

**Islagring av torsk (*Gadus morhua*) og brosme
(*Brosme brosme*)**

Har brosme spesiell lang holdbarhet?

Av

Steinar Eilertsen

Mastergradsoppgave i fiskerifag

Studieretning for marine næringsmidler (60 stp.)

Institutt for marin bioteknologi

Norges fiskerihøgskole

Universitetet i Tromsø

Juni 2008



**Islagring av torsk (*Gadus morhua*) og brosme
(*Brosme brosme*)**

Har brosme spesiell lang holdbarhet?

Av

Steinar Eilertsen

Mastergradsoppgave i fiskerifag

Studieretning for marine næringsmidler (60 stp.)

Institutt for marin bioteknologi

Norges fiskerihøgskole

Universitetet i Tromsø

Juni 2008



Forord

Endelig skal jeg avslutte mitt hovedfagstudium på fiskerihøgskolen. Jeg startet på studiene i 1991 og med hovedfag i 1996. Jeg blir antagelig blir den siste av studentene på 1991 kullet som avslutter. Det har vært tøffe tak å komme tilbake etter nesten ti år for å skrive sammen resultatene. Det å sette av tid som selvstendig næringsdrivende og med to småbarn har ikke vært helt enkelt. Dette setter slutt på mange fine år som student på fiskerihøgskolen, med mange gode vennskap og gode relasjoner å ta med seg videre.

Jeg må takke mine veiledere professor Ragnar L. Olsen og førsteamanuensis Olaf B. Styrvold for veldig god veiledning. Fra å finne en interessant oppgave å arbeide med, god oppfølging med laboratorium arbeidet, og for at jeg har fått lov å komme tilbake for å fullføre. Spesielt takk til Ragnar som har pushet på og hjulpet meg fantastisk mye med skrivingen de siste ukene, uten hans oppbakking og pågangsmot hadde dette vært vanskelig å gjennomføre. Håper at døren til kontorene demmes ennå står åpen for en lett prat ved senere anledninger.

Takk til Anita Kjuul for opplæring i nye metoder og godt samarbeid på labben, og til Tor Haug for hjelp med utregninger og resultatbehandlinger.

Takk til skipper Torfinn Lundberg på M/K Lundberg for fisk og for at han ville ha med seg en sjøsyk student på havet.

Så må jeg takke min kjære Karin som har pushet meg frem, stilt opp for familien og meg hele døgnet, med en sånn oppfølging vil alt umulig være mulig. En stor takk til moderen som stille opp tidlig og seint. Erik og Petter dokker har vært tålmodig og god med han pappa, no e æ færdi å ska leke me dokker.

Steinar Eilertsen

Innhold

Forord.....	5
Sammendrag.....	9
Abstract.....	10
1 Innledning.....	11
2 Kvalitetsendringer i muskel hos fisk.....	12
2.1 Fiskemuskel.....	12
2.2 Kjemisk nedbrytning (autolyse/selvnedbrytning).....	13
2.2.1 Post-mortem forandringer pre-rigor.....	13
2.2.2 Endogene proteaser.....	15
2.3 Bakteriell nedbrytning.....	16
2.3.1 Kontaminering av bakterier.....	16
2.3.2 Vekstbetingelser for bakterier i fisk.....	16
2.3.3 Bakteriefloa i fisk.....	17
2.4 Naturlige barrierer for bakterier.....	18
2.4.1 Fiskeskinn.....	18
2.4.2 Definisjon av slim (mucus).....	19
2.4.3 Slim har flere funksjoner.....	19
2.4.4 Slimet etter død.....	19
2.5 Kvalitetsforskriftene.....	20
3 Material og metoder.....	21
3.1 Fisken.....	21
3.2 Lagring.....	21
3.3 Prøvetaking.....	21
3.4 Vekstmedier.....	22
3.5 Kimtallsmålinger.....	22
3.5.1 Muskelprøver med skinn.....	22
3.5.2 Muskelprøver uten skinn.....	22

3.6	Måling av muskel pH	23
3.7	Slim prøver	23
3.7.1	Kvantifisering av slim	23
3.7.2	Antibakterielle faktorer i slim	23
3.7.3	Hemming av bakterievekst.....	25
3.8	Biokjemiske analyser	25
3.8.1	Bestemmelse av TVN, TMA og TMAO	25
3.8.2	TCA løselige proteiner-Lowrys metode.....	26
4	Resultater.....	27
4.1	Mikrobiologisk utvikling under lagring	27
4.1.1	Endring i kimtall over tid i muskel med skinn	27
4.1.2	Endringer i kimtall over tid i muskel uten skinn	28
4.2	Totalt flyktig nitrogen (TVN) over tid i muskel uten skinn	29
4.3	Nedbryting av TMAO over tid i muskel uten skinn.....	30
4.4	Endring av TMA over tid i muskel uten skinn.....	31
4.5	Muskel-pH.....	32
4.6	TCA løselig protein i muskel uten skinn.....	33
4.7	Slimfaktor.....	34
4.8	Antimikrobielle aktiviteter	35
4.8.1	Antimikrobiell aktivitet målt på <i>Bacillus megaterium</i>	35
4.8.2	Antimikrobiell aktivitet målt på <i>Vibrio anguillarum</i> (<i>Listonella anguillarum</i>) 35	
4.8.3	Antibakteriell aktivitet målt på <i>Escherichia coli</i>	36
4.8.4	Antibakteriell aktivitet målt på <i>Yersinia ruckeri</i>	37
4.8.5	Antimikrobiell aktivitet målt på <i>Shewanella putrefaciens</i>	37
5	Diskusjon.....	38
6	Referanser.....	41

Sammendrag

Torsk og brosme er viktige råstoff for produksjon av konvensjonelle produkter som tørrfisk og saltfisk. Begge er torskefisker, men en stor forskjell er at brosme vanligvis skiller ut mye mer slim fra skinnet enn torsk etter slakting. Kvalitetsforskriftene tillater brosme å islagres i 15 dager før produksjon av for eksempel tørrfisk, mens grensen for torsk er 12 dager. I perioder har det til og med vært lov å islagre brosme i 30 dager.

Målet med oppgaven var å undersøke om brosme virkelig har lengre holdbarhet enn torsk. I tillegg ble det undersøkt om slim fra skinn hos brosme og torsk inneholder eventuelle varmemestabile, lavmolekylære antibakterielle stoffer som kan forsinke den mikrobielle veksten og derved kvalitetsforringelsen.

Resultatene var ikke entydige, men indikatorer på muskeldegradering/bakterievekst tydet på at det skjedde litt saktere hos brosme enn hos torsk. Generelt økte totalt flyktig nitrogen (TVN) og trimetylamin (TMA) litt raskere hos torsk. Det samme ble observert for proteinnedbrytning målt som TCA-løselig protein. Kimtallsutvikling var imidlertid lik i torske- og brosmemuskel under islagringen. Innholdet av lavmolekylære varmemestabile, antimikrobielle stoffer syntes å være tilstede i samme konsentrasjon i slim fra begge artene. Brosme skilte imidlertid ut mye mer slim enn torsk. Først etter 12 dager begynte slimet å løses opp og tapes fra den islagrede fisken. Slim bør være borte fra fisken før den henges, ellers blir skinnet missfarget. Det kan ha vært en medvirkende årsak til lengre tillatte lagringstid for brosme.

Abstract

Cod and tusk are important fish species for conventional products as stockfish and full-salted fish. Both species belonging to the gadoid family, but tusk differs from cod by excreting more mucus from the skin after being slaughtered. According to the Norwegian Food Safety Authority tusk can be stored on ice up to 15 days before production for example to stockfish, while cod can be stored only for 12 days. For some periods, tusk has even been allowed to be stored on ice up to 30 days before production.

The main objective with this study was to investigate whether tusk actually keeps its qualities for a longer period compared to cod. It was also investigated whether mucus from the skin of tusk and cod contains heat stable low molecular weight antibacterial substances.

The results were not clear, but indications were that muscle degradation/bacterial growth occurred more slowly in tusk than in cod. In general, the amount of total volatile nitrogen (TVN) and trimethylamine (TMA) increased faster in cod muscle. The same pattern was observed for protein degradation measured by TCA-soluble proteins. On the other hand, the total bacterial counts (CFU) were similar in cod and tusk muscle during ice-storage. The content of low molecular heat stable antibacterial substances seemed to be present in similar concentrations in mucus of both cod and tusk. Tusk excreted however much more mucus from the skin than cod. For tusk stored on ice the mucus started to disappear first after 12 days. All mucus should be absent from the fish before hanging to dry. Otherwise the skin will be discolored which is negative for the end quality of stockfish. This might have contributed to why tusk is allowed a longer storage time on ice prior to production.

1 Innledning

Torsk (*Gadus morhua*) er en av våre økonomisk viktigste fiskeart med en norsk fangst på 217.000 tonn rund vekt og en førstehåndsverdi på 3662 mill. kroner i 2007 (SSB 2008). Torsk er utbredt i hele nord Atlanteren. Det er to hovedtyper torsk. Kysttorsken er mer stedbunden og er en utpreget bunnfisk. Den norsk-arktiske torsken er en vandrende pelagisk art, som hovedsakelig lever i Barentshavet. Den drar på beitevandring etter lodde (*Mallotus villosus*) inn til Finmarkskysten og kommer også som moden inn til kysten for å gyte. Vi har i Norge lange tradisjoner i fisket av torsk, og da særlig utenfor Nord-Norge.

Brosme (*Brosme brosme*) er av mindre betydning økonomisk, men er en viktig bifangst med en norsk fangst på 15.000 tonn rund vekt og en førstehåndsverdi på 130 mill. kroner i 2007 (SSB 2008). Brosme er en torskefisk som lever på 50-1000 meters dyp langs hele Norskekysten, i Nordsjøen og i området mellom Island og Skottland. Fisket drives langs eggakanten og i fjordene med teiner og line. Den største fangst av brosmen skjer av banklinebåtene.

Bruksområdene til torsk og brosmen er som fersk og lettsaltet til konsum og til produksjon av konvensjonelle produkter som tørrfisk, saltfisk og klippfisk.

Etter fangst vil torsk og brosmen normalt sløydes så raskt som mulig og deretter lagres ved kjølebetingelser før konsumering eller foredling til konserverte produkter for eksempel tørrfisk og saltfisk. Etter død vil nedbrytningsprosessene som både er autolytiske og mikrobielle, starte opp. På et visst tidspunkt vil fisken ikke være egnet som menneskemat eller til produksjon av konserverte produkter.

I norsk fiskerinæring er det tillatt å islagre brosmen og torsk i henholdsvis opptil 15 og 12 dager før råstoffet brukes til produksjon av saltfisk og tørrfisk (Mattilsynet, Kvalitetsforskrift for fisk 1996, 2004). I tillegg til dette kom det i 1996 en K-melding som ga dispensasjon (5 år) for brosmen slik at den kunne lagres i is i 30 dager før produksjon, til for eksempel til tørrfisk.

Hovedmålet med denne oppgaven var å undersøke om brosmen virkelig har lengre holdbarhet enn torsk. I tillegg ble det undersøkt om slim fra skinn hos brosmen og torsk inneholder eventuelle varmestabile lavmolekylære antibakterielle stoffer som kan forsinke den mikrobielle veksten.

