt på lik linje med prosedyren i 3.8.4, men med 20 μ l reaksjonsprodukt, 40 μ l 95 % etanol og 2 μ l 3M NaOAc (pH 5,2). Etter lufttørring ble rørene tilsatt 20 μ l formamid og sekvensen ble bestemt i en kapilær-sekvensator (ABI Prism 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems, Japan)

3.8.6. Identifisering av isolatene fra 16 S-rDNA-sekvensen

Dataene fra den primære avlesning fra sekvensatoren ble overført til programmet BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) for vurdering av kvaliteten på sekvensen. Ble denne funnet tilfredstillende ved at det var få eller ingen baser med usikker identitet, ble hoveddelen av sekvensen (oftest ca. 500 bp) kopiert og lagret som diskfil. Denne sekvensen ble benyttet til klassifisering via to

søkemotorer: RDP Classifier/The Ribosome Database Project II; <http://rdp.cme.msu.edu>) og BLAST (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Førstnevnte er mer konservativ, ved at den søker i 16S-rDNA-sekvenser fra etablerte, identifiserte bakteriearter og den gir identitet kun ned til et nivå som kan fastslå med 95% sikkerhet (dvs. typisk slektsnivå). Denne er utgangspunktet for klassifiseringen som presenteres i Tabell 2-1. BLAST-databasen er større, men mindre kvalitetssikret og er benyttet for å få en antydningvis klassifisering også på artsnivå.

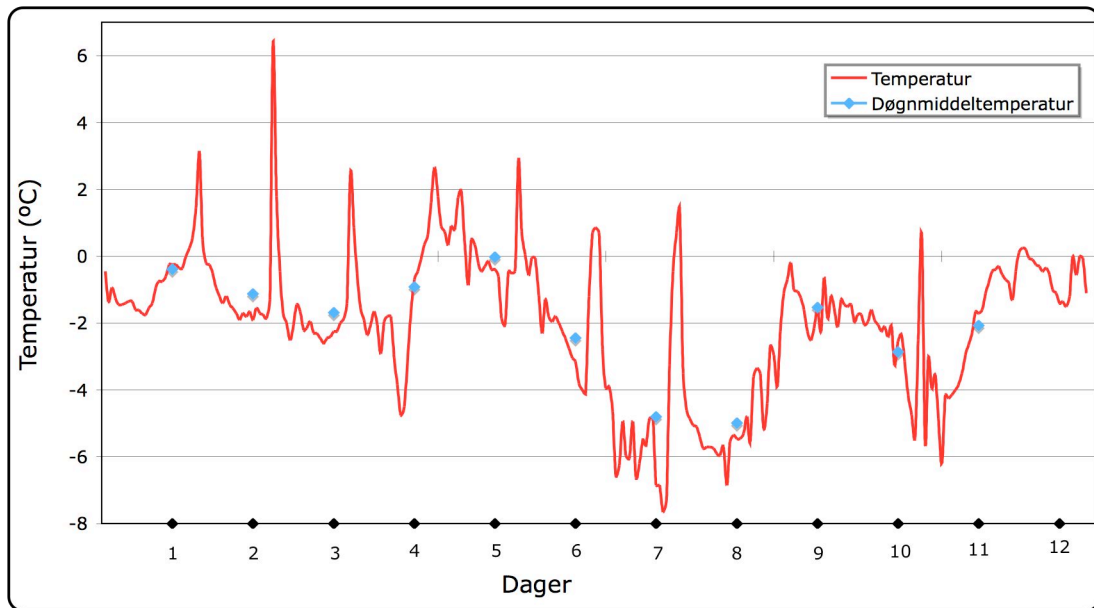
4. Resultater

4.1. *Produksjon av boknafisk*

Garnfanget torsk ble rotskjært og hengt på hjell på Spildra i perioden 23. oktober - 4. november 2006. Uttak for mikrobiologiske prøver ble gjennomført på dag 0, 4, 8 og 12.

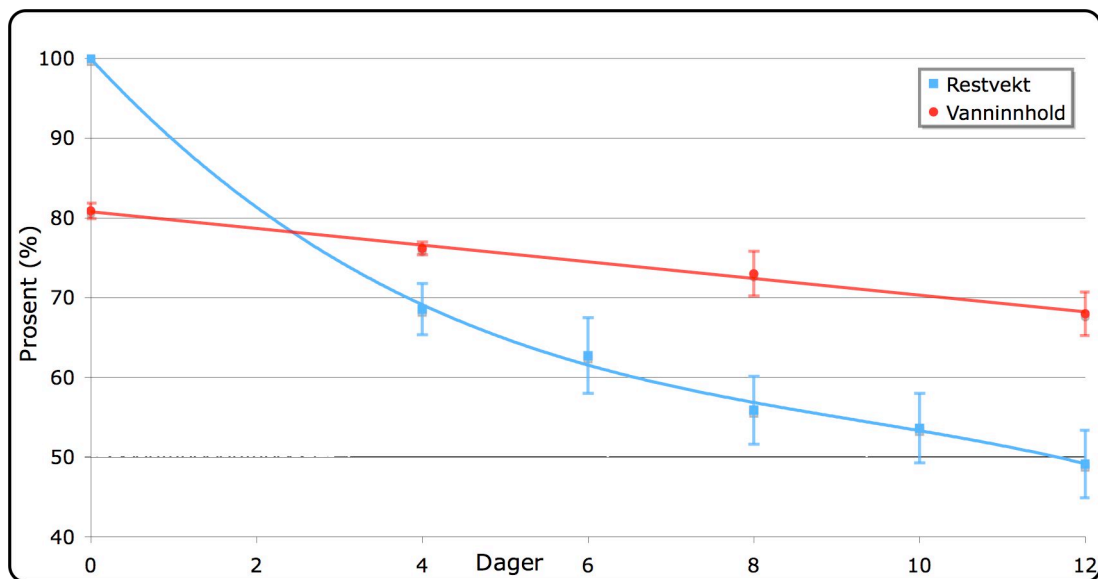
4.1.1. Temperatur og tørking

Det ble målt lufttemperaturen hver time ved hjelp av temperaturloggere. Ved beregning av gjennomsnitttemperaturen for den enkelte dag er det brukt Meteorologisk Institutt sin definisjon på temperaturdøgn, med 24 målinger der døgnet går fra kl. 19 til 19 (vinterstid) (met.no, 2007). De blå firkantene i Figur 4-1 angir døgnmiddeltemperaturen mens den røde grafen angir gjennomsnittet av temperaturen målt på timebasis med 2 temperaturloggere. Figur 4-1 viser at temperaturen i hele tørkeperioden hadde et døgngjennomsnitt på ≤ 0 °C, der kaldeste temperaturdøgn var dag 8 med -5 °C. Kaldeste temperatur som ble logget gjennom hele perioden var på dag 7 med -7,7 °C kl. 08.35. Det var klart vær i første halvdel av perioden, slik at solen på sitt høyeste hadde en merkbar effekt på temperaturmålingene, det vil si høye temperaturverdier. Høyeste temperatur i perioden ble målt på dag 2 med +6,4 °C klokken 12.35. Dag 4 og dag 5 hadde høyest døgntemperatur med henholdsvis -0,9 og 0,0 °C.



Figur 4-1: Døgnmiddeltemperatur (blå firkanter) og løpende temperaturmålinger (rød graf) gjennom tørkeforsøket 23.10.06-04.11.06. Døgnmiddeltemperaturen er beregnet i henholdt til Meteorologisk Institutt sin definisjon på døgntemperatur.

