

Kristina Olsen

NTNU
Norges teknisk-naturvitenskapelige
universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

Kristina Olsen

Bionservering- Screening av melkesyrebakterier som mulig beskyttende kultur i spiseklar sjømat

Juni 2020



Kunnskap for en bedre verden

Bionservering- Screening av melkesyrebakterier som mulig beskyttende kultur i spiseklar sjømat

Kristina Olsen

Mat og Teknologi

Innlevert: Juni 2020

Hovedveileder: Anita N. Jakobsen

Medveileder: Sunniva Hoel

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

Sammendrag

Forbrukernes ønske om spiseklare sjømatprodukter med høy sensorisk og ernæringsmessig kvalitet er utfordrende og kan medføre økt matsvinn. For å hindre dette bør barriereteknologi anvendes for å sikre trygg mat med tilstrekkelig holdbarhet. En mulig innovativ tilnærming er biokonservering ved hjelp av melkesyrebakterier. Biokonservering er bruk av en naturlig eller kontrollert mikroflora, antimikrobielle metabolitter, eller en kombinasjon av disse for å forhindre uønsket bakterievekst, eller endring av produktets næringsinnhold og sensoriske egenskaper.

Hensikten med studien var å screene et utvalg melkesyrebakterier isolert fra røykalaks, gravlaks og sushi for deres inhiberende egenskaper mot forringelsesorganismene *S. putrefaciens* og *P. fluorescens*. I den forbindelse ble vekstegenskapene til melkesyrebakteriene ved 15 °C undersøkt, og screeningmetoden optimalisert ved utarbeidelse av en standardkurve (OD mot kde/ml) og testing av selektive og/eller differensielle medier. Screeningens forløp ved oppdyrking av melkesyrebakterier og målorganismer i co-kultur og kvantifisering ved hjelp av mikrospotting. Melkesyrebakteriene ble identifisert ved hjelp av 16S rRNA gen sekvensering og stammene med inhiberende egenskaper og inkludert i et rørforsøk hvor målet var å dokumentere deres vekstkinetikk under forhold tilsatt 0,26 % røyksyre-kondensat.

93 av 100 melkesyrebakterier hadde vekst ved 15 °C og brønnplateoppsettet og mikrospotting under screeningen av *P. fluorescens* fungerte godt. 35 av 93 stammer ble videre screenet for inhiberende egenskaper hvor 13 stammer av *Leuconostoc* (12 fra sushi og 1 fra gravlaks) og én stamme av *Carnobacterium* (fra sushi) hadde en inhiberende effekt mot målorganismen *P. fluorescens* med en gjennomsnittlig reduksjon på 3,4 log kde/ml. Stammen identifisert som *Weissella* hadde ingen inhiberende effekt. Brønnplateoppsettet for *S. putrefaciens* krever imidlertid optimalisering, på grunn av manglende vekst i fiskejuice og hvit kolonidannelse på jernagar (JA) ved 15 °C.

Ved oppformering av melkesyrebakterier i Brain Heart Infusion- buljong (BHI- buljong) tilsatt røyksyre kondensat ble 13 av 14 stammer hemmet i form av en forlenget lag-fase, og noen med en lavere cellekonsentrasjon ved stagnering enn kontrollen. Stamme nr. 299 hadde ingen registrert lag- fase og endte opp med samme cellekonsentrasjon som kontrollen. Den ansees derfor som en god kandidat som fremtidig biokonserverende faktor i kaldrøkt laks produsert med røyksyre kondensat.

Abstract

Consumers' desire for ready-to-eat seafood products with high sensory and nutritional quality is challenging and can lead to increased food waste. To prevent this, barrier technology should be used to ensure safe food with adequate shelf life. A possible innovative approach is biopreservation using lactic acid bacteria. Biopreservation is the use of a natural or controlled microflora, antimicrobial metabolites, or a combination of these to prevent unwanted bacterial growth or change the nutritional content and sensory properties of the product.

The aim of the study was to screen a selection of lactic acid bacteria isolated from cold smoked salmon, graved salmon and sushi for their inhibitory properties against the spoilage organisms *Shewanella putrefaciens* (*S. putrefaciens*) and *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*). The growth characteristics of the lactic acid bacteria at 15 ° C were investigated and the screening method optimized by preparing a standard curve for the lactic acid bacteria and testing of selective and/or differential media for lactic acid bacteria and target organisms. The screening was carried out by cultivation of lactic acid bacteria and target organisms in co-culture and quantification by micro spotting. The lactic acid bacteria were identified by 16s- rRNA gene sequencing and the strains with inhibitory properties were included in a tube experiment to determine their growth kinetics under conditions added 0,26 % purified condensed smoke.

93 out of 100 lactic acid bacteria grew at 15 ° C and the well plate setup and micro spotting during the screening of *P. fluorescens* worked well. 35 of 93 strains were further screened for inhibitory properties, with 13 strains of *Leuconostoc* (12 from sushi and 1 from tomb salmon) and one strain of *Carnobacterium* (from sushi) having an inhibitory effect against the target organism *P. fluorescens* with an average reduction of 3.4 log kde / ml. The strain identified as *Weissella* had no inhibitory effect. The well plate layout of *S. putrefaciens* requires optimization, due to lack of growth in fish juice and white colony formation on iron agar (IA) at 15 ° C.

For the lactic acid bacteria in BHI, added purified condensed smoke, 13 of 14 strains were inhibited in the form of an extended lag- phase, and some with a lower cell concentration at

stagnation than the control. Strain 299 had no recorded lag and ended up with the same cell concentration as the control. This strain is therefore considered a good candidate as a possible bio-preserving factor in cold smoked salmon produced with purified condensed smoke.

Forord

Denne studien utgjør 45 studiepoeng og ble gjennomført ved institutt for bioteknologi og matvitenskap, fakultet for naturvitenskap ved Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet i Trondheim høsten 2019 og våren 2020.

En stor takk rettes til førsteamanuensis Anita N. Jakobsen og universitetslektor Sunniva Hoel for god veiledning gjennom prosjektet, og til Ph.d. stipendiat Jelena Stupar for hjelp på laboratoriet i en hektisk periode. Takknemlighet sendes også og til alle ansatte ved NTNU som har gitt meg veiledning, svart på mine mange spørsmål og sendt positivitet min vei.

Jeg vil også takke mine medstudenter, spesielt Åshild T. Moen, som har motivert meg gjennom lange dager på laboratoriet og gjennom skriveprosessen. Og til slutt en stor takk til min samboer som har vært svært tålmodig, og støttende gjennom lange kvelder og flere år med utdanning. Og til Ida Bjørnstad som har vært til uvurderlig hjelp med lille Liam. Uten deg hadde dette aldri vært gjennomførbart.

16 juni 2020, Trondheim

Forfatter
Kristina Olsen

Kristina Olsen

Innholdsfortegnelse

1. Bakgrunn for oppgaven	1
2. Teoretisk bakgrunn	4
2.1 Mekanismer som styrer forringelse av fisk	4
2.2 Forringelsesmikrobiota i fersk- og spiseklare fiskeprodukter	5
2.3 Spesifikke forringelsesbakterier (SSO)	7
2.3.1 Pseudomonas fluorescens.....	7
2.3.2 Shewanella putrefaciens	9
2.4 Konservering av mat.....	10
2.4.1 Barriereteknologi.....	10
2.4.2 Røyking av laks	12
2.4.3 Biokonservering.....	13
2.5 Melkesyrebakterier	15
2.5.1 Bruk av melkesyrebakterier til biokonservering	16
2.6 Antimikrobielle komponenter produsert av melkesyrebakterier	19
2.6.1 Organiske syrer.....	19
2.6.2 Bakteriosiner	20
2.7 Mikrobiologiske analyser.....	21
3. Material og metode	23
3.1 Preparering av fiskejuice	23
3.2 Melkesyrebakterienes vekstegenskaper ved 15 °C.....	24
3.3 Standardisering av bakteriekulturenes cellekonsentrasjon – OD mot kde/ml	24
3.4 Utvelgelse av melkesyrebakterier til screening.....	25
3.5 Test av potensielt selektive medier for melkesyrebakterier og målorganismer.....	26
3.5.1. Melkesyrebakterier	26
3.5.2 Pseudomonas fluorescens.....	26
3.5.3 Shewanella putrefaciens	26
3.6 Screening av melkesyrebakteriers inhiberende effekt på utvalgte forringelsesmikrobiota	27
3.6.1 Statistisk analyse	30
3.7 Identifisering av melkesyrebakterier isolert fra spiseklar sjømat	31
3.8 Melkesyrebakteriers vekstkinetikk under forhold tilsatt røyksyre kondensat	33
4. Resultat	35
4.1 Melkesyrebakterienes vekstegenskaper ved 15 °C.....	35
4.2 Standardisering av bakteriekulturenes cellekonsentrasjon – OD mot kde/ml	39
4.3 Test av potensielt selektive medier for melkesyrebakterier og målorganismer.....	41