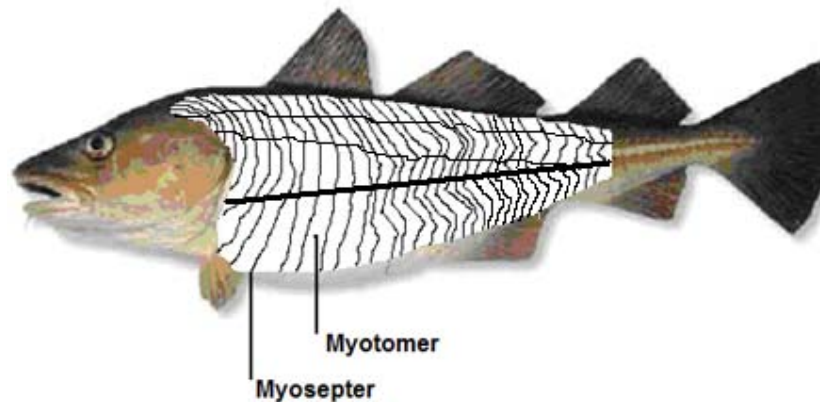
2 Kvalitetsendringer i muskel hos fisk

For å bevare god kvalitet er behandlingen av fisk etter fangst og avlivning viktig. En må unngå fysiske skader (kutt og slag) som gir åpning for bakterier og blodansamling. Blodtapping gjøres for å få blodet ut fra muskel og vev siden blod er substrat for bakterievekst, og kan gi misfarging på kjøttet. Sløyning av matfull fisk er særlig viktig for å hindre enzym diffundering fra mageinnhold til fiskevevet. Mest kjent er buksprengning hos loddetorsk og återik fisk hvor en kan ha omfattende nedbrytning/oppløsning av fisken, på grunn av høy enzymaktivitet i mageinnholdet.

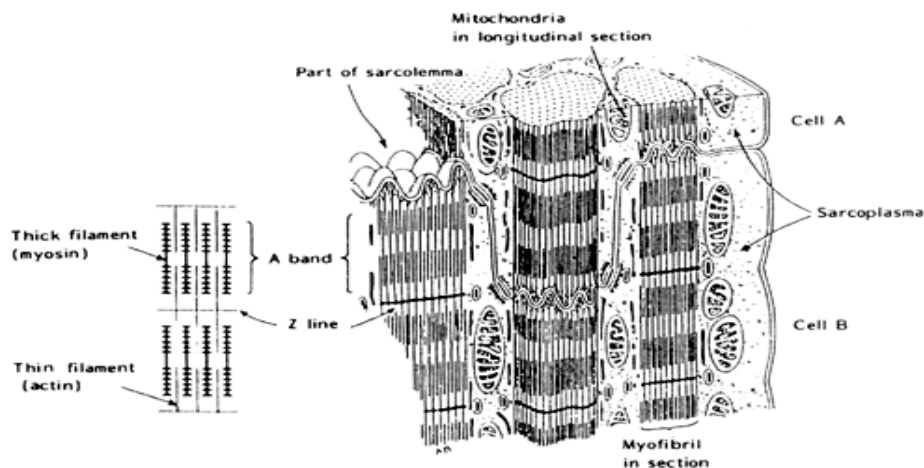
Kvalitetsforringelse etter avlivning/slaktning av fisk har oftest to årsaksforhold. Det ene er forårsaket av endogene faktorer som fiskens egne enzymer (autolyse). Den andre hovedårsaken er eksogene faktorer som mikrobiell vekst og enzymer fra føden. I følge Huss (1976): skjer endringer i spisekvalitet i islagret torsk (0°C) de første 6 dager ved autolyse (selvfordøyelse), og fra dag 6 og utover ved bakterievekst. Før disse prosessene omtales, beskrives først kort oppbyggingen av fiskemuskel og de forandringer som skjer etter død.

2.1 Fiskemuskel

Fiskemuskel er delt opp i segmenter (myotomer). Disse holdes sammen av myosepter (myocommata) som er de tverrgående stripene i fileten (Figur 1). Myotomene er bunter med muskelfibre (celler) som er holdt sammen av bindevev (perymysium). Alle muskelcellene ligger parallelt med hverandre i fiskens lengderetning, og har sin fulle lengde mellom myoseptene. Muskelcellenes oppbygning er sakrolemma (cellemembran), sakroplasma (cytoplasma) og myofibriller (den kontraktile delen av muskelen). Myofibrillene består av aktinfilamenter (tynne) og myosinfilamenter (tykke). Disse ligger tettpakke i sarkomerer, og etter hverandre med Z-band mellom (Figur 2).



Figur 1. Oppbygging av fiskemuskel med myotomer bunnet sammen med myosepter.



Figur 2. Muskelcellens strukturer med myofibrillene (Bell et al. 1976).

Kontraksjon i muskel kontrolleres av kalsium (Ca^{2+}) som aktiverer enzymet ATPase. Nerve impulsene gjør slik at Ca^{2+} ioner kommer inn i myofibrillene, myosinet spalter ATP og fester seg til aktin og trekker Z linjene sammen.

2.2 Kjemisk nedbrytning (autolyse/selvnedbrytning)

2.2.1 Post-mortem forandringer pre-rigor

Ved død stopper blodtilførsel til muskler og vev. Transport av oksygen (O_2), næringsstoffer, og avfallsstoffer stopper opp. Den viktigste energigiveren i muskelceller er ATP (adenosintrifosfat). ATP dannes i glykolyzen (anaerob) og i Kreb's-syklus (aerob).

Anaerob forbrenning: Glykolysen

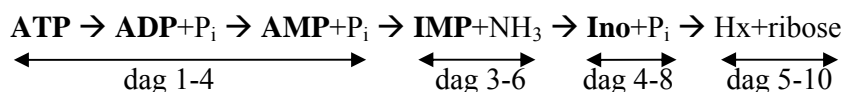


Fiskemuskel inneholder lite glykogen og etter død vil melkesyrenivået øke og pH vil synke. Glykogeninnhold i muskel blir i noen grad påvirket av energistatus. En velfødd oppdrettstorsk har relativt høyt glykogeninnhold og får gjerne en lav muskel-pH (ca. 6,2). En vill torsk med oftest relativt liten mattilgang har lite glykogen og får en relativt høy muskel-pH (ca. 6,8-7,0) (Kristoffersen et al. 2006). Denne muskel-pH som fisken får når glykogen og ATP er brukt opp kalles gjerne endelig (ultimalt) pH. Når ATP i praksis er brukt opp vil fisken gå inn i dødsstivhet (rigor mortis). Tiden det tar før en fisk får dødsstivhet er avhengig av stress og aktivitet før slakting og lagringstemperaturen. En fisk som har hatt høyt energi forbruk under fangst eller før slakting, vil kunne gå i rigor i løpet av 1-2 timer. Dersom fisk blir fanget eller slaktet uten stress (skånsomme betingelser) kan det gå opptil 12-16 timer før dødsstivheten inntreffer.

Før rigor er fisken veldig elastisk i kjøttet, under rigor er muskelen helt stiv og etter rigor blir den helt slapp. Dødsstivheten løses opp, vanligvis etter 3-4 dager ved islagring, ved at endogene enzymer bryter ned (aktinmyosin) komplekset. Mekanismene og hvilke enzymer som er involvert i oppløsningen av rigor mortis er ikke fullstendig kartlagt, men man antar at det er proteolytiske enzymer i kjøttet som er involvert.

ATP nedbrytning skjer ved musklenes egne enzymer med hypoxantin (Hx) som slutt produkt. Reaksjonssekvensen er en indikator på ferskhet hos fisk (Figur 3).

Enkelt oppsett av ATP nedbryting.



Figur 3. Nedbrytning av ATP, ADP, AMP, IMP (inosin monofosfat), Ino (inosin), Hx (hypoxantin). Med et ca. tidsforløp i forhold til fiskens kondisjon ved fangsttidspunkt.

Stress før fangst påvirker bare nedbrytning av ATP til ADP og i mindre grad de senere reaksjonene. Hastigheten på disse er artsavhengig. ATP hos torsk lagret på is vil være spaltet til IMP på 3-4 dager. IMP som er en aromaforsterker gir fisk en frisk fiskesmak og lukt. Når IMP brytes ned til inosin vil lukt og smak forsvinne. Hypoxantin vil gi fisk en uønsket bitter smak i fiskekjøttet. Dannelse av Hx vil hos torsk gradvis skje med en eksponensiell økning fra dag 6-7, med et maks nivå etter 10 dager (Fraser et al. 1967).

2.2.2 Endogene proteaser

Ved rette betingelser etter død vil enzymene i og utenfor muskelcellene fortsette å fungere. Enzymene vil starte nedbryting av muskelvev og bindevev.

Protolytiske enzymer (proteaser) bryter ned proteiner og bindevev. De kan komme fra organeller (lysosomer) i muskelcellene eller andre celler i muskelvevet. Disse kalles gjerne lysosomale proteaser og kan frigjøres ved at lysosomene sprekker/ skades under lagring. Den andre hovedgruppen er sakroplasmatiske proteaser, som vil kunne bryte ned protein fordi normale reguleringsmekanismer går tapt etter død. For eksempel kontroll med kalsium.

Det er 5 forskjellige typer katalytiske enzymfunksjoner i henhold til EC- systemet (Enzyme Commission), disse er serine-, cysteine-, aspartic-, metallo og teorine peptidaser. I nedbryting av fiskemuskel er det hovedsakelig cystin peptidasene kalpain og kathepsiner som er mest interessant (Lødemel 2004). Fra gruppen metallo peptidaser er kollagenase (matrix metalloproteinases "MMP") en av de få som er beskrevet i fisk.

2.2.2.1 Kathepsiner

Det er kjent 13 forskjellige kathepsiner som finnes i organellene (lysosomene) i muskelcellene. Kathepsiner er effektive med svak sur pH. I levende fisk er funksjonen til kathepsiner å bryte ned dødt og skadd vev. Post mortem vil disse være i lysosomene til organelleveggen sprekker. Disse kan slippe ut viss fisken blir hardt fysisk behandlet, eller ved lagring i høy temperatur. De typene kathepsin som er foreslått å forringe muskel er kathepsin B, L, H og D. Kathepsin D er registrert i torsk, hvor det er registrert en stor økning i sult perioder (Guderly et al. 2003). Det er registrert opptil 10 ganger så mye kathepsin D i muskel hos fisk forhold til pattedyr, noe som er antatt å være viktigste faktoren i nedbryting av fisk etter død (Gildberg 1988).

2.2.2.2 Kalpainer

Kalpainer er intracellulære endopeptidaser, som er kalsium Ca^{2+} avhengige. Kalpainer har optimalt pH 7,0-7,5 (Ouali 1992). Det er to hovedgrupper kalapiner μ -kalpain og m-kalpain, etter hvor mye Ca^{2+} (μ -mol og m-mol) de trenger for å være i aktivitet. Kalpainer ser ut til å være tidlig ute i nedbrytning av myofibriller. Enzymet er mest kjent fra modningsprosesser i biffkjøtt og skal bryte Z-linjeproteinet, og er spesifikk på å bryte ned bindinger i myosin-kjeden. De er beskrevet i flere typer fisk, men det er ennå mye igjen å finne ut om rollen til kalpainer i fisk.

2.2.2.3 Kollagenaser/metalloproteinaser (MMP'er)

25 forskjellige MMP'er er kjent. MMP'er bryter ned bindevev og kollagen sammen med ikke spesifikke proteinaser. MMP'er er mest effektiv med pH 7-8. MMP'er er registrert som en viktig proteinase i torsk, men påvirket ikke strukturen i fiskemuskel etter død (Lødemel & Olsen 2003). Det er spekulert at MMP'er kan aktiveres ved stress og ved høy temperatur etter død, som vil føre til bløt muskel og filetspalting.

2.3 Bakteriell nedbrytning

Bakterievekst på fisk er hovedsakelig på overflater i innledende stadier. Fisken vil lukte og se så dårlig ut at den ikke vil være egnet til mat før fiskekjøttet er ødelagt av bakterievekst. Bakterienes nedbrytningsstoffer er gjerne ammoniakk NH_3 , hypoxantin (HX) og hydrogensulfid (H_2S), som er stoffer som gjør fisk mindre sensorisk og organoleptisk attraktiv.