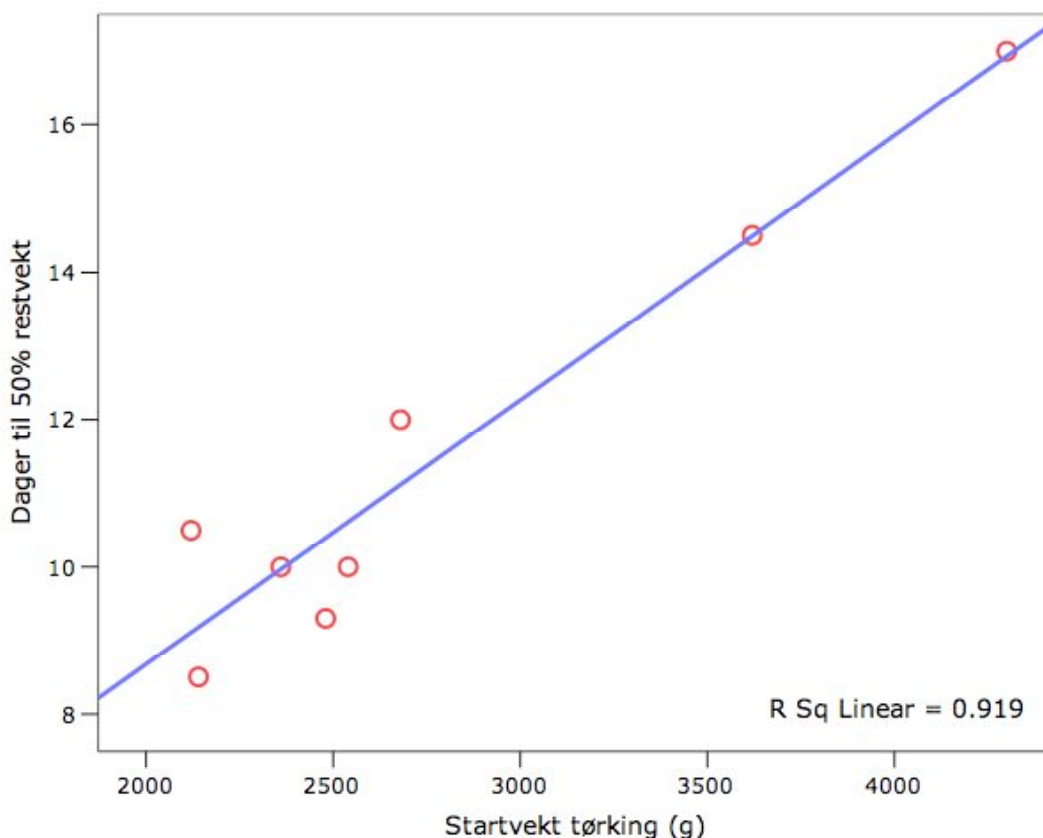
Det var i utgangspunktet usikkerhet med tanke på hvor lang tid fisken ville bruke på å tørke ned til 50% av den opprinnelige vekten. Derfor ble det i alt hengt 18 fisk på dag 0. På denne måten ble det lagt opp til mikrobiologiske uttak av prøver også på dag 14 og 16, hvis det skulle bli behov for det. Ved dag 12 ble imidlertid tørkingen avsluttet, siden fisken hadde nådd ønsket vekt, det vil si $49,1 \pm 4,2\%$ (\pm standardavvik) av sin opprinnelige ved dag 0. Alle fiskene ble veid på dag 0, 4, 6, 8, 10 og 12. Fra dag 0 og til dag 4 er det en reduksjon fra den opprinnelige vekten på $31,5 \pm 3,2\%$.



Figur 4-2: Restvekt (blå punkter) og vanninnhold (røde punkter) av rotskjært torsk under tørking på hjell, angitt i prosent (%). Ved kurvetilpasningen er det brukt 3. ordens polynom for restvekt og lineær regresjon for vanninnhold.

Figur 4-2 viser restvekt og vanninnhold på fisken. Den røde linjens målepunkter stammer fra fisk brukt ved mikrobiologiske prøver (3 fisk for hver av prøvedagene). Den blå kurven er dannet fra vektmålinger av all fisk hengt på hjellen, der de mikrobielle uttakene har ført til en reduksjon av 3 fisk for hver av uttaksdagene. Den prosentvise restvekten (blå kurve) ble bestemt for hver enkelt fisk ut fra den vekten den hadde da den ble veid før henging (=100%). Fra dag 0 til dag 4 hadde fisken en restvekt på $68,5 \pm 3,1\%$, ved dag 8 var vekten $56,9 \pm 5,5\%$ og dag 12 var den sunket til $49,6 \pm 4,3\%$. Den videre vektreduksjonen fra det ene måletidspunktet til det neste (dag 4 → dag 6, dag 6 → dag 8, dag 8 → dag 10 og dag 10 → dag 12) lå i området 6-11%.

Den røde linjen i Figur 4-2 angir det prosentvise vanninnholdet i muskelprøver fra fisken som ble tatt ut til mikrobiologiske prøver. Vanninnholdet sank tilnærmet lineært gjennom hele tørkeperioden. Fra et utgangspunkt på $80,9 \pm 0,9\%$ ved dag 0 var det $76,2 \pm 0,8\%$ ved dag 4, $73,0 \pm 2,8\%$ ved dag 8 og $68,0 \pm 2,7\%$ ved dag 12.



Figur 4-3: Antall dager frem til 50% restvekt som funksjon av vekten (g) ved dag 0. Målepunktene ble bestemt for de ulike fiskene ved å interpolere/ekstrapolere for hånd ut fra måledataene for tørketid. Trendlinjen er en lineær regresjon

Om man ser nærmere på den prosentvise vektreduksjonen fra dag 8 til dag 12, så går den fra 56,5% til 49,6%. Den minste fisken som i utgangspunktet allerede ved dag 8 hadde nådd halvert vekt, hadde ved dag 12 45% av startvekt. Fisk som på dag 10 hadde nådd halvert vekt, gikk frem til dag 12 til ned til mellom 45% og 46% restvekt. I Figur 4-3 er antall dager frem til 50% restvekt satt inn som en funksjon av startvekt hos fisken ved dag 0. Selv om det var stor usikkerhet i estimatene for den minste fisken, indikerte den tilhørende lineære trendlinjen at det var så mye som 7-9 dagers forskjell i tørketid innen det størrelsesintervallet som ble brukt i forsøket (2-5 kg)

Fra dag 0 til dag 8 hadde den største fisken et prosentvis mindre vakttap enn den minste fisken. Beregninger gjort mellom startvekt dag 0 og restvekt ved dag 8 viste en tett korrelasjon mellom disse størrelsene ($R^2=0,998$). Forholdet mellom startvekt dag 0 og prosentvis vektreduksjon dag 8 viser også en høy grad av korrelasjon ($R^2 =0,98$).