4.3.1 Melkesyrebakterier	41
4.3.2 Pseudomonas fluorescens.....	42
4.3.3 Shewanella putrefaciens	42
4.4 Screening av melkesyrebakteriers inhiberende effekt på utvalgte forringelsesmikrobiota.....	43
4.4.1 Pseudomonas fluorescens.....	44
4.4.2 Shewanella putrefaciens	46
4.5 Identifisering av melkesyrebakterier isolert fra spiseklar sjømat	48
4.6 Melkesyrebakteriers vekstkinetikk under forhold tilsatt røyksyre kondensat	50
5. Diskusjon.....	53
5.1 Melkesyrebakterienes vekstegenskaper ved 15 °C.....	53
5.2 Metodeutvikling	54
5.2.1 Standardisering av bakteriekulturenes cellekonsentrasjon – OD mot kde/ml	54
5.2.2 Test av potensielt selektive medier for melkesyrebakterier og målorganismer.....	55
5.3 Screening av melkesyrebakteriers inhiberende effekt på utvalgte forringelsesmikrobiota	57
5.4 Identifisering av melkesyrebakterier isolert fra spiseklar sjømat	63
5.5 Melkesyrebakteriers vekstkinetikk under forhold tilsatt røykdyrekondensat.....	65
6. Konklusjon	67
7. Referanseliste.....	68

Vedlegg 1: OD-måling av målorganismer etter 96 t. inkubering i brønnplate ved 15 °C

Vedlegg 2: Melkesyrebakterieisolater fra røykalaks, gravlaks og sushi

1. Bakgrunn for oppgaven

Fisk og sjømat industrien i Norge og verden generelt er i stadig vekst. Bare i januar 2020 eksporterte Norge 207 000 tonn (rød- og hvitfisk), noe som tilsvarer en verdiøkning på 15 % sammenlignet med året før (Norges-sjømatråd, 2020; Hage, 2019). Samtidig har interessen økt blant forbrukere for ferske- og spiseklare produkter av sjømat med høy sensorisk og ernæringsmessig kvalitet (Hage, 2019; Ghanbari *et al.*, 2013; EFSA Dietetic Products og Allergies, 2014).

Næringsmiddelhygieneforskriften definerer spiseklare produkter som «Næringsmidler som produsenten eller fabrikanten har framstilt med henblikk på direkte konsum uten at koking eller annen tilberedning er nødvendig for å fjerne, eller redusere til et akseptabelt nivå, uønskede mikroorganismer» (Lovdata, 2019b). Eksempler på slike produkter er vakuumpakket røykt og gravet fisk, samt fiskeprodukter som skal konsumeres rå eller tilnærmet rå, som sushi eller vakuumpakkede fiskeloins (Mattilsynet, 2016). Spiseklare sjømatprodukter blir også ofte omtalt som lett- eller semiprosesserte med et innhold på 3-6% NaCl og med en pH > 5 (Leroi, 2011; Bozariis, Stamatiou og Nychas, 2013; Calo-Mata *et al.*, 2008). Fersk- og/eller spiseklar fisk har en relativ kort holdbarhet på 1-2 uker for fersk og 3-4 uker for spiseklare produkter (Wiernasz *et al.*, 2017).

På grunn av den økte interessen for fersk og spiseklar sjømat har mer tradisjonelle konserveringsmetoder som salting, frysing, fermentering og røyking måttet vike til fordel for, nyere og mildere barriereteknologi (Stiles, 1996; García *et al.*, 2010). Eksempler på dette er bruk av mindre salt, lavere oppvarmingstemperatur, og pakkemetoder som vakuum (VP)- og modifisert atmosfærepakking (MAP) (Ghanbari *et al.*, 2013).

Bruk av mildere metoder for konservering har i løpet av de siste tiårene gitt matindustrien nye utfordringer knyttet til både mattrygghet og holdbarhet. Sjømat står høyt på listen over næringsmidler assosiert med utbrudd av matbårne sykdommer (Huss, 1994; FHI, 2019), og deres nærings sammensetning legger et godt grunnlag for vekst av patogener. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Clostridium botulinum* og *Aeromonas hydrophilia*, er

eksempler på patogene organismer som kontaminerer produktet gjennom, prosessering, håndtering og lagring før konsum (Ghanbari *et al.*, 2013).

Produkter av fisk -og sjømat er en gruppe som er svært utsatt for vekst av uønskede forringelsesorganismer grunnet den mangfoldige nærings sammensetningen (Ghanbari *et al.*, 2013). Gjennom produksjon av ulike metabolitter som aminer, sulfider, aldehyder, alkoholer, ketoner og ulike organiske syrer, dannes det ubehagelig lukt og smak, slim og misfarging som gjør produktet sensorisk uakseptabel for forbruker (Gram *et al.*, 2002; Gram og Dalgaard, 2002). Eksempler på slik forringelsesmikrobiota er de spesifikke forringelsesbakteriene (SSO) *Shewanella putrefaciens* (*S. putrefaciens*) og *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*), som begge er hyppig isolert fra ferske og prosesserte fiskeprodukter (Jørgensen og Huss, 1989; Masniyom, 2011; Gram og Dalgaard, 2002).

I takt med et økende matforbruk, kastes det mat som aldri før. 25% av alt som produseres og omsettes ender opp som søppel (Haraldsen, 2011). Hver konsument kaster ca. 43 kg mat årlig noe som tilsvarer 50 % av det totale matsvinnet (Regjeringen, 2019). En av hovedårsakene er kort- eller utgått datostempling (Haraldsen, 2011). For at vi innen 2030 skal kunne nå FNs bærekraftsmål nr. 12- Sikre bærekraftig forbruks- og produksjonsmønstre ved å halvere andelen matsvinn per innbygger på verdensbasis (FN, 2020), er man avhengig av en kombinasjon av barriereteknologi som forlenger holdbarheten tilstrekkelig, og som samtidig gjør det mulig for produsentene og dekke forbrukernes etterspørsel etter høykvalitetsprodukter. En innovativ tilnærming er biokonservering.

Biokonservering er bruk av en naturlig eller kontrollert mikroflora, antimikrobielle metabolitter, eller en kombinasjon av disse for å forhindre uønsket bakterievekst, eller endring av produktets næringsinnhold og sensoriske egenskaper (Stiles, 1996; Leroi *et al.*, 2015). Melkesyrebakterier kan ha et stort potensiale for bruk i biokonservering. Hovedsakelig fordi de er antatt trygge å konsumere og har derfor fått GRAS- status (Generally Recognized as Safe) (Smid og Gorris, 1999; Stiles, 1996), men også grunnet deres evne til å dominere mikrobiotane i flere ulike matvarer som kjøtt, grønnsaker, fisk og meieriprodukter under lagring (Stiles, 1996). Melkesyrebakterier isolert fra fisk er ofte i stand til å vokse ved kjøleskapstemperatur, og flere stammer takler andre konserveringsmetoder som modifisert

atmosfære (MAP), høyere saltkonsentrasjoner, og lav pH godt (Ghanbari og Jami, 2013). Det vil si at de kan være tilpasningsdyktige, og at de potensielt kan benyttes som en av flere barrierer for å forlenge produktets holdbarhet og trygghet.

Kjølt fisk har en høyere merverdi enn fryst fisk og spises ofte rå (sushi) eller prosessert (røykalaks, gravlaks o.l.) (Fletcher *et al.*, 2002; Macé *et al.*, 2012). Produktene er å finne i kjøledisken pakket i MAP indusert med CO₂ eller vakuumpakket, og begge metodene er med på å forlenge holdbarheten (Macé *et al.*, 2012). Produkter som for eksempel kaldrøkt laks produseres ved hjelp av salting, tørking og røyking. Her vil alle trinnene fungere som barrierer mot uønsket mikrobiota ved å senke pH og vannaktivitet (a_w) (Visciano *et al.*, 2006; Suñen, Aristimuño og Fernandez-Galian, 2003).

Selve røykingen har en hemmende effekt på grunn av dens innhold av fenoler, karboksylsyre og formaldehyd (Suñen, Aristimuño og Fernandez-Galian, 2003). Forbrenning av trefliser fører i tillegg med seg polisyklisk aromatiske hydrokarboner (PAH) som er kreftfremkallende og lite miljøvennlige komponenter (Valø, Jakobsen og Lerfall, 2020). Produksjonen av disse kan senkes eller forhindres ved bruk av røyksyre-kondensat, som er et naturlig produkt fra røyk, med lite eller ingen innhold av PAH (Lingbeck *et al.*, 2014). Røyksyre-kondensat benyttes i dag til produksjon av røykte kjøtt- og fjærkreprodukter og ost, men bruk i sjømat for konsum er enda lite dokumentert (Valø, Jakobsen og Lerfall, 2020).

Hensikten med studien var å screene et utvalg melkesyrebakterier isolert fra røykalaks, gravlaks og sushi for deres vekst og inhiberende egenskaper mot forringelsesorganismene *S. putrefaciens* og *P. fluorescens*. Målet skal nås gjennom følgende delmål:

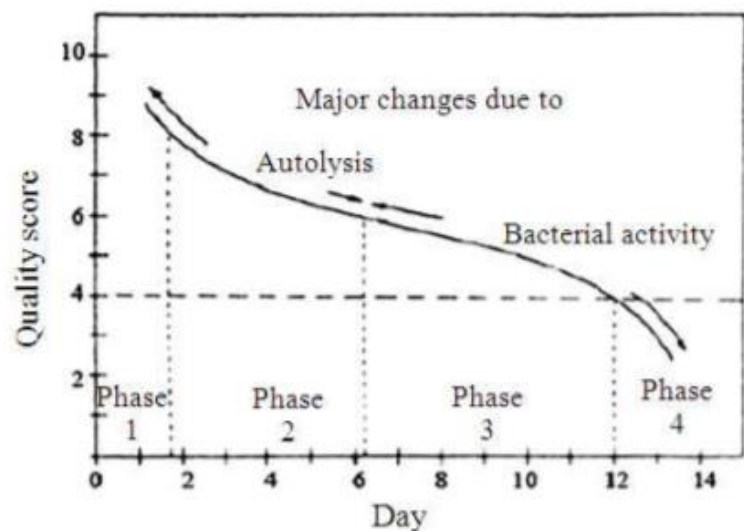
1. Måle vekstegenskapene til 100 melkesyrebakterier ved 15 °C.
2. Optimalisere metodikk for screening av inhiberende egenskaper til et utvalg melkesyrebakterier mot *S. putrefaciens* og *P. fluorescens*.
3. Måle inhiberende egenskaper til et utvalg melkesyrebakterier mot *S. putrefaciens* og *P. fluorescens*.
4. Identifisere melkesyrebakterier ved hjelp av 16S rRNA gen- sekvensering.
5. Fastsette vekstkinetikk for et utvalg melkesyrebakterier under forhold tilsatt 0,26 % røyksyre-kondensat.

