

Alternativ produksjon av Matjessild

Del 1: Nordsjøschild

Torstein Skåra, Mats Carlehög, Josefine Skaret, Asbjørn Gildberg, Flemming Jessen, Henrik Hauch Nielsen og Trond Løvdal





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

Nofima har om lag 400 ansatte.

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

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

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

Bergen:

Kjerreidviken 16
NO-5141 Fyllingsdalen

Sunndalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

Faks: 64 97 03 33

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA

Rapport

		ISBN: 978-82-8296-098-4 (trykt) ISBN: 978-82-8296-099-1 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Alternativ produksjon av Matjessild Del 1: Nordsjøsil		<i>Rapportnr.:</i> 28/2013
		<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Torstein Skåra, Mats Carlehög, Josefine Skaret, Asbjørn Gildberg, Flemming Jessen, Henrik Hauch Nielsen og Trond Løvda		<i>Dato:</i> 19. juni 2013
<i>Avdeling:</i> Prosessteknologi		<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 39
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)		<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF#900765
<i>Stikkord:</i>		<i>Prosjektnr.:</i> 10239
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> <p>Forsøk med lab-skala produksjon av matjes-type produkter fra Nordsjøsil ble gjennomført i Egersund, i juni 2012. I tillegg til å modne sild på tradisjonelt vis, ganet i saltlake, ble 3 alternative metoder forsøkt: modning av sløyd sild (uten innvoller), modning av filet i resirkulert lake, samt modning av filet i lake tilsatt innvollsenzymer (kunstig lake).</p> <p>Det ble utført sensorisk analyse av alle prøvene fra forsøkene, samt av et kommersielt matjes-produkt som var produsert i samme tidsrom som prøvene. Dessuten ble det utført analyse av enzymaktivitet i laker og muskel, proteomanalyse av råstoff, tradisjonell matjessild og filet i kunstig lake, i tillegg til en enkel screening av bakterieinnholdet i de ulike lakene.</p> <p>Hovedkonklusjonen fra forsøkene er at analyseresultatene, gir betydelig innsikt i ulike faktorerers effekt på produkttegenskapene til matjessild. Både hver for seg og samlet, utgjør de et solid grunnlag for videre utvikling av disse produktene.</p>		
<i>English summary/recommendation:</i> <p>This report describes laboratory scale trials with salting of matjes herring; both traditional salting of gibbed herring, as well as salting of gutted herring and filets.</p> <p>Samples from the trials were subjected to sensory analysis. Furthermore measurements of enzymatic activity were performed, and also, for some samples, measurement of changes in the protein fraction and screening of microbial growth.</p> <p>The results reveal interesting effects of the different process parameters, on the different product characteristics of matjes herring.</p>		

Innhold

1	Introduksjon	1
2	Forsøk.....	2
2.1	Materiale og Metoder	2
2.1.1	Fangstråstoff.....	2
2.1.2	Forsøksvarianter	3
3	Sensorikk	7
3.1	Mål.....	7
3.2	Materiale og metoder	7
3.2.1	Prøver	7
3.2.2	Prøvetilberedning.....	8
3.2.3	Sensorisk bedømmelse.....	9
3.2.4	Statistikk	10
3.3	Resultater	11
3.3.1	Prøver	11
3.3.2	Sensorisk bedømmelse.....	12
3.3.3	Prinsipal komponent analyse (PCA).....	16
3.4	Diskusjon	17
3.5	Konklusjon	18
4	Enzymer	19
4.1	Mål.....	19
4.2	Materiale og metoder	19
4.2.1	Prøveopparbeidelse	20
4.2.2	Substrat	20
4.2.3	Myofibrillprotein	20
4.2.4	Måling av enzymaktivitet	20
4.3	Resultater	21
4.3.1	Ferske og fryselagrede lakeprøver	21
4.3.2	Screening av aktivitet i sild og i laker	22
4.3.3	Målinger av proteaseaktivitet i enkeltindivider – Hel fisk.....	23
4.3.4	Målinger av proteaseaktivitet i enkeltindivider – Skinnfri filet.....	24
4.4	Diskusjon	25
4.5	Konklusjon	25
5	Proteomanalyse	27
5.1	Mål.....	27
5.2	Materiale og metoder	27
5.2.1	Proteomanalyse.....	27
5.3	Prøvemateriale og prøve oparbeidelse.....	27
5.3.1	Proteinbestemmelse	27
5.3.2	To-dimensional gelelektroforese (2DE).....	28
5.4	Resultater og diskusjon.....	28

5.4.1	Sammenligning af proteinprofiler	29
5.4.2	Relationer til enzymaktiviteter	31
5.5	Konklusion	32
6	Mikrobiologi	33
6.1	Material og metoder	33
6.1.1	Stammesamling og DNA panel	33
6.1.2	Validering og optimalisering av real-time PCR deteksjonssystemer	34
6.1.3	Real-time PCR betingelser	34
6.2	Resultater	35
6.3	Diskusjon	36
7	Sammendrag og konklusjon	37
	Litteratur	38

1 Introduksjon

Bedrifter i pelagisk foredlingssektor ønsker å se nærmere på mulighetene for å produsere matjessild på en mer kostnadseffektiv måte, samtidig som en beholder produktets egenskaper med hensyn til smak, tekstur og kvalitet. Dersom man lykkes med dette er det også interessant å undersøke hvorvidt det er mulig å overføre en slik alternativ metode til NVG-sildefisket tidlig i sesongen.

Ved dagens produksjon benyttes hel, rund nordsjøsild der en fjerner gjeller for blant annet å hindre nedgradering av kvaliteten. Silden legges så i kar for modning i cirka 24 timer. Deretter sorterer en ut silda fra laken som blir dannet under modningen og den modnede (matje)silden går til innfrysning og eksport til ulike markedsland for videre bearbeiding. Bearbeidingen består i hovedsak i at den fileteres på en særegen måte, pakkes og fryses deretter inn for andre gang. I neste operasjon transporteres matjessilden for videre distribusjon ut til kunder i viktige hovedmarkeder. Silden er på dette stadiet filetert slik at den henger sammen i sporden. Hode, innmat, ryggbein er fjernet. Andre bein registreres ikke ved konsum. Enten er de fjernet fysisk eller så er de blitt så bløte under prosessen at de ikke registreres.

Hensikten med prosjektet er å undersøke mulighetene for å benytte en alternativ metode for produksjon av et matjes-lignende produkt med samme smak og egenskaper som tradisjonell matjessild. Utgangspunktet vil være fersk filet av nordsjøsild. Forsøk gjennomført i Nederland på 1990-tallet med gjenbruk av lake fra tradisjonell matjesproduksjon på råstoff fanget utenfor matjes-sesongen indikerte at man ikke oppnådde et produkt som et trent sensorisk panel oppfattet som tradisjonell matjessild, eller som hadde de samme kjemiske karakteristika. I dette prosjektet har man imidlertid ikke planer om å bruke råstoff fra utenom sesongen, men anser at fettinnhold og enzymaktivitet er viktige egenskaper for å oppnå et godt resultat.

Prosjektforespørselen er i hovedsak basert på en hypotese som innebærer at:

- Det finnes aktive enzymer i laken etter normal matjessildproduksjon.
- Disse enzymene har opphav i sildens innvoller.
- Enzymene forårsaker de sensoriske endringene som finner sted under modningsprosessen

Prosjektet ble gjennomført av Nofima, i samarbeid med Danmarks Tekniske Universitet (DTU). Rapporten er satt sammen av delrapporter. Derfor er delen om proteom-analyse, skrevet på dansk (av DTU).

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

2 Forsøk

2.1 Materiale og Metoder

Det ble gjennomført 4 ulike typer forsøk (3 gjentak) ved et sildeforedlingsanlegg i Egersund:

- Tradisjonell produksjon med ganet fisk
- Produksjon av ganet fisk uten calanus (sløyd)
- Produksjon av filet i gjenbrukt lake
- Produksjon av filet i "ny lake – med innvollsrester"

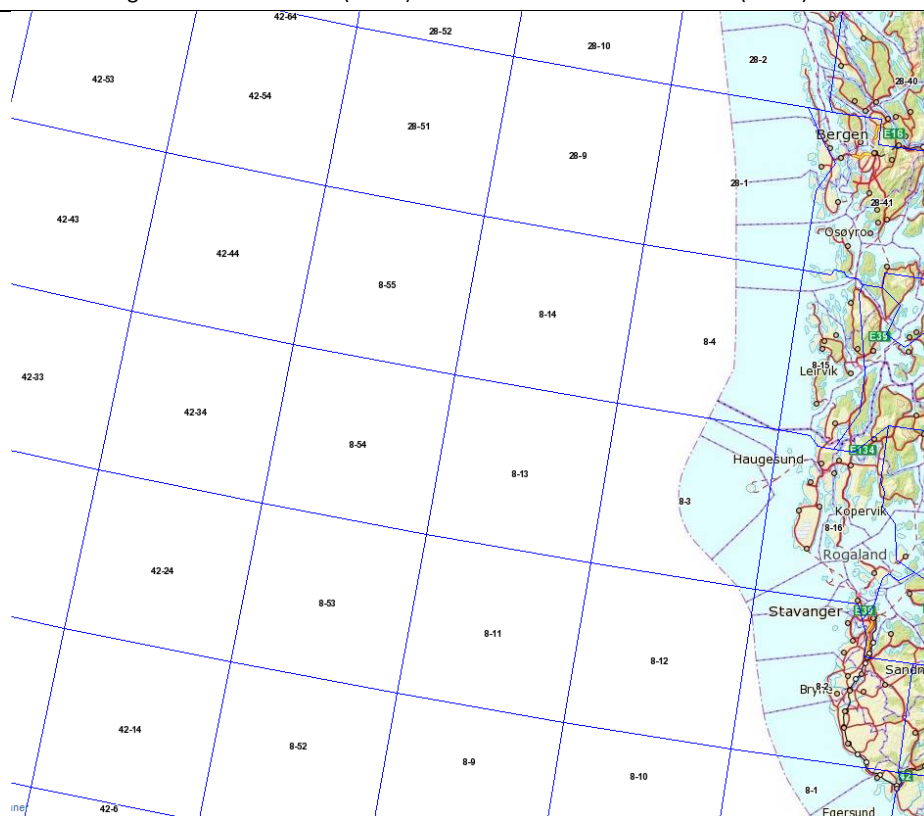
Forsøkene ble utført den 6. 12. og 14. juni, av personell fra Nofima med god assistanse og tilrettelegging fra Egersund Seafood.

2.1.1 Fangstråstoff

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

Tabell 1 Fangstdata

Dato	Fartøy	Fangstdato (tid)	Fangstområde	Lossing	
				Begynt	Slutt
6. 6.12	Brennholm	5.6. (12:30)	4233	6.6. (08:00)	6.6. (16:30)
12. 6.12	Sjarmør	10.6. (24:00)	4254	12.6. (07:00)	12.6. (09:15)
14. 6.12	Gunnar Langva	13.6. (20:00)	4233	14.6. (16:00)	15.6. (00:45)



Kartutsnitt kopiert fra: <http://kart.fiskeridir.no/default.aspx?gui=1&lang=2>

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

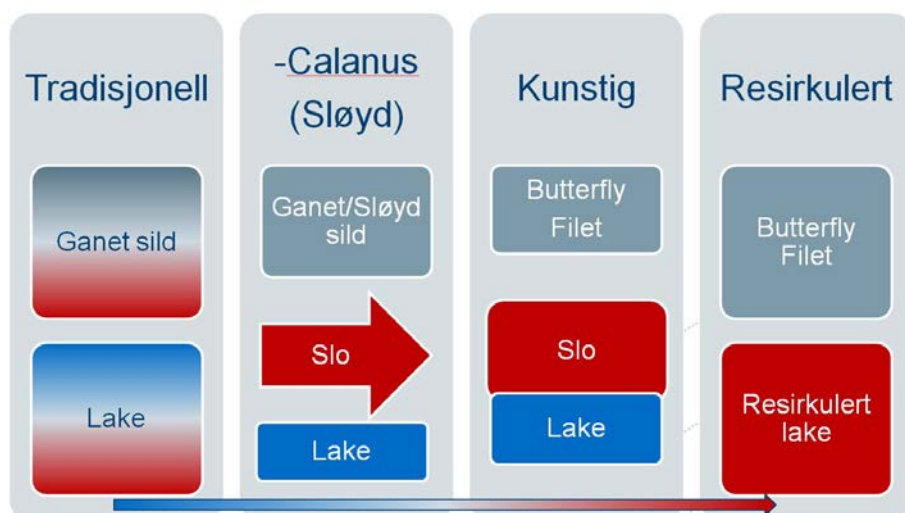
Tabell 2 Råstoffegenskaper

Dato	Fett % (rund)	Fett % (filet)	Temperatur i fisk (°C)		Kvalitet*
			I fartøy	Produksjon	
6.6.12	19,17	20,97	-1,2		1,4
12.6.12		20,10		0,5	2
14.6.12	20,54	22,01	-0,8	0,5	1,6

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

2.1.2 Forsøksvarianter

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



Figur 1 Skjematisk oversikt over variantene som ble produsert

Forsøk 1: 6. juni

Som nevnt ble råstoffet gradert ved mottak. En oversikt over kvalitetsgraderingen på råstoffet som ble brukt den 6. juni, er gitt i Tabell 3.