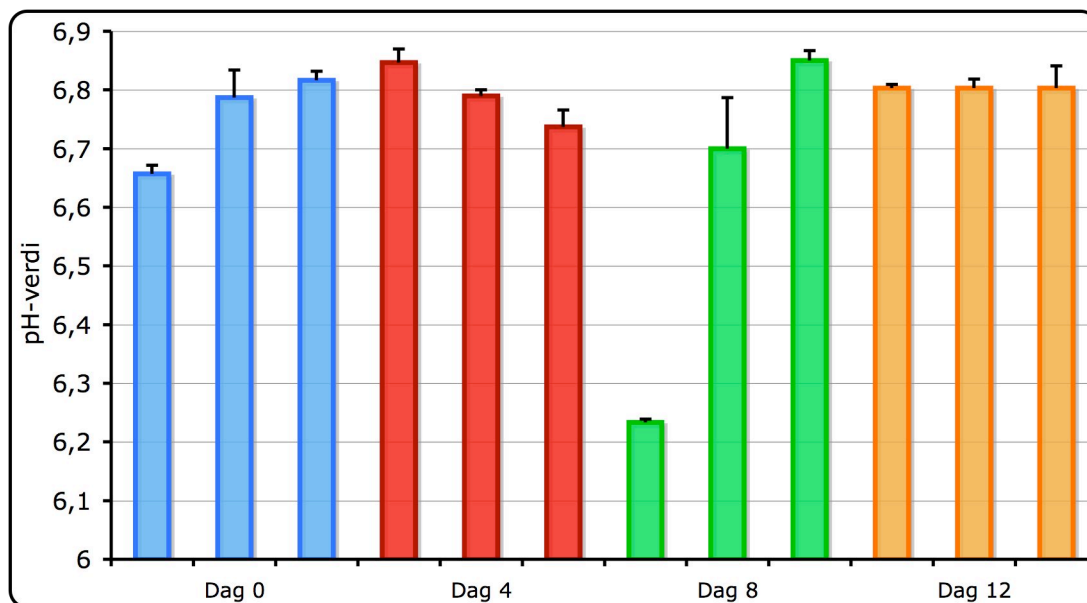


Figur 4-4: Tørkesjikt i fiskemuskel. De ulike sjiktene er angitt med tall 1, 2 og 3.

Ved uttak av fisk på dag 12 ble det i fiskemuskelen registrert 3 ulike sjikt i snitt av filéten (Figur 4-4). Sjikt 1, eksponert mot vær og vind, var blankt med en fast konsistens, læraktig. Sjikt 2 var hvitt med en løsere fiberkonsistens. Sjikt 3, mot skinnsiden, var likt lag 1, men noe tynnere. Sjiktingen i fiskemuskelen ble også registrert ved tidligere uttak, men ble mer tydelig utover i tørkeperioden.

4.1.2. pH-målinger

pH-måling ble gjort ved hjelp av stikk-pH-meter. Tre målinger ble gjort på hver fisk. Figur 4-5 viser pH-verdien under tørkeprosessen som varierte mellom 6,64 og 6,86, med unntak av en enkelt fisk som hadde en verdi på 6,23. Det var ingen tendens til noen systematisk endring over tørkeperioden.



Figur 4-5: pH-verdier fra muskelprøver tatt under produksjon av boknafisk. Blå farge angir de 3 fiskene fra dag 0, rød farge angir dag 4, grønn farge angir dag 8 og gul farge angir dag 12. Feilfeltene angir standardavvik mellom 3 målinger i hver muskelprøve.

4.1.3. Mikrobielle målinger

Totalt kimtall (TVC) og antall sulfidproduserende bakterier (SPB) ble registrert under tørkingen. Det ble tatt ut tre fisk på dag 0, 4, 8 og 12. Prøvene ble opparbeidet, strøket ut på jernagarmedium med L-cystein og inkubert ved romtemperatur i 3 dager. På dag 0 ble det registrert i alt 60 kolonier på 5 plater med fortytning 10^{-1} . Dette svarte til $2,4 \cdot 10^3$ CFU/g. På dag 4 ble det totalt observert < 10 kolonier på de 5 platene med minst fortytning, noe som ikke ga grunnlag for et pålitelig estimat. På dag 8 og 12 ble det ikke registrert bakteriekolonier. Det ble, som en sikkerhetsjekk på at jernagarmediet med L-cystein fungerte som det skulle, gjennomført en mikrobiologisk analyse av fisk lagret i romtemperatur i 24t, hvor det ble registrert teppevekst på samtlige tre fortytninger (10^{-1} , 10^{-2} og 10^{-3}).

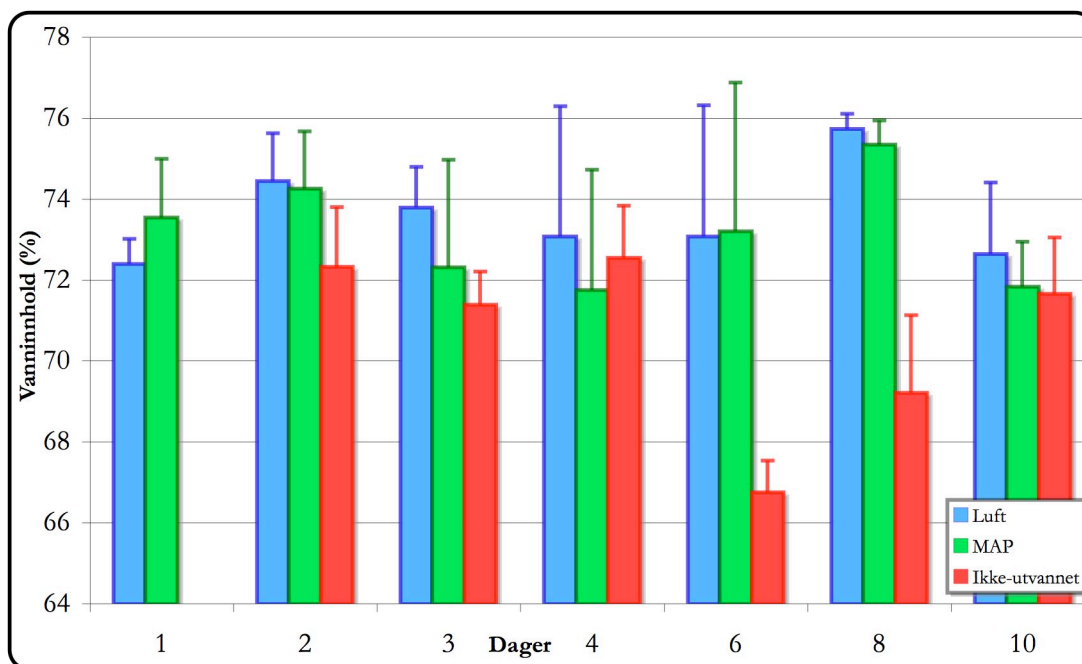
4.2. Kjølelagring av porsjonspakninger

4.2.1. Utvanning

Porsjonsstykker av renskåret trimmet boknafisk, der sporden, bukhinna og skinnet var fjernet, ble pakket i tette plastbakker og lagret på kjølelager ved 5 °C i inntil 10 dager. Boknafisken var av identisk kvalitet med den som ble produsert ved hengingsforsøket. Fisken ble gitt tre forskjellige behandlinger: Ikke-utvannet og utvannet fisk i luftatmosfære, og utvannet fisk i modifisert gass-atmosfære (MAP).

Fisken ble vannet ut i seks timer i stamp ved 5 °C i seks timer. Fisken hadde en prosentvis vektøkning på $21,1 \pm 4,5\%$ under utvanningen. Gjennomsnittsvekten av fisken var før utvanning $0,784 \pm 0,225\text{kg}$ og $0,943 \pm 0,256\text{kg}$ etter utvanningen.