2.3.1 Kontaminering av bakterier

I nyhalt fisk er fiskekjøttet fritt for bakterier, men det er mye bakterier på gjeller (opptil $10^6/\text{gram}$), skinn (opptil $10^7/\text{cm}^2$) og i tarm (opptil $10^{8-13}/\text{gram}$). Etter fangst vil fisk utsettes for mange typer kontaminering av bakterier. Båt/fiskemottak vil være et nytt miljø, og kontakten med redskaper og lagringsenheter øker bakteriespredning. Fisken blir avlivet ved bløgging og lagt sammen med annen fisk for å blø ut for så å bli sløyd. Fisk vil da ofte tømme seg for feces, slik at bakterier lett vil spre seg under utblødning og slaktning. Selv om fisken blir skylt senere vil det være mye bakterier på fiskens overflater. Ved lagring og produksjon vil bakterier komme inn i fiskekjøttet via kuttflater, og over tid gjennom skinn og bukhule.

2.3.2 Vekstbetingelser for bakterier i fisk

I marine subarktisk miljø er det mange psykrofile bakterier som også kan vokse ned mot 0°C ved islagring av fisk.

Fiskemuskel har gode vekstbetingelser for bakterier. Noen av grunnene er:

- Høy vannaktivitet
- Høy $\text{pH} > 6$
- Store mengder med ekstraktivstoffer
- Store mengder NPN(non-protein-nitrogen), blant disse veldig mye TMAO (Trimethyl amin oksid) som har et stort redox potensiale (Gram & Huss 1996)
- Nukleotider og spaltingsprodukter fra autolysen spesielt $\text{ATP} \rightarrow \text{ribose}$

- Urinstoffer, betainer og betainlignende stoffer

2.3.3 Bakterief flora i fisk

2.3.3.1 Egenskaper hos marine bakterier

Bakterier fra sub-arktiske miljø er oftest gram-negative, stavformende, psykrotrofe, Na⁺ krevende, ofte pigmentert, aerobe, men er fakultativ anaerob. De er heterotrofe og kan leve i næringsfattige miljøer.

2.3.3.2 Bakterief flora på levende fisk

De fleste heterotrofe eubakterier lever i havet. Flest bakterier er festet til overflater, og en del er frittlevende permanent eller delvis. De dominerende bakterieslektene i marine miljø er gram-negative: *Vibrionaceae*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Aeromonadaceae* og *Pseudomonas*. Gram-positive er: *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* og *Corynebacterium*. Bakterief floraen på torsk er mye beskrevet, og Wilson et al. (2008) har sekvensert og beskrevet hovedtypene på torskeskinn som:

- *Loktanella salsilactus*
- *Marine γ-proteobacterium (Pseudomonas)*
- *Acinetobacter* sp.
- *Photobacterium phosphoreum*
- *Pseudoalteromonas* sp.
- *Psychrobacter okhotskensis*
- *Bacteroides* sp.
- *Flavobacterium frigoris*
- *Marine bacterium*

Tilstedeværelsen av de forskjellige bakteriene kan være steds og årstidsbestemt (Wilson et al. 2008).

2.3.3.3 Bakterief floraen i tarm hos fisk

De vanligste bakterieslektene i tarm hos fisk er *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Micrococcus* og *Bacillus*.

2.3.3.4 Forråtnelsesbakterier i fisk

Her beskrives bakterier som er kjent for å bryte ned fiskemuskel ved islagring. Opptil 90% av bakteriene på fersk fisk fra slektene *Pseudomonas (Marine)*, *Alteromonas (Shewanella)*, *Moraxella (Psychrobacter)*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* og *Vibrio*, som er gram-negative og psykrotrofe (Huss 1983) (navn i () er nye navn på bakteriene). Hovedsakelig er det

Shewanella putrefaciens og *Pseudomonas* spp. som er spesifikke forråtnelsesbakterier (SSB spesifik spoilage bacteria) hos fisk på is, sammen med *Photobacterium phosphoreum* som oftest er å finne i CO₂ pakket fisk.

Shewanella putrefaciens har evnen har egenskaper til å bruke TMAO som en terminal elektron-akseptor i anaerob respirasjon, bryter ned cystein, metonin, IMP, inosin og karbohydrater inkludert melkesyre. *Pseudomonas* spp. bryter ned metonin, andre aminosyrer, IMP, inosin. *Photobacterium phosphoreum* kan bruke TMAO som terminal elektron-akseptor i anaerob respirasjon, bryter ned IMP og inosin (Gram & Huss 1996).

2.4 Naturlige barrierer for bakterier

Første barrieren bakterier, parasitter, virus og sopp møter på i fiskens naturlige miljø er slimlaget på hud, på gjeller og i mage/tarm. Fiskens muskelmasse er dekket av vanskelig gjennomtrengelig hud/skinn. Dersom mikrober kommer seg inn i fiskekjøttet vil fiskens eget immunforsvar sette inn, med blant annet antistoffer og fagocytter. Magetarm traktus vil ha surt miljø, salter og enzymer som fordøyer eller innaktivere de fleste virus og bakterier, før de får anledning til å trenge inn i tarmveggen. Fiskens naturlige bakterieflora vil også bidra sterkt til at inntrengende mikroorganismer ikke får etablere seg. Etter slakting vil mange av disse naturlige forsvarsmekanismene være borte eller bli svekket etter hvert.

2.4.1 Fiskeskinn

Fiskens hud består av underhud, lærhud og overhud.

- Underhuden (hypodermis) ligger over musklene er fettholdig og rik på blodårer.
- Lærhuden (dermis) er delt opp i den faste stratum compactum som ligger over underhuden, og stratum spongiosum som inneholder pigmentceller og fiskeskjell. Fiskeskjellene er festet i stratum compactum og ligger lagvis med stratum spongiosum mellom og rundt seg. Det sies om brosme at skjellene ligger så dypt at skinnen blir helt glatt.
- Overhuden (epidermis) er cellelaget som ligger over og mellom fiskeskjellene, skjellene er dekket av collagenfibre og pigmentceller. Det ytterste laget har epitelceller og slimceller og et heldekkende lag med slim. Hos levende fisk vil slimcellene (begerceller/gobletceller) etter produksjon av slim tømme seg mot overflaten slik at slimlaget fornyer seg kontinuerlig. Slimlaget er normalt ca. 1/10mm tykt. Overhuden

og slimet består også av celler som produserer forskjellige forsvarsstoffer, disse vil bli forklart senere.

2.4.2 Definisjon av slim (mucus)

Slim er det som gjør at fisk er sleip å ta på. Det er en masse av høymolekylære geleformende makromolekyler med et høyt vanninnhold. Hos fisk er det hovedsakelig glykoproteiner (mucins) som er dominerende. Disse molekylene har den egenskap at de sveller i vann, og de kan kobles med hverandre fysisk eller kjemisk (Shephard 1994).

2.4.3 Slim har flere funksjoner

Slimet hos levende fisk har flere funksjoner. Som nevnt tidligere er det på fiskeslim på hud, gjeller og i tarm. Her vil jeg ta med de fleste funksjoner til slimet på hud, da det er hovedsakelig dette som kan påvirke kvaliteten på fiskekjøttet etter død. Dog vil de fleste funksjonene i hud og på gjeller være de samme, med et fellestrekk å holde unna skadelige fremmedstoffer og mikrober.

En del av fiskeslimets viktige funksjoner (Hjelmeland et al. 1983, Shephard 1994, Ellis 2001):

- Minker svømmemotstand, minker friksjon i vann (Breder 1926)
- Respirasjon skjer via slim (Ultsch & Gross 1979)
- Er en antatt å være ione og osmose regulerende (Van Oosten 1957)
- Inneholder lysosymer (Fletcher & Grant 1968, Bullock et al. 1978)
- Inneholder antimikrobielle peptider (Smith et al. 2000)
- Inneholder proteolytiske enzymer (Hjelmeland et al. 1983). Proteasene, kathepsin L og B er funnet (Aranishi & Mano 2000)
- Mekanisk forsvar med at slimet fornyes hele tiden og slipper slim (Pickering 1974)
- Inneholder haemagglutinins (Hjelmeland et al. 1983)
- Inneholder antistoffer (Fletcher & Grant 1969)

2.4.4 Slimet etter død

Etter død vil gobletcellene enda produsere slim, så lenge de har næringsstoffer. Funksjonene til slim vil etter en tid avta etter som forskjellige stoffer blir brukt opp. Slim og rester etter nedbrutte fremmedstoffer vil kunne fungere vekstsubstrat for mange typer bakterier.

2.5 Kvalitetsforskriftene

Mattilsynets kvalitetsforskrift for fisk og fiskevarer juni 1996, Endret ved forskrift 9 jan 2004 nr. 42. Kap.5. Kvalitetskrav til ulike råstoff for ulike anvendelser.

§5-3 Tørrfisk og fullsalting av fisk

1. Råstoffet skal tilfredsstillende følgende organoleptiske og kjemiske krav:
 - a. Fisken skal ikke være bløt og deformert.
 - b. Lukten av nedbrytningsprodukter kan være moderat.
 - c. Slimhuden skal ikke ha gulsleipe.
 - d. Fisken skal ikke være buktært.
 - e. Kjøtt langs ryggbein skal ikke ha rosa eller rød missfarge.
 - f. For trimetylamin-nitrogen skal 100 gram fiskekjøtt i gjennomsnitt av undersøkte prøver ikke inneholde mer enn 10 milligram og ingen enkelt prøver over 15 milligram
 - g. For totalt flyktig nitrogen skal 100 gram fiskekjøtt i gjennomsnitt av undersøkte prøver etter metode fastsatt av fiskeridirektøren inneholde III) mindre enn 35 milligram
3. Tilvirkning av fisk som fullsaltes skal påbegynnes snarest etter opptak/landing.

Fisk skal ikke oppbevares iset utover 12 døgn før salting/tørking, dog kan lange og brosme oppbevares inntil 15 døgn.

I tillegg til denne forskriften kom K-melding F-4/96, den ga en dispensasjon fra § 5-3pkt. 3 til å lagre lange og brosme i 30 døgn i is.

LANGE OG BROSME TIL SALTING OG HENGING. DISPENSASJON FRA KVALITETFORSKRIFTENS § 5-3.

Det vises til Kvalitetsforskrift for fisk og fiskevarer, § 5-3.

I medhold av § 24-2 i kvalitetsforskrift for fisk og fiskevarer gir fiskeridirektøren hermed dispensasjon fra nedenfor nevnte bestemmelser for linefanget lange og brosme fanget på fjerne farvann og som ilandføres kjølt:

Fra § 5-3. nr. 3 siste punktum, slik at nevnte fiskeslag kan oppbevares i inntil 30 døgn i is før produksjon av salt- og tørrfisk.

Fra § 5-3. nr. 1, punktene E, F og G III.

Fra § 1-10. nr. 1, punkt I.

Dispensasjon gjelder i 5 år fra K-meldingens dato og gjøres gjeldende kun for norske fiskefartøy.

Denne forskriften holder ikke i forhold til Distriktslaboratoriet i Ålesund sin rapport (Barnung 1991) om ”**Definering av lengste tillatte lagringstid i fersk iset tilstand for lange og brosme for anvendelse til salting**”, hvor sammendraget sier:

Vurdert ut fra kvalitetsnormer brukt på andre fiskeslag vil brosme og lange ha en holdbarhet som råstoff fram til dag 9. Det skjer en gradvis nedbrytning av råstoffet, men brosme og lange går ikke i forråtnelse slik vi kjenner fra andre fiskearter. De kjemiske parametrene øker og luktavviket øker, men brosme og lange beholder fortsatt tilnærmet samme konsistens og struktur i fiskemuskelen.