2. Teoretisk bakgrunn

2.1 Mekanismer som styrer forringelse av fisk

Nedbrytning av organiske materiale er en naturlig prosess som er avgjørende for resirkulering av næringsstoffer på jorda. Når disse materialene påvirker menneskers helse, for eksempel gjennom mat, anses metabolismen som ødeleggende (Blackburn, 2006). Forringelse kan oppstå ved hvert trinn langs næringskjeden fra fjord til bord og kan defineres som «enhver sensorisk endring i produktet som forbruker anser som uakseptabel» (Rawat, 2015). Eksempler på dette kan være skader, endret smak, lukt, utseende (misfarging, slim, bulking av emballasje) eller tekstur (Gram *et al.*, 2002).

I levende, men også fersk rund fisk er fiskemuskelsteril på grunn av det ugjennomtrengelige skinnnet. I tillegg inneholder fisken enkle næringsstoffer som gjør det vanskelig for eventuell mikroflora å vokse (Mukundan, Antony og Nair, 1986). Ved fangst og avlivning av fisken vil det oppstå sirkulasjonssvikt og respirasjonssystemet stopper opp. Anaerobe prosesser som



Figur 1 Forringelsesprosessen til fisk og sjømat (kvalitetsscore mot dager) delt inn i 4 faser. (Kilde: Mukundan, Antony og Nair, 1986)

nedbrytning av glukose starter, og fisken ender til slutt opp i rigor mortis hvor forringelsesprosessen begynner (Datta, 2013). Forringelse av sjømat kan deles inn i 4 faser som starter med autolytisk nedbrytning og ender med mikrobiell vekst (Figur 1). Forringelse kan også oppstå grunnet oksidasjon (Ghaly *et al.*, 2010; Blackburn, 2006). Prosessen starter med autolytisk nedbrytning (fase 1 og 2) som er nedbrytning av muskel og hud (proteiner) av intracellulære endogene enzymer (Mukundan, Antony og Nair, 1986). Nedbrytningen kan føre til tap av smak, aroma og endret konsistens (Gokoglu og Yerlikaya, 2015). Fiskehuden og musklene blir gjennomtrengelig for bakterier både innen- og utenifra, samtidig som det

frigjøres enkle sukkerarter, samt frie fett- og aminosyrer som gjør produktet til et næringsrikt miljø for bakterievekst. (Mukundan, Antony og Nair, 1986; Ghaly *et al.*, 2010)

Under fangst, håndtering og prosessering kan fisk og sjømat kontamineres av et bredt spekter av mikroorganismer. Under lagring vil bare et fåtall av disse utvikle seg videre og forårsake kvalitetsforringelse av produktet (Gram og Huss, 1996). I fase 3. er forandringene mer bakteriologiske og fisken viser tegn til forringelse i form av sterk lukt, smak, og endring i tekstur (myk eller tørr) (Abbas, Saleh og Saeed, 2009). Hvilke mikroorganismer som deltar, avhenger av type næringsmiddel og produktets miljøfaktorer under lagring (Huis in't Veld, 1996). I Fase 4 betegnes fisken som fullstendig forringet og uspiselig (Abbas, Saleh og Saeed, 2009).

Foringelse av spiseklar fisk kan også oppstå på grunn av lipidperoksidasjon, som er oksidativ nedbrytning av lipider og en av hovedårsakene til forringelse av både planter, dyr og fisk (Min og Ahn, 2005). Siden fisk inneholder mye flerumettet fett, som er kjent for å oksidere raskt (Min og Ahn, 2005; Buege og Aust, 1978). Harskningen katalyseres av faktorer som lys, varme, tilgjengelighet på oksygen og metallioner (Ramanathan, Das og Li, 1994). Prosessen forløper ved at frie-radikaler stjeler elektroner fra lipidene som fører til celledskader som gir harsk lukt og smak (Buege og Aust, 1978). Foringelseshastigheten kan imidlertid senkes eller forhindres ved bruk av oksygenfri atmosfære (vakuumballasje), tilsetning av antioksidanter, og bruk av lystett emballasje (Velasco, Dobarganes og Márquez-Ruiz, 2010).

2.2 Forringelsesmikrobiota i fersk- og spiseklare fiskeprodukter

Næringsmidler er i konstant endring når det kommer til pH, nærings sammensetning, atmosfære og mikrobiota over tid. Under lagring skjer de mikrobiologiske endringene på grunn av bakterienes evne til å tolerere produktets barrierebetingelser, og deres evne til å produsere ulike metabolitter (Gram og Dalgaard, 2002).

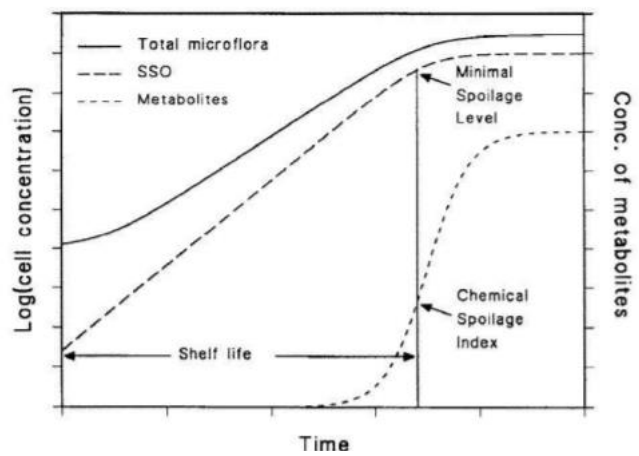
Fersk- og spiseklar fisk blir hovedsakelig forringet av aerobe gram-negative bakterier og vil ved kjølelagring være godt egnet for vekst av psykrotolerant *Pseudomonas* spp og *S. putrefaciens* (Emborg *et al.*, 2002; Gram og Huss, 1996). Ved forringelse vil et stort antall bakterier (10^7 - 10^8

kde/ml) være til stede i produktet, men ikke alle vil klassifiseres som forringende mikrobiota (Gram, Trolle og Huss, 1987). Mikrobiota i spiseklar fisk er enda ikke fullstendig dokumentert, men flere kilder har funnet at fisk pakket i CO₂ indusert atmosfære, som MAP, vil favorisere vekst av anaerobe bakterier som melkesyrebakterier (*Carnobacterium* og *Lactobacillus* (Gram og Dalgaard, 2002)) og CO₂ resistente, TMAO reduserende *P. phosphoreum* (Emborg et al., 2002; Leroi et al., 1998). Kjølelagrede og vakuumpakkede fiskeprodukter som er preservert med lave saltkonsentrasjoner og lett forsuret ved hjelp av røyking, inhiberer som oftest aerobe gram- negativ (G-) bakterieflora (Gram og Dalgaard, 2002). Flere andre bakterier som *Enterobacteriaceae* (Gram og Dalgaard, 2002) og *Brochothrix thermospacta* (Leroi et al., 1998), mugg og gjær har også blitt påvist (Lianou, Panagou og Nychas, 2016).

Foruten om mikrobiotaen nevnt ovenfor er patogene bakterier en av de største farene knyttet opp mot ferske og spiseklare sjømatprodukter. Disse står for et stort antall sykdomstilfeller verden over og bare små mengder kan føre til matforgiftning (WHO, 2020). Sykdomsfremkallende bakterier kan ifølge Ghanbari *et al.* (2013) klassifiseres i tre grupper alt etter hvor i næringskjeden de kontaminerer produktet. *Clostridium botulinum*, *Vibrio* spp. og *Aeromonas hydrophilia* tilhører gruppe 1, som er en del av den naturlige mikrobiotaen til fisk. *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Shigella* spp og *Staphylococcus aureus* tilhører gruppe 2, som kontaminerer produktet ved tilstedeværelse i miljø eller ved fekal forurensning. Gruppe 3 er bakterier som kontaminerer produktet under prosessering, håndtering eller lagring og kan være *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* i tillegg til bakteriene nevnt i gruppe 1 og 2 (Ghanbari *et al.*, 2013).

2.3 Spesifikke forringelsesbakterier (SSO)

Under lagring har alle næringsmidler en unik mikrobiota som varierer etter produktenes miljømessige egenskaper. Hvordan produktet brytes ned handler ikke om antallet mikroorganismer, men de organismene som produserer ødeleggende metabolitter kalt spesifikke forringelses organismer (SSO) (Caldera, 2014). *Shewanella putrefaciens* og *Pseudomonas spp.* er eksempler på slike bakterier (Speranza



Figur 2 Oversikt over vekst av SSO i forhold til den totale mikrofloraen og deres produksjon av metabolitter som fører til forringelse av produkt
kilde: (Huis in't Veld, 1996)

et al., 2013). Disse vil vokse raskere enn de andre bakteriene under lagring, og etter hvert bli en del av den dominerende mikrobiotaen som vist i figur 2. Samtidig vil de produsere uønskede metabolitter som er ansvarlig for kvalitetsforringelsen av produktet (Huis in't Veld, 1996; Caldera, 2014). Eksempler på slike metabolitter er frie aminosyrer som ved mangel på oksygen vil bli nedbrutt til H_2S , kadaverin, putrecin og NH_3 som er illeluktende forbindelser forbundet med fordervet mat (Caldera, 2014; Huis in't Veld, 1996). SSO kan også fermentere enkle sukkerarter som fører til senkning i pH, og produsere gass som bulker emballasje og danner sur smak (Caldera, 2014). Andre metabolitter er TMA, biogene aminer, ammoniakk og ketoner, som er med på å danne uønsket lukt og smak i produktet under lagring (Huis in't Veld, 1996; Boziaris, Stamatiou og Nychas, 2013).