Figur 4-6 viser vanninnholdet i muskelprøver av utvannet, luftpakket boknafisk, MAP-fisk og ikke-utvannet boknafisk. De utvannede prøvene varierte etter samme mønster, selv om nivået i den luftpakkede gjennomgående var noe høyere ved de fleste prøveuttakene. Student t-test viste at middelveiden av differansen ikke var signifikant forskjellig fra 0 ($P=0,05$). Den eneste forskjellen mellom de to utvannede gruppene var atmosfæren i pakningen, siden prøvene fra samme dag skrev seg fra samme fisk. Det ble ikke registrert noe vesentlig drypptap – heller ikke i de gasslagrede prøvene med 30% CO₂. De ikke-utvannede prøvene hadde et gjennomsnittlig vanninnhold på $70,5 \pm 3,6\%$ mens de utvannede hadde gjennomsnittlig vanninnhold på $73,4 \pm 2,1\%$.



Figur 4-6: Vanninnholdet i muskelprøver som ble tatt ut under kjølelagringsforsøket. Blå søyle angir utvannet, luftpakket fisk, grønn søyle angir MAP-fisk og rød søyle angir ikke-utvannet fisk. Feilfeltene angir standardavviket mellom 3 prøver.

4.2.2. Kimtallsbestemmelser

Kimtallsutviklingen på boknafisk lagret på kjølerom vises i Figur 4-8. Det benyttede vekstmediet ga mulighet for både å bestemme total kimtall (TVC) ved telling av samtlige kolonier på agarskålene og antall sulfidproduserende bakterier (SPB) fra telling av svarte kolonier. Figur 4-7 viser fortynningen 1:10⁶ på dag 8. Forskjellen i antall bakterier fra samme fisk, men med ulik pakkemetode kan sees. Petriskålene hadde henholdsvis 168 kolonier totalt og 96 svarte kolonier for den luftpakkede fisken, mens de tilsvarende tallene var henholdsvis 44 og 40 for MAP-fisken.

Fisken pakket i luft hadde gjennomgående høyere TVC enn den pakket i MAP, uavhengig av om den var utvannet eller ikke. Mens MAP-fisk nådde

maksimalnivået for log CFU per g på $8,15 \pm 0,27$ etter 8 dager, ble samme nivået passert etter ca. 5 dager i utvannet, luftpakket fisk. For ikke-utvannet, luftpakket



Figur 4-7: Petriskåler med hvite og svarte bakteriekolonier. Øverst til høyre er en petriskål fra utvannet, luftpakket boknafisk. Nederst til venstre er petriskål fra den samme fisken i MAP. Platene stammer fra dag 8 og har fortykning $1:10^6$.

fisk var maksimalnivået for log CFU per g lik $7,28 \pm 0,45$. På dag 1 var det totale kimtallet for utvannet fisk pakket i luft og i MAP tilnærmet det samme, men differansen økte deretter raskt, siden bakteriene i den MAP-pakkede fisken viste en tydelig nølefasen og lengre doblingstid fram til dag 4. Utgangs-TVC i ikke-utvannet fisk var tilnærmet likt nivået til utvannet, luftpakket fisk ved dag 2. Kimtallet for utvannet/luftpakket lå systematisk $0,1-0,8$ log-enheter høyere f.o.m. dag 3 til avslutningen av forsøket.

SPB var til stede i påvisbare mengder i endel av de luftpakkede, utvannet fiskene på dag 2 med log

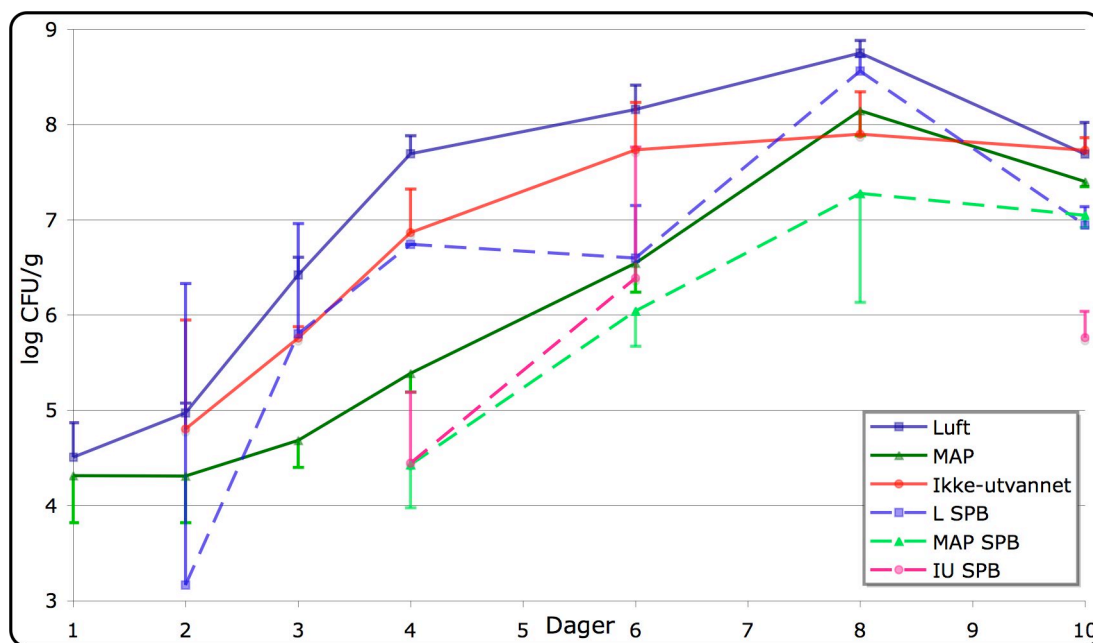
CFU per g på 3,16. I MAP ble SPB observert fra og med dag 4, med log CFU per g lik 4,43.

Som for TVC var dag 8 også den dagen det høyeste nivået av SPB ble observert i de utvannede prøvene. I luftlagret fisk nådde TVC på log CFU per g $8,75 \pm 0,13$ og log SPB var $8,56 \pm 0,15$ denne dagen, mens MAP hadde TVC på log CFU per g lik $8,15 \pm 0,27$ og SPB lik CFU $7,28 \pm 1,14$.

Ikke utvannet boknafisk viste en litt annen utvikling ved at verdiene for totalt kimtall flatet ut ved ca. log CFU per g lik 7,80 etter 6 dager. SPB ble kun påvist i prøver fra dag 4, 6 og 10, der SPB på 4. dag bare utgjorde 1% (Tabell 4-1) av

TVC, dag 6 utgjorde de hele 40% av TVC, mens for dag 10 utgjorde de igjen bare 1% av TVC.

SPB på MAP-fisk var ved 4. dag 5% av TVC, mens for dag 6, 8 og 10 var 35%, 41% og 45% av TVC.