3 Material og metoder

3.1 Fisken

Fisken ble tatt på line av M/K Lundberg på eggakanten tre timer gange nordvest fra Vengsøy 6. januar 1997 (dag 0). Det ble det plukket ut 50 stk. brosme (*Brosme brosme*) og 50 stk. torsk (*Gadus morhua*) av den ordinære fangsten helt vilkårlig. All fisk var levende når den kom om bord og ble avlivet med bløgging. Etter utblødning ble fisken sløyd, skylt og lagt i stamper med brosme og torsk adskilt. Under skylling ble rester av innvoller fjernet for å unngå mulig kontaminering med tarm bakterier. Fisken ble behandlet på en skånsom måte for hindre skader, da spesielt på skinnen og slim. Stampene med fisken var på dekk de 4 timene inn til land, temperaturen var – 5-6°C. På land ble så fisken umiddelbart lagt på is i kar. Karene ble kjørt direkte til Fiskeriforskning og satt på kjølen på fiskemottaket.

3.2 Lagring

Fisken kom til Fiskeriforskning dag 0 og ble lagret i hver sine kar over 30 dager med is. Forholdene i karene skulle være mest mulig lik bingene som er ombord i linebåtene. Et godt lag med 30-35 cm is i bunnen så et lag med fisk med buken ned og inntil hverandre. Deretter et lag med is (3-5 cm) før et nytt lag med fisk med is på topp. Det ble etterfylt is på topp, og karene var dekket med lokk. Det var gode forhold på kjølerommet (1- 4°C), slik at is smeltet og smeltevann fikk renne over fisken og holde temperaturen nede. Vannet rant ut av karene og direkte i sluk. Isen i forsøket ble laget i ismaskin (Scotman, Frimont. MF 82, ASE 2608).

3.3 Prøvetaking

Det ble tatt ut 3 fisk for prøvetaking ved dag 1,4,8,12,16,20,25 og 30, totalt 8 ganger. Fiskene som ble tatt prøver av fikk egne nummer brosme B 1-24 og torsk T 1-24. Fisken ble tatt opp fra en av sidene, hvor 4 fisker som lå inntil hverandre ble valgt ut. Fisken som lå nærmest forrige uttak ble ikke benyttet. Ved uttaket ble først isen over fisken fjernet. For å beholde mest mulig av slimet på fiskeskinnet, ble fisken forsiktig tatt opp og lagt på steril plastfolie. Prøvene ble tatt med steril teknikk.

I rekkefølge ble følgende utført:

- Veiging av fisken
- Kintall med skinn

- Skraping av slim
- Kimtall filet /muskel
- Muskel til pH måling
- Muskel til nedfrysing - 39°C (Biokjemiske prøver)

3.4 Vekstmedier

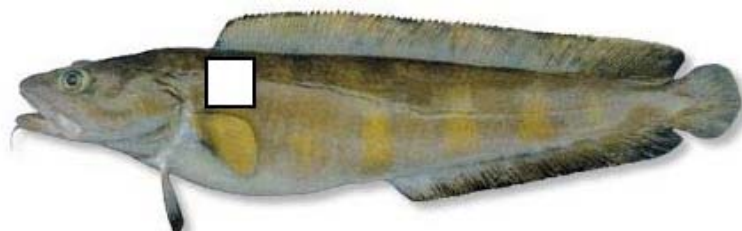
I mine forsøk har jeg brukt to typer vekst medier laget på medielab på fiskerihøgskolen.

- TSA Tryptic soya agar (Difco Bacto Laboratories, USA)
- BHI Brain heart infusion (BD Becton, Dickinson and Company, USA)

3.5 Kimtallsmålinger

3.5.1 Muskelprøver med skinn

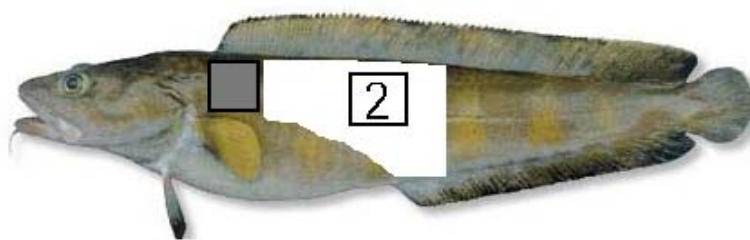
Det ble brukt sterilt utstyr og sterilteknikk til å ta ut prøvene. Det ble skjært ut ca. 10 gram av fisken med 2 x 2 cm skinn med slim. Prøvene ble tatt under fremste ryggfinne (Figur 4).



Figur 4. Markeringen viser hvor kimtallsprøver med skinn ble tatt.

3.5.2 Muskelprøver uten skinn

Utstyret ble sterilisert på nytt, det ble gjort et snitt langs ryggfinnen og skinnet dratt av for så å ta en ny prøve av fileten, 10 gram muskel (Figur 5).



Figur 5. Markering [2] viser hvor kimtallsprøver av fileten ble tatt.

Begge typer prøver ble direkte overført til Stomackerposer (400 ml) som ble lagt på is til de skulle brukes etter alle prøvene var tatt. Prøvene ble fortynnet med sterilt fysiologisk saltvann

1:10 homogenisert 60 sekunder i stomacker (Labratorie Blender, Seward). Fortynninger 1:10, 1:100, 1:1000 eller 1:10 000 ble de sådd ut på TSA, med 3 plater på hver fortynning. Prøvene ble også testet på 3M petrifilm aerobic (FOOD DIAGNOSTICS). Alle prøvene ble dyrket i romtemperatur 20°C. CFU (koloniformende enheter) ble talt med en koloni teller (STUART SCIENTIFIC) etter 24, 48 og 96 timer.

3.6 Måling av muskel pH

Fra hver fisk ble 10 gram filet tatt ut og tilsatt 10 ml 0,15 M KCl. Prøvene ble homogenisert med mortelstav før pH måling. Standard kalibrert pH meter (PHM 80 PORTABLE pH-meter, Radiometer, Copenhagen) ble brukt.

3.7 Slim prøver

Definering av tilgjengelig slim: Det er det slimet som blir med fisken når en fjerner islaget over og løfter fisken over på en steril plastfolie.

3.7.1 Kvantifisering av slim

Etter muskelprøver med skinn var tatt ble alt tilgjengelig slim skrapet av fisken. Slimet rundt gattåpningen ble ikke tatt med, grunnet risiko for tarmbakterier. Jeg prøvde å få med meg alt slimet som var løsnet og var fast på platen. Slimet ble veid og lagret på 50 ml tuber (NUNC 50 ml) fryst i -20°C. Slimet ble senere ekstrahert, og sjekket for antimikrobiell aktivitet på.

Definisjon av slimfaktor :

$$\text{Slimfaktor} = \text{Vekt slim (gram)} / \text{vekt av fisk (kg)}$$

3.7.2 Antibakterielle faktorer i slim

For å undersøke mulig innhold av varmemestabile, lavmolekylære antimikrobielle faktorer ble slim fra dag 8 og 16 i lagringsperioden valgt. Det ble tatt ut 6 brosme nr (B7,8,9,13,14,15) og 6 torsk (T7,8,9,13,14,15), totalt ble 12 slimprøver ekstrahert og testet. Metoden er etter en prosedyre etablert på laboratoriet ved Norges fiskerihøgskole, som senere er blitt modifisert og publisert (Haug et al. 2002).

3.7.2.1 Ekstrahering fra slim

- 5 ml slim ble tilsatt 5 ml 0,2 M Na-acetat buffer pH 4,5 og satt på omrøring over natt 4°C
- Blandingen sentrifugeres 20.000 g 30 min. (RC5C Sorvall instruments DUPONT)
- Supernatant ble kokt på vannbad i 10 min.
- Sentrifugering 10.000 g i 20 min.
- Supernatanten ble så filtrert
 1. I et 0,45 µm filter
 2. I et 0,22 µm filter
 3. Så ultrafiltrering 10K filter i sentrifuge 5000 g i 50 min.
- Filtratet etter siste filtrering ble frysetørket (MAXI dry iyo/plus). Det resterende materialet ble ikke brukt videre.

3.7.2.2 Fastfaseekstraksjon

- Det frysetørkede materiale ble så løst opp i 1 ml destillert vann
- Ristet kraftig til prøven er løst opp
- Filtreres i 0,22 µm filter

Filtratet elueres så i en Varian bond eluation på hver sin Sep-Pac[®] C₁₈ vac (1g kolonne materiale) SPE-kolonne (Waters Associates, MA, USA). Kolonnene var kondisjonert med 10 ml 100% acetonitrill etterfulgt av 10 ml 0,05% TFA. Filtratet blir helt på kolonnen og vasket ut og samlet. Følgende fraksjoner ble samlet opp 1-6.

1. Retardert materiale (prøve som går rett gjennom kolonnen)
2. Materiale som elueres ut med 1 ml 0,05% TFA,
3. Materiale som elueres ut med 1 ml 10% acetonitrill
4. Materiale som elueres ut med 1 ml 40% acetonitrill
5. Materiale som elueres ut med 1 ml 60% acetonitrill
6. Materiale som elueres ut med 1 ml 100% acetonitrill gjentas og slås sammen

Eluatene fra 1 til 6 frysetørkes (MAXI dry iyo/plus)

De frysetørkede prøvene ble løst i 1 ml sterilt fysiologisk vann og sammen med 1:10 og 1:100 fortykning, ble hemming av vekst av 5 forskjellige bakteriestammer testet.

3.7.3 Hemming av bakterievekst

Hemming av bakterievekst ble undersøkt på ELISA-plater (NUNCLON Delta 96 celler) av alle prøvene (1) fraksjonert fra fastfaseekstraksjon, og disse med en fortykning på (2) 1:10 og (3) 1:100. I forhold til 5 ml slim som utgangspunkt vil prøvene (1) være 5 x oppkonsentrert, (2) vil være fortynnet 1:2 og (3) være fortynnet 1:20. Disse fraksjonene ble testet på bakterier som var oppdyrket i BHI medium.

Bakteriene i forsøket:

- *Vibrio anguillarum*
- *Bacillus megaterium*
- *Escherichia coli D31*
- *Yersinia ruceri*
- *Shewanella putrefaciens*

Som negativ test brukte jeg vann som hadde fulgt prosessen, og som positiv kontroll brukte jeg Cecropin B og Cecropin P (1 µg/50 µl) (Kjuul et al. 1999).

Oppsett av forsøk ble utført på sterilbenk. I hver brønn hadde jeg 50 µl BHI-medium med ca. 500 bakterier (målt ved OD 600(UV1201, uv-vis SPECTROPHOTOMETER) og 50 µl prøve, ved kontroll bare 50 µl BHI-medium.

Disse ble avlest i en THERMO max plate reader (MOLECLAR DEVICES CORP) etter 24, 48 og 96 timer.

For å regne ut om det var hemming av vekst ble følgende formel brukt:

$$\frac{\text{OD bakterier + prøve (48 timer)} - \text{OD bakterier + prøve (0 time)}}{\text{OD bakterier + vann (48 timer)} - \text{OD bakterier + vann (0 time)}} \times 100\% = \text{vekst i \%}$$

3.8 Biokjemiske analyser

Etter slimprøvene var tatt ble fisken filetert og det ble tatt ferske prøver til pH målinger. Resten av fileten ble fryst ned på -39°C for senere analyser. Disse ble tatt opp og tint etter hvert for gjennomføring av biokjemiske analyser.

3.8.1 Bestemmelse av TVN, TMA og TMAO

For å måle totalt fritt nitrogen (TVN), trimetylamin (TMA) og trimetylaminoksid (TMAO), ble Conway's mikrodifusjonmetode brukt (Conway & Byrne 1933).

3.8.1.1 *Prosess*

- 20 g muskel ble tilsatt 40 ml 15% TCA homogenisert med stavmikser 30 sek.
- Filtrert, filtratet ble tilsatt 30ml 15% TCA og homogenisert på nytt 30 sek.
- Filtrert på nytt, nesten tørt filter blir vasket med 10ml 15% TCA.
- Prøven (P) settes i conwayskåler 4 timer, som blindprøve (B) brukes vann.
- Titreres (B=titreringsvolum blank, P=titreringsvolum prøve).