2.3.1 *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas spp. Er en gram- negativ stavbakterie som anses å være en av de vanligste spesifikke forringelsesbakteriene i fersk- og spiseklar fisk (Gram og Huss, 1996; Gram, Wedell-Neergaard og Huss, 1990). Bakterien har rette eller lett kurvede staver på mellom 1,5 og 5,0 μm . Den er katalase og oksidase positiv og er mobil med en eller flere polare flageller.

P. fluorescens er av genuset *Pseudomonas* og stammer fra én av seks undergrupper (*P. anguilliseptica*, *P. lutea*, *P. putida*, *P. straminea*, and *P. fluorescens*, *P. syringae*) kalt *Pseudomonas fluorescens* gruppen (Andreani og Fasolato, 2017). Gruppen er forbundet med forringelse i sammenheng med kontaminering under prosessering og *P. fluorescens* sees på som en stamme med stort ødeleggelsespotensiale (Bossis *et al.*, 2000).

P. fluorescens har som andre *Pseudomonas*- stammer enkle ernæringsmessige krav, og bruker ulike organiske forbindelser som energi- og karbonkilder. Dette gjør den svært godt egnet for overlevelse i flere ulike produkter (Andreani og Fasolato, 2017). Arten *P. fluorescens* er blant annet isolert fra proteinrike produkter med høyt vanninnhold og naturlig pH, som melkeprodukter, kjøtt, fisk og frukt og grønnsaker (Jay, 2003; Oliveira *et al.*, 2015; Raposo *et al.*, 2017; Gram *et al.*, 2002). Stammen har optimumstemperatur på mellom 25- 35 °C (Andreani og Fasolato, 2017), men er også psykrotolerant og har evnen til å tilpasse seg kalde miljø (Andreani og Fasolato, 2017; Murray, 2019; Miller *et al.*, 1973). Dette gir den gode forutsetninger til å overleve og formere seg i kjølelagrede fiskeprodukter.

P. fluorescens kan danne biogene aminer, ketoner, aldehyder, estere og ikke-H₂S svovelholdige forbindelser (Lunestad og Rosnes, 2008). Enkelte stammer er i tillegg i stand til å produsere pigmenter og proteolytiske- og lipolytiske enzymer som kan være med på å påvirke kvaliteten på ferske- og spiseklare sjømatprodukter (Miller *et al.*, 1973).

Bakterien er strengt aerob, og vil hemmes ved bruk av modifisert atmosfærepakking (MAP) og varmebehandling (Gram *et al.*, 2002; Andreani og Fasolato, 2017). Allikevel er det vist at den kan vokse under anaerobe betingelser ved tilstedeværelse av nitritt. Det optimale forholdet for vekst er ved pH- verdier over 5,8. Surere miljø vil senke veksthastigheten (Andreani og Fasolato, 2017).

2.3.2 *Shewanella putrefaciens*

Shewanella putrefaciens er en gram negativ, fakultativt anaerob stav-bakterie som har vært gjennom flere endringer av navn og klassifisering opp gjennom tidene (Leblanc *et al.*, 2001). Den ble opprinnelig isolert fra smør i 1931 (Derby og Hammer, 1931), og klassifisert som *Achromobacter putrefaciens* og *Pseudomonas putrefaciens*, før den fikk sitt nåværende navn i 1985 (Leblanc *et al.*, 2001).

Stammen er hovedsakelig forbundet med det marine miljø, og er på lik linje med *P. fluorescens* ansett som en av de vanligste forringelsesbakteriene i kjølelagret fisk- og sjømat (Paździor, 2016; Gram, Trolle og Huss, 1987). Den har også blitt dokumentert til å være årsaken til forringelse av fisk pakket i MAP og er isolert fra ferskvann, samt proteinrike næringsmidler som storfe og fjørfe (Gram og Huss, 1996; Gram og Dalgaard, 2002).

Selv om bakterien er mesofil, med en optimumstemperatur på mellom 25 og 35 °C (Pakchung, Soe og Codd, 2008; Korber, Mangalappalli-Illathu og Vidović, 2009), anses bakterien å være svært psykrotolerant (Hau og Gralnick, 2007). Flere stammer har evnen til å vokse og leve i et relativt bredt temperaturspekter helt nede i 0 °C (Jørgensen og Huss, 1989), noe som kan være et fortrinn når det kommer til overlevelse i kjølelagrede næringsmidler over lengre tid. Et eksempel på dette er et lagringsforsøk av kaldrøkt laks ved 8 °C utført av Leroi *et al.*, (1998) hvor det ble funnet at den dominerende forringelsesmikrobiotaen de to første ukene hovedsakelig besto av de gram- negative bakteriene, *S. putrefaciens* og *Photobacterium spp.* Videre viser Power og Tamplin, (2012) lignende resultater i et lagringsforsøk (ved 4 °C) av modifisert atmosfærepakket (MAP) atlantehavslaks, hvor *Shewanella* var en av stammene i den dominerende mikrobiotaen 15 dager etter pakking (Powell og Tamplin, 2012). Dalgaard (1995) konstaterte i tillegg at høyere konsentrasjoner enn 10⁸ kde/ml var nødvendig for at bakterien skulle kunne produsere uønsket lukt ved for eksempel dannelse av H₂S.

S. putrefaciens kan redusere trimetylaminoxid (TMAO) til trimetylamin (TMA), produsere hydrogensulfid (H₂S) fra cystein og bidra til proteolytisk og lipolytisk degradering. Dette er med på å danne en ubehagelig odør i produktet (Lyu *et al.*, 2017; Gram og Huss, 1996). En studie av Boskou og Debevere (1998) viste imidlertid at minimum 10 % oksygen til stede ved anaerob

respirasjon ga fravær av TMA og at en reduksjon av pH fra 6,8 til 5,8 minsket dannelsen av TMA og senke generasjonstiden til *S. putrefaciens*. Bruk av MAP med høyt innhold av CO₂ og en liten mengde O₂ vil hemme veksten av *S. putrefaciens* og videre senke produksjonen av metabolske produkter (Boskou og Debevere, 1998).

2.4 Konservering av mat

Konservering av mat kan defineres som en behandling og håndtering av mat på en slik måte at den stopper, kontrollerer eller reduserer forringelse og muligheten for matbåren sykdom, og samtidig beholder optimal ernæringsverdi, tekstur og smak (Subramaniam og Wareing, 2016).

Konservering ved hjelp av tørking, salting og gjæring regnes i dag som de tradisjonelle metodene for å oppnå forlenget holdbarhet på mat. I 1920-årene skjedde det en utvikling, og hermetisering og frysing ble introdusert. Starten på kjemiske tilsetningsstoffer i mat ble igangsatt i forbindelse med krydderhandel og ble i utgangspunktet brukt for å maskere uønskede smaker i forringet mat, men ble raskt en metode for konservering ved innføring av nye smaker i flere ulike næringsmidler (Stiles, 1996). I tillegg til bruk av sukker, salt og røyking, bruker industrien nitritt, sulfider, parabener, samt organiske syrer til preservering (Stiles, 1996; Gould, 1996). I senere tid har bruk av salt og sukker for reduksjon av vannaktiviteten (a_w) blitt mindre populært på grunn av konsumenters ønske om å spise mat som er mindre prosessert, er fri for kunstige tilsetningsmidler og som er av samme høye kvalitet (Gould, 1996). Milde konserveringsteknikker kan imidlertid under riktige forhold kontrollere mikrobiotaen i maten til en viss grad, da ved hjelp av barriereteknologi (Smid og Gorris, 1999).

2.4.1 Barriereteknologi

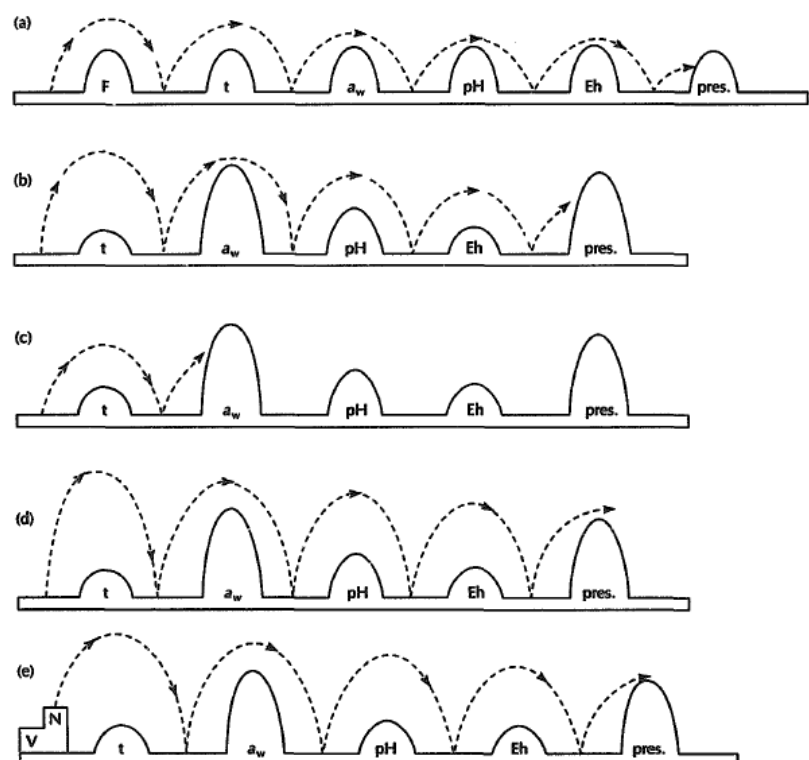
Barriereteknologi eller hinderteknologi er et konsept utviklet av Lothar Leistner kalt «The hurdle effect» (Leistner, 1994; Singh og Shalini, 2016) og skal føre til en sikker, stabil, næringsrik, smakfull og økonomisk produksjon av mat. Teknologien innebærer bruk av to eller flere ulike konserveringsfaktorer (barrierer) som etablerer en serie med milde konserverende

metoder, som til sammen har som mål å hemme eller forhindre vekst av mikroorganismer i produktet (Leistner og Gorris, 1995).