Tabell 3 Kvalitetssegenskaper for silderåstoff

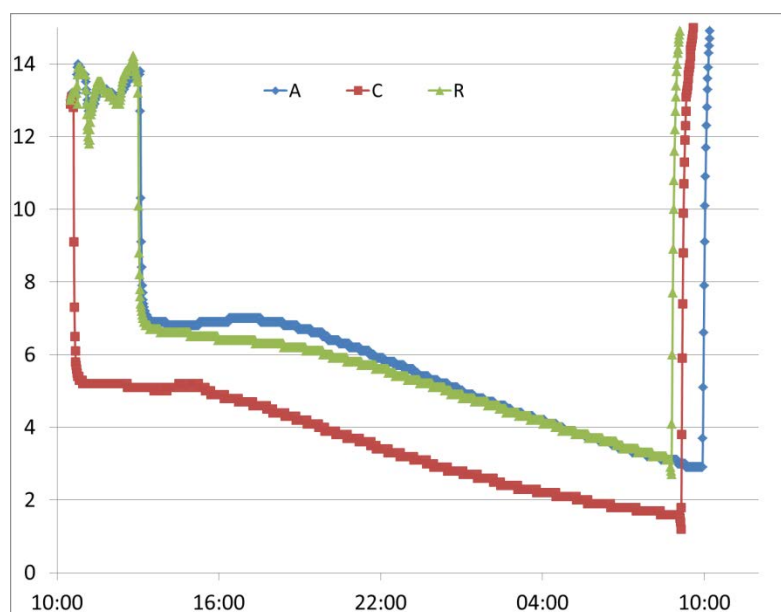
Egenskap	Karakter (1-4)	Egenskap	Karakter (1-4)
Ferskhhet	1,	Stivhet	1
Farge skinn	1,	(Meat condition)	1
Farge gjeller	1,	Sortering (Grading)	1
(Feed)	2,5	Tarminnhold	1
Buuskade	1,5	Nematoder	2
		Totalinntrykk	1,4

Råstoff til forsøkene ble tatt direkte fra produksjonen. Ganet fisk ble veid og lagt direkte i tønner. Dette råstoffet ble dessuten sløyd, og brukt til – Calanus varianten (C). Filetene ble maskinfiletert til butterfly-fileter. Etter veiing ble disse lagt i tønner og tilsatt enten resirkulert lake (R) eller kunstig lake (A). En oversikt er gitt i Tabell 4.

Tabell 4 Oversikt over forsøksvarianter

Forsøksvarianter	Kode	Sild	Lake
Trad maatjes	T	37,5 kg ganet (vekt 150 g, n= 20)	7,5 liter 13 % salt
- Calanus	C	37,5 kg sløyd (vekt 130 g, n = 20)	7,5 liter 13 % salt
Resirkulert lake	R	37,5 kg flaps	7,5 liter (frosset og tint lake fra produksjonen 5. juni.) justert til 7 % salt
Kunstig lake	A	37,5 kg flaps	7,5 liter (med innvoller fra C, ekstrahert i 1 time, og silt gjennom engangslue) justert til 7 % salt

Temperaturen ble registret under hele modningsperioden. En graf som viser temperaturen i tre av tønnene, er vist i Figur 2.



Figur 2 Temperaturprofil i ulike forsøktønner (A: kunstig lake, C: - Calanus, R: Resirkulert lake)

Forsøk 2: 12. juni

En oversikt over kvalitetsgraderingen på råstoffet som ble brukt den 12. juni, er gitt i Tabell 5.

Tabell 5 Kvalitetssegenskaper for silderåstoff

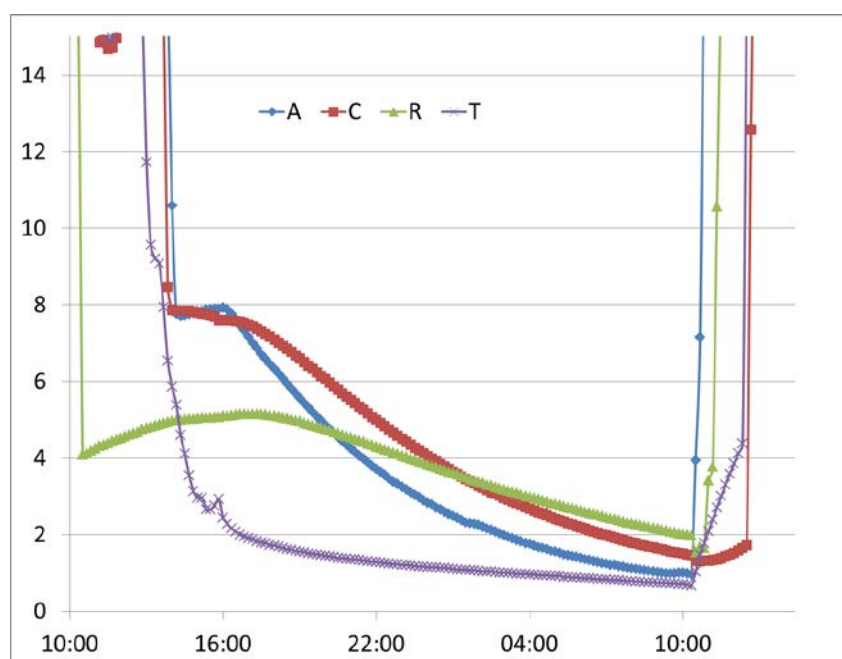
Egenskap	Karakter (1-4)	Egenskap	Karakter (1-4)
Ferskhets	2	Stivhet	2,5
Farge skinn	2	(Meat condition)	1,5
Farge gjeller	2	Sortering (Grading)	1
(Feed)	2,5	Tarminnhold	1
Buuskade	2,5	Nematoder	2
		Totalinntrykk	2

Råstoff til forsøkene ble tatt direkte fra produksjonen. Ganet fisk ble veid og lagt direkte i tønner. Dette råstoffet ble dessuten sløyd, og brukt til – Calanus varianten (C). Filetene ble maskinfiletert til butterfly-fileter. Etter veiing ble disse lagt i tønner og tilsatt enten resirkulert lake (R) eller kunstig lake (A). En oversikt er gitt i Tabell 6.

Tabell 6 Oversikt over forsøksvarianter

Forsøksvarianter	Kode	Sild	Lake
Trad maatjes	T	37,5 kg ganet (vekt 173 g, n= 20)	7,5 liter 13 % salt
- Calanus	C	37,5 kg sløyd	7,5 liter 13 % salt
Resirkulert lake	R	37,5 kg flaps (vekt 87 g, n= 20)	7,5 liter (frosset og tint lake fra produksjon 6. juni) justert til 7 % salt
Kunstig lake	A	37,5 kg flaps (vekt 87 g, n= 20)	8 liter (med innvoller fra C, ekstrahert i 30 min, og silt i to trinn) justert til 7 % salt

Temperaturen ble registret under hele modningsperioden. En graf som viser temperaturen i tre av tønnene, er vist i Figur 3.



Figur 3 Temperaturprofil i ulike forsøkstønner (A: kunstig lake, C: - Calanus, R: Resirkulert lake)

Forsøk 3: 14. juni

En oversikt over kvalitetsgraderingen på råstoffet som ble brukt den 14.juni, er gitt i Tabell 7.

Tabell 7 Kvalitetssegenskaper for silderåstoff

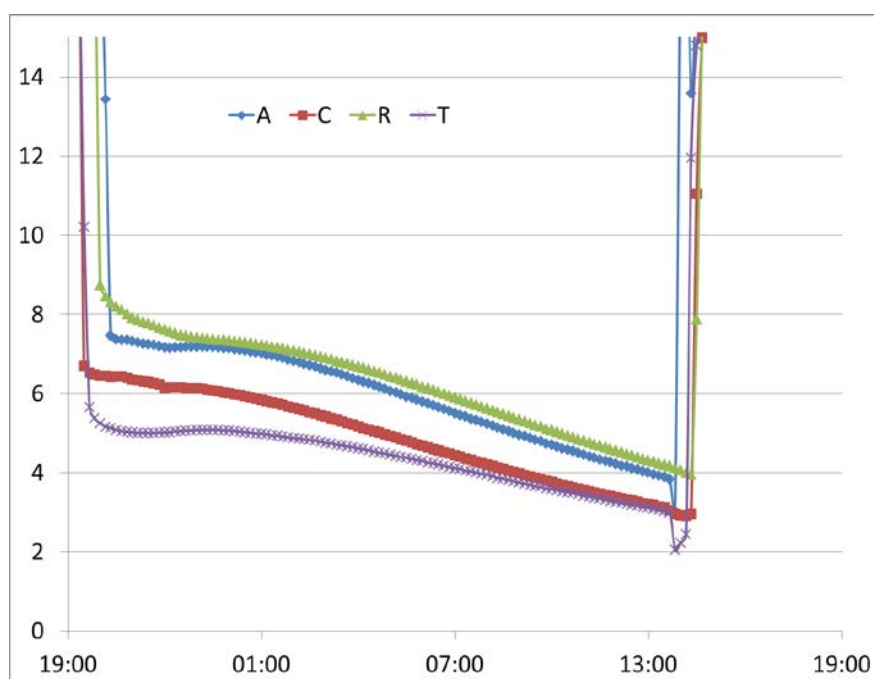
Egenskap	Karakter (1-4)	Egenskap	Karakter (1-4)
Ferskhets	1,5	Stivhet	1,5
Farge skinn	2	(Meat condition)	1
Farge gjeller	2	Sortering (Grading)	1
(Feed)	2,5	Tarminnhold	1
Buuskade	1,5	Nematoder	2
		Totalinntrykk	1,6

Råstoff til forsøkene ble tatt direkte fra produksjonen. Ganet fisk ble veid og lagt direkte i tønner. Dette råstoffet ble dessuten sløyd, og brukt til – Calanus varianten (C). Filetene ble maskinfiletert til butterfly-fileter. Etter veiing ble disse lagt i tønner og tilsatt enten resirkulert lake (R) eller kunstig lake (A). En oversikt er gitt i tabell 2.8.

Tabell 8 Oversikt over forsøksvarianter

Forsøksvarianter	Kode	Sild	Lake
Trad matjessild	T	37,5 kg ganet (vekt 172 g, n= 20)	7,5 liter 13 % salt
- Calanus	C	37,5 kg sløyd (vekt 153 g, n= 20)	7,5 liter 13 % salt
Resirkulert lake	R	37,5 kg flaps (vekt 82 g, n= 20)	7,5 liter (frosset og tint lake fra produksjon 13. juni) justert til 7 % salt
Kunstig lake	A	37,5 kg flaps (vekt 82 g, n= 20)	7,5 liter (med innvoller fra C, ekstrahert i 30 min, og silt i to trinn) justert til 7 % salt

Temperaturen ble registret under hele modningsperioden. En graf som viser temperaturen i tre av tønnene, er vist i Figur 4.



Figur 4 Temperaturprofil i ulike forsøktønner (A: kunstig lake, C: - Calanus, R: Resirkulert lake)

3 Sensorikk

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

Sensorisk analyse av matjessild inngår i noen grad i Kvalitets indeks metoden (QIM), som er beskrevet av (Lyhs *et al.*, 2005), men denne er i hovedsak fokusert på kvalitetsnedbrytning og holdbarhet. (Gudmundsdottir *et al.*, 1997) har undersøkt effekten av ganing versus sløying eller filetering, for vanlig kryddersild, ved hjelp av sensorisk analyse. De fant at både den ganede og den sløyde silda hadde en betydelig moden smak, som de ikke kunne påvise i filetene.

Denne rapporten beskriver resultatene fra disse analysene.

3.1 Mål

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

3.2 Materiale og metoder

3.2.1 Prøver

Prøvematerialet til den sensoriske analysen ble produsert den 6. 12 og 14. juni. Ettersom råstoffet som ble brukt den 12. juni var bedømt til ikke å være av "matjeskvalitet", ble resultatene fra denne produksjonsdagen holdt utenfor den endelige datanalysen.

Tabell 9 Oversikt over prøver fra matjessild råstoff

Produkt	Kode	Fangst Dato	Forkortelser
Filet Kunstig Lake	A	6.6.12	A-6
Filet Kunstig Lake	A	14.6.12	A-14
Sløyd fisk - Calanus	C	6.6.12	C-6
Sløyd fisk - Calanus	C	14.6.12	C-14
Filet Resirkulert Lake	R	6.6.12	R-6
Filet Resirkulert Lake	R	14.6.12	R-14
Tradisjonell matjessild	T	6.6.12	T-6
Tradisjonell matjessild	T	14.6.12	T-14
Kommersielt produkt (matjessild)	K		K

Det er altså prøvene i Tabell 1 som utgjør hoveddelen av denne rapporten.

Tabell 10 Oversikt over prøver fra ikke-Matjes råstoff

Produkt	Kode	Fangst Dato	Forkortelser
Filet Kunstig Lake	A	12.jun	A-12
Sløyd fisk - Calanus	C	12.jun	C-12
Filet Resirkulert Lake	R	12.jun	R-12
Tradisjonell matjessild	T	12.jun	T-12

3.2.2 Prøvetilberedning

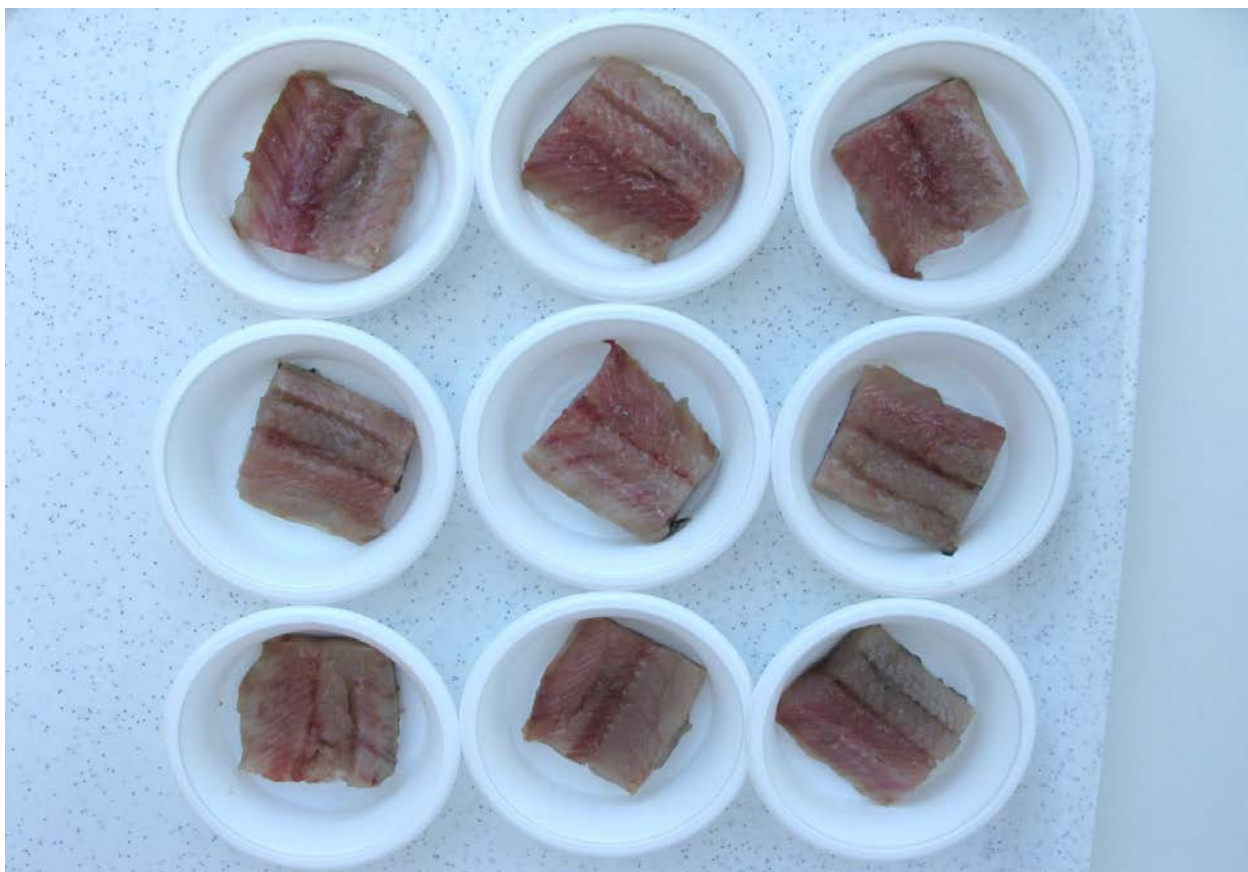
Prøvene ble levert i uke 37 og satt på fryserom. Hver prøve (2 kg sild/filet) var frosset inn i 0,5 liter 7% saltlake og vakuumert i poser (hver sort bestod av 2 poser). Disse ble lagt i rennende vann for tining i 3-5 timer, dagen før analyse.