Utregninger:

Totalt fritt nitrogen (TVN):

$$\frac{(B-P)\text{ml} \times 5 \times 10^{-6} \text{mol/ml} \times 100\text{ml}(P) \times 14\text{g/mol} \times 100\text{g} \times 1000\text{mg/g}}{1,0\text{ml}(P) \times 20\text{g muskel}} = \text{TVNmg/100g muskel}$$

Trimetylammin (TMA):

$$\frac{(B-P)\text{ml} \times 5 \times 10^{-6} \text{mol/ml} \times 100\text{ml}(P) \times 59 \text{g/mol} \times 100\text{g} \times 1000\text{mg/g}}{1,0\text{ml}(P) \times 20\text{g muskel}} = \text{TMAmg/100g muskel}$$

Trimetylamminoksid (TMAO):

$$\frac{(B-P)\text{ml} - (B-P(\text{TMA})) \times 5 \times 10^{-6} \text{mol/ml} \times 100\text{ml}(P) \times 67\text{g/mol} \times 100\text{g} \times 1000\text{mg/g}}{1,0\text{ml}(P) \times 20\text{g muskel}} = \text{TMAOmg/100g muskel}$$

3.8.2 **TCA løselige proteiner-Lowrys metode**

For å måle TCA-løselig protein bruke jeg Lowrys-metode (Lowry et al. 1951), hvor jeg brukte tyrosine som standard under mine målinger.

3.8.2.1 *Prosess*

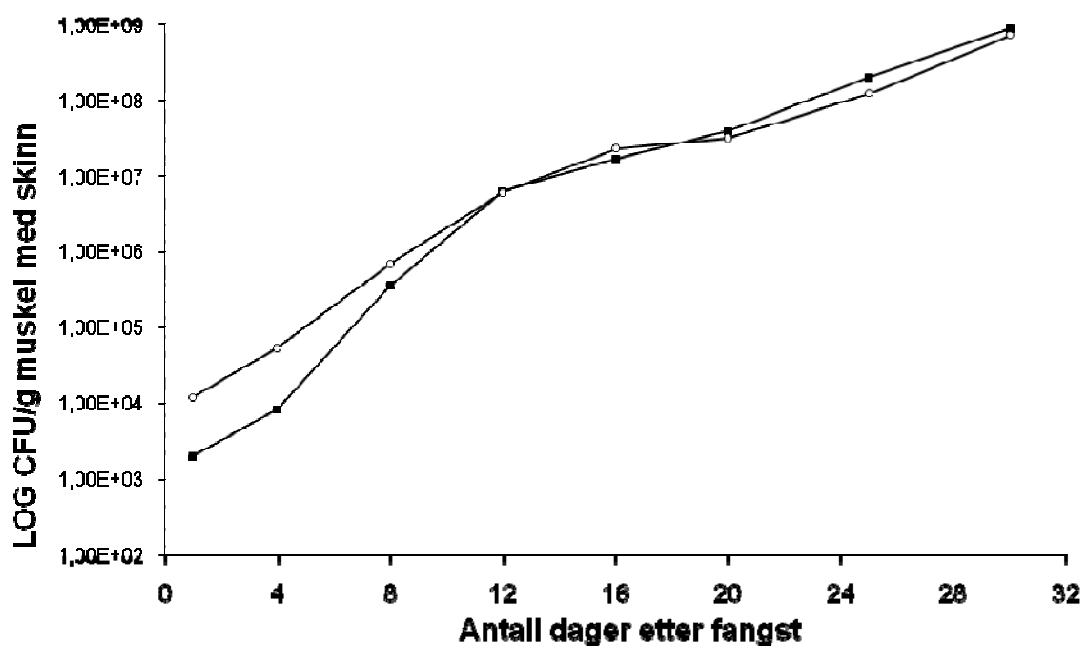
- 20 g muskel ble tilsatt 40 ml 15% TCA homogenisert med stavmikser 30 sek.
- Filtrert, filtratet ble tilsatt 30 ml 15% TCA og homogenisert på nytt 30 sek.
- Filtrert på nytt, nesten tørt filter blir vasket med 10ml 15% TCA.
- 1ml prøve tilsettes 4 ml Alkalisk kopperreagens la stå 30 min.
- Tilsettes så 0,25 ml Folin-Colin reagens la stå 30 min.
- Avleses OD 700, Forhold til standard (Tyrosine).

4 Resultater

4.1 Mikrobiologisk utvikling under lagring

4.1.1 Endring i kimtall over tid i muskel med skinn

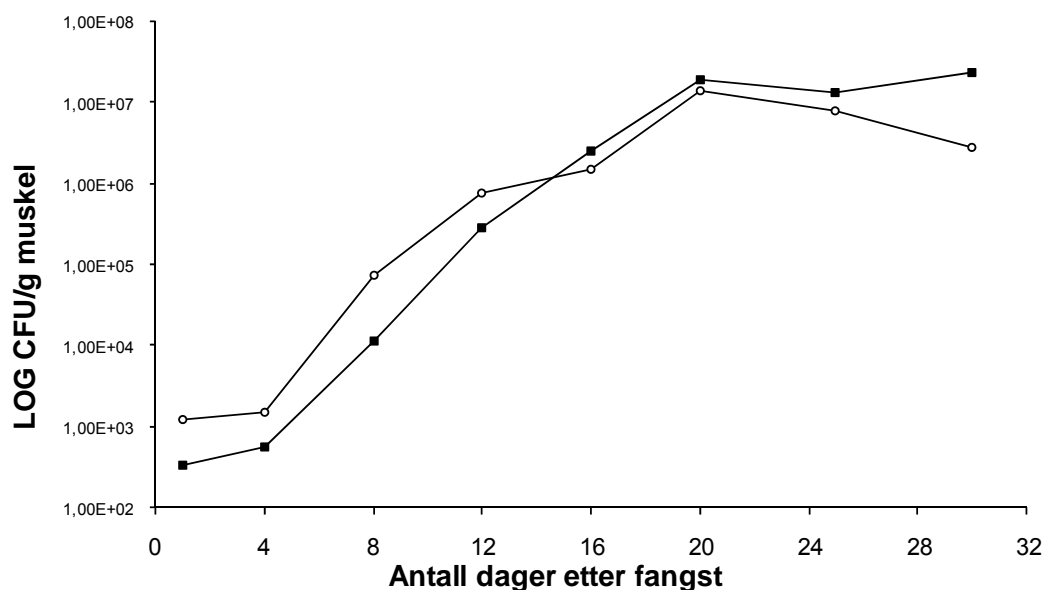
På dag 1 er det et lite bakterietall hos både brosme og torsk ca. 10^3 - 10^4 (Figur 6). Det synes å være noe høyere bakterietall hos torsk. På dag 4 og dag 8 er bakterietallet økt for begge. Fra dag 12 er det ikke forskjeller mellom bakterieveksten i muskelprøver med skinn hos torsk og brosme (6×10^6). Veksten for begge er jevn til dag 30 hvor en teller 8×10^8 .



Figur 6. Totalt kimtall i muskel med skinn hos brosme (-■-) og torsk (-O-) ved lagring på is i bingje over 30 dager.

4.1.2 Endringer i kimtall over tid i muskel uten skinn

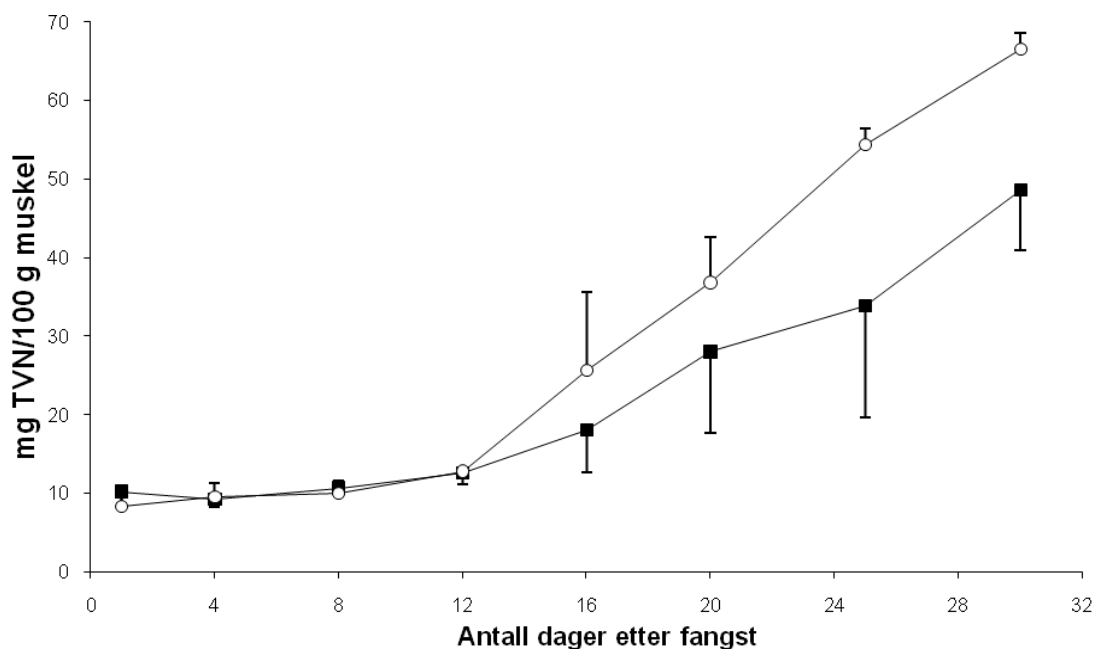
Ved dag 1 og 4 er bakterietall hos torsk og brosme lite 10^2 - 10^3 (Figur 7). Bakterietallet for både torsk og brosme øker fra dag 4 og jevnt hvor det ved dag 16 er ca. 10^6 . Ved dag 20 har bakterietallet økt til 10^7 . For brosme holder det seg stabilt mot dag 30. For torsk synes det som om det er en svak nedgang i bakterietallet.



Figur 7. Totalt kimtall i muskel uten skinn hos brosme (-■-) og torsk (-O-) ved lagring på is i bingje over 30 dager.

4.2 Totalt flyktig nitrogen (TVN) over tid i muskel uten skinn

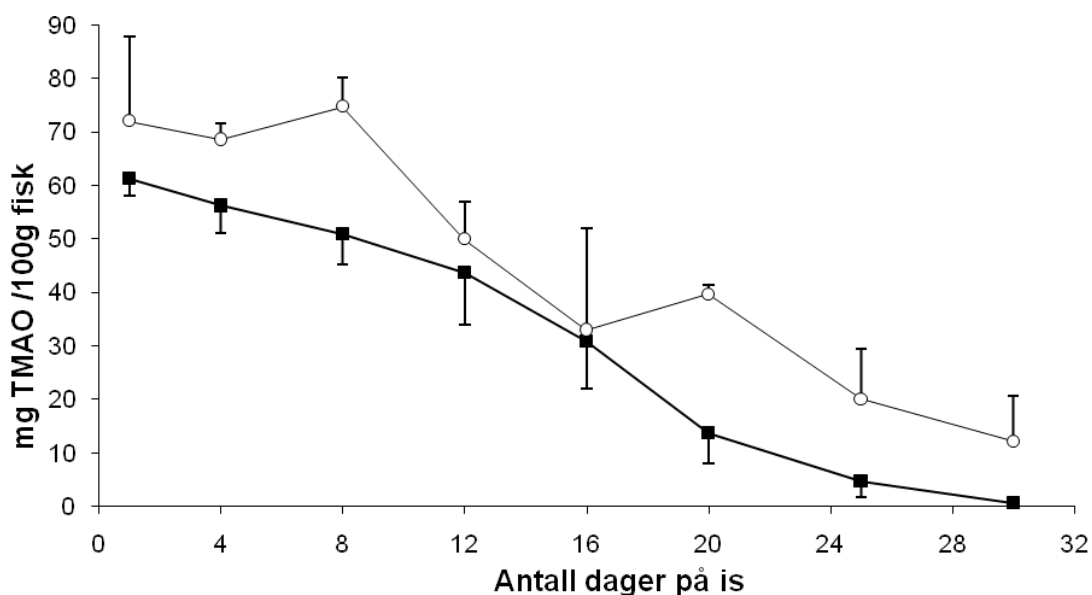
På dag 1 har torsk og brosme ca. 10 mg TVN/100 gram muskel (Figur 8). Det er en svak økning til dag 12 (12 mg). Fra dag 12 til dag 30 har begge stor økning, men torsk synes å øke noe mer. Ved dag 30 er innholdet TVN 66 mg/100 g torskemuskel og 48 mg/g brosmemuskel.