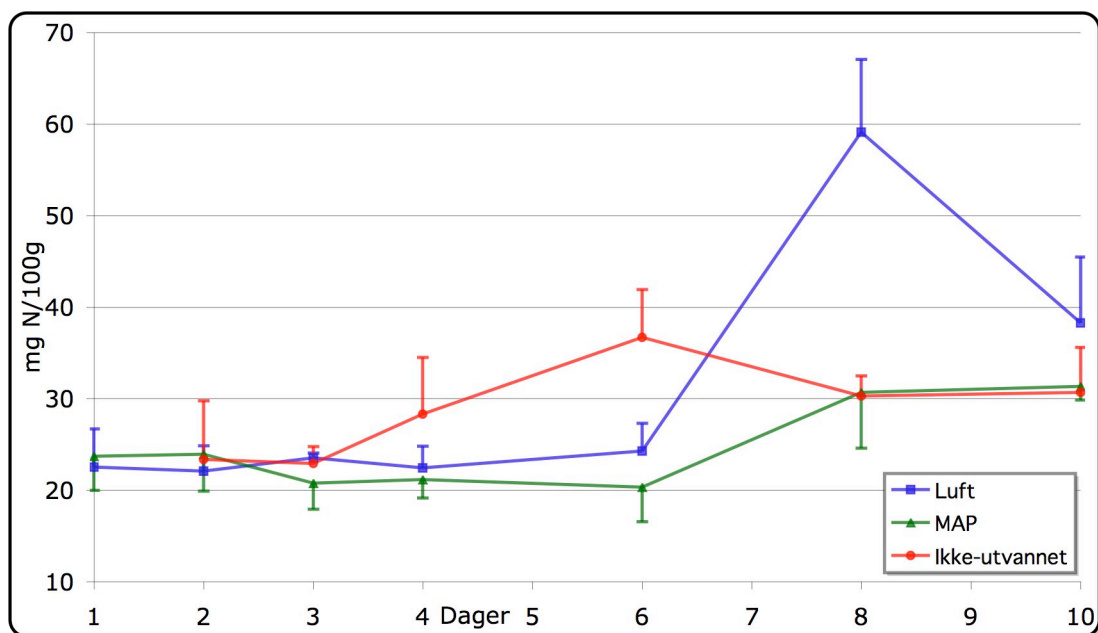
Figur 4-8: Utviklingen av totalt kimtall (TVC; heltrukne linjer) og antall sulfidproduserende bakterier (SPB; striplede linjer) under kjølelagring av boknafisk, angitt som log-verdier av CFU per g prøve. Blå punkter og linjer angir utvannet, luftpakket fisk, grønne punkter og linjer angir MAP-fisk og røde punkter og linjer angir ikke-utvannet fisk. Det ble ikke pakket ikke-utvannet boknafisk for dag 1. Feilfeltene angir standardavviket mellom tre prøver. Manglende målepunkter svarer til at bakterietallet ikke overskred deteksjonsgrensen på ca. 500 CFU/g.

Tabell 4-1: Andelen sulfidproduserende bakterier (SPB) i prosent av totalt kimtall. i.p. angir at SPB ikke ble påvist.

Lagringstid (døgn)	Luft	MAP	Ikke-utvannet
2	2	i.p.	i.p.
3	65	i.p.	i.p.
4	8	5	1
6	5	35	40
8	65	41	i.p.
10	16	45	1

4.2.3.TVN og pH

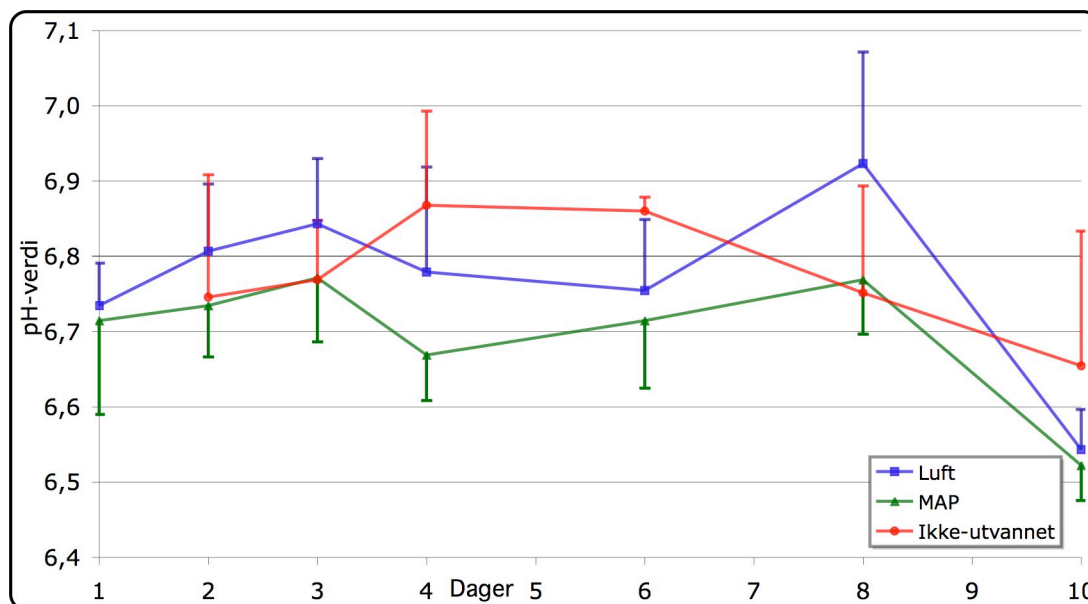
TVN-målingene var stabile på 20-23 mg N/100g for både utvannet, luftpakket, MAP-fisk og ikke-utvannet boknafisk til og med dag 3 (Figur 4-9). Ikke-utvannet fisk hadde på dag 4 steget til $28,3 \pm 6,2$ mg N/100g, mens de utvannede prøvene fremdeles holdt seg på utgangsnivået. Dag 6 hadde ikke-utvannet den høyeste verdien med $36,7 \pm 5,2$ mg N/100g. Fra dag 6 til 8 skjedde det er kraftig økning i TVN-nivået i prøvene av utvannet, luftlagret fisk, til hele $59,1 \pm 7,9$ mg N/100g. I 10-dagersprøvene var middelverdien igjen under 40 mg N/100g, men likevel klart høyere enn i de to andre variantene, som begge stabiliserte seg på nær 30 mg N/100 g på dag 8 og 10.



Figur 4-9: TVN-verdier i kjølelagret boknafisk. Blå linje angir utvannet, luftpakket fisk, grønn linje angir MAP-fisk og rød linje angir ikke-utvannet fisk. Feilfeltene angir standardavvik mellom 3 prøver.

pH-målinger ble gjort ved hjelp av stikk-pH-meter. Figur 4-10 viser at pH-verdien for luftpakket, utvannet boknafisk lå noe over MAP-fisken gjennom hele perioden

Differansen var 0,77 pH-enheter og en Student t-test bekreftet at den var statistisk signifikant ($p < 0,01$).



Figur 4-10: pH-verdi i muskelprøver som ble tatt under kjølelagringsforsøket. Blå linje angir utvannet, luftpakket fisk. Grønn linje angir MAP-fisk. Rød linje angir ikke-utvannet fisk. Feilfeltene angir standardavviket mellom tre prøver.

4.2.4. Systematisk klassifisering

Totalt 17 renisolater fra dag 8 ble dyrket i flytende medium (Tabell 4-2). Fra prøvene av utvannet fisk ble det kun plukket svartpigmenterte kolonier (SPB). På platene fra luftpakkede prøver ble det kun observert en SPB-kolonitype, og det ble plukket 2 isolater fra disse. MAP-platene hadde to SPB-kolonityper. Selv om en av disse var tallmessig helt dominerende, ble begge plukket for klassifisering, med henholdsvis 6 og 1 isolat. Ingen SPB ble observert på plater fra ikke-utvannet fisk fra dag 8, og det ble plukket 4 isolater fra hver av de to dominerende kolonitypene. Bakteriepelleter fra de flytende kulturene gjennomgikk DNA-ekstraksjon, PCR-amplifisering av 16S-rDNA og sekvensering av nedre del(5'-enden) av genet fra 27F-primeren. Gjennomgående gav dette 500-550 basepar med sekvens av god kvalitet, noe som i de fleste tilfeller gir grunnlag for pålitelig klassifisering av bakteriene ned til slektsnivå, mens artsklassifiseringen er

mer usikker (Bjarne Landfald, personlig meddelelse). Underveis i prosessen ble det endel negative prøver. Kun 12 av de 17 kulturene ble verifisert å gi PCR-produkt av rett størrelse ved gel-elektroforese og ytterligere 3 ga ikke sekvenser av tilfredstillende kvalitet for å bruke til klassifiseringen (Tabell 4-2) Dette har gjort at noen kolonityper som ble valgt ut fra dag 8 er dårlig representert eller helt urepresentert blant de 9 prøvene som ga god sekvens.