Den tinte silden ble oppbevart, emballert, i isvann på kjølerom i påvente av tilberedning. 5 fisk av prøvetypene: Tradisjonell matjessild, Sløyd sild – Calanus og Kommersielt produkt ble så filetert på tradisjonelt vis (med kyndig hjelp fra Arjen Kraijeveld). Skinnen ble fjernet fra butterfly-filetene.

Alle filetene ble kuttet opp i 2 biter à 4 cm og samlet opp i en plastbakke. Bitene ble lagt opp i tilfeldig kodede plastikkskåler, 1 bit med lokk per dommer, som vist i Figur 5.

Ved kalibreringen av det sensoriske panelet den 18. september ble Kommersiell og Resirkulert lake benyttet. I hovedforsøket den 18. og 19. september ble det først servert en oppvarmingsprøve i forkant av analysen. Deretter fikk dommerne servert totalt 26 prøver, 13 sorter i 2 gjentak (pose 1=gjentak 1 og pose 2=gjentak 2) fordelt på 6 serveringsomganger.

Temperaturen på prøvene ved servering var 15 °C (+/- 2 °C). Alle prøver ble randomisert med hensyn til sort, dommer og pose.



Figur 5 Prøver til sensorisk bedømmelse

3.2.3 Sensorisk bedømmelse

Det ble utført en beskrivende test i henhold til metoden (ISO 6564:1985E) Nofimas sensoriske laboratorium er akkreditert for gjennomføring av metoden, og 23 sensoriske egenskaper ble bedømt på en skala fra 1–9 (1=ingen intensitet, 9=tydelig intensitet)

Bedømmelsen ble utført av et trent sensorisk panel bestående av 9 personer.

Sensoriske egenskaper som ble bedømt er beskrevet nedenfor.

Lukt

6 ulike lukteegenskaper ble beskrevet i analysen:

Syrigluk	Relateres til en frisk, sur-søt lukt
Metallukt	Lukt av metall (ferrosulfat)
Sjøluk	Relateres til lukt av frisk, salt sjø
Fiskeoljelukt	Relateres til lukt av fiskeolje
Modenluk	Relateres til en balansert rund lukt av modnet fisk
Harsklukt	Relateres til lukt av oksiderte fettstoff (gress, høy, stearin, maling)

Smak

11 ulike smaksegenskaper ble beskrevet i analysen:

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

Tekstur

I tillegg til 2 parametere som omhandlet forekomst og hardhet av fiskeben i prøvene, ble 5 ulike teksturegenskaper beskrevet i analysen:

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

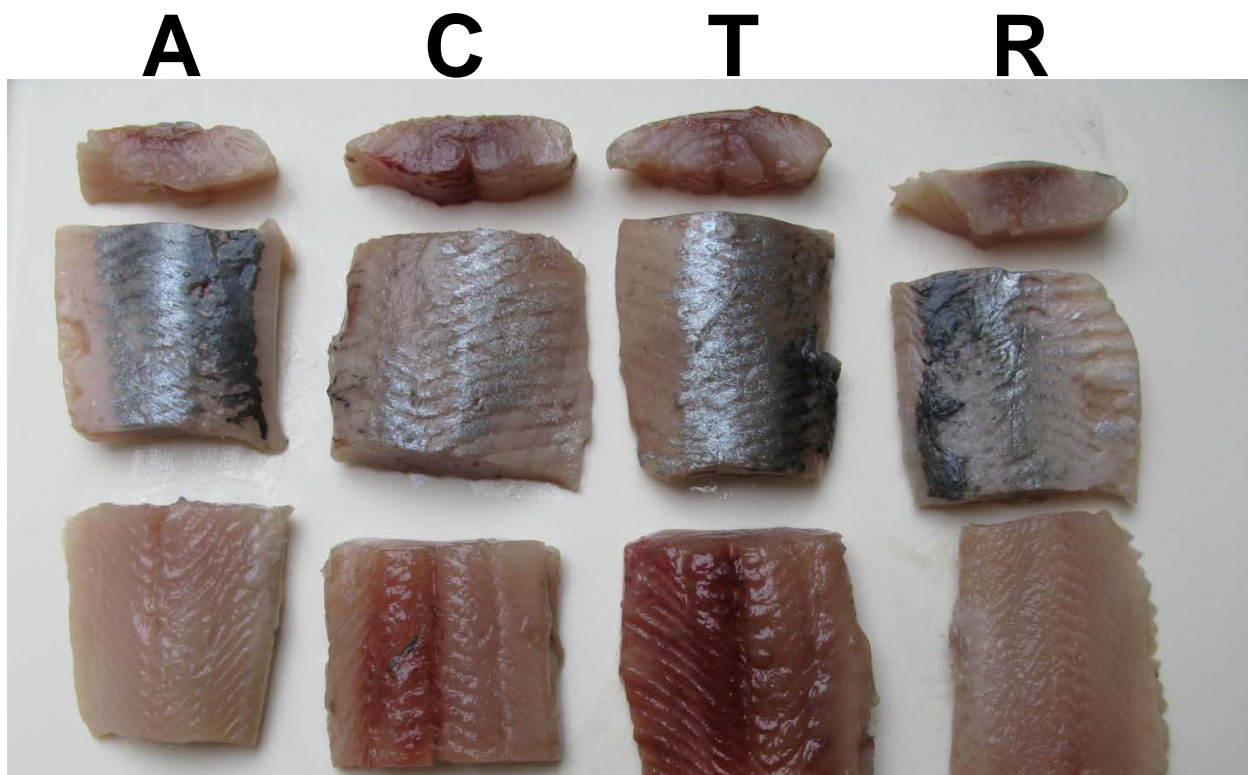
3.2.4 Statistikk

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

Resultatene er oppsummert ved hjelp av middelerverdier og p-verdier. Middelerverdiene er et gjennomsnitt av 9 dommere og 2 gjentak/prøve. Dataprogrammene som ble benyttet var Unscrambler x.10.1 (Camo Software AS, Oslo, Norge) og SAS Version 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

3.3 Resultater

3.3.1 Prøver



Figur 6 *Eksempler på de ulike prøvetypene; A = Filet modnet i kunstig lake, C = sløyd sild modnet uten calanus, T = tradisjonell matjessild, modet ganet, med innvoller og R = Filet modnet med resirkulert lake*

Figur 6 viser et utvalg av prøvene før sensorisk bedømmelse. Det er påfallende å se effekten av tidlig filetering på blodinnholdet i fileten. Prøvene som er modnet som filet (A og R) er de desidert lyseste av prøvene. Blod/nyrevev preger også prøven som er sløyd før modning (C). Mens den tradisjonelt modnede (ganet, med innvoller) er veldig rød på filetsiden (T).

3.3.2 Sensorisk bedømmelse

Detaljerte resultater fra den sensoriske analysen er presentert i tabellene som følger:

Lukt

Tabell 11 Resultater fra bedømmelsen av Lukteegenskaper (Syrlig, Metall, Sjø, Fiskeolje, Moden, Harsk)

Prøve	Syrlig	Metall	Sjø	Fiskeolje	Moden	Harsk
K	4,01 ^{ab}	4,58	3,79 ^b	4,84	4,61 ^a	2,45 ^{ab}
A-6	3,50 ^b	4,41	4,22 ^{ab}	5,04	3,25 ^{bcd}	2,24 ^{ab}
A-14	3,34 ^b	4,31	4,04 ^{ab}	4,22	3,09 ^{cd}	1,88 ^b
C-6	4,66 ^a	4,57	5,17 ^a	4,33	4,48 ^{ab}	1,74 ^b
C-14	4,04 ^{ab}	4,73	4,69 ^{ab}	4,68	3,87 ^{abcd}	2,30 ^{ab}
R-6	3,47 ^b	4,46	4,19 ^{ab}	4,41	2,82 ^d	2,44 ^{ab}
R-14	3,04 ^b	4,27	3,62 ^b	5,16	2,84 ^d	2,94 ^{ab}
T-6	3,51 ^b	4,62	3,89 ^b	5,25	4,34 ^{abc}	3,33 ^a
T-14	4,08 ^{ab}	4,70	4,53 ^{ab}	4,43	4,25 ^{abc}	2,33 ^{ab}
p-verdi	0,0007	0,543	0,0034	0,117	<0,0001	0,0125

Metode	Syrlig	Metall	Sjø	Fiskeolje	Moden	Harsk
A	3,42 ^b	4,36	4,13 ^{ab}	4,63	3,17 ^b	2,06 ^a
C	4,35 ^a	4,65	4,93 ^a	4,51	4,17 ^a	2,02 ^a
R	3,25 ^b	4,36	3,91 ^b	4,79	2,83 ^b	2,69 ^a
T	3,79 ^{ab}	4,66	4,21 ^{ab}	4,84	4,30 ^a	2,83 ^a
p-verdi	0,0024	0,188	0,0136	0,546	0,0002	0,0192

Dato	Syrlig	Metall	Sjø	Fiskeolje	Moden	Harsk
6. juni	3,78	4,51	4,37	4,76	3,72	2,44
14. juni	3,63	4,50	4,22	4,63	3,51	2,36
p-verdi	0,342	0,945	0,287	0,676	0,169	0,694

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

Smak

Tabell 12 Resultater fra bedømmelsen av syrligsmak og de grunnsmaker som ble brukt (Søt, Salt, Bitter og Umami)

Prøve	Syrlig	Søt	Salt	Bitter	Umami
K	4,48 ^{ab}	3,57 ^{ab}	4,46 ^{cd}	4,02	4,23 ^{abc}
A-6	3,78 ^{abc}	3,52 ^{ab}	5,43 ^{ab}	4,51	3,51 ^{bcd}
A-14	4,14 ^{abc}	3,18 ^{abc}	5,39 ^{ab}	4,09	3,38 ^{cd}
C-6	4,92 ^a	3,49 ^{ab}	4,88 ^{bcd}	3,78	4,82 ^a
C-14	4,37 ^{abc}	3,38 ^{abc}	5,24 ^{abc}	4,35	4,07 ^{abc}
R-6	3,65 ^{bc}	3,03 ^{bc}	5,19 ^{abc}	4,32	3,38 ^{cd}
R-14	3,13 ^c	2,81 ^c	5,90 ^a	4,36	2,89 ^d
T-6	3,82 ^{abc}	3,74 ^a	4,58 ^{bcd}	4,45	4,31 ^{abc}
T-14	4,56 ^{ab}	3,43 ^{ab}	4,14 ^d	4,01	4,47 ^{ab}
p-verdi	0,0008	0,0001	<0,0001	0,071	<0,0001

Metode	Syrlig	Søt	Salt	Bitter	Umami
A	3,96 ^{ab}	3,35 ^a	5,41 ^a	4,30	3,44 ^b
C	4,65 ^a	3,44 ^a	5,06 ^a	4,06	4,45 ^a
R	3,39 ^b	2,92 ^b	5,55 ^a	4,34	3,13 ^b
T	4,19 ^{ab}	3,59 ^a	4,36 ^b	4,23	4,39 ^a
p-verdi	0,0068	0,0017	<0,0001	0,542	<0,0001

Dato	Syrlig	Søt	Salt	Bitter	Umami
6. juni	4,04	3,45	5,02	4,26	4,01
14. juni	4,05	3,20	5,17	4,20	3,70
p-verdi	0,9764	0,0076	0,2272	0,607	0,0329

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

Tabell 13 Resultater fra bedømmelsen av de produktspesifikke smakene (Metall, Sjø, Fiskeolje, Emmen, Moden og Harsk)

Prøve	Metall	Sjø	Fiskeolje	Emmen	Moden	Harsk
K	3,98	3,79 ^{ab}	4,54	2,48	5,62 ^a	2,40 ^{ab}
A-6	4,18	4,37 ^{ab}	4,88	2,09	3,71 ^{cde}	1,89 ^{ab}
A-14	4,09	3,93 ^{ab}	4,33	2,33	3,42 ^{de}	1,77 ^b
C-6	3,98	4,77 ^a	4,33	1,63	5,58 ^{ab}	1,81 ^b
C-14	4,28	4,42 ^{ab}	4,72	2,17	4,14 ^{bcd}	1,99 ^{ab}
R-6	4,26	4,08 ^{ab}	4,31	2,39	3,47 ^{de}	2,31 ^{ab}
R-14	4,43	3,42 ^b	5,02	3,07	2,61 ^e	2,91 ^{ab}
T-6	4,16	3,72 ^{ab}	4,84	2,76	5,17 ^{abc}	3,21 ^a
T-14	4,01	4,27 ^{ab}	4,56	2,73	5,17 ^{abc}	2,28 ^{ab}
p-verdi	0,619	0,0158	0,361	0,089	<0,0001	0,0096