Figur 8. Endringene i TVN totalt fritt nitrogen i muskel over tid i modell forsøk med brosme (-■-) og torsk (-O-) lagret på is i bing i 30 dager. Standardavvik angitt for hvert punkt n=3 fisk med 3 målinger på hver.

4.3 Nedbryting av TMAO over tid i muskel uten skinn

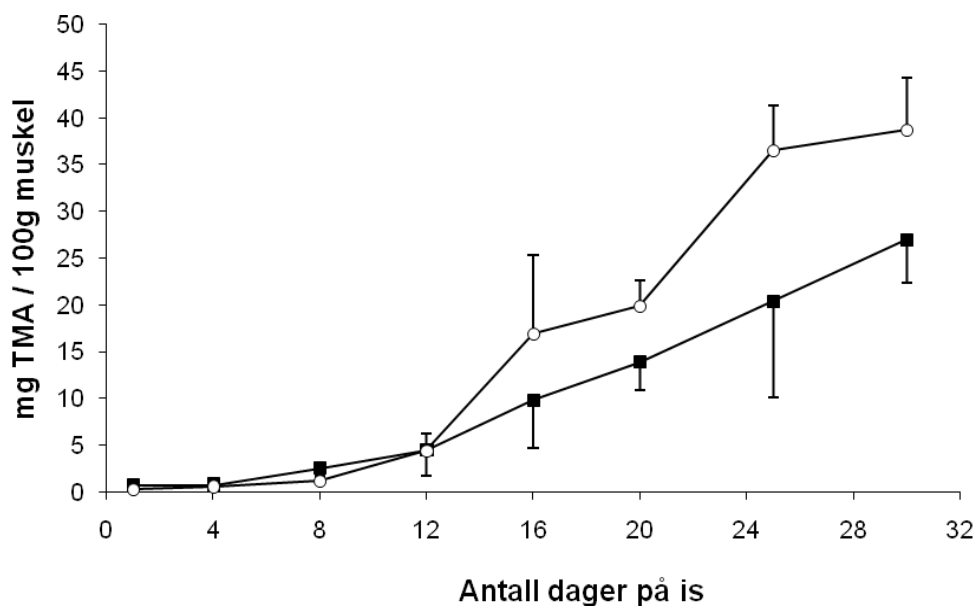
Ved dag 1 har torsk ca. 75 mg/100 g TMAO i forhold til brosme ca 60 mg/100 g (Figur 10). Mengden i torsk er relativt stabil til dag 8, men minsker deretter raskt til dag 12 (50 mg) og dag 16 (35 mg). Deretter reduseres innholdet jevnt til dag 30 (12 mg). For brosme synker mengden med TMAO jevnt fra dag 1 til det er fritt ved dag 30.



Figur 10. Mengden av trimethylaminoksid (TMAO) over tid i modellforsøk med torsk (-O-) og brosme (-■-) lagret på is i bunge i 30 dager. Standardavvik angitt for hvert punkt n=3 fisk med 3 målinger på hver.

4.4 Endring av TMA over tid i muskel uten skinn

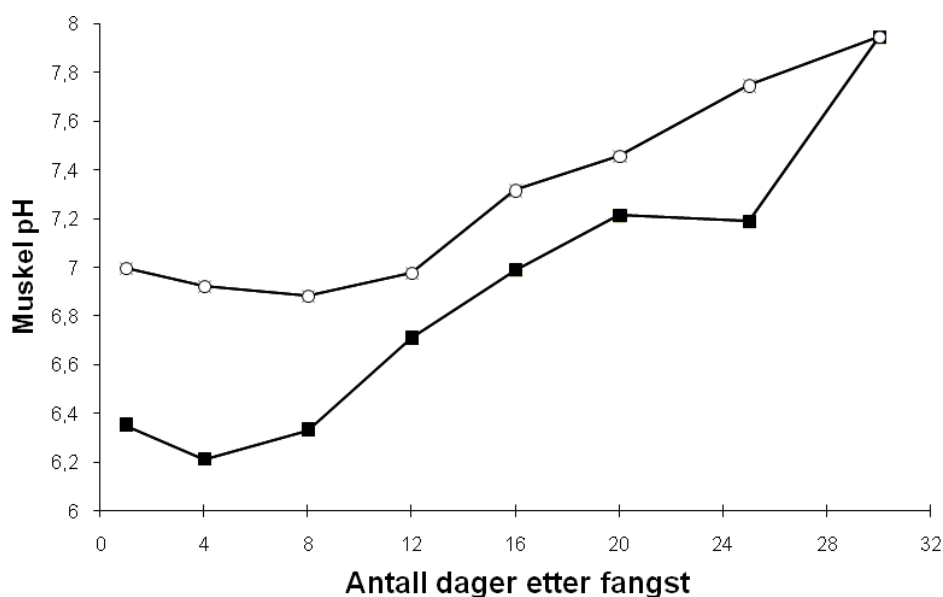
Det er lite TMA i både torsk og brosme til dag 12 med 4 mg/100 g fisk (Figur 11). Fra dag 12 øker mengden TMA hos begge, der torsk har den største økningen. Ved dag 16 har brosme ca. 10 mg TMA mot torsk 16 mg. Trenden fortsetter til dag 30 (brosme ca. 20 mg/100 g og torsk ca. 35 mg/100 g).



Figur 11. Mengden trimetylamin (TMA) i muskel over tid i modellforsøk med brosmefisk (-■-) og torsk (-○-) lagret på is i bunge i 30 dager. Standardavvik angitt for hvert punkt n=3 fisk med 3 målinger på hver.

4.5 Muskel-pH

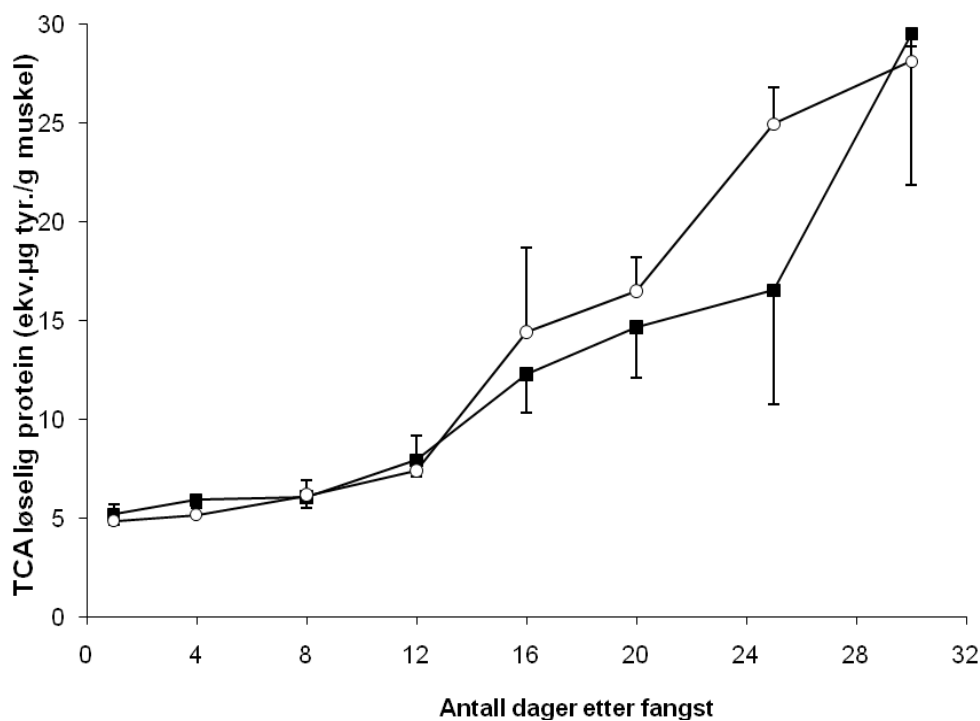
Resultatet av pH undersøkelsene viser at det er stor forskjell mellom pH i brosme og torsk (Figur 9). På dag 1 var pH i brosme 6,3 og i torsk 7,0. Disse verdiene holdt seg relativt konstant til og med dag 8. Deretter begynte pH å øke og mest hos brosme. På dag 16 var pH blitt 7,0 hos brosme og 7,3 hos torsk. Ved dag 30 var pH 7,9 for begge fiskeslagene.



Figur 9. Utviklingen av pH i muskel hos sløyd brosme (-■-) og torsk (-O-) under lagring på is i bunge i 30 dager. pH er gjennomsnitt målt på 3 fisk med 3 målinger på hver.

4.6 TCA løselig protein i muskel uten skinn

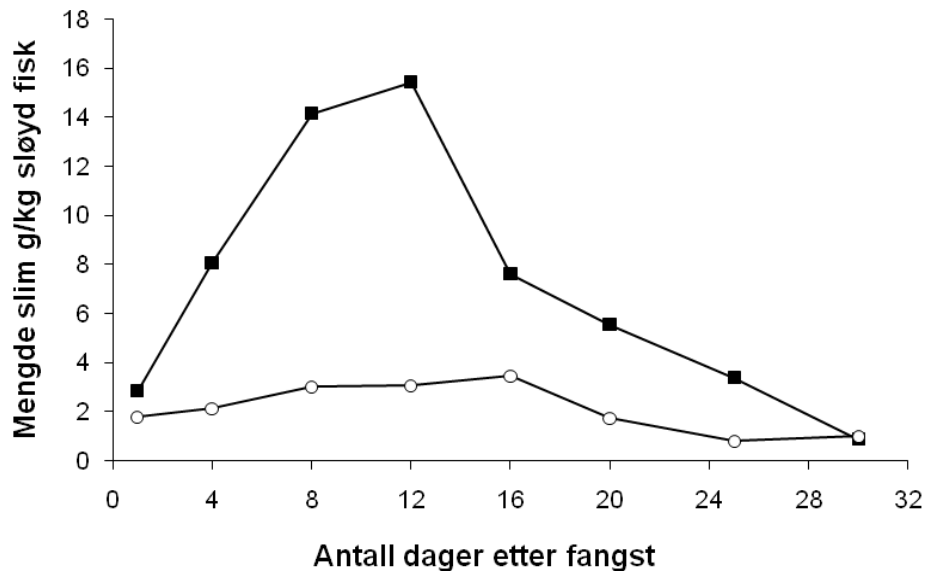
Dag 1 har både torsk og brosme ca. 5 µg/g muskel TCA løselig protein, hvor mengden hos begge stiger til 7 µg/g på dag 12 (Figur 12). Frem mot dag 20 øker mengden hos begge, men torsk har en litt større økning. Fra dag 20 til 25 får torsk en kraftig økning løselig protein mens brosme får denne økningen fra dag 25 til dag 30. Ved dag 30 har både torsk og brosme opp mot 30 µg løselig protein/gram muskel.



Figur 12. Endringer i TCA løselige proteiner i muskel, ekvivalent med Tyrosin µg/g fisk, over tid i modellforsøk med brotse (-■-) og torsk (-○-) lagret på is i bunge i 30 dager. Standardavvik angitt for hvert punkt n=3 fisk med 3 målinger på hver.