De vanligste konserveringsmetodene som benyttes som barrierer er senkning av vannaktivitet (a_w) og forsuring (senkning av pH), som blant annet innføres ved produksjon av kaldrøkt laks. Regulering av temperatur (høy eller lav), konserveringsmidler (sulfitt, nitritt og sorbat), og konkurrerende mikrobiota (eks. melkesyrebakterier) er også kjente metoder (Leistner, 2000; Singh og Shalini, 2016). Konservering kan ha både en positiv og negativ effekt, og vil ikke alltid gi den ønskede effekten alene. Et eksempel på dette kan være konservering ved hjelp av kjøling til lav temperatur. Her kan kvaliteten på enkelte matvarer forringes ved den temperaturen som hemmer sykdomsfremkallende bakterier, mens en litt høyere temperatur vil kunne være gunstig for en forlenget holdbarhet (Leistner, 1994). Det er her hinderteknologien kommer inn. Hvis intensiteten til en barriere er for høy, må den senkes. Ved å tilføre flere barrierer kan konserveringsmetodene holdes i et område som er optimalt for produktet og som samtidig øker den totale kvaliteten for sikkerhet og kvalitet (Leistner, 2000).

Leistner og Gorris (1995) gir et godt bilde av «The hurdle effect» som illustrert i figur 3. Her vil produktet være mikrobielt stabilt på grunn av barrierene som er satt sammen for det gitte produktet. De ulike barrierene har sjeldent den samme intensiteten.

Eksempel (b) viser et bilde av totalt 5 barrierer (temperatur, vannaktivitet (a_w), forsuring (pH), lavt redox-potensiale (Eh) og konserveringsmidler (pres.)). Her



Figur 3 Oversikt over ulike barrieremuligheter i "the Hurdle effect". Barrierene består av sammensetninger av konserveringsmetoder som høy temperatur under prosessering (F) temperatur (t), vannaktivitet (a_w), forsuring (pH), lavt redokspotensiale (Eh) og konserveringsmidler (pres.) kilde: (Leistner og Gorris, 1995)

er « a_w » og «pres» satt som hoved barrierer og de resterende 3 mindre hindringer. Hvis det i utgangs- punktet er et lavt antall mikrobiota til stede i produktet, er få barrierer med en lavere intensitet nok til å forhindre videre vekst som vist i eksempel (c). Et større antall mikroorganismer vil igjen kunne kreve et større antall barrierer med høyere intensitet for å forhindre at mikroorganismene overkommer barrierene som vist i eksempel (d).

2.4.2 Røyking av laks

Røyking benyttes hovedsakelig for å endre sensoriske kvaliteter i produktet i form av smak, farge og aroma på produktet (Visciano *et al.*, 2008). Prosessen har konserverende effekt på grunn av salting og tørking, i tillegg til den antimikrobielle aktiviteten til enkelte røykkomponenter (karboksylsyrer, fenoler og formaldehyd) (Suñen, Aristimuño og Fernandez-Galian, 2003; Visciano *et al.*, 2008). Fenoler er naturlige komponenter og er kjent for å inneha en antimikrobiell effekt ved at den forstyrrer den cytoplasmiske membranen hos bakterier og får den til å lekke intracellulær væske (Lingbeck *et al.*, 2014).

Den vanligste røykemethoden benyttet for røyking av laks er kaldrøyking. Røykeprosessen involverer pyrolyse av treflis, som er med på å danne polysyklisk aromatiske hydrokarboner (PAH), en gruppe kjemiske stoffer som produseres ved forbrenning av organisk materiale (Valø, Jakobsen og Lerfall, 2020; Hattula *et al.*, 2001). Produksjon av PAH er miljømessig sett ikke særlig gunstig. Avfallsstoffer slippes ut i luft og vassdrag og anses å være kreftfremkallende (Hattula *et al.*, 2001; Visciano *et al.*, 2006). Innholdet av PAH i produktet kan imidlertid begrenses ved bruk av indirekte røyking ved hjelp av en ekstern røykgenerator eller ved bruk av rensert, kondensert røyk (røyksyre-kondensat) (Visciano *et al.*, 2008).

Bruk av røyksyre-kondensat for dens antimikrobielle -og aromatiske egenskaper er en nyskapende metode som er flittig brukt ved produksjon av røykte kjøtt- og fjærkreprodukter (Gedela *et al.*, 2007; Lingbeck *et al.*, 2014; Valø, Jakobsen og Lerfall, 2020). Bruken av den i forbindelse med røyking av sjømat for konsum er imidlertid ikke like godt dokumentert (Valø, Jakobsen og Lerfall, 2020). Røyksyre-kondensat er antimikrobielt grunnet dens innhold av karboksylsyrer, fenoler og organiske syrer. Den har vist å ha hemmende effekt i form av en

forlenget lag- fase på både gram-positive og gram- negative bakterier. (Lingbeck *et al.*, 2014; Milly, 2003)

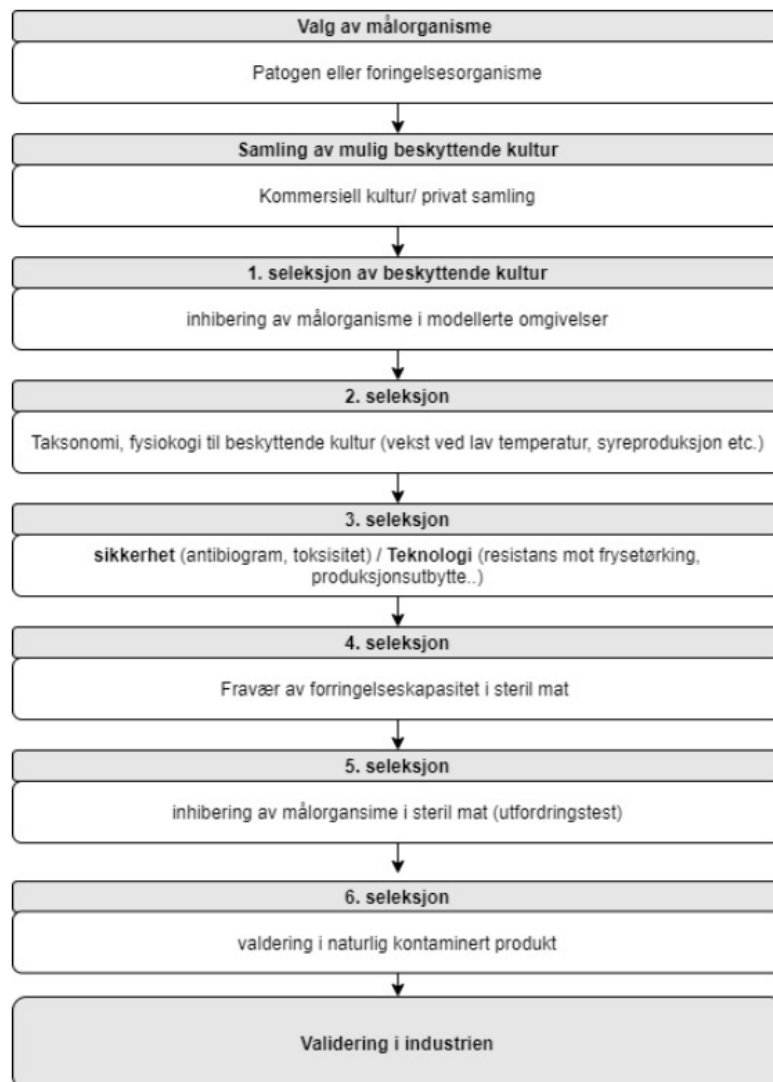
Bruk av røyksyre kondensat krever mindre tid, samt mengde og konsentrasjon er lettere å kontrollere enn ved tradisjonell røyking (Lingbeck *et al.*, 2014). Røyken gir ønsket smak og aroma, og er i tillegg mer miljøvennlig enn tradisjonelle røykemetoder. (Lingbeck *et al.*, 2014) Siden røykaromaen dannes fra røyk som er fraksjonert og renses, anses den av *Helse- og omsorgsdepartementet*, fattet i *aromaforskriften* som helsemessig tryggere en bruk av tradisjonelle metoder (Lovdata, 2019a)

Flere studier har gitt positive resultater når det kommer til bruk av røyksyre kondensat i sjømatprodukter. Hattula *et al.* (2001) undersøkte blant annet forskjellen mellom tradisjonell røyking og bruk av røyksyre kondensat, og konkluderte med at innholdet av PAH i produktet tilsatt kondensat var adskillig lavere enn ved tradisjonell røyking. En studie av Valø, Jakobsen og Lerfall (2020) fant i tillegg ut at kaldrøkt laks produsert med røyksyre kondensat hadde en inhiberende effekt på totalt kimtall og melkesyrebakterier. *Listeria monocytogenes* ble også hemmet (da i lave konsentrasjoner i produkt) i laks tilsatt røyksyre kondensat inkubert ved 37 °C i en studie av Gram (1991).