Metode	Metall	Sjø	Fiskeolje	Emmen	Moden	Harsk
A	4,14	4,15	4,61	2,21	3,56 ^b	1,83 ^b
C	4,13	4,59	4,53	1,90	4,86 ^a	1,90 ^b
R	4,34	3,75	4,66	2,73	3,04 ^b	2,61 ^{ab}
T	4,08	3,99	4,70	2,74	5,17 ^a	2,74 ^a
p-verdi	0,542	0,0533	0,907	0,105	<0,0001	0,0049

Dato	Metall	Sjø	Fiskeolje	Emmen	Moden	Harsk
6. juni	4,14	4,23	4,59	2,22	4,48	2,30
14. juni	4,20	4,01	4,66	2,58	3,84	2,24
p-verdi	0,578	0,0965	0,711	0,099	0,0398	0,7802

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

Tekstur

Tabell 14 Resultater fra bedømmelsen av teksturegenskapene (Hardhet, Mørhet, Fethet, Saftighet, Antall ben, Hardhet ben)

Prøve	Hardhet	Mørhet	Fethet	Saftighet	Antall ben	Hardhet ben
K	4,14 ^a	6,54 ^b	5,88 ^b	5,73 ^{ab}	3,29	3,21 ^{abc}
A-6	3,24 ^{ab}	7,17 ^{ab}	6,94 ^a	6,37 ^a	3,98	3,93 ^{ab}
A-14	3,61 ^{ab}	6,67 ^{ab}	6,53 ^{ab}	6,19 ^{ab}	3,79	4,01 ^a
C-6	3,14 ^b	7,27 ^{ab}	5,92 ^b	5,76 ^{ab}	2,75	2,68 ^c
C-14	3,73 ^{ab}	6,59 ^b	5,86 ^b	5,55 ^b	3,22	3,29 ^{abc}
R-6	3,54 ^{ab}	6,53 ^b	5,92 ^b	5,56 ^b	3,38	3,25 ^{abc}
R-14	3,62 ^{ab}	6,51 ^b	5,96 ^b	6,01 ^{ab}	3,23	3,52 ^{abc}
T-6	2,87 ^b	7,41 ^a	5,87 ^b	5,94 ^{ab}	2,98	2,83 ^{bc}
T-14	3,71 ^{ab}	7,11 ^{ab}	6,04 ^b	5,62 ^b	3,00	2,93 ^{abc}
p-verdi	0,0023	0,0004	<0,0001	0,0027	0,0558	0,0022

Metode	Hardhet	Mørhet	Fethet	Saftighet	Antall ben	Hardhet ben
A	3,43	6,92 ^{ab}	6,74 ^a	6,28 ^a	3,89 ^a	3,97 ^a
C	3,44	6,93 ^{ab}	5,89 ^b	5,65 ^b	2,98 ^a	2,98 ^b
R	3,58	6,52 ^b	5,94 ^b	5,78 ^b	3,30 ^a	3,38 ^{ab}
T	3,29	7,26 ^a	5,95 ^b	5,78 ^b	2,99 ^a	2,88 ^b
p-verdi	0,6804	0,0197	0,0004	0,0066	0,0423	0,0056

Dato	Hardhet	Mørhet	Fethet	Saftighet	Antall ben	Hardhet ben
6. juni	3,20	7,10	6,16	5,91	3,27	3,17
14. juni	3,67	6,72	6,10	5,84	3,31	3,44
p-verdi	0,0004	0,0003	0,5070	0,1173	0,7317	0,0647

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

Oppsummering

Filetene modnet i kunstig lake (A-6 og A-14) hadde høyest intensitet for fethet, saftighet og hardhet ben og lavest intensitet for harsk smak.

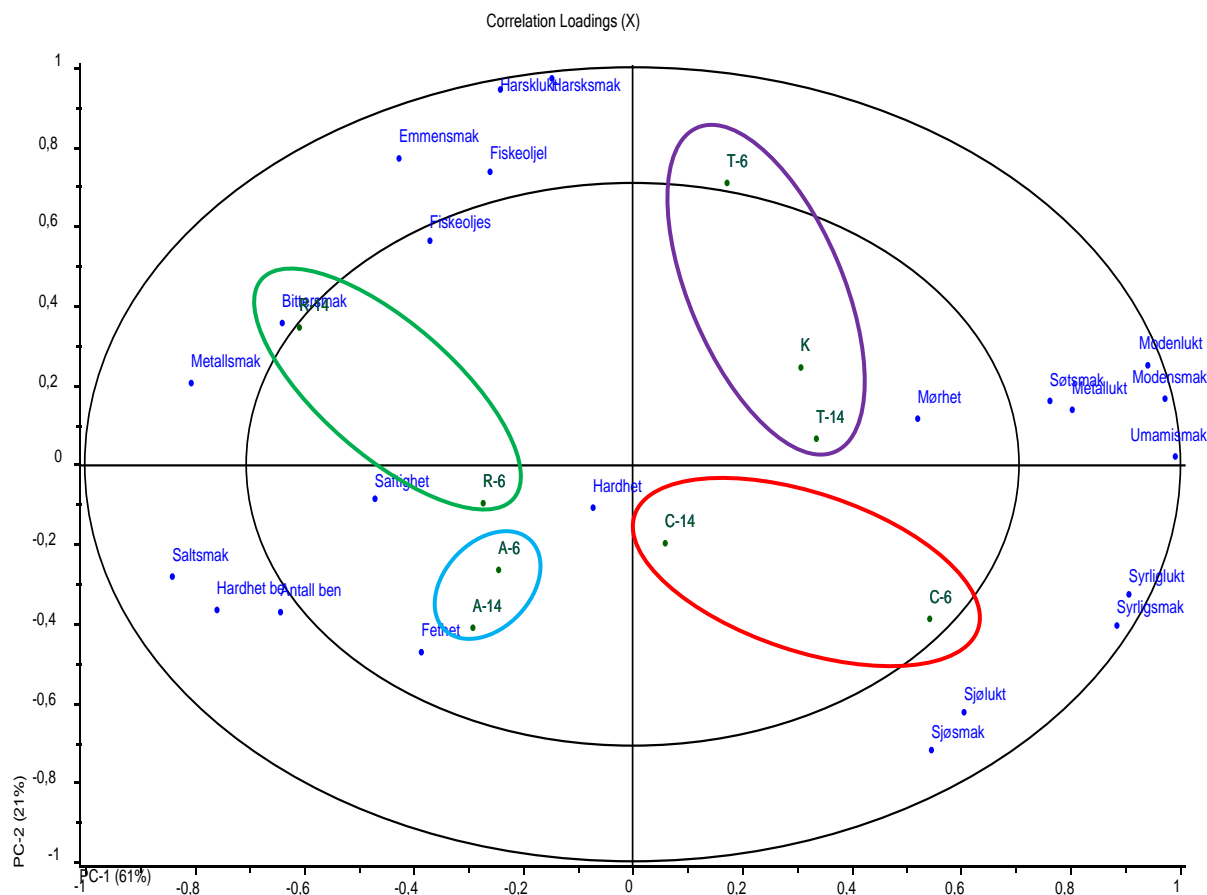
Den sløyde silden modnet uten innvoller (calanus) (C-6 og C-14), hadde høyest intensitet for syrlig lukt, sjølukt, syrlig smak og umamismak, og lavest intensitet for fethet og saftighet.

Filetene modnet i resirkulert lake (R-6 og R-14) hadde høyest intensitet for saltsmak, og lavest intensitet for syrlig lukt, sjølukt, moden lukt, syrlig smak, søtsmak, umamismak, modensmak og mørhet.

Ganet sild, modnet på matjes vis, med innvoller (T-6 og T-14) hadde høyest intensitet for moden lukt, søtsmak, moden smak, harsk smak og mørhet og lavest intensitet for saltsmak og hardhet ben.

3.3.3 Prinsipal komponent analyse (PCA)

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



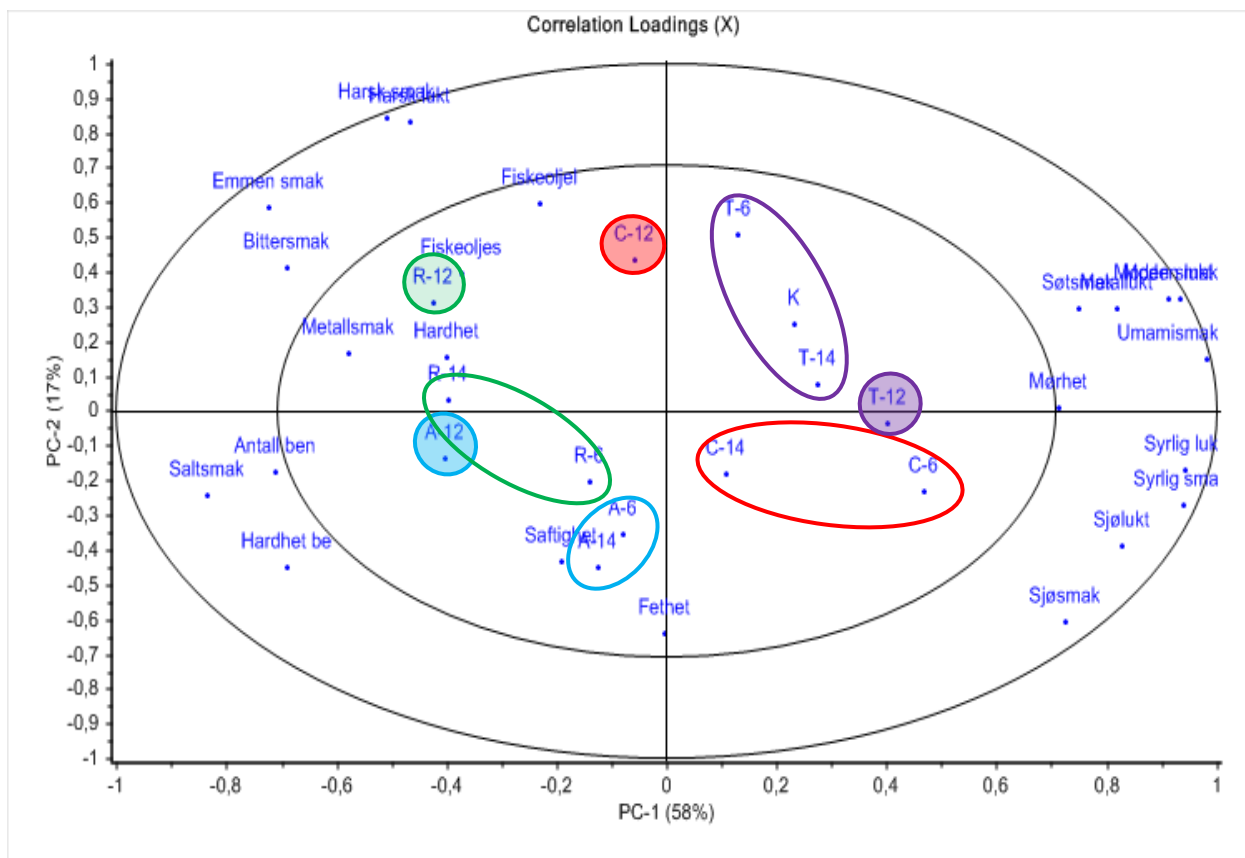
Figur 7 PCA-plot over prøver (6. og 14. juni), relatert til sensoriske egenskaper

Resultatene av prinsipalkomponent analysen og data fra 6. og 14. juni (Figur 7) viser at 61 % av variasjonen forklares langs PC1 som viser de viktigste forskjellene og 21 % av variasjonen forklares langs PC2 som viser de nest viktigste forskjellene. (Vær oppmerksom på at skalaer ikke bør tolkes direkte. Figuren illustrerer kun forholdet mellom prøver og egenskaper.)

Prøvene framstilt ved hjelp av kunstig lake (A-6 og A-14) kan beskrives med egenskapen fethet. Prøver som er modnet uten calanus (sløyd) (C-6 og C-14) kan beskrives med egenskapene syrlig lukt og smak, sjøluk, og smak.

Filetene som er modnet i resirkulert lake (R-6 og R-14) kan beskrives med egenskapen bitter smak og metallsmak.

Tradisjonell matjessild, modnet ganet, med innvoller (T-6 og T-14) plasserer seg like i nærheten av det kommersielle produktet, K.



Figur 8 PCA-plot over prøver (6., 12. og 14. juni), relatert til sensoriske egenskaper

Resultatene fra den sensoriske analysen av prøver produsert av råstoff som ikke var av matjeskvalitet er inkludert i data-analysen, og indikert i Figur 8. Som det framgår av figuren, faller disse utenfor den grupperingen som utgjøres av de to andre produksjonsdatoene.

Prøvene framstilt ved hjelp av modning i kunstig lake (A-12) kan beskrives med egenskapen hardhet og antall ben. Prøvene som er modnet uten calanus (sløyd) (C-12) kan beskrives med egenskapene fiskeoljelukt og fiskeoljesmak.

Filetene som er modnet i resirkulert lake (R-12) kan beskrives med egenskapene hardhet og fiskeoljesmak. Tradisjonell matjessild, modnet ganet, med innvoller (T-12) plasserer seg like i nærheten av det kommersielle produktet, K, og kan karakteriseres med egenskapen mørhet.

3.4 Diskusjon

Figur 7 viser at den sensoriske analysen skiller klart mellom de ulike forsøksvariantene. Forsøksvariantene som er produsert av matjesråstoff, ganet, med innvoller, plasserer seg i nærheten av det kommersielle produktet. Dette styrker resultatene ved at produksjonsskala (1:20) og forsøksbetingelser ikke synes å gi opphav til avvik i produktegenskapene.

Prøvene som er produsert av sløyd fisk (uten calanus) har flere av matjessildens egenskaper, spesielt med hensyn til tekstur, men oppleves å ha mindre moden smak, men mer sjø-lukt og sjø-smak. Dette kan ha sammenheng med at innvollsenzymene bidrar til smaksendringene.

Prøvene som er produsert av butterfly-filet med enzymer tilsatt i laken, oppleves fetere og saftigere enn de andre prøvene. Dette kan ha sammenheng med at enzymenes nedbrytning av vevet kan medføre endringer som kan påvirke oppfatningen av konsistensegenskaper som fethet.

Prøvene som er modnet med resirkulert lake beskrives som saftigere og bitrere enn resten. Saftigheten kan ha sammenheng med vannopptak. Det ble brukt lavere saltinnhold i laken til fileter. Kombinert med betydelig større kontaktoverflate mot laken, kan dette medføre høyere opptak av vann – og salt, sammenlignet med ikke-filetert råstoff.