4.7 Slimfaktor

På både brosme og torsk var det litt slim på huden rett etter fangst (dag 0), men brosmen opplevdes mye sleipere enn torsken. Under lagringen økte slimmengden hos brosme frem til dag 8 (Figur 13). Etter dag 12 så slimet ut for å forsvinne fra brosmen. På det meste ble det funnet 16 gram slim pr. kg brosme. Hos torsk var slimmengden konstant lav ca. 3 gram/kg. Etter dag 16 ble dette redusert.



Figur 13. Utviklingen i slimmengde (g slim/kg sløyd fisk) på skinn hos brosme (-■-) og torsk (-O-) over tid.

4.8 Antimikrobielle aktiviteter

Tabellene i del 4.8 viser resultater av innhiberingsforsøkene med ekstrakter fra av torskeslim og brosmeslim. Som positiv kontroll ble brukt cecropine B og cecropine P. Som negativ kontroll ble det brukt vann som hadde vært gjennom hele prosessen. I utregningene er (0 time) OD satt til 0,040 for både negativ kontroll og bare medium. Avlesningene er gjort etter 48 timer. Der det var ingen reduksjon ble avlesningen etter 24 timer sjekket for å undersøke om det kunne være noen form for forsinkelse av vekst.

4.8.1 Antimikrobiell aktivitet målt på *Bacillus megaterium*

Aktiviteten av utvaskningsfraksjonene fra både torske- og brosmeslim var sterkt hemmende på *B. megaterium* (Tabell 1). Det er også hemming av vekst fortynt i fortyningene 1:2, og 1:20 i noen av fraksjonene.

Tabell 1. Hemming av vekst på *Bacillus megaterium* i ulike fraksjoner fra fast faseekstraksjon av slim hos brosme og torsk islagret 8 og 16 dager. Avlest etter 48 timer. +; 30-70 % vekstreduksjon 5x oppkonsentrert, ++; 70-100 % vekstreduksjon 5x oppkonsentrert,+++; vekstreduksjon > 50 % fortynt 1:2, ++++; vekstreduksjon > 50 % fortynt 1:20, -; ingen vekst reduksjon.

Utvaskningsveske	gjennom filter	0,05%TFA	10% ACN	40%ACN	60%ACN	100%ACN
brosme 7, fra dag 8	++	++	+++	++	++	-
brosme 8, fra dag 8	++	+++	++++	+++	++++	++
brosme 9, fra dag 8	++	+++	++	+++	+++	+++
brosme 13, fra dag 16	++	+++	++	++	+++	++
brosme 14, fra dag 16	-	+++	++	+++	+++	++
brosme 15, fra dag 16	+	+++	++	++	+++	++
torsk 7, fra dag 8	++	++	+++	+++	+++	++
torsk 8, fra dag 8	++	+++	+++	++	++	++
torsk 9, fra dag 8	++	-	++	+++	+++	+++
torsk 13, fra dag 16	++	+++	++	++	++	++
torsk 14, fra dag 16	-	++	*	++++	++++	++
torsk 15, fra dag 16	-	++	+++	++++	++++	++

4.8.2 Antimikrobiell aktivitet målt på *Vibrio anguillarum* (*Listonella anguillarum*)

Aktiviteten av de fleste utvaskningsfraksjonene fra både torske- og brosmeslim på dag 8 var hemmende på *V. anguillarum* (Tabell 2). Etter 16 dager på is er det ennå litt reduksjon på vekst fra brosme. Fra dag 16 vises ingen hemming i fraksjoner fra torsk, på torsk 14 er det en liten forsinkelse av vekst.

Tabell 2. Hemming av vekst på *Vibrio anguillarum* (*Listonella anguillarum*) i ulike fraksjoner fra fast faseekstraksjon av slim hos brosme og torsk islagret 8 og 16 dager. Avlest etter 48 timer. +; 30-70 % vekstreduksjon 5x oppkonsentrert, ++; 70-100 % vekstreduksjon 5x oppkonsentrert, -; ingen vekst reduksjon, *; forsinker vekst etter 24 timer.

Utvaskningsveske	gjennom filter	0,05%TFA	10% ACN	40%ACN	60%ACN	100%ACN
brosme 8, fra dag 8	++	++	+	+	-	-
brosme 9, fra dag 8	++	++	+	+	+	-
brosme 13, fra dag 16	++	+	+	-	+	-
brosme 14, fra dag 16	++	++	++	++	++	++
brosme 15, fra dag 16	+	++	-	*	-	-
torsk 7, fra dag 8	++	-	+	+	+	-
torsk 8, fra dag 8	++	++	++	+	+	*
torsk 9, fra dag 8	++	+	+	+	+	*
torsk 13, fra dag 16	*	-	-	-	-	-
torsk 14, fra dag 16	-	-	-	*	-	-
torsk 15, fra dag 16	++	-	-	-	-	-

4.8.3 Antibakteriell aktivitet målt på *Escherichia coli*

I forsøket med *E. coli* viste både torske- og brosmefraksjonene som gikk gjennom filter og 0,05%TFA vekstreduksjon (Tabell 3). I de organiske fasene var det ingen vekstreduksjon bortsett fra 60% ACN der brosmepróven viste litt vekstreduksjon.

Tabell 3. Hemming av vekst på *Escherichia coli* i ulike fraksjoner fra fast faseekstraksjon av slim hos brosme og torsk islagret 8 og 16 dager. Avlest etter 48 timer. +; 30-70 % vekstreduksjon 5x oppkonsentrert, ++; 70-100 % vekstreduksjon 5x oppkonsentrert, -; ingen vekstreduksjon, *; forsinker vekst etter 24 timer.

Utvaskningsveske	gjennom filter	0,05%TFA	10% ACN	40%ACN	60%ACN	100%ACN
brosme 8, fra dag 8	++	++	-	-	+	-
brosme 9, fra dag 8	*	*	-	-	*	-
brosme 13, fra dag 16	++	-	-	-	*	-
brosme 14, fra dag 16	+	+	-	-	*	-
brosme 15, fra dag 16	++	++	-	-	++	-
torsk 7, fra dag 8	++	-	-	-	-	-
torsk 8, fra dag 8	++	++	-	-	-	-
torsk 9, fra dag 8	*	+	-	-	-	-
torsk 13, fra dag 16	+	-	-	-	-	-
torsk 14, fra dag 16	+	-	-	-	-	-
torsk 15, fra dag 16	++	-	-	*	-	-

4.8.4 Antibakteriell aktivitet målt på *Yersinia ruckeri*

I forsøket med *Y. ruckeri* viste både torske- og brosmefraksjonene som gikk gjennom filter vekstreduksjon. Hos brosme var det vekstreduksjon i fraksjonen 0,05% TFA. I de organiske fasene var det lite eller ingen vekstreduksjon, men noen av fraksjonene spesielt fra brosme forsinket veksten første 24 timer (Tabell 4).

Tabell 4. Antimikrobiell aktivitet målt på *Yersinia ruckeri* i ulike fraksjoner fra fast faseekstraksjon av slim hos brosme og torsk islagret 8 og 16 dager. Avlest etter 48 timer. +; 30-70 % vekstreduksjon ikke fortynnet, ++; 70-100% vekstreduksjon ikke fortynnet, *; forsinket vekst.

Utvaskningsveske	gjennom filter	0,05%TFA	10% ACN	40%ACN	60%ACN	100%ACN
brosme 8, fra dag 8	++	++	*	-	*	-
brosme 9, fra dag 8	*	*	*	*	*	-
brosme 13, fra dag 16	++	++	*	*	*	-
brosme 14, fra dag 16	+	+	-	-	*	-
brosme 15, fra dag 16	++	-	*	+	+	-
torsk 7, fra dag 8	*	-	-	-	-	-
torsk 8, fra dag 8	++	-	-	-	-	-
torsk 9, fra dag 8	++	-	-	-	-	-
torsk 13, fra dag 16	+	-	-	-	-	-
torsk 14, fra dag 16	*	-	*	*	-	-
torsk 15, fra dag 16	++	-	*	-	-	-

4.8.5 Antimikrobiell aktivitet målt på *Shewanella putrefaciens*

Aktiviteten av utvaskningsfraksjonene fra både torske- og brosmeslim var sterkt hemmende på *S. putrefaciens* (Tabell 5).

Tabell 5. Hemming av vekst på *Shewanella putrefaciens* i ulike fraksjoner fra fast faseekstraksjon av slim hos brosme og torsk islagret 8 og 16 dager. Avlest etter 48 timer. +; 30-70 % vekstreduksjon 5x oppkonsentrert, ++; 70-100 % vekstreduksjon 5x oppkonsentrert, -; ingen vekst reduksjon, *; forsinket vekst etter 24 timer.

Utvaskningsveske	gjennom filter	0,05%TFA	10% ACN	40%ACN	60%ACN	100%ACN
brosme 8, fra dag 8	++	++	++	++	++	-
brosme 9, fra dag 8	++	++	++	++	++	-
brosme 13, fra dag 16	+	++	++	++	++	+
brosme 14, fra dag 16	+	++	-	++	++	-
brosme 15, fra dag 16	+	++	++	++	++	++
torsk 7, fra dag 8	++	*	+	+	+	-
torsk 8, fra dag 8	++	++	++	++	++	++
torsk 9, fra dag 8	+	*	++	++	++	++
torsk 13, fra dag 16	++	++	++	++	++	++
torsk 14, fra dag 16	*	-	-	++	++	-
torsk 15, fra dag 16	++	-	++	++	++	-

5 Diskusjon

I følge regelverket er det tillatt å lagre brosme i 15 dager og torsk i 12 dager for produksjon av konvensjonelle produkter som tørrfisk og fullsaltet fisk (Kvalitetsforskriften 2004 § 5-3 Tørrfisk og fullsalting av fisk). Målet med oppgaven var å undersøke om det var grunnlag i lengre holdbarhet til brosme i tillegg skulle innholdet av eventuelle varmemestabile, lavmolekylære antibakterielle stoffer i slim fra torsk og brosme undersøkes.

For å undersøke en eventuell holdbarhet ble kimtall, TVN, TMAO/TMA, pH og proteinnedbrytning undersøkt i muskel av torsk og brosme ved islagring i 30 dager etter fangst. Resultatene av kimtallsmålingene viste at utviklingene var omtrent lik for begge artene. Som forventet var kimtallene generelt høyere på samme dag etter fangst i muskelprøvene med skinn sammenlignet uten skinn. I ettertid er det klart at en burde ha analysert på de spesifikke forråtnelsesbakteriene som *Shewanella putrefaciens* og *Photobacterium phosphoreum*, som er spesielt effektive til å produsere TMA (Dalgaard 1995). Huss et al. (1974) har foreslått at total kimtall er en dårlig indikator på forråtnelse av fisk. Totalt flyktig nitrogen utgjøres i stor grad av NH_3 og TMA som dannes under bakterievekst. TMA blir produsert hovedsakelig av de spesifikke forråtnelsesbakteriene. Resultatene tyder på at torsk utvikler mer TVN og TMA under lagringen enn brosme. Dette kan være forårsaket at det er noe mere TMAO i torsk enn i brosme. Nedgangen i TMAO under lagringen er noenlunde jevn for begge. Dette indikerer at det ikke er forskjell i vekst av spesifikke forråtnelsesbakterier. Disse burde selvsagt vært målt (med jernagar) under lagringen.

Endelig muskel-pH hos torsk var cirka 7,0 som stemmer overrens med det andre har funnet for vanlig vill torsk (Kristoffersen et al. 2006). At brosme har lavere endelig muskel-pH (cirka 6,3) behøver ikke å bety at den var i bedre kondisjon (ernæringsstatus) enn torsk, men kan være artsspesifikke årsaker. Generelt er det slikt at lav pH hemmer mikrobiell vekst, men det er et spørsmål om pH 6,3 er lav nok til å påvirke vekst. Forøvrig så synes muskel-pH å øke noenlunde i samme takt hos begge artene under lagringen og derved kan man anta at noenlunde like mengder flyktige baser dannes. Det vil si at bakterieveksten er tilsvarende.