2.4.3 Biokonservering

Biokonservering er en naturlig måte for å forlenge holdbarheten, sikre mattryggheten og forhindre degradering av næringsinnhold og sensoriske aspekter til ulike matvarer, ved å tilsette mikroorganismen og/ eller deres antimikrobielle komponenter (Ghanbari *et al.*, 2013). Dette kan gjøres ved å tilsette rasktvoksende stammer direkte i produktet, tilsette rensede og klargjorte komponenter fra mikroorganismen eller tilsette en mesofil bakterier som en sikkerhet i tilfelle brudd på kjølekjeden (Stiles, 1996). Det å finne en god mikroorganisme som egner seg til biokonservering krever mye forarbeid. Leroi *et al.* (2015) oppsummerer strategien for utvelgelsen av den beskyttende kulturen i 9 trinn illustrert i figur 4.

Trinn 1. består av å identifisere den målorganismen man ønsker å hemme, noe som er lettere for patogene organismer enn for forringelsesmikrobiota da disse ofte er flere og ukjente i det gitte produktet. Trinn 2 er et oppsett av et utvalg beskyttende kulturer man ønsker å teste før den første screeningen trer i kraft i trinn 3 (1. seleksjon). Trinnet er basert på inhibering av målorganismen ved hjelp av den beskyttende kulturen i kontrollerte omgivelser. Eksempler på dette kan være testing i buljong, eller ved diffusjonstesting på



Figur 4 Trinnene i utvelgelsen av beskyttende kultur til bruk i biokonservering. figur: egen. Innhold oversatt fra Leroi et al (2015)

agar-plater som inneholder målorganismen alene og spotter fra inkubering i co-kultur. Her må det selektive mediet være spesifikt utvalgt da det kan ha påvirkning på et endelige resultatet. Trinn 4. (2. seleksjon) går på taksonomi og testing av den beskyttende kulturen. Ved bruk av biokonservering i for eksempel røykalaks, som oppbevares ved lavere temperaturer, er det avgjørende at den beskyttende kulturen har evnen til å vokse ved like betingelser.

Syreproduksjon kan også være en faktor. Trinn 5 (3. seleksjon) omhandler sikkerhet. Her undersøkes det om stammen produserer giftstoffer, om den er resistent mot antibiotika og invasivitet. Teknologiske data undersøkes også, som for eksempel resistens mot frysetørking og produksjonsutbytte. Videre må den beskyttende kulturen bevise at den ikke forringer næringsmidlet. Dette gjøres ved testing i steril mat (4. seleksjon). 5. seleksjon går ut på å teste

den beskyttende kulturens hemmende effekt mot målorganismen ved inokulering i en steril matmatriks før den til slutt testes i naturlige omgivelser i produkt. Ved gode resultater tas testingen videre og introduseres til industrien. Flere studier på sjømat har helt siden 90-tallet blitt utført på et utvalg bakterier som kan være tilstede i produktet i store mengder uten å endre dens sensoriske kvalitet, og i tillegg ha antimikrobielle egenskaper (Leroi, 2010). Melkesyrebakterier har et stort potensiale for bruk i biokonservering da de naturlig dominerer mikrobiotaen i mange ulike næringsmidler (Ghanbari *et al.*, 2013). De har blant annet vist seg å være den dominante mikrobiotaen i kjølt, vakuum -og MAP pakket fisk og har evnen til å produsere et bredt spekter av antimikrobielle komponenter som blant annet organiske syrer, fettsyrer, diacetyl og bakteriosiner (Wiernasz *et al.*, 2017; Ghanbari *et al.*, 2013).

2.5 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier (LAB) er en gruppe gram- positive (G+) bakterier bestående av ikke-sporedannende, kokker eller staver. Stammer assosiert med mat består av slektene *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* og *Vagococcus* (Stiles og Holzapfel, 1997) Disse artene tilhører riket *Bacteria*, phylumet *Firmicutes/ Actinomyces*, klassen *Bacilli* og orden *Lactobacillales* (Calo-Mata *et al.*, 2008).

Taksonomien har i nyere tid resultert i drastiske endringer i melkesyrebakterienes nomenklatur. Endringene baserer seg på kjemotaksonomiske og fylogenetiske studier hvor molekylære egenskaper som blant annet mol % G + C- innhold (guanin og cytosin) i DNA er blitt viktige verktøy (Stiles og Holzapfel, 1997). Studiene viser at melkesyrebakterier (laktikere) fylogenetisk tilhører clostridial- grenen (*firmucutes*) av gram-positive bakterier som har < 55 % mol % G + C innhold. Disse skiller seg imidlertid fra de probiotiske melkesyrebakteriene (bifidobacterium) som har et innhold på > 55 mol% G + C og tilhører grenen *Actinomyces* som er den nest største grenen til gram- positive bakterier (Stiles og Holzapfel, 1997; Calo-Mata *et al.*, 2008; Vinderola *et al.*, 2019).

Melkesyrebakterier forekommer i mange ulike økosystemer og finnes i både jord, vann, planter og dyr (Calo-Mata *et al.*, 2008). De danner melkesyre ved fermentering av karbohydrater og er ansvarlige for flere fermenteringsprosesser i ulike næringsmidler. Eksempler på fermenterte produkter er kefir, syltede grønnsaker, surdeigsbrød og rakfisk (Vergès, 2018). Bakteriene er også påvist i ikke-fermenterte produkter som frukt, grønnsaker, kjøtt, melk og korn (Calo-Mata *et al.*, 2008; Stiles, 1996). Det at bruken av melkesyrebakterier i mat ikke har gitt noen negativ helseeffekt, men tvert om kan være helsefremmende (i form a probiotika), har ført til at de har fått GRAS-status (Generally recognized as Safe) (Smid og Gorris, 1999, s. 293-294; Stiles, 1996). Dette betyr at bakterien er gransket av eksperter og godkjent til overnevnte formål i FDA (Federal Food, Drug and Cosmetic Act- loven) (FDA, 2019).

2.5.1 Bruk av melkesyrebakterier til biokonservering

Melkesyrebakteriene har mange egenskaper som favoriserer bruken av dem som biokonserverende faktor. De er antatt trygge å konsumere, har evnen til å overleve under anaerobe forhold og MAP, tolerere høye saltkonsentrasjoner og kan vokse ved kjøleskapstemperatur (Dalgaard, Paw *et al.*, 2003; Calo-Mata *et al.*, 2008). Vannaktiviteten (a_w) i kaldrøkt laks ligger på mellom 0,96 og 0,98 (Løvndal, 2015). Det er derfor avgjørende av stammene som skal benyttes tolererer a_w i produktet. a_w - kravet til melkesyrebakteriene er ikke nøyaktig definert, men praktisk arbeid gjort i forbindelse med produksjon og lagring av mat har ført til en erfaringsmessig etablering av a_w med minimale grenser for vekst på mellom 0,91 til 0,94 (Troller og Stinson, 1981).

Når det kommer til toleransen ovenfor røyk eller røyksyre kondensat kan melkesyrebakterier oppføre seg ulikt ved eksponering i forbindelse ved eksempelvis kaldrøyking av laks. Det kan være varierende mottakelighet blant de ulike stammene, noe som gjør det vanskelig å definere mekanismene som eventuelt er ansvarlige for hemming eller hvilke stammer som tolererer de ulike komponentene (Sofos, Maga og Boyle, 1988; Lingbeck *et al.*, 2014).

Melkesyrebakterier er konkurrerende organismer som kan senke pH i produktet, og produsere antimikrobielle komponenter innenfor et bredt inhiberende spekter (organiske syrer, hydrogenperoksid og bakteriosiner) (Stiles, 1996). Det er disse antimikrobielle komponentene

som gjør biokonservering ved bruk av melkesyrebakterier mulig. Ved å tilsette egnede stammer som en «beskyttende kultur» i et næringsmiddel, kan dens vekst og egenskaper utkonkurrere andre uønskede mikroorganismer og følgelig forlenge holdbarheten, uten å endre produktets sensoriske egenskaper. (Smid og Gorris, 1999, s. 294)

Selv om melkesyrebakterier er vidt utbredt som startkultur, er bruken av dem som beskyttende kultur, i ferske- og spiseklare fiskeprodukter, eksempelvis sushi, røyket- og gravet laks, fortsatt under utvikling (Leroi *et al.*, 1998). Bruk av melkesyrebakterier i fisk ble lenge sett bort fra, da de teoretisk sett ikke forekommer naturlig i produktet (Ghanbari *et al.*, 2013). Årsaken til dette er antatt å være fiskens lave innhold av sukker, høye pH post mortem i muskulaturen, og den lave temperaturen i tempererte farvann. Sistnevnte punkter vil derimot favorisere psykrotolerante, gram negative bakterier, eksempelvis *Shewanella*, *Photobacterium* og *Pseudomonas* (Leroi, 2010). Til tross av disse ugunstige forholdene har flere arter som *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, og *Lactobacillus* allikevel blitt isolert i fersk- og spiseklar sjømat før og under lagring (tabell 1) (Leroi, 2010; Ghanbari *et al.*, 2013; Truelstrup Hansen, Røntved og Henrik Huss, 1998).