Fileter ble oppfattet å ha flere og hardere ben enn variantene som var produsert av ikke filetert råstoff, mest sannsynlig fordi ryggbeinet «rives» løs fra fileten ved tilberedning av matjessild fra ikke filetert sild. I denne prosessen følger også mange (de fleste?) småbein med.

Som det framgår av Figur 8, faller prøvene produsert den 12. juni fra råstoff som ikke var av matjes-kvalitet, utenfor den grupperingen som utgjøres av de to andre produksjonsdatoene. Det gjelder spesielt for prøven som er framstilt med kunstig lake (A-12), og prøvene som er framstilt uten innvoller (calanus) (C-12).

Prøven som er modnet med innvoller (T-12) ligger ikke så langt fra de to andre. Dette kan ha sammenheng med at innvollsenzymer kan ha bidratt til modning, selv om man ikke kunne påvise raudåte i tarmen. Dette kan ha sammenheng med at råstoffet har vært lagret lengre, og ved høyere temperatur før prosessering, slik at den samlede tiden for eksponering til innvollsenzymer ble lengre enn for de andre variantene.

Den sløyde varianten (C-12) skiller seg betydelig fra de to andre produksjonsdatoene, og karakteriseres av fiskeoljesmak og harsksmak.

3.5 Konklusjon

Den sensoriske analysen skiller klart mellom de ulike forsøksvariantene. Forsøksvariantene som er produsert av matjes-råstoff, ganet, med innvoller, plasserer seg i nærheten av det kommersielle produktet.

Prøvene som er produsert av sløyd fisk (uten calanus) har flere av matjessildens egenskaper, spesielt med hensyn til tekstur, men oppleves å ha mindre moden smak, men med sjø-lukt og sjø-smak.

Prøvene som er produsert av butterfly-filet med enzymer tilsatt i laken, oppleves fetere og enn de andre prøvene.

Mens prøvene som er modnet med resirkulert lake beskrives som saftigere og bitrere enn resten.

Fileter ble oppfattet å ha flere og hardere bein enn variantene som var produsert av ikke filetert råstoff. Filetene smakte dessuten saltere.

Med unntak av prøvene som ble modnet, ganet med innvoller, skilte prøvene av råstoff som ikke var av matjes-kvalitet, seg betydelig fra de to andre variantene.

4 Enzymer

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

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

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

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

4.1 Mål

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

De første var relatert til den laken som er "til overs" etter at matjes-modningen er ferdig etter 24 timer. Kan det påvises relevant enzymaktivitet i denne laken?

Dersom denne laken skal kunne brukes til andre typer råstoff (resirkulert), må den kunne (fryses) lagres. Derfor var det interessant å avklare om eventuelt enzymatisk aktivitet endres ved fryselagring av lake? Videre var det et element som måtte avklares med modningsforsøk: Er det mulig å gjenbruke laken til produksjon av matjesfilet av nordsjøsild/NVG-sild?

4.2 Materiale og metoder

Vi har valgt å utføre enzymmålinger som forteller noe om aktiviteten i forhold til nedbrytning av muskel og bindevevsproteiner i råstoffer og laker som er benyttet ved framstilling av matjessild. For å påvise aktivitet som kan bryte ned henholdsvis bindevev og myofibrillproteiner, har vi brukt gelatin fra torskeskinn og myofibrillproteiner fra torskemuskel. Her er det verdt å merke seg at mens myofibrillproteinet langt på vei vil være nativt (udenaturert), er gelatinet en denaturert form av det native kollagenet som finnes i frisk muskelstruktur. Dermed kan vi ikke ukritisk hevde at en høy aktivitet målt mot gelatin nødvendigvis trenger å bety en høy aktivitet mot intakte

bindevevsstrukturer i muskelen. I en studie med begrenset omfang, slik som denne, vil det likevel være nyttig å se på gelatinnedbrytning, fordi den i alle fall er en god indikasjon på aktiviteter som kan bryte ned fiskens bindevev.

4.2.1 Prøveopparbeidelse

Prøvene ble lagret ved -25°C. De ble tint ved ca 3°C i cirka 24 timer. Homogeniseringen ble foretatt med kjøttkvern. Fra homogenisatet ble 100 g prøve suspendert i 400 ml destillert vann ved cirka 10°C og rørt en time før sentrifugering (40 min, 7000xg, cirka 4°C). Supernatantprøver ble fryselagret ved -25°C inntil enzymmålinger ble utført.

4.2.2 Substrat

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

Bindevev (Gelatin)

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

4.2.3 Myofibrillprotein

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

4.2.4 Måling av enzymaktivitet

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

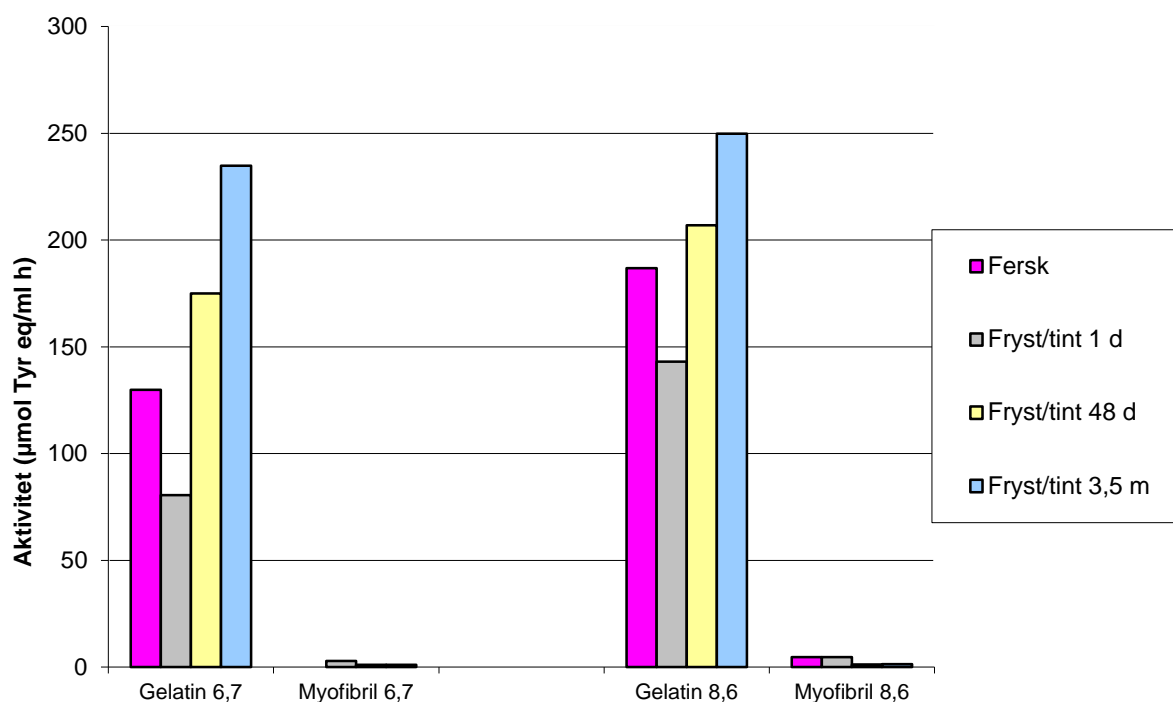
Aktiviteter ved nøytral pH ble målt i fortynninger av lake og i oppmalt sild eller sildefilet. Sild/filet ble malt i kjøttkvern ($\Phi = 4 \text{ mm}$). Hundre g fiskemasse ble tilsatt 400 ml kaldt vann og satt til røring en time ved 10°C før sentrifugering (40 min, 7000 x g). Supernatantprøver ble fryselagret ved -25°C inntil enzymmålinger ble utført.

4.3 Resultater

4.3.1 Ferske og fryselagrede lakeprøver

Ettersom man ville ha grunnlag for å kunne vurdere muligheten for å kunne fryse inn resirkulert lake, var det en klar målsetting i prosjektet å avdekke hvorvidt enzymaktiviteten ville reduseres ved innfrysing, og under fryselagring. Det ble derfor gjort et enkelt forsøk med fersk lake, flysendt fra Stavanger.

Proteaseaktiviteter i ferske og fryselagrede lakeprøver er vist i Figur 9.



Figur 9 Proteaseaktiviteter i laker fra matjessild før frysing og etter opptining etter forskjellige lagringstider ved -25°C. Tallverdi 6,7 og 8,6 er relatert til laker fra sildestørrelser henholdsvis 6,7 og 8,6 fisk/kg.

Figuren viser at aktiviteter målt mot gelatin er mye høyere enn aktiviteter målt mot myofibrillproteiner. Den viktigste årsaken til dette er at gelatin er en denaturert form av bindevevsprotein kollagen og derfor lettere nedbrytbart enn den native formen; kollagen, mens myofibrillprotein er et ikke denaturert strukturprotein som er mindre utsatt for enzymnedbrytning. Dessuten er myofibrillprotein bare delvis oppløst og dermed også mindre tilgjengelig for enzymatisk nedbrytning. I dette forsøket er det derfor mest interessant å se på gelatinnedbrytning som gir tydelige utslag. Det ble målt høyest aktivitet i laken fra den minste silda. Dette kan være tilfeldig, men kan også bety at lekkasjen av fordøyelsesenzym er større fra små enn fra store sild. Selv om muskel inneholder et stort antall lysosomale proteaser, er proteasekonsentrasjoner i fordøyelseskanalen normalt mye større (Gildberg, 1988). Det er som forventet en tydelig nedgang i aktivitet etter frysing og tining som trolig skyldes en viss denaturering av enzym. Mer overraskende var det å registrere økende aktivitet som funksjon av fryselagringstid. Det er vanskelig å si sikkert hva

som er årsaken til dette, men en mulig forklaring er at fryselagringen kan ha forårsaket aktivering av inaktive proenzymer. En annen mulig forklaring er at enzymhemmere (inhibitorer) som finnes naturlig i blod og muskel (Hjelmeland, 1983) blir inaktivert under fryselagringen.

4.3.2 Screening av aktivitet i sild og i laker

Det ble målt proteaseaktivitet i en rekke forskjellige silde- og filetprøver. Resultatene fra disse målingene er vist i Tabell 15.

Tabell 15 Proteaseaktivitet målt i matjessild Råstoff og Produkt, produsert den 14. juni 2012. Gelatin og myofibrillprotein er brukt som enzymsubstrater. Aktivitetene er målt ved nøytral pH og 25°C. Aktiviteter er angitt som $\mu\text{mol Tyr eq./g hr}$ i sild/filet og som $\mu\text{mol Tyr eq./ml hr}$ i laker. Tabellen angir også forholdstallet mellom de to aktivitetene (Gel-Akt./Myo-Akt.). Forholdstall er ikke beregnet ved Myo-Akt.<1 fordi disse aktivitetene er usikre.

Prøvetype	Enzymsubstrat		Forholdstall
Kode	Gelatin	Myofibrill	Gel-Akt./Myo-Akt.
Tradisjonell (ganet)			
Råstoff (TR)	402	0	-
Produkt (TP)	887	1,40	633
-Calanus (sløyd)			
Råstoff (CR)	402	0	-
Produkt (CP)	189	0,11	-
Kunstig			
Råstoff (AR)	533	0	-
Produkt (AP)	240	0	-
Resirkulert			
Råstoff (RR)	533	0	-
Produkt (RP)	402	0,26	-

Tabell 15 viser at det er moderate proteaseaktiviteter i sild/filet-prøvene. Prøvene av råstoff (RR og TR) ligger omtrent på samme nivå. Prøve TP har litt høy aktivitet mot gelatin og også målbar aktivitet mot myofibrillprotein. Dette var en prøve av tradisjonelt modnet matjessild, og resultatet er som forventet, fordi den oppmalte prøven trolig vil inneholde en god del tarmproteaser som er aktive ved nøytral pH (særlig trypsin og chymotrypsin).

Ellers viser analysene at enzymaktiviteten (gelatin) i sild, modnet, sløyd sild (CP) og filet modnet i kunstig lake (AP) faktisk er litt lavere enn i råstoffet.

Det ble også målt proteaseaktivitet i de ulike lakene. Resultatene fra disse målingene er gitt i Tabell 16.

Tabell 16 Proteaseaktiviteter målt i laker fra matjessild med gelatin og myofibrillprotein som enzymsubstrater. Aktivitetene er målt ved nøytral pH og 25°C. Aktiviteter er angitt som $\mu\text{mol Tyr eq./g hr}$ i sild/filet og som $\mu\text{mol Tyr eq./ml hr}$ i laker. Tabellen angir også forholdstallet mellom de to aktivitetene (Gel-Akt./Myo-Akt). Forholdstall er ikke beregnet ved Myo-Akt. <1 fordi disse aktivitetene er usikre.

Prøvetype	Enzymsubstrat		Forholdstall
Kode	Gelatin	Myofibrill	Gel-Akt./Myo-Akt.
Tradisjonell (ganet) - Produkt			
0606-TP	1150	3,4	339
0612-TP	272	2,0	137
0614-TP	312	1,7	189
-Calanus (sløyd) - Produkt			
0606-CP	1910	2,0	960
0612-CP	558	1,7	332
0614-CP	448	0,55	-
Kunstig - Råstoff			
0614-AR	2610	55	47
Kunstig - Produkt			
0606-AP	2610	35	75
0612-AP	435	0,67	-
0614-AP	2300	37	62
Resirkulert - Råstoff			
0612-RR	237	0,90	-
0614-RR	285	0,36	-
Resirkulert - Produkt			
0606-RP	781	1,7	471
0612-RP	90	0,19	-
0614-RP	201	0,52	-

Som resultatene i Tabell 16 viser, er det stor forskjeller mellom lakene. Fire laker skiller seg ut med høye aktiviteter mot gelatin. Det er 0606-AP, 0614-AR, 0614-AP og 0606-CP. Lakene 0606-TP og 0606-RP har middels aktivitet, mens de andre lakene har moderat aktivitet bortsett fra 20120612-RP som har lav aktivitet. Når det gjelder laker med høy aktivitet mot myofibrillprotein, er det tre laker som skiller seg klart ut. Det er 0614-AR, 0614-AP og 0606-AP. Dette er også de tre lakene som har høyest aktivitet mot gelatin.