Det mest entydige resultatet av klassifiseringen, var at samtlige isolater som ga

Tabell 4-2: Fra ren-isolat via PCR-produkt til god sekvens.

	ren-isolat	PCR-produkt	god sekvens	klassifisering
Ikke-utvannet (ikke SPB)	4	3	3	<i>Psychrobacter</i>
	4	1	1	<i>Pseudomonas</i>
Utvannet, luftpakket (SPB)	2	2	1	<i>Psychrobacter</i>
Utvannet, MAP (SPB)	1	1	0	
	6	5	4	<i>Shewanella</i>
Totalt	17	12	9	

resultat fra MAP-lagret fisk, viste seg å tilhøre slekten *Shewanella*. BLAST-søk pekte videre mot at de alle med stor sannsynlighet var isolater av *S. putrefaciens*. Det synes derfor som denne arten var den dominerende SPB i de gasslagrede prøvene, iallfall i en sein fase av kjølelagringen. Den ene SPB-isolatet som ga god sekvens fra luftpakkede, utvannede prøver, var fra en annen slekt, nemlig *Psychrobacter* – og BLAST-søk pekte sterkt i mot den nylig beskrevne *P. cibarius*. Grunnlaget er for tynt til at en kan trekke konklusjoner, men som nevnt, så såg alle SPB-koloniene på disse agarplatene identiske ut. Det er derfor en god sannsynlighet for at *P. cibarius* er en karakteristisk SPB i disse prøvene.

Psychrobacter slekten var åpenbart også representert blant bakteriene fra ikke-utvannede prøver, men disse isolatene, som BLAST-søk indikerte at tilhørte *P. glacincola* var ikke av SPB-typen. Det ene isolatet fra ikke-utvannet fisk som ble klassifisert som *Pseudomonas fluorescens*, tilhørte også en sterkt representert kolonitype, noe som peker mot at denne arten var et stort innslag i disse prøvene.

5. Diskusjon

De forsøkene som er blitt gjennomført har hatt som mål å undersøke en del viktige forhold knyttet til produksjon av boknafisk, og kjølelagringsegenskapene til det ferdige produktet.

5.1. *Produksjon av boknafisken*

Produsenten av boknafisk på Spildra har et klart mål om å levere fisk av førsteklasses kvalitet for å tilfredstille kresne kunder blant annet innen restaurantsegmentet. ”Kvalitet fremfor kvantitet” er et gjennomgående mantra hos produsenten. De satser på lik kvalitet ved hver produksjon, slik at boknafisken skal fremstå som et gjenkjennbart produkt fra gang til gang. Ved å ha klare retningslinjer i forhold til hvilken kvalitet fisken må ha for å bli tatt *inn* i produksjonen til boknafisk, vil sjansen for et førsteklasses produkt *ut* i den andre enden være større. Heving av kvaliteten på produktet skjer allerede før fisken blir hengt, gjennom grundig vasking og fjerning av ryggbeinet og bukhinna. Slik fremstår fisken som mer kvalitetsmessig homogen.

Rotskjært boknafisk vil tørke ned til 50% restvekt i løpet av ca. 13 dager, mens sperret fisk (sløyd, hodekappet) når samme nivå etter ca. 26 dager (Joensen et al., 1995). Vanninnholdet i rotskjært boknafisk vil i følge de samme forfattere være lavere enn i sperret fisk, idet rotskjært fisk etter 13 dager har et vanninnhold på 70,3%, mens sperret fisk har 76,7%. Fra dag 19 til 26 synker vanninnholdet i rotskjært fisk fra 67,7% til 55,7% og restvekta fra 46,5% og 36,6%. Tørkingen i forsøket på Spildra hadde en varighet på 12 dager, der det gjennomsnittlige vanninnholdet i fisken ved dag 12 var 67,7% mens restvekten på dag 12 var 49,1%. Resultatene til Joensen et al. (1995) samsvarer godt med de målingene som ble gjort på Spildra under tørkeperioden. Vanninnholdet og vektreduksjonskurvene i denne studien er så å si identiske med rotskjært torsk i

Joensen et al. (1995) sin studie, noe som bekrefter og forsterker resultatene i denne studien.

Grafen som viser restvekten gjennom tørkeperioden på Spildra (Figur 4-2) samsvarer med Joensen et al. (1995) sine målinger. Vektnedgangen i første del av perioden var størst, med en etterfølgende jevn nedgang fra dag 6 til dag 12. Fisken fremstod under tørking som veldig lys, uten vesentlige blodutredelser i muskelen. Det var heller ikke vesentlig luktutvikling under tørkingen. Forsøket gjennomført av Joensen et al. (1995) visste også at etter fiskevekten var halvert (rotskjært fra dag 13 og sperret fra dag 26) fortsatte både vanntapet og vekttap med en jevn reduksjon frem til forsøket ble avsluttet.

Temperaturen ser ikke ut til å ha avgjørende innvirkning på tørkehastigheten under produksjon av boknafisk. Døgnmiddeltemperaturen under forsøket på Spildra var $\leq 0^{\circ}\text{C}$ mens temperaturen under forsøk av Joensen et al. (1995) var $\geq 0^{\circ}\text{C}$ i 9 av de første 10 dagene av tørkingen. Fra dag 10 til 13 var den mellom 0°C og $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Den lave temperaturen ser ikke ut til å ha medført noen skade på råstoffet som sådan. Det ble sagt av lokale fiskere på Spildra at produksjon av boknafisk under de rådende værforholdene som var i perioden ville føre til såkalt ”fosfisk”, dvs. fisk med frostskafer. At fisken ble rotskjært kan være en av faktorene som gjorde at dette ikke skjedde. En faktor her kan være at innfrysningshastigheten sannsynligvis var vesentlig raskere enn i sperret fisk under lignende temperaturforhold. Sakte innfrysning er kjent å ha negativ effekt på teksturen til fiskemuskel (Love, 1988). En annen mulig forklaring er at rask uttørking gjorde at vanninnholdet sank under det nivået der skader fra isdannelse kan bli et problem *før* slike skader rakk å inntre.

Sjiktingen som går frem i Figur 4-4, der det ble dannet en skorpe i det ytterste laget, kan ha bidratt til en ekstra sein tørking i kjernen ved å hindre diffusjon av vann ut i overflaten. Dette kan årsaksforklare den høye vektreduksjonen i begynnelsen av tørkingen og utflatingen mot slutten av perioden (Figur 4-2).

Som vist i Figur 4-3 bekrefter denne studien at tørketiden for boknafisk er markert størrelsesavhengig. Med forsterket datagrunnlag i forhold til denne studien vil en kunne sette opp en modell som kan utnyttes i produksjonssammenheng, idet en kan ta ut mindre fisk etter vesentlig kortere tid på hjell enn den større. Dette vil være viktig både i forhold til formålet om å kunne levere så homogene produkter som mulig og i forhold til lønnsomhet. Siden vekten på boknafisk er halvert i forhold til råstoffet og den er et tilsvarende høyt priset produkt, vil selv en beskjeden systematisk ”overtøking” av mindre fisk gi et betydelig inntektstap. Samtidig vil ikke kvaliteten bli optimal. På den andre side kan man også få et kvalitetsproblem med den største fisken, som ikke blir skikkelig ”bokna” i løpet av ei middels lang tørketid.