Tabell 1 Oversikt over melkesyrebakterier isolert fra ferske- og spiseklare sjømatprodukter

Produkt	Melkesyrebakterier	Kilde
Kaldrøkt laks	<i>Carnobacterium divergens</i>	(Leroi <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	(Paludan-Müller <i>et al.</i> , 1998; González-Rodríguez <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Lactobacillus curvatus</i>	(Hansen og Huss, 1998; González-Rodríguez <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Leuconostoc gelidum/ mesentorides</i>	(Hansen og Huss, 1998)
	<i>Carnobacterium ssp</i>	(Jeppesen og Huss, 1993)
	<i>Enterococcus spp</i>	(Leroi <i>et al.</i> , 1998; González-Rodríguez <i>et al.</i> , 2002)
Gravet laks	<i>Leuconostoc ssp</i>	(Jeppesen og Huss, 1993; Leisner <i>et al.</i> , 1994)
	<i>Lactobacillus sake</i>	(Jeppesen og Huss, 1993)
	<i>Enterococcus</i>	(Dalgaard, Paw <i>et al.</i> , 2003)
Sushi	<i>Weissella ssp</i>	(Hoel, Jakobsen og Vadstein, 2017; Byun <i>et al.</i> , 1997)
	<i>Lactobacillus ssp</i>	(Hoel, Jakobsen og Vadstein, 2017)
	<i>Carnobacterium ssp</i>	(Hoel, Jakobsen og Vadstein, 2017)

Det er ved flere anledninger funnet høyere konsentrasjoner av melkesyrebakterier i fiskeprodukter lagret over tid, som ikke har ført til endringer i produktets sensoriske kvalitet. En artikkel av Leroi *et al.* (1998) sier blant annet at upubliserte studier fra deres laboratorier viser at antallet levedyktige melkesyrebakterier kunne bli svært høyt ($10^7 - 10^8$ kde/ml) uten at den kaldrøkte laksen ble forringet. Videre viste resultatene fra samme artikkel at gram-negative bakterier dominerte den vakuuerte, kaldrøkte laksen de første 14 dagene, men at stammer av *Carnobacterium* til slutt ble den dominerende mikrobiotaen (Leroi *et al.*, 1998). Bruk av melkesyrebakterier (*C. maltaromaticum*, *C. inhibens*, *L. Piscum*) har ved flere studier gitt lovende resultater når det kommer til inhibering av uønskede mikroorganismer (Wiernasz *et al.*, 2017; Wiernasz *et al.*, 2020; Matamoros *et al.*, 2009).

Allikevel er det ikke alle som er like godt egnet. Enkelte melkesyrebakteriearter kan produsere metabolitter som fører til uønskede sensoriske endringer i næringsmidlet på samme måte som SSO (Lyhs, 2002; Hansen, Gill og Hussa, 1995; Hansen og Huss, 1998). En studie av Dalgaard, Paw *et al.* (2003) fant blant annet at *Enterococcus* spp og *Carnobacterium* spp. var den dominerende mikrobiota assosiert med kokt og marinert MAP-pakkede reker. Sistnevnte stamme har også vist seg å være den dominerende forringelsesmikrobiota i tint MAP-pakket laks, hvor den blant annet sto for produksjon av biogene aminer av typen tyramin (Emborg *et al.*, 2002). Produksjon av større mengder tyramin har også blitt dokumentert i vakuumpakket, sukkersaltet fisk, da av melkesyrebakteriene *C. piscicola* og *Weissella viridences* (Jay, Loessner og Golden, 2008).

Siden enkelte stammer av melkesyrebakterier har vist seg å være en del av forringelsesmikrobiotaen i ulike typer fisk- og sjømat, og at melkesyrebakterier generelt har evnen til å vokse i mange ulike typer produkter er det derfor en ide å benytte stammer som finnes naturlig til stede i produktet og bruke dem som beskyttende kultur i samme type produkt. Den er da tilpasset miljøet produktet er i under lagring (temperatur, pH, pakkemetode etc.) og har dermed større mulighet for å lykkes som biokonserverende faktor uten at kvaliteten påvirkes i negativ retning (Jeppesen og Huss, 1993).

2.6 Antimikrobielle komponenter produsert av melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier kan fungere som en biokonserverende faktor ved blant annet konkurransedyktig vekst hvor melkesyrebakterien ender opp som den dominerende floraen i produktet (Leroi *et al.*, 1998). De kan i tillegg som nevnt ovenfor produsere flere antimikrobielle komponenter hovedsakelig organiske syrer som melkesyre, bakteriosiner, peroksider, CO₂ og fettsyrer (Stiles, 1996).

2.6.1 Organiske syrer

I flere århundrer har melkesyrebakterier blitt benyttet som biopreserverende mikroorganismer ved fermentering av melk, kjøtt, surdeig og grønnsaker (Crowley, Mahony og van Sinderen, 2013). Melkesyrebakterier er i tillegg kjent for å tolerere miljøer med svært lav pH, og kan overleve under forhold andre bakterier ikke er i stand til å gjøre (Muhialdin *et al.*, 2011). Ved produksjon av organiske syrer begrenser de i tillegg vekst av både sopp og andre sykdomsfremkallende og forringelsesmikrobiota (Crowley, Mahony og van Sinderen, 2013).

Organiske syrer er et av hovedproduktene til melkesyrebakterier under fermentering av karbohydrater og består hovedsakelig av melk- og eddiksyre (Muhialdin *et al.*, 2011). Disse har som melkesyrebakteriene fått «GRAS» status og anses derfor som trygge (Rusmana, Suwanto og Mubarik, 2020). Syrene er effektive ved bruk i konservering fordi de i tillegg til å ha antibakteriell virkning, også kan fungere som forsurner, og senker den totale pH-en i produktet (Rusmana, Suwanto og Mubarik, 2020). Piard og Desmazeaud (1991) forklarer at mekanismen bak den antimikrobielle effekten er at syren diffunderer gjennom membranene til målorganismen i deres hydrofobe ikke-dissosierte form. Dette gjør at den intracellulære pH i organismen reduseres og dermed stopper den metabolske aktiviteten (Piard og Desmazeaud, 1991).

En studie av Ouattara *et al.* (1997) som tar for seg ulike organiske syrs evne til å hemme vekst av seks forringelsesorganismer *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sake*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Serratia*

liquefaciens) konkluderte med at eddiksyre var den syren med mest hemmende effekt etterfulgt av sitronsyre, melkesyre, og propionsyre. Alle syrene ga en hemmende effekt på en eller flere av de overnevnte forringelsesorganismene i fullstendig eller mindre grad (Ouattara *et al.*, 1997).

2.6.2 Bakteriosiner

Bakteriosiner er en heterogen gruppe av små ribosomal syntetiserte antimikrobielle peptider eller proteiner som produseres av både gram- positive og gram- negative bakterier (Muhialdin *et al.*, 2011). Det er disse peptidene og proteinene som kan ha evnen til å drepe andre smalsprektrede (relaterte), eller bredsprektrede (ikke-relaterte) mikroorganismer som en del av bakteriens forsvarssystem i konkurransen om plass og ressurser (Yang *et al.*, 2014). Hvor god hemmende effekt bakteriosiner har påvirkes blant annet av type, og antallet mikroorganismer tilstede, temperatur og pH (Castro *et al.*, 2011). Det er blant annet dokumentert at lav pH kan favorisere bakteriosinproduksjon og videre øke dens aktivitet (Rodgers, 2001). I den gram-positive gruppen er melkesyrebakterier ansett som en typisk produsent av en rekke ulike bakteriosiner av ulik størrelse, struktur og antimikrobielle egenskaper som har vist seg å ha hemmende effekt på forringelsesmikrobiota i lite prosesserte og spiseklare produkter (Yang *et al.*, 2014; Cotter, Hill og Ross, 2005). Bakteriosinene Nisin og Pediocin (PA1) er allerede mye brukt i forbindelse med osteproduksjon og andre meieriprodukter (Cotter, Hill og Ross, 2005). Disse har og vist seg å ha hemmende effekt mot *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridier*, *Lactobacillus* og *Bacillus spp* (Cotter, Hill og Ross, 2005; Calo-Mata *et al.*, 2008).

Bakteriosiner som benyttes til preservering av mat er foreløpig bare produsert av melkesyrebakterier (Cotter, Hill og Ross, 2005). Stammer av *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium* og *Enterococcus* er kjent for sin produksjon av bakteriosiner. Blant disse er stammer av *Carnobacterium* og *Enterococcus* isolert fra fisk mulige kandidater for bruk i biokonservering av sjømat (Calo-Mata *et al.*, 2008). Årsaken til dette er at de få marine bakteriosinene isolert fra sjømat hovedsakelig er isolert fra disse (Nes, Diep og Holo, 2007; Bakkal, Riley og Robinson, 2012). *Carnobacterium* kan produsere bakteriosiner ved lave temperaturer, høye saltkonsentrasjoner og har i tillegg en lav surningskapasitet (Bakkal, Riley

og Robinson, 2012). Stammen har i tillegg vist å ha en hemmende effekt mot *Listeria monocytogenes* i kald røkt laks (Brillet *et al.*, 2005).