4.3.3 Målinger av proteaseaktivitet i enkeltindivider – Hel fisk

Det var av interesse å danne seg et bilde av variasjonen i prøvematerialet. Analysene som var gjennomført under screeningen, ble foretatt på ekstrakter av oppmalt fisk (filet, sløyd eller ganet). Derfor ble samme opparbeidingsprosedyre brukt også for disse analysene.

Ettersom proteinsammensetningen i muskel ble undersøkt ved hjelp av 2-D gelelektroforese (egen rapport), var det interessant å måle enzymaktiviteten i de samme prøvene som var analysert på 2-D gel, for å se om man kunne korrelere aktivitet, med noen av de endringene som ble observert på gelene.

Fryst sild ble mottatt fra DTU 15.01.2013. Enzymmålinger ble utført som tidligere beskrevet. Resultatene av målingene er vist i Tabell 17.

Tabell 17 Enzymaktiviteter i matjesråstoff (sløyd fisk), og matjes-produkt (ganet fisk) angitt som $\mu\text{mol Tyr ekv./g time}$

Råstoff						
TR	3136	3138	3141	3143	3145	Snitt \pm SD
Gelatin	279	437	545	142	260	333 \pm 158
Myofibrill	0,09	0,38	0	0	0	0,09 \pm 0,16
Produkt						
TP	3121	3122	3123	3124	3125	
Gelatin	769	1330	500	1180	511	858 \pm 382
Myofibrill	3,46	1,96	4,13	2,15	0,48	2,44 \pm 1,42

Prøver av råstoff (TR) hadde lavere aktiviteter enn prøver av produkt (TP). Råstoff (TR) hadde liten eller ingen målbar aktivitet mot myofibrillprotein og i gjennomsnitt ca 60 % lavere aktivitet mot gelatin enn produkter (TP). Det ble registrert forholdsvis store standardavvik mellom individer i gruppene.

Det så ikke ut til å være sammenfall av aktivitetsnivå mot gelatin og myofibrillprotein i en og samme prøve. Dette tyder på at det kan være forskjellige enzymer som er aktive mot de to forskjellige substratene.

4.3.4 Målinger av proteaseaktivitet i enkeltindivider – Skinnfri filet

Analysene som var gjennomført under screeningen, ble foretatt på ekstrakter av oppmalt fisk (filet, sløyd eller ganet). Mens det kun var muskelvev som ble analysert på 2-D gel. Derfor ble prøvene skinnnet og filetert, slik at man kunne måle enzymaktivitet i muskel.

Ettersom proteinsammensetningen i muskel ble undersøkt ved hjelp av 2-D gelelektroforese (egen rapport), var det interessant å måle enzymaktiviteten i de samme prøvene som var analysert på 2-D gel, for å se om man kunne korrelere aktivitet, med noen av de endingene som ble observert på gelene.

Fryst sild ble mottatt fra DTU 15.02.2013. Prøvene ble delvis tint og filetert, og etterpå ble filetene kvernet og ekstrahert som beskrevet tidligere. Enzymmålinger ble utført som tidligere beskrevet.

Resultatene av målingene er vist i Tabell 18.

Tabell 18 Enzymaktiviteter i matjesråstoff (sløyd fisk) filet, og matjes produkt (ganet fisk) filet - angitt som $\mu\text{mol Tyr ekv./g time}$

Råstoff						
TR	3137	3139	3140	3142	3144	Snitt \pm SD
Gelatin	160	295	10,3	0	197,9	133 \pm 126
Myofibrill	0,11	0	0,13	0	0	0.05 \pm 0.07
Produkt						
TP	3116	3117	3118	3119	3120	
Gelatin	447	152	602	223	69	299 \pm 220
Myofibrill	0	0,82	0	0	0	0,16 \pm 0,37

Det ble, som forventet, målt lavere aktiviteter i ekstrakter av filet enn tidligere (4.3.3) målt i ekstrakter av hel sild. Ved måling mot myofibrillprotein var alle verdiene, kanskje med unntak av 3117, tilnærmet 0. Også måling mot gelatin viste lavere aktiviteter. Aktiviteter i filetprøvene var i gjennomsnitt omkring 60 % lavere enn i hel sild (4.3.3).

Målt mot gelatin var det, som sist, i gjennomsnitt cirka 60 % lavere aktivitet i råstoff enn i produkt. Det var dessuten store individuelle variasjoner innen hver serie.

4.4 Diskusjon

Ved første øyekast er det nærliggende å anta at det er de samme enzymene som bryter ned både gelatin og myofibrillprotein. Til en viss grad er nok dette riktig, men dersom vi ser på det relative forhold mellom de to aktiviteter i hver enkelt prøve, går det fram at det er store forskjeller. Som forklart tidligere, er det ikke særlig meningsfylt å sammenligne tallverdier mellom de to aktivitetene i hver enkelt prøve. Forholdstallene vil derimot fortelle mye om potensialet for nedbrytning av henholdsvis bindevevsprotein og myofibrillprotein i hver enkelt prøve.

Det går klart fram av disse tallene at noen laker, og særlig 0606-CP, har et stort potensiale for nedbrytning av gelatin, men bare moderat evne til å bryte ned myofibrillprotein. Det samme kan til en viss grad sies om lakene 0606-RP, 0606-TP og 0612-CP, mens de tre lakene med aller høyest aktivitet mot gelatin; 0614-AR, 0606-AP og 0614-AP også har størst potensiale for nedbrytning av myofibrillprotein.

De store forskjellene mellom forholdstallene viser dermed tydelig at prøvene inneholder forskjellige proteaser med forskjellig evne til å bryte ned de to substratene, og at mengdeforholdet mellom disse proteasene er svært forskjellig i mange av prøvene.

Det er grunn til å tro at de relative forskjellene ville bli langt mindre dersom laker basert på rene muskelprøver og rene innvollsfraksjoner ble sammenlignet hver for seg. Men ettersom lakene er framstilt fra råstoffer basert på blandinger av muskel og innvollsfraksjoner, vil det være naturlig at slike forskjeller oppstår. Både innvollsmengden og fødesituasjon til silda som er brukt vil være avgjørende for innhold av forskjellige proteaser.

Det må understrekes at de fleste aktiviteter, også mot gelatin, er lave og dermed noe usikre. Til sammenligning kan det nevnes at det ved målinger i enkelte prøver av "kunstig lake" (oktober 2012) ble målt aktiviteter opp til 3500 og 43 mot henholdsvis gelatin og myofibrillprotein.

4.5 Konklusjon

Trolig vil en av målsettingene med modning være å oppnå et mykt produkt uten for stort tap av muskelmasse. For å oppnå dette vil det være ønskelig at laken inneholder mye enzymaktivitet som kan bryte ned bindevev og tilsvarende liten aktivitet som angriper myofibrillprotein. I dette tilfellet vil det bety at de lakene som har høye relative verdier (Gel-Akt./Myo-Akt) er de mest gunstige. Dermed framstår lake 0606-CPE som den klart beste etterfulgt av 0606-RPE og 0606-TPE.

Ettersom lave proteaseaktiviteter er vanskelig å måle nøyaktig ved hjelp av myofibrillsubstrat, kan det være et alternativ å se nærmere på autolyse av muskelprotein under modningsprosessen ved senere forsøk.

5 Proteomanalyse

5.1 Mål

Med udgangspunkt i projektets problemstillinger søgte vi også svar på yderligere spørgsmål, med henblik på at kunne optimere en lage. En optimeret lage definerer vi som en lage, hvor den biomolekylære sammensætning (herunder enzymerne) er således sammensat, at produktet efter modning kommer til at ligne den traditionelle matjessild. For at opnå det, er det nødvendigt at kende de processer som er vigtige for matjes-modningen.

Et væsentligt spørgsmål er derfor: Hvilke proteinforandringer sker der i fileten under modningsprocessen?

5.2 Materiale og metoder

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

5.2.1 Proteomanalyse

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

5.3 Prøvemateriale og prøve oparbejdelse

Vacuumpakket frosne sild blev modtaget fra Nofima, Stavanger den 8 august 2012 . Der indgik 4 koder: råstof (R), traditionel matjes-produkt (TP), kunstig produkt (AP) og –calanus produkt (CP). Sildene blev opbevaret ved -80°C indtil analyse. Efter optøning blev der udtaget muskelstykker lige under rygfinnen og muskelstykkerne blev lagret i prøverør ved -80 °C indtil analyse.

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

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

5.3.1 Proteinbestemmelse

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

5.3.2 To-dimensional gelelektroforese (2DE)

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

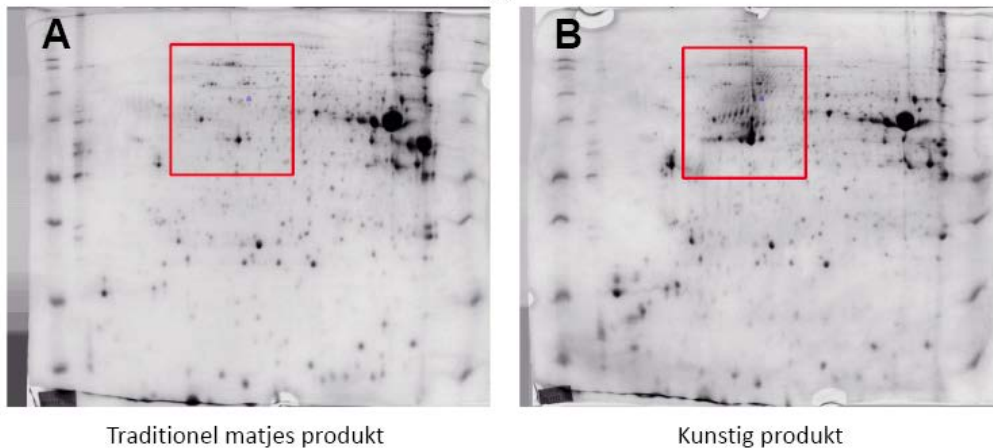
Efter elektroforesen blev proteinerne fixeret og farvet med colloid Coomassie Brilliant Blue (Rabilloud *et al.*, 2000). 2D-gelen blev herefter fotograferet (CCD kamera) og billederne blev analyseret ved hjælp af programmet Progenesis SameSpots (version 4.5, Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK)

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

5.4 Resultater og diskussion

Med henblik på at finde proteinforandringer der sker i sildemusklens under modnings-processen blev proteomanalysen (2D-gelelektroforese) anvendt på 10 fisk af råvaren samt 10 fisk fra hver af modnings-koder, altså i alt 40 fisk. I Figur 10 er der eksempler på 2 færdige 2D-geler, en fra et traditionel matjes-produkt (TP) og en fra et kunstigt produkt (AP). Forskellen i proteinprofilen (fingeraftrykket) mellem disse to sildeprøver er så store at det tydeligt kan ses direkte (f.eks. i den markerede røde firkant). Proteinprofilerne er dog så vanskelige at overskue at det kræver digital billedanalyse at sammenligne mange geler. På den måde kan mængden af det samme protein (den samme plet) i alle gelerne sammenlignes, og databehandlingen kan afsløre om mængden af de enkelte proteiner ændres under modningen i forhold til i råvaren. Derved kan en modningsproces karakteriseres ved en bestemt udvikling i proteinprofilen og modningsprocesserne i de forskellige koder kan således sammenlignes.

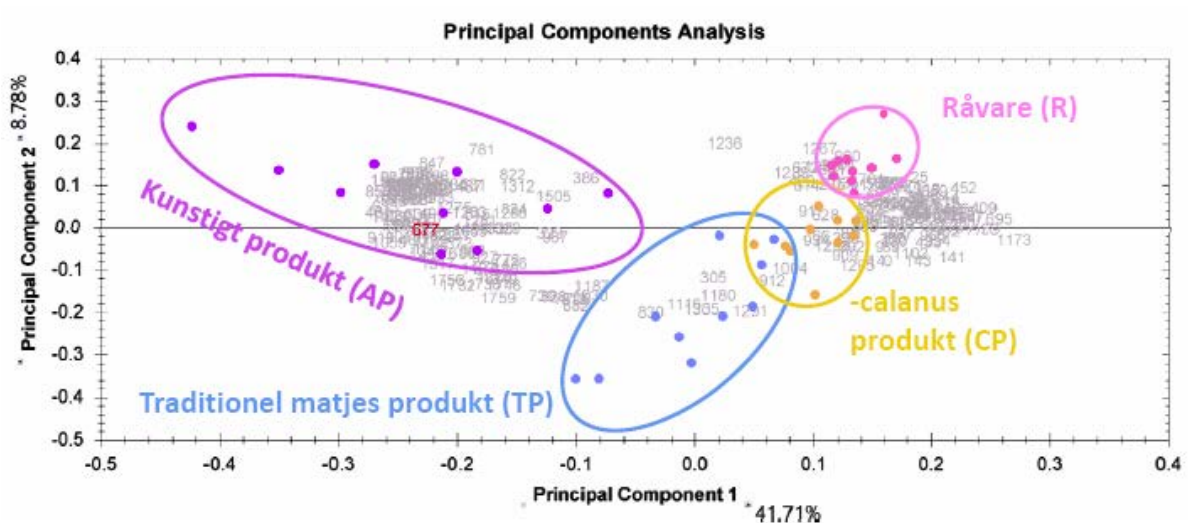
2D-geler



Figur 10 2D-geler af prøve fra henholdsvis traditionel matjes-produkt (A) og kunstig produkt (B). De mest markante forskelle i proteinprofilen mellem sild, som er modnet i den kunstige lage og de traditionelle matjessild ses indenfor den røde ramme.