Forsøket ga et noe uventet resultat i den forstand at man ikke fikk noen registrerbar bakteriell vekst i løpet av tørkeperioden. I stedet falt bakterietallet fra et i utgangspunktet lavt nivå i råstoffet til under deteksjonsgrensen i løpet av de første dagene. Tidligere forsøk med henging av tørrfisk og boknafisk har til dels vist betydelig bakterievekst og til dels høye kimtall, også innenfor den tilsvarende tidsintervall som i dette forsøket (Pettersen, 2006; Joensen et al. 1995; Bjarne Landfald, personlig meddelelse). Siden det åpenbart var bakterier til stede i råstoffet da det ble hengt opp med potensiale til å formere seg videre, er det vanskelig å peke på andre faktorer enn den lave temperaturen som har hemmet det som under andre forhold ville ført til økte kimtall.

Figur 4-2 beskriver sammenhengen mellom vanninnholdet i fisk som ble tørket og tørkehastigheten. Prøven fra dag 0, det vil si fra fisk som ikke hadde blitt hengt på hjell i det hele tatt, viser et vanninnhold på $80,9 \pm 1,0$, noe som er innenfor det naturlige variasjonsområdet for torskemuskel (Huss, 1983). Etter hvert som fisken tørket viste det seg at reduksjonen i vannprosent i muskelprøvene tilsynelatende ikke samsvarte med vekttapet for hele fisken. Dette kan årsaksforklares med at den biten som ble tørket kom fra den tykkeste delen av fileten, og denne delen var mindre gjennomtørket enn de mer perifere delene av fisken. Der hvor fisken er tynnere vil den nødvendigvis tørke fortere enn den delen av fisken som er tykkere.

5.2. Kjølelagring av porsjonspakninger

Ut i fra kimtallsmålingene kan det virke som at MAP har en hemmende virkning på bakterieveksten i kjølelagret, utvannet boknafisk sammenlignet med bakterieveksten ved luftlagring. Hemmingen skyldes både en forlenget nølefase og noe seinere vekst. I forhold til Colifast sin FAST-test, med en grense på 5 millioner SPB/g for uakseptabel ferskfiskkvalitet, nådde kjølepakket boknafisk denne grensen etter 3-4 dager for utvannet, luftpakket fisk og etter 6-7 dager for MAP-fisk.

Andre undersøkelser på pakking av såkalte gryteklare produkter innenfor samme produktkategori (utvannet tørrfisk, klippfisk og boknafisk) er veldig begrenset. Bjørkevoll et al. (2004) viser ingen forlenget holdbarhet ved pakking av utvannet tørrfisk i modifisert atmosfære. Kjølelagringen i denne studien har i så måte har tilført ny kunnskap i forhold til holdbarhetstid med pakking av boknafisk i modifisert atmosfære, der forskjellene i forhold til luftpakking utgjorde 3-4 dager i forlenget holdbarhet.

Pakking av fersk torsk viser at pakking i modifisert atmosfære, MAP (29% CO₂) virker hemmende på vekst av sulfidproduserende bakterier, SPB, i forhold til pakking i 2% CO₂ (Dalgaard et al., 1993). Ved høye konsentrasjoner av CO₂ ble nivået av SPB redusert med 3 log-enheter.

Det kunne heller ikke observeres noen synlige negative kvalitetskonsekvenser av gasspakking, som eksempelvis drypptap eller kolaps av pakningen. Disse er påpekt som problemer ved MAP-lagring av fersk fisk i CO₂-rik atmosfære (Cann, 1984). Men også den graden av tørking som boknafisken ble utsatt for, hadde en effekt på holdbarheten som ferskvarer, siden det i luftpakkede prøver var lavest kimtall fra og med dag 3 i ikke-utvannet fisk. Avstanden i bakterietall, og dermed i holdbarhet, var imidlertid mindre enn til MAP-fisken. Forskjellene mellom

variantene synes stort sett å gjelde for både TVC og SPB-verdiene, selv om SPB hos ikke-utvannet boknafisk viste en så uforutsigbar utvikling, ved bare å være over deteksjonsgrensen på 4., 6. og 10. dag, at det vanskelig lar seg trekke sikre konklusjoner. TVC på ikke-utvannet boknafisk ligger mellom utvannet, luftpakket og MAP fra dag 3 til 6, så forskjellen i utvanning og pakkemetode kan sies å ha hatt både en positiv og negativ effekt på TVC. Pakkemetoden for ikke-utvannet boknafisk trekker da i negativ retning i forhold til MAP, mens det at fisken ikke er vannet ut trekker i positiv retning i forhold til utvannet, luftpakket boknafisk, der pakkemetoden er den samme.

Ved siste produksjon av jernagarmedium med L-cystein ble det benyttet Meat Extract (Merck, Tyskland) i stedet for Lab Lemco, som er forskrevet i resepten, siden dette ikke var tilgjengelig. Disse platene ble tatt i bruk på dag 10, altså siste uttaksdag for kjølelagret boknafisk. Endringen av resepten kan være eventuell årsak til den betydelige nedgangen i TVC og SPB fra dag 8 til dag 10, men individuelle forskjeller mellom de ulike fiskene som ble benyttet i forsøkets siste dag kan også ha vært en mulig årsaksforklaring.

Fiskemuskelene inneholder som kjent store mengder vann, og dette vil i kombinasjon med CO₂ danne karbonsyre, som senker pH i produktet. Lavere pH-verdi er ugunstig for de fleste bakterier, noe som forklarer en forlengelse av holdbarhetstiden hos produkter som er pakket i MAP (Prytz og Sørensen, 1998). Dette samsvarer godt med pH-målingene som ble gjort under kjølelagringsforsøket, der fisk pakket i modifisert atmosfære hadde en gjennomsnittlig lavere pH-verdi på 0,7 pH-enheter i forhold til luftpakket fisk.

TVN-målingene gav endel uventede resultater, idet ikke-utvannet fisk viste en markert økning i forhold til de andre variantene i en tidlig fase uten at dette ble reflektert i et høyere kimtall. Denne økningen kan antas å skyldes TMA-utvikling. På en annen side falt den markante toppen i TVN for utvannet, luftlagret fisk på dag 8 sammen med de høyeste kimtallene som ble målt i noen prøve. Både TMA og ammoniakk må antas å ha bidratt til et nivå på nesten 60 mg N/100g, noe som

den markert dårlige lukta i disse pakningene også tydet på. På grunn av de store forskjellene mellom dag 10 og dag 8, ble analysene av prøvene for de siste dagene gjort på nytt. Resultatet ble imidlertid de samme.

Tidligere TVN-målinger gjort under tørking og kjølelagring av boknafisk (Joensen et al., 1995) viser gjennomgående høyere nivåer enn i denne studien, særlig for sperret fisk. Utgangsverdien ved starten av kjølelagringen var hos disse forfatterne på 32-77 mg N/100g og den økte til opptil 109 mg N/100g etter 7 dagers lagring ved 2-4 °C. Analysene ble gjort med samme damp-destilleringsmetode som i denne oppgaven. Forskjellen synes derfor primært å skyldes at bakterieveksten i fisken under henging hadde resultert i utvikling av TMA og NH₃ mens nivået i fisken tørket på Spildra, med null bakterievekst, ikke overskred det i ferskt råstoff korrigert for vanntapet.