2.7 Mikrobiologiske analyser

16S- rRNA analyse

16S ribosomal RNA- gen- sekvenser er en av de vanligste genetiske markørene identifisere den taksonomiske sammensetningen og det fylogenetiske mangfoldet av bakterier i miljøprøver (Langille *et al.*, 2013). Årsaken er at dette «husholdningsgenet» er til stede i nesten alle bakterier og dens funksjon har ikke endret seg over tid (Janda og Abbott, 2007; Mignard og Flandrois, 2006). Ved sammenligning av et nesten komplett sett av gen- sekvenser kan man studere taksonomi og forhold mellom prokaryote stammer med en likhet på 98,65% (Kim og Chun, 2014). 16S- rRNA gen- sekvenser er ca. 1550 basepar (bp) lang, og inkluderer både faste og variable regioner av nukleotidsekvenser (Mignard og Flandrois, 2006). En metode for identifikasjon er amplifisering av DNA ved hjelp av Polymerase chain reaction (PCR). Under kjøring av PCR benyttes PCR-primere som er rettet mot spesifikke deler av regionen og amplifiserer disse (Jenkins *et al.*, 2012). Det amplifiserte produktet blir videre kjørt i en gel elektroforese for å bekrefte at produktet har riktig størrelse. Produktet sekvenseres ved hjelp av 16s sanger sekvensering, for å få tilgang til organismens genetiske kode (sigmaaldrich, u.å).

Screening av melkesyrebakterier for biokonserverende egenskaper og mikrospotting

Screening er en metode som trekker ut, isolerer og identifiserer en forbindelse eller en gruppe komponenter til stede i en prøve (Muñoz-Olivas, 2004). Dette gjøres med så få trinn som mulig og med minst mulig manipulering av prøven. Målet med screeningen vil være å undersøke en større gruppe mikroorganismer, som i denne oppgaven vil være melkesyrebakterier og deres eventuelt hemmende effekt mot utvalgt forringelsesmikrobiota. (Muñoz-Olivas, 2004) Prosessen beskrives av Wiernasz *et al.* (2017) og foregår kort forklart ved isolering og oppdyrking av melkesyrebakterier og målorganisme i egnet medie, og videre inkubering i

flytende medie ved 15 °C. Kulturene overføres til en 96- brønnsplate tilsatt fiskejuice av laks, (alene og i co-kultur) og inkuberes ved 15 °C i 96 timer før mikrospotting på selektivt medie. En mer nøyaktig beskrivelse av metoden vil bli gjort rede for under material og metode (avsnitt 3.6).

Single Plate Serial Dilution Spotting (SP- SDS) eller «mikrospotting» er en alternativ metode for platespredning av bakteriekulturer som har blitt brukt ved et mangfold laboratorier. Metoden er en miniaturisert platespredning hvor små mengder inokulum av ulike fortynninger av en prøve blir overført (spottet) på en og samme agarplate (Sieuwerths *et al.*, 2008).

Leal, Prates og de Araújo (2019) forklarer forskjellene mellom de ulike metodene ved at man i standard platespredning framstiller bakteriekulturer i flere fortynninger vanligvis mellom 10^1 og 10^7 kde/ml. Der det er vekst er den gyldne regelen at fortynningene må ha tellbare kolonier på mellom 25-250 kde (100 μ l). Videre forklarer Leal, Prates og de Araújo at man ved mikrospotting gjør det mulig å bestemme hvilke fortynning som vil produsere mengden kde som skal vurderes å telles. Mikrospotting vil føre til en besparelse i tid, lønn og materialer siden vanlig platespredning krever til sammen 21 skåler for hvert eksperiment (3 paralleller + en plate for hver fortynning) hvor man med mikrospotting bruker bare tre (3 paralleller) (Leal, Prates og de Araújo, 2019; Thomas *et al.*, 2015).

3. Material og metode

3.1 Preparering av fiskejuice

Produksjon av fiskejuice ble utført i henhold til artikkel Wiernasz *et al.* (2017) med enkelte modifikasjoner nevnt nedenfor. Det ble i oppgaven benyttet 500 gram skinn og beinfri lean back loin (Salma, Norge) per liter vann. Laksen ble skjært opp i terninger, tilsatt avionisert vann og kjørt i foodprosessor på middels hastighet til en jevn masse. Videre ble massen stavmikset til den fikk en grøtete konsistens for å forenkle filtreringsprosessen. Massen ble deretter kokt i ca. 2 minutter og silt gjennom en sil for å skille ut større klumper. Den grøtete massen ble så filtrert gjennom en glasstrakt med foldefilter (Schleicher & Schuell Ref. No.311 647), plassert i en erlendmeyerkolbe (2000 ml) (figur 5).



Figur 5 Tilberedning av fiskejuice. Tv: koking av laksemasse, filtrering av kokt masse (midten) og den ferdige fiskejuicen t.h. (Bilde: Eget)

Fiskejuicen ble fordelt på 500 ml flasker og sterilisert i autoklav (105 °C i 30 minutter) og overført til 50 ml Sarstedt rør. Den ferdige fiskejuicen ble i artikkel Wiernasz *et al.* (2017) frosset ned ved -20°C, men ble her valgt frosset ned ved -45 °C for bedre stabilitet.

Før screening av melkesyrebakterier etter inhiberende egenskaper mot utvalgte målorganismer ble 90 ml fiskejuice tint i romtemperatur og tilsatt 1,5g Natriumklorid (VWR 27810295), 1g D (+) -glukosemonohydrat (Merck 1.08342.1000) og 10 ml fosfatbuffer bestående av 1 M K₂HPO₄ (Merck 1051011000) og 1 M KH₂PO₄ (Merck 1048731000) i et

blandingsforhold tilsvarende pH 6,7. Den berikede fiskejuicen ble sterilisert gjennom et PTFE-filter (0,45µl) og oppbevart i kjøleskapstemperatur (4 °C) før bruk.

3.2 Melkesyrebakterienes vekstegenskaper ved 15 °C

For å kunne benytte melkesyrebakterier som en av flere barrierer for å forlenge holdbarheten til spiseklar fisk og sjømat var det avgjørende at disse også hadde evnen til å vokse ved lav temperatur. Det var derfor ønskelig å teste om et utvalg miljøisolater bestående av 33 stammer fra røkelaks, 23 fra gravlaks og 44 fra sushi fra ulike produsenter for deres vekstegenskaper ved 15 °C. Stammene var oppbevart ved –80 °C.

De ulike melkesyrebakteriene ble dyrket opp på De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS) (Oxoid CM0361) og inkubert anaerobt ved 25 °C i 48 timer. Stammer med lang nølefase ble inkubert videre i til sammen 5 dager. Etter oppdyrking ble en koloni fra hver stamme overført til hvert sitt Sarstedt rør (15 ml) tilsatt 13 ml MRS- buljong (Oxoid CM0359). Rørene ble inkubert ved 15 °C i 24 timer. Videre ble optisk tetthet (OD_{600}) målt to ganger per dag ved hjelp av spektrofotometer (Shimadzu UV 1800 Shimadzu, Tyskland) ved 600 nm, og nullstilt ved bruk av 1 ml MRS-buljong. Prøver med $OD_{600} \geq 0,6$ ble fortynnet i MRS buljong (1/10). Dette ble utført til godt over stasjonærfasen som oppsto etter ca. 120 t.

3.3 Standardisering av bakteriekulturenes cellekonsentrasjon – OD mot kde/ml

Målet med standardiseringen var å kunne dyrke melkesyrebakterier og målorganismer i co-kultur med et tilnærmet likt forholdstall i konsentrasjonen mellom stammene. Ønsket konsentrasjon var 10^8 kde/ml for melkesyrebakteriene og 10^4 kde/ml for målorganismene (Wiernasz *et al.*, 2017). For å oppnå ønsket konsentrasjon og sikre reproduerbare forsøksoppsett måtte det utarbeides en standardkurve for å finne den OD-verdien som tilsvarte ønsket cellekonsentrasjon for melkesyrebakteriene.

For å standardisere prosedyrene ble det valgt ut to melkesyrebakterier fra hvert sjømatprodukt på til sammen seks stammer for utarbeidelse av en standardkurve (OD mot kde /ml). En koloni fra hver stamme ble overført til rør tilsatt MRS-buljong og oppformert ved 25 °C frem til stagnering av vekst. Prøver til OD-måling og kimtallbestemmelser ble tatt ut en gang per døgn. To ti-folds fortynningsserier av hver kultur ble sådd ut på MRS agar for beregning av kimtall. Skålene ble deretter inkubert anaerobt ved 25°C og talt etter 2 og 3 døgn. Målet var at standardkurven kunne benyttes til å fastsette startkonsentrasjonen for melkesyrebakteriene basert på OD-målinger.

Trendlinjer for OD mot kimtall (for punkter i eksponentiell fase) for stammene ble plottet i et linjediagram og gjennomsnittlig OD-verdi for startkonsentrasjon $X = 5 \cdot 10^8$ kde/ml ble beregnet ved å løse ligningen $Y = Ax + B$ i grafen for hver av stammene. Et avvik på 10 % ble også inkludert. Oppdyrking og standardisering av vekst for melkesyrebakterier ble gjort i samarbeid med to andre masterstudenter (Astrid Lillebjerka og Åshild T. Moen).

For målorganismene *S. putrefaciens* (CCUG 13452 DT) og *P. fluorescens* (CCUG 1253) ble det valgt å benytte en cellekalkulator (Labtools, u.å.) for standardisering av cellekonsentrasjon, noe som ga en konsentrasjon på $8 \cdot 10^8 \pm 10\%$ kde/ml ved OD 1,0.

3.4 Utvelgelse av melkesyrebakterier til screening

Det ble av de opprinnelig 93 melkesyrebakteriene som vokste ved 15 °C valgt ut 35 stammer som skulle benyttes videre i