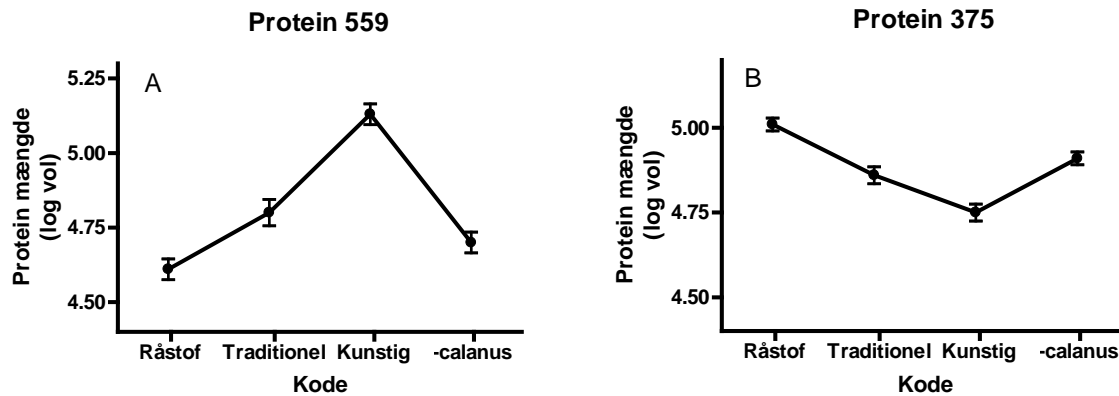
5.4.1 Sammenligning af proteinprofiler

Ved billedanalysen af de 40 2D-geler blev der fundet 660 proteinpletter, som kunne sammenlignes mellem alle gelerne. I figur 2 ses resultatet af en principal komponent analyse (PCA), som viser hvilke prøver der ligner hinanden i forhold til proteinpletter. Det ses tydeligt at prøverne grupperes i relation til de fire koder. Der er størst forskel mellem det kunstige produkt og råvaren, mens den traditionelle matjessild er placeret et sted ind imellem disse. Det kan således se ud til at modningsprocessen er progressiv forstået således at den udvikling der sker fra råvaren til den traditionelle matjessild fortsætter (forstærkes) under modningen med den kunstige lage. Denne antagelse kan styrke ved at se på enkelt proteiner, hvor flere ændres som vist i Figur 12. Her ses at protein nummer 559 er til stede i råvaren i mindst mængde, mens der er 60 % mere af dette protein i den traditionelle matjessild og hele 230 % mere i det kunstige produkt. Dette protein kunne således antages at være et enzymatisk kløvningsprodukt som der bliver mere af afhængig af enzymaktiviteten.



Figur 11 Principal komponent analyser af 2D-gel data. Placeringen i plottet af de enkelte sildeprøver er angivet med massivt farvede symboler, mens de diffuse grå tal angiver 200 proteinpletter som er høj signifikante ($p < 0,01$) i en ANOVA der sammenligner de 4 koder.

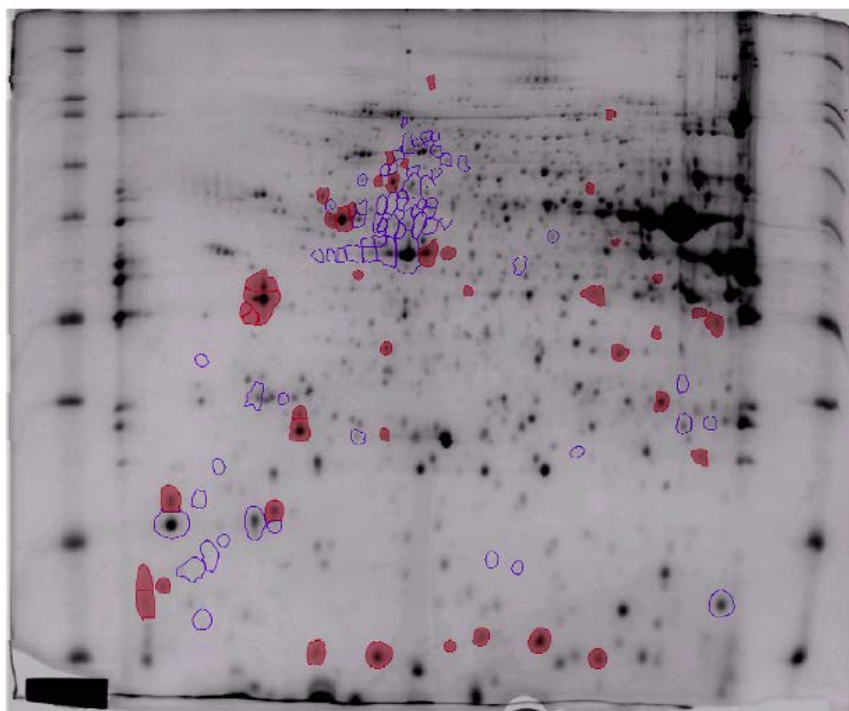
Protein 375 (Figur 12) er et eksempel på et protein der bliver mindre af under modningen og ligesom for protein 559 er effekten størst i det kunstige produkt i forhold til den traditionelle matjessild. Protein 375 kunne således antages at være et af de muskelproteiner som nedbrydes enzymatisk under modningen og igen er effekten størst i det kunstige produkt.



Figur 12 Profil af proteinerne 559 (A) og 375 (B) i de fire koder. Den gennemsnitlige mængde af proteinet i kodens 10 geler er angivet +/- SD. Proteinmængden er angivet som logaritmen til den farveintensitet pletterne har i 2D-gelerne.

Hvad angår -calanus produktet viser PC-analysen at disse sild ligger mellem råvaren og den traditionelle matjessild (Figur 11). Der er altså sket ændringer i proteinprofilen i den rigtige retning af den traditionelle matjessild, hvad også bekræftes ved eksemplerne i Figur 12. Dette indikerer at der også sker proteinændringer i en rensset sild under modningsprocessen som ikke kan relateres til indvoldsenzymer

Med henblik på eventuelt at kunne optimere den kunstige lage så modningsresultatet vil nærme sig den traditionelle matjessild har vi set på de proteiner, der på samme måde som protein 559 øges fra råvare til kunstigt produkt. Det drejer sig om alle de proteiner der er markeret i Figur 13. Af disse proteiner er de med rødt markerede proteiner (Figur 13) som også stiger i mængde i den traditionelle matjessild i forhold til råvaren.



Figur 13 Proteiner i 2D-gel som øges i mængde under modning med kunstig lage (alle markerede proteiner). En delmængde af disse proteiner (rødt markerede) øges også under den traditionelle matjess-modning.

Det kan føre til den hypotese at den kunstige lage fører til at de processer som hænger sammen med fremstillingen af en traditionel matjessild faktisk sker. I den kunstige lage sker dog nogle yderligere processer som resulterer i at mængden af de med blå markerede proteiner (Figur 5.4) øges. Disse proteiner kan være medvirkende til at det kunstige produkt afviger fra det traditionelle med hensyn til sensoriske egenskaber. Ud fra den hypotese vil det være muligt at benytte 2D-gelanalysen som værktøj til at optimere en kunstig lage, således at de processer der resulterer i de uønskede proteiner (blå) minimeres, og slutproduktets proteinprofil kommer til at ligne den traditionelle matjessild's proteinprofil mest muligt.

5.4.2 Relationer til enzymaktiviteter

Proteaseaktiviteterne målt i enkeltindivider af henholdsvis hel fisk og skindfri filet fra råstof og traditionel matjessild (se kapittel om Enzymer), blev søgt korreleret til 2D-proteinprofilerne. Der kunne dog ikke findes sikre korrelationer mellem gelatin-aktiviteten, myofibril-aktiviteten eller ratioen mellem disse (gelatin-akt/myo-akt) og 2D-proteinprofilerne for de traditionelle matjessprodukter. Det skyldes sandsynligvis at der indgik for få fisk i dataanalysen, da proteaseaktiviteterne for hel fisk og skindfri filet ikke kunne indgå i samme analyse. Hvis vi derimod søgte sammenhænge mellem proteaseaktiviteterne fra alle de hele fisk (uafhængigt af om det drejede sig om TR råstof eller produkt) og 2D-proteinprofilerne kunne der findes proteinmønstre som korrelerede til især gelatin-aktiviteten. Dette er dog noget usikkert da der indgår både umodnede og modnede.

Med henblik på kommende forsøg vil det derfor være formålstjenstlig at inkludere sild fra forskellige modninger (for eksempel TP, AP og CP).

5.5 Konklusion

Proteomanalysen udgør et godt værktøj til undersøgelse af hvordan forskellige modninger (lager) og råvarer påvirkes under proceduren. Et væsentligt resultat af denne undersøgelse er at den kunstige lage faktisk har haft en effekt på sildens muskelproteiner som til dels ligner hvad der sker under en traditionel matjessild modning. Den kunstige lage har imidlertid også haft andre effekter som kan have bidraget til afvigende sensoriske egenskaber i forhold til den traditionelle matjessild. Det vil være oplagt at benytte proteomanalysen til en udvikling af lage således at disse

6 Mikrobiologi

Det finnes noe litteratur som beskriver ulike aspekter av matjessild. Mesteparten er gammelt (Karnop, 1982; 1986; Nieper *et al.*, 1995; Priebe, 1980; von Pohl, *et al.*, 1973; Wurziger, 1977), og også litt forvirrende ettersom matjes-betegnelsen brukes både for hollandsk type (som er den som inngår i disse forsøkene), men også for den tyske utgaven, som framstilles i en helt annen prosess – og som oftest ved tilsats av modningssalt.

Lyhs *et al.*, (2007) beskriver mikrobiologiske og sensoriske endringer i matjessild lagret i luft og i modifisert atmosfære. Det er også undersøkt hvilke melkesyrebakterier som forårsaker spoling av matjessild, lagret i luft og i modifisert atmosfære (Lyhs *et al.*, 2008). Men så vidt vi kan se, finnes det ingen tilgjengelig litteratur som beskriver mikrobiologiske forhold knyttet til laken, og de problemstillinger som inngår i dette prosjektet.

6.1 Material og metoder

6.1.1 Stammesamling og DNA panel

Bakterier (Tabell 1) fra stammesamlinger (American Type Culture Collection (ATCC; levert fra Oxoid), Culture Collection University of Göteborg (CCUG), og Norges Veterinærhøgskole (NVH)) ble rekonstituert som foreskrevet i litteraturen. Alle bakterier er lagret i Microbank rør (Pro-lab Diagnostics) ved – 70 °C.

Tabell 19 Stamme/DNA samling

Art	ATCC nr.	CCUG nr.
<i>Lactobacillus casei</i>	393	
<i>Lactobacillus curvatus subsp. curvatus</i>		30669
<i>Lactobacillus plantarum</i>	8014	
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>		32211
<i>Lactococcus piscium</i>		32732
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>		21965
<i>Listeria innocua</i>	33090	
<i>Listeria innocua</i>		35613
<i>Listeria monocytogenes</i>	15313	
<i>Photobacterium phosphoreum</i>		16288
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	
<i>Pseudomonas putida</i>	49128	
<i>Shewanella putrefaciens</i>	8071	
<i>Vibrio cholerae non O1</i>		33379
<i>Vibrio vulnificus</i>	27562	
<i>Vibrio splendidus</i>		20273

Det ble isolert DNA fra alle organismene ved hjelp av FastDNA kit (MP Biomedicals; cat no 6540–400) som foreskrevet av produsent. DNA-konsentrasjon og kvalitet ble målt på NanoDrop spektrofotometer, og ufortynnet samt bruksfortynninger av DNA er lagret ved –70 °C.

6.1.2 Validering og optimalisering av real-time PCR deteksjonssystemer

Validering av real-time PCR deteksjonssystemer (assays) besto av 3 trinn; (i) *in silico* validering (bioinformatisk (spesifisitet, teoretisk inklusivitet og eksklusivitet), primer kompatibilitet, sekundærstrukturanalyse), (ii) Standardkurve karakterisering (priming effektivitet, deteksjonsgrense, smeltepunktsanalyse), og (iii) Wet lab validering (spesifisitet, praktisk inklusivitet og eksklusivitet).

Standardkurve karakterisering

For hvert assay ble PCR-effektiviteten til primerne kalkulert ved å lage en standardkurve generert ved å amplifisere en 10x fortynningsserie av målsekvensen over 5 til 8 punkter. Ved å plotte fortynningsgrad mot C_T kan man få fram mål for primereffektiviteten ved de gitte betingelser, samt deteksjonsgrense. Smeltepunktsanalyse (Anonymous, 2008) ble utført på SYBRgreen assays for å bekrefte amplifisering av ett produkt og fravær av primer-dimer artefakter. Fortynningsseriene ble laget enten av totalt genomisk DNA isolert fra en målorganisme, eller av en syntetisk kopi av templatet med kjent konsentrasjon laget ved kloning i plasmider (PrimerDesign Ltd.).

6.1.3 Real-time PCR betingelser

Mengde og type reagenser per reaksjon for et universelt assay (Nadkarni *et al.*, 2002) er vist som et eksempel på et TaqMan basert assay Tabell 20). Mengde mastermix er konstant, mens konsentrasjon av primere og eventuelt prober avhenger av optimalisering. Nukleasefritt vann tilsettes for å gi et totalt volum på 15 μL (før tilsats av templat). For SYBRgreen baserte assays ble det benyttet mastermix med SYBRgreen (Precision +SY+ROX; PrimerDesign, eller ABI Power Universal SG mastermix; Applied Biosystems). For skreddersydde assays (PrimerDesign), ble primere og eventuell probe levert som en ferdigblandet løsning som ble tilsatt i en mengde på 1 μL per reaksjon.

Tabell 20 Konsentrasjon og mengde av reagenser for et TaqMan basert, universelt real-time PCR assay.

	Navn	Stock kons. [μM]	Endelig kons. [nM]	Volum pr. reaksjon [μL]
Mastermix	Precision –SY+ROX	2x	1x	10
Forward primer	Nadkarni-F	10	150	0,3
Reverse primer	Nadkarni-R	10	150	0,3
Probe	Nadkarni-TMpr	10	200	0,4
Vann				4
Sum				15
Templat				5

Temperatursyklus for amplifisering varierte som indikert i Tabell 21. Det ble rutinemessig kjørt 50 sykluser for TaqMan assays, og 40 for SYBRgreen assays. For SYBRgreen assays ble det rutinemessig gjort en smeltepunktsanalyse etter siste syklus der temperaturen ble øket i trinn av 0.3 $^{\circ}\text{C}$ fra 60 til 95 $^{\circ}\text{C}$.