Ved hjelp av partielle 16S rRNA gensekvenser lyktes det å klassifisere representanter for en del dominerende kolonityper fra utstrykene på dag 8. Ni sekvenserte stammer fordelt på 3 behandlingsvarianter er for lite til å trekke sikre konklusjoner angående hvor representative de er for bakterie floraen i prøvene. Der det lyktes å klassifisere flere antatt identiske kolonityper (3 i ikke-utvannet fisk, 4 i MAP-fisk) viste disse imidlertid å ha identisk sekvens, noe som tyder på at diversiteten blant like kolonityper var beskjeden. De påviste identitetene er derfor trolig representative for betydelige andeler av bakteriene i prøvene. Utvalget i de utvannede variantene ble imidlertid begrenset til sulfidproduserende bakterier, så det store antallet i ikke-SPB i disse prøvene (35% av TVC i luftlagret, 59 % i MAP) er av ukjent identitet.

Shewanella putrefaciens syntes å være dominerende blant SPB og et stort innslag i den totale bakteriefloraen i den MAP-lagrede fisken. Dette samsvarer med Hovda et al. (2007), som viser at *S. putrefaciens* er sterkt til stede i CO₂/N₂-lagret og luftlagret fersk torsk, men ikke i pakninger med CO₂/O₂. Andre studier av bakteriefloraen i fisk lagret i MAP (Boskou G og J, 1997) bekrefter også et betydelig innslag av *S. putrefaciens*.

Det tilsynelatende betydelige innslaget av en sulfidproduserende *Psychrobacter*-art i den luftlagrede, utvannede fisken var mer overraskende. *Psychrobacter* er tidligere ikke rapportert som SPB, men *P. cibarius*, som dette isolatet viste klart høyest slektskap med, synes ikke å være testet for denne egenskapen (Jung et al., 2005). *P. cibarius* er opprinnelig isolert fra tradisjonell koreansk fermentert sjømat.

Også andre *Psychrobacter*-arter er assosiert med lagring av fisk. Bjørkevoll et al. (2003) har vist at isolater som ble assosiert med *Psychrobacter* kan være helt dominerende som forringelsesbakterie i utvannet klippfisk. Denne har, i likhet med utvannet tørrfisk, meget dårlig holdbarhet som kjølevare. I kjølelagret, ikke utvannet boknafisk ble det også funnet ikke-sulfidproduserende *Psychrobacter*, nærmest assosiert med *P. glacicola*. Den andre dominerende kolonitypen i disse prøvene kunne knyttes til *Pseudomonas*, som er en vel dokumentert slekt av forringelsesbakterier i fisk som i en rekke andre næringsmidler (Hovda et al. 2007; Gram og Huss 1996)

6. Konklusjon

- Under produksjon av boknafisk ble det ved hjelp av vektmålinger underveis satt opp en funksjon mellom startvekt og antall dager frem til 50% restvekt for å beregne antall dager frem til et ferdig produkt.
- Ved de temperaturmessige forholdene som var under tørkeprosessen var det ingen synlig mikrobiell vekst på boknafisken.
- Ved kjølelagringsforsøket var det en klar hemming på antall sulfidproduserende bakterier ved pakking i modifisert atmosfære i forhold til luftpakket fisk.
- Utvidelser av forsøket, ved å kjølelagre ikke-utvannet boknafisk i modifisert atmosfære kunne vært en videre vei å gå, siden produktet slik det fremstår fra produsenten ikke nødvendigvis trenger utvanning, noe som muligens ville ført til en lengre holdbarhet for et slikt produkt.
- Klassifiseringen av de dominerende bakteriene kunne i etterpåklokskapens lys vært gjort noe mer omfattende, med flere rendyrkede kolonier som grunnlag. Ved mer tid tilgjengelig kunne nok de produktene som ga negativt resultat ved PCR vært rensset ytterligere for å få frem ønsket mengde med PCR-produkt.

7. Referanser

- Bjørkevoll, I. (2005). "Bruk av bikarbonat og lut under utvanning av tørrfisk, effekt på mikrobiologisk og sensorisk kvalitet." Fiskeriforskning Rapport **15/2005**: 20.
- Bjørkevoll, I., M. Heide og J. Østli (2004). "Kvalitetsanalyser og markedstest av gryteklar tørrfisk." Fiskeriforskning Rapport **2/2004**: 36.
- Boskou G og D. J (1997). "Reduction of trimethylamine oxide by shewanella spp. Under modified atmospheres in vitro." FOOD MICROBIOLOGY **14 (6)**.
- Cann, D., C (1984). "Packing fish in a modified atmosphere." Torry Advisory Notes **No. 88**.
- Dalgaard, P. (1995). "Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish." International Journal of Food Microbiology **26(3)**: 319-333.
- Dalgaard, P., L. Gram og H. H. Huss (1993). "Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres." International Journal of Food Microbiology **19(4)**: 283-294.
- Fiskeriforskning (1998). "Norsk mattradisjon til italia- halvtørr fisk falt i smak." Fiskeriforskning informerer **Nr. 2**: 2.
- Gram, L. og P. Dalgaard (2002). "Fish spoilage bacteria - problems and solutions." Current Opinion in Biotechnology **13(3)**: 262-266.
- Gram, L. og H. H. Huss (1996). "Microbiological spoilage of fish and fish products." International Journal of Food Microbiology **33(1)**: 121-137.
- Hovda, M. B., B. T. Lunestad, M. Sivertsvik og J. T. Rosnes (2007). "Characterisation of the bacterial flora of modified atmosphere packaged farmed atlantic cod (gadus morhua) by pcr-dgge of conserved 16s rna gene regions." International Journal of Food Microbiology **117(1)**: 68-75.

- Huss, H. H. (1983). Fersk fisk: Kvalitet og holdbarhed. Lyngby, Fiskeriministeriets Forsøgslaboratorium.
- Joensen, S., L. Akse og N. K. Sørensen (1995). "Boknafisk, -henging, -lagring." Fiskeriforskning Rapport **20**: 45.
- Jorgensen, B. R. og H. H. Huss (1989). "Growth and activity of *shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish." International Journal of Food Microbiology **9**(1): 51-62.
- Jung, S.-Y.M.-H. LeeT.-K. OhY.-H. Park ogJ.-H. Yoon (2005). "Psychrobacter cibarius sp. Nov., isolated from jeotgal, a traditional korean fermented seafood." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **55**: 577-582.
- Lovdata.no (1996). "Kvalitetsforskrift om fisk og fiskevarer." Hentet 14 august fra Lovdata:
<http://www.lovdata.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-19960614-0667.html>
- Love, R. M. (1988). The food fishes: Their intrinsic variation and practical implications. London, Farrand Press.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko og J. Parker (2003). "Brock biology of microorganisms." (Tenth edition): 1019.
- met.no (2007). "Middeltemperatur." Hentet 14 august 2007
http://met.no/met/met_lex/l_p/middeltemperatur.html
- NMKL (2003). "Nordisk metodikkomité for næringsmidler."
- Pettersen, M. (2006). "Mikrobiologiske aspekter under tørking og utvanning av tørrfisk." Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø: 44.
- Prytz, K. og N. K. Sørensen (1998). Fisk i modifisert atmosfære: Temahefte. Oslo, AGA.
- Skjerdal, O. T., G. Lorentzen, I. Tryland og J. D. Berg (2004). "New method for rapid and sensitive quantification of sulphide-producing

bacteria in fish from arctic and temperate waters." International Journal of Food Microbiology **93**(3): 325-333.

Stene, O. M. H. (2006). "Konsumenters assosiasjoner til et lokalt nisjeprodukt og mulige implikasjoner for merkevarebygging" -eksemplet boknafisk fra spindaj." Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø: 63.

Østli, J. og K. Prytz (1996). "Markedsutredning for boknafisk i italia." Fiskeriforskning Rapport **14/1996**: 37.