Mengden TCA-løselig protein er et uttrykk for nedbrutt protein og resultatene viser at mengden øker med lagringstiden. Siden økningen først og fremst kommer etter tolv dager så kan det antas at nedbrytningen er forårsaket av bakterier. Det kan synes som om mer protein

brytes ned i torskemuskel sammenlignet med muskel fra brosme. Dette tyder på høyere vekst av proteindegraderende bakterier.

Kanskje den mest overbevisende forskjellen mellom islagret brosme og torsk er i slimproduksjon. Det er klart at skinnet (gobletcellene) hos brosme skiller ut mye mer slim enn tilsvarende hos torsk. Det er også interessant å merke seg at det er først etter tolv dagers islagring at slimet synes å slippe fra fisken. Alternativt er at slim blir vasket bort kontinuerlig av smeltende is, men at cellene fortsetter å produsere store mengder slim. Den store mengden slim kan være et problem i produksjon av tørrfisk. Dersom brosme henges før den har sluppet slimet vil tørrfisken få farge på skinnet og kvaliteten blir dårligere. Til forskjell fra brosme får tørrfisk av islagret torsk merke av isen og bør derfor henges rett etter fangst (Tørrfisk, uten år).

Siden slimet kan inneholde en rekke forskjellige typer antibakterielle stoffer så kan mengden slim være avgjørende for hvor lett bakteriene kan nå inn til selve skinnet og videre inn i muskel. Det vil forøvrig vært interessant å måle konsentrasjon av ulike antimikrobielle stoffer i slimet for å se om den totale mengden er mye større i brosme. I tillegg kan man kanskje anta at de store mengdene slim på skinnet til brosme de første tolv dagene kan virke som en fysisk barriere for inntrengning av bakterier. I oppgaven ble ikke slimproduksjon inne i bukhulen undersøkt. Det kan godt være at her er det ingen forskjell mellom torsk og brosme som i så fall kan forklare den like store bakterieveksten i muskel hos begge artene.

Lavmolekylære, varmestabile, antibakterielle stoffer i slimeprøvene (fra dag 8 og 16) ble separert ved hjelp av fast fase ekstraksjon. Seks forskjellige fraksjoner fra fast fase ble undersøkt med henhold på hemming av vekst hos fem forskjellige bakteriestammer. De var to fiskepatogene bakteriearter (*Vibrio anguillarum* (*Listonella anguillarum*) og *Yersinia ruckeri*), en gram-positiv; *Bacillus megaterium*, en vanlig laboratoriebakterie; *Escherichia coli* D31 og en forråtnelsesbakterie; *S. putrefaciens*. Bakterien *P. phosphoreum* ble også forsøkt testet, men vokste ikke under de gitte forsøksbetingelsene.

De fleste av de to første fraksjonene fra fast fase viste hemming av vekst for de fem bakteriestammene. Årsaken til hemmingen kan antageligvis være høye konsentrasjoner av salter i disse fraksjonene som hemmer bakterieveksten, ikke av spesifikke antibakterielle stoffer.

Bakteriene *B. megaterium* og *S. putrefaciens* ble begge sterkt hemmet i de fleste fraksjonene fra ACN fasene både fra torske- og brosmeslim. *B. megaterium* ble også hemmet i lavere konsentrasjoner helt til 1:20. *B. megaterium* ser ut til å være en lett bakterie å hemme vekst på. Årsaken kan være at det er en stor bakterie, slik at det under den gitte start OD vil

kunne være færre bakterier i mediet enn for de andre bakteriene i forsøket. En annen årsak kan være at den er gram-positiv. Forsøk har vist at gram-positive bakterier kan være sensitive for stoffer i fraksjoner ekstrahert fra marine arter (Haug et al. 2002). Ellers er det vanskelig å spekulere i hva årsaken kan være til at disse 2 hemmes til dels kraftig i vekst, men ikke de 3 andre

På *V. anguillarum* var det på dag 8 vekstreduksjon med ACN fraksjonen 10%, 40% og 60% fra både torsk og brosme. På dag 16 var det kun vekstreduksjon fra brosme. Dette kan bety at brosmeslim inneholder andre eller mer av antibakterielle stoffer enn torskeslim. For alle ACN fasene var det ingen vekstreduksjon hos *Y. ruckeri* og *E. coli*. Et unntak var 40% og 60% av ACN brosmefraksjoner som gav svak vekstreduksjon. Dette kan muligens også tyde på at det finnes noe annet (eller mer) i brosmeslim. Bergsson et al. (2005) har i forsøk med torskeslim vist hemming på *E. coli*, men de hadde tilsatt salt (NaCl) til sine utvaskninger fra fast fase kolonne. Hvis salter var tilstede i ACN fraksjonene ville muligens bakterieveksten blitt mer hemmet. Det hadde vært interessant å tilsette salt til ekstrakt fra brosmeslim, for å finne ut om det ble mer hemmende. Kanskje det er en synergieffekt i naturen?

Det har blitt antydnet at fiskeslim kan være en kilde for antimikrobielle stoffer som kan ha anvendelsesmuligheter innen fiske og humanmedisin (Subramanian et al. 2008). Siden brosme skiller ut ganske mye slim ville det være interessant å kvantifisere mengde antimikrobielle stoffer i forhold til mengden slim, identifisere stoffene og finne ut om de for eksempel har anvendelsesmuligheter innen fiske og humanmedisin etc.

Som konklusjon kan sies at resultatene i oppgaven ikke gir noe klart svar om brosme har lenger holdbarhet enn torsk. Forråtnelsesindikatorer som TVN, TMA og TCA-løselig protein kan tyde på at muskeldegradering går noe saktere hos brosme under islagring. Kimtallsutviklingen er imidlertid i praksis lik, men det er nødvendig å undersøke vekst av spesifikke forråtnelsesbakterier. Mye mer slim skilles ut fra brosmeskinnet enn fra torskeskinnet og dette kan ha betydning for bakterieinntrengning. Resultatene viser at det er liten forskjell i konsentrasjon av lavmolekylære varmemestabile, antibakterielle stoffer i slim fra de to artene. Ekstraherte stoffer hemmer vekst av enkelte bakteriestammer.

6 Referanser

- Aranishi, F. & Mano, N. (2000). Response of skin cathepsins to infection of *Edwardsiella tarda* in Japanese flounder. *Fisheries Science* 66:169-170.
- Barnung, T.N. (1991). Definerings av lengste tillatte lagringstid i fersk iset tilstand for lange og brosme for anvendelse til salting. Distriktslaboratoriet. Ålesund.
- Bergsson, G., Agerberth, B., Jörnvall, H. & Gudmundsson, G.H. (2005). Isolation and identification of antimicrobial components from the epidermal mucus of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *FEBS Journal* 272:4960-4969.
- Bell, G.H., Emslie-Smith, D. & Paterson, C.R. (1976). Textbook of Physiology and Biochemistry, 9th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Breder, C.M. (1926). The locomotion of fishes. *Zoologica* 4:159-256.
- Bullock, A.M., Marks, R. & Roberts, R.J. (1978). The cell kinetics of teleost fish epidermis: epidermal mitotic activity in relation to wound healing at varying temperatures in plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Zoology* 185:197-204.
- Conway, E.J. & Byrne, A. (1933). An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. The micro-determination of ammonia. *Biochemical journal* 27:419-429.
- Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology* 26:319-333.
- Ellis, A.E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25:827-839.
- Fletcher, T.C. & Grant, P.T. (1968). Glycoproteins in the external mucus secretions of the plaice *Pleuronectes platessa* (L.). *Biochemical Journal* 106: Nr. 2 p 12.
- Fletcher, T.C. & Grant, P.T. (1969). Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice *Pleuronectes platessa* (L.). *Biochemical journal* 115: Nr. 5 p 65.
- Fraser, D.I., Dingle, J.R., Hines, J.A., Nowlan, S.C. & Dyer, W.J. (1967). Nucleotide degradation, monitored by thin-layer chromatography and associated post mortem changes in relaxed cod muscle. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 24:1837-1841.
- Gildberg, A. (1988). Aspartic proteinases in fish and aquatic invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 91:425-435.
- Gram, L. & Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33:121-137.

- Guderly, H., Lapointe, D., Bédard, M. & Dutil, J.D. (2003). Metabolic priorities during starvation; enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 135:347-356.
- Haug, T., Kjuul, A.K., Stensvåg, K., Sandsdalen, E. & Styrvold, O.B. (2002). Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunology* 12:371-385.
- Hjelmeland, K., Christie, M. & Raa, J. (1983). Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *Journal of Fish Biology* 23:13-22.
- Huss, H.H., Dalsgård, D., Hansen, L., Ladefoged, H., Pedersen, A. & Zittan, L. (1974). The influence of hygiene in catch handling on the storage life of cod and plaice. *Journal of Food Technology* 9:213-221.
- Huss, H.H. (1976). Konsumfisk – biologi, teknologi, kvalitet og holdbarhed. *Dansk Vet. Tidsskrift* 59:165-175.
- Huss, H.H. (1983). Fersk fisk – Kvalitet og holdbarhed Monograph Technological Laboratory, Ministry of Fisheries, Technical University, Lyngby, Denmark.
- Kjuul, A.K., Büllsbach, E.E., Espelid, S., Dunham, R., Jørgensen, T. Ø., Warr, G.W. & Styrvold, O.B. (1999). Effects of cecropin peptides on bacteria pathogenic to fish. *Journal of Fish Diseases* 22:387-394.
- K-melding F-4/96 Lange og brosme til salting og henging. Dispensasjon fra kvalitetsforskriftens § 5-3.
- Kristoffersen, S., Tobiassen, T., Esaiassen, M., Olsson, G.B., Godvik, L.A., Seppola, M.A. & Olsen, R.L. (2006). Effects of pre-rigor filleting on quality aspects of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research* 37:1556-1564.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Lødemel, J.B. & Olsen, R.L. (2003). Gelatinolytic activities in muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*), spotted wolffish (*Anarhinchas minor*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:1031-1036.
- Lødemel, J.B. (2004). Gelatinolytic activities, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in fish. Dr.scient. Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø.
- Mattilsynets kvalitetsforskrift for fisk og fiskevarer juni 1996, Endret ved forskrift 9 jan 2004
- Ouali, A. (1992). Proteolytic and physicochemical mechanisms involved in meat texture development. *Biochimie* 74:251-265.

- Pickering, A.D. (1974). The distribution of mucus cells in the epidermis of brown trout, *Salmo trutta* (L.) and the char *Salvelinus alpinus* (L.). *Journal of Fish Biology* 6:111-118.
- Shepard, K.L. (1994). Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4:401-429.
- Smith, V.J., Fernandes, J.M.O., Jones, S.J., Kemp, G.D. & Tatner, M.F. (2000). Antibacterial proteins in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology* 10:243-260.
- SSB 2008 <http://www.ssb.no/emner/10/05/fiskeri/tab-2008-02-07-02.html>
- Subramanian, S., Ross, N.W. & MacKinnon, S.L. (2008). Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 150:85-92.
- Tørrfisk. Prosjektledelse av Fiskerinæringens Felles Kompetansestyre, Tromsø. Uten år.
- Ultsch, G.R. & Gross, G. (1979). Mucus as a diffusion barrier to oxygen: possible role in O₂ uptake at low pH in carp (*Cyprinus carpio*) gills. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 62:685-989.
- Van Oosten, J. (1957). The skin and scales. In *The Physiology of Fishes, Vol. I* (M.E. Brown, ed.). pp. 207-244. New York, Academic Press.
- Wilson, B., Danilowicz, B.S. & Meijer, W.G. (2008). The Diversity of Bacterial Communities Associated with Atlantic Cod *Gadus morhua*. *Microbial Ecology* 55:425-434.