Tabell 21 Temperatursyklus ved real-time PCR

Temp. [°C]	Tid	Antall sykluser
50*	2–5 min	1
95	10 min	
95 (denaturering)	15–20 sek	40-50
56–61 (annealing)	1 min	

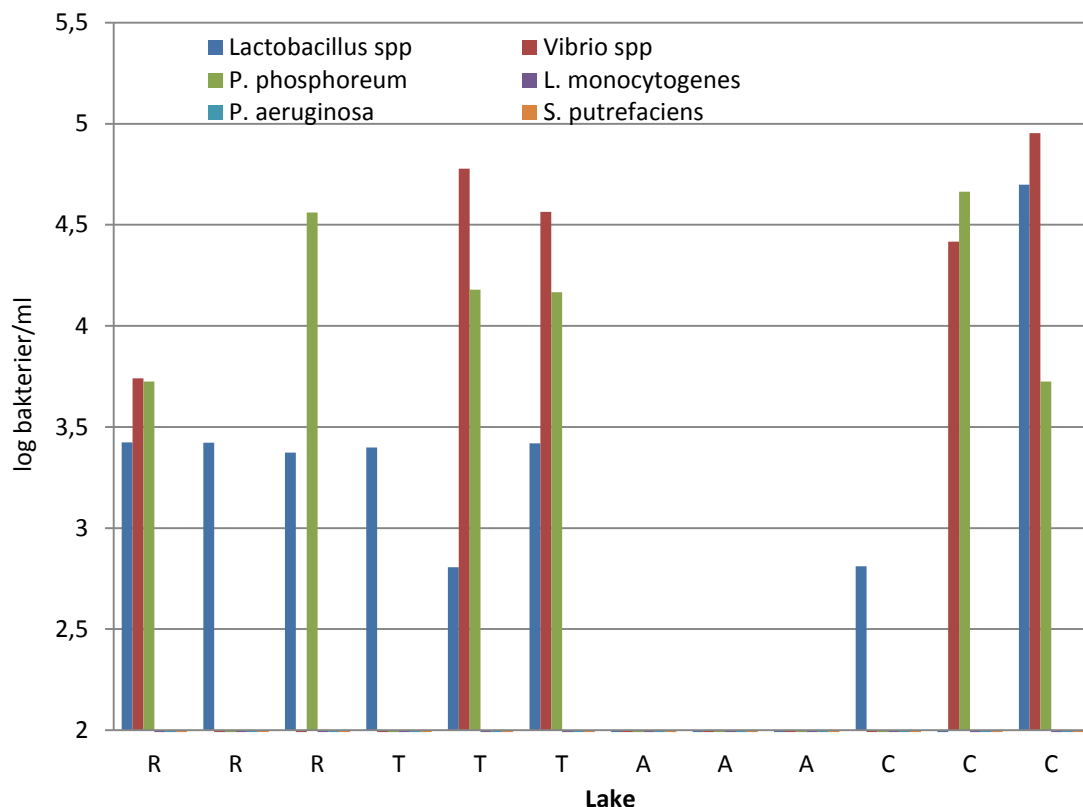
* Gjelder bare SYBRgreen assays

6.2 Resultater

Fordelen med real-time qPCR i forhold til tradisjonelle kultiveringsmetoder er at det går mye kortere tid før prøvesvaret foreligger. Analysene kunne dessuten gjøres på frosne prøver, etter at forsøkene var gjennomført.

Brukt på riktig måte er også PCR mye mer spesifikt og sensitivt enn tradisjonelle metoder. Arbeids- og tidsmessig er det mindre å tjene ved analyse av få prøver med lett kultiverbare enkeltbakterier (pga arbeid med DNA-isolering), men dersom det analyseres på flere arter samtidig eller mange prøver, kan arbeidsmengden reduseres betraktelig.

Resultatene fra PCR-analysen er vist i Figur 14.



Figur 14 Påvist bakterieinnhold i ulike laker fra matjessild-produksjon (R = Resirkulert lake, T = Tradisjonelt modnet, A= kunstig modnet, C = uten innvoller (sløyd))

Resultatene gir få entydige svar. Det ble påvist i overkant av 10^4 CFU/ml av spoleringsbakterien *Photobacterium phosphoreum*, hovedsakelig i prøver av tradisjonell matjessild (T), og sløyd sild (C). Videre ble det påvist 10^3 – 10^5 CFU/ml av *Lactobacillus* og *Vibrio*, som er naturlig forekommende i sild. Det ble ikke påvist *L. monocytogenes* i noen av prøvene. Men deteksjongrensen var ca. 10^2 /ml, så bildet kan være noe mer nyansert.

Nivåene er i tråd med tidligere funn (Lyhs *et al.*, 2007).

6.3 Diskusjon

Resultatene viser betydelig variasjon mellom prøvene. I prøvene fra kunstige modnet (A), kan resultatene tyde på at prøveoppbeidelsen ikke var tilpasset prøven, som var spesiell på grunn av mye oppløst materiale og høy enzymaktivitet. Ettersom andre deler av prosjektet, blant annet sensorikkdelen, tilsier at man ikke kommer til å gå videre med resirkulert lake, ble analyseresultatene ikke fulgt opp.

Etter 24 timer er det mye lett nedbrytbart organisk materiale i laken. Med et saltinnhold som ikke er tilstrekkelig til å hemme vekst av *Listeria*, kan det være at myndighetene ville hatt betenkeligheter med å tillate gjenbruk, uten streng mikrobiologisk kontroll.

For øvrig er det positivt at man ikke påviser *Listeria monocytogenes*. Selv om den høye deteksjongrensen ikke utelukker at den kan ha forekommet i prøvene.

Bakteriefloraen for øvrig gjenspeiler den naturlige floraen i sild, både når det gjelder arter og nivå.

7 Sammendrag og konklusjon

Det ble utført 3 forsøk med lab-skala produksjon (35 kg/batch) av matjes-type produkter fra Nordsjøsild. Forsøkene ble gjennomført i Egersund, i juni 2012. Til 2 av forsøkene ble det brukt råstoff som inngikk i regulær matjessild produksjon. Til ett forsøk ble det brukt råstoff som ikke ble ansett til å være av "matjes-råstoff" kvalitet, mest sannsynlig på grunn av manglende raudåte i tarmen. I tillegg til å modne sild på tradisjonelt vis, ganet i saltlake, ble 3 alternative metoder forsøkt: modning av sløyd sild (uten innvoller), modning av filet i resirkulert lake, samt modning av filet i lake tilsatt innvollsenzymer (kunstig lake).

Det ble utført sensorisk analyse av alle prøvene fra forsøkene, samt av et kommersielt matjes-produkt som var produsert i samme tidsrom som prøvene. Den sensoriske analysen skiller klart mellom de ulike forsøksvariantene. Forsøksvariantene som er produsert av matjes-råstoff, ganet, med innvoller, plasserer seg i nærheten av det kommersielle produktet. Prøvene som er produsert av sløyd fisk (uten calanus) har flere av matjes-produktets egenskaper, spesielt med hensyn til tekstur, men oppleves å ha mindre moden smak, men mer sjø-lukt og sjø-smak. Prøvene som er produsert av butterfly-filet med enzymer tilsatt i laken, oppleves i tillegg som fetere enn de andre prøvene. Mens prøvene som er modnet med resirkulert lake beskrives som saftigere og bitrere enn resten.

Fileter ble oppfattet å ha flere og hardere ben enn variantene som var produsert av ikke filetert råstoff. Filetene smakte dessuten salttere. Med unntak av prøvene som ble modnet, ganet med innvoller, skilte prøvene av råstoff som ikke var av matjes-kvalitet, seg betydelig fra de to andre variantene.

Analysene av enzymaktivitet indikerte høy aktivitet av myofibrill-nedbrytende enzymer i den kunstige laken. Vi har indikasjoner på at man ved modning oppnår et mykt produkt uten for stort tap av muskelmasse. For å oppnå dette bør laken inneholde mye enzymaktivitet som kan bryte ned bindevev og tilsvarende liten aktivitet som angriper myofibrillprotein.

Også proteomanalysen skilte klart mellom forsøksvariantene. Analyseresultatene viser at denne analysen er et godt verktøy til å undersøke hvordan forskjellige modninger (laker) og råvarer påvirkes under prosessen. Den kunstige laken har en effekt på sildens muskelproteiner som til dels ligner det som skjer under en tradisjonell matjes-modning, men også effekter som kan ha bidratt til avvikende sensoriske egenskaper i forhold til tradisjonell matjessild.

Mikrobiologisk analyse inngikk som en liten del av karakteriseringen. De noe begrensede resultatene gjenspeilet stort sett den naturlige bakteriefloraen i sild. Noen metodiske utfordringer ble ikke fulgt opp ettersom man ikke fant det naturlig å gå videre med denne forsøksvarianten.

Hovedkonklusjonen fra forsøkene er at analyseresultatene gir betydelig innsikt i ulike faktorerers effekt på produktegenskapene til matjessild. Både hver for seg og samlet, utgjør de et solid grunnlag for videre utvikling av disse produktene.

Litteratur

- Anonymous (2008). *Real-time PCR: From theory to practice*. Carlsbad, CA: Invitrogen Corp.
- Arnesen, J.A., & A. Gildberg (2007). Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology*, **98**, pp. 53–57.
- Barrett, A.J. (1972). Lysosomal enzymes. In: J. T. Dingle (ed.), *Lysosomes – A Laboratory Handbook*, (pp. 46–135). Amsterdam: North Holland Publishing Company.
- Birkeland, S., M. Sivertsvik, H.H. Nielsen & T. Skåra (2005). Effects of brining conditions on weight gain of herring (*Clupea harengus*) fillets. *Journal of Food Science*, **70**, pp. E418–424.
- Engvang, K. & H.H. Nielsen (2000). In situ activity of chymotrypsin in sugar-salted herring during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, pp. 1277–1283.
- Gildberg, A. (1988). Aspartic Proteinases in Fishes and Aquatic Invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **91**, pp. 425–435.
- Gildberg, A. & J. Raa (1983). Purification and Characterization of Pepsins from the Arctic Fish Capelin (*Mallotus villosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology*, **75**, pp. 337–342.
- Gudmundsdottir, G. & G. Stefansson (1997). Sensory and Chemical Changes in Spice-salted Herring as Affected by Handling. *Journal of Food Science*, **62**, pp. 894–897.
- Gudmundsson, M. & H. Hafsteinsson (1997). Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *Journal of Food Science*, **62**, pp. 37–39.
- Hjelmeland, K. & J. Raa (1980). Fish tissue degradation by trypsin type enzymes. In J. J. Connell (ed.), *Papers presented at the Jubilee Conference of the Torry Research Station Aberdeen, Scotland. 23–27 July 1979 ed., vol. Advances in Fish Science and Technology* (pp. 456–459). Farnham, Surrey, England: Fishing News Books Ltd.
- Kaplan, R.S. & P.L. Pedersen (1989). Sensitive protein assay in presence of high-levels of lipid. *Methods in Enzymology*, **172**, pp. 393–399.
- Karnop, G. (1982). (Bacteriological differentiation of genuine matjes and matje-style herring fillets.) Zur bakteriologischen Unterscheidung von echtem Matjes und Heringsfilets nach Matjesart. *Informationen für die Fischwirtschaft*, **29**, pp. 104–105.
- Karnop, G. (1986). (Analysis of the bacterial population of matje and matje-like herring fillets and possible distinction by means of *Vibrio costicola*.) Analyse der Bakterienpopulationen von Matjes und Heringsfilets nach Matjesart und Unterscheidungsmöglichkeit beider Produkte anhand von *Vibrio costicola*. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **37**, 114–117.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randell (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, **193**, pp. 265–275.
- Lyhs, U., & J.K. Bjorkroth (2008). *Lactobacillus sakei/curvatus* is the prevailing lactic acid bacterium group in spoiled maatjes herring. *Food Microbiology*, **25**, pp. 529–533.
- Lyhs, U., J. Lahtinen & R. Schelvis-Smit (2007). Microbiological quality of maatjes herring stored in air and under modified atmosphere at 4 and 10 degrees C. *Food Microbiology*, **24**, pp. 508–516.
- Lyhs, U., & R. Schelvis-Smit (2005). Development of a Quality Index Method (QIM) for Maatjes Herring Stored in Air and Under Modified Atmosphere. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **14**, pp. 63–76.
- Nadkarni, M.A., F.E. Martin, N.A. Jacques & N. Hunter (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology-Sgm*, **148**, pp. 257–266.

- Nielsen, L.B. & H.H. Nielsen (2002). Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology*, **128**, pp. 351–363.
- Nieper, L. & J. Stockemer (1995). (Spoilage of Matjes type herring fillets with particular reference to formation of biogenic amines.) Zum Verderb von Heringsfilets nach Matjesart unter besonderer Beruecksichtigung der Bildung biogener Amine. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **46**, pp. 66–67.
- Olsen, S.O. & T. Skara (1997). Chemical changes during ripening of North Sea herring. In J. Luten, T. Børresen & J. Oehlenschläger (eds.). *Seafood from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality*, **38** (pp. 305–318). Noorwijkerhout, The Netherlands: Elsevier.
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, **83**, pp. 346–356.
- Priebe, K. (1980). (Trends in manufacture and evaluation of fish products with limited shelf life.) Trends bei der Herstellung von beschraenkt haltbaren Fischerzeugnissen und deren Beurteilung. *Fleischwirtschaft*, **60**, pp. 225–230.
- Rabilloud, T. & S. Charmont (2000). Detection of proteins on two-dimensional electrophoresis gels. In T. Rabilloud (ed.), *Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*, (pp. 107–126). Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Schubring, R. & J. Oehlenschläger (1997). Comparison of the ripening process in salted Baltic and North Sea herring as measured by instrumental and sensory methods. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, **205**, pp. 89–92.
- Stefansson, G., H.H. Nielsen, T. Skåra, R. Schubring, J. Oehlenschläger, J. Luten, S. Derrick & G. Gudmundsdottir (2000). Frozen herring as raw material for spice-salting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, pp. 1319–1324.
- von Pohl, J.E. & F.V. Goedicke (1973). (Method of producing enzymically matured fish products, particularly Matjes herrings.) Verfahren zur Herstellung enzymatisch gereifter Fischprodukte, insbesondere von Matjesheringen, **2**, pp. 235–996).
- Wulff, T., A. Jokumsen, P. Hojrup & F. Jessen (2012). Time-dependent changes in protein expression in rainbow trout muscle following hypoxia. *Journal of Proteomics*, **75**, pp. 2342–2351.
- Wurziger, J. (1977). (Legal evaluation of 'Matjes' herring fillets.) Beitrag zur lebensmittelrechtlichen Beurteilung von Heringsfilets mit 'Matjes' - Bezeichnungen. *Fleischwirtschaft*, **57**, pp. 1831–1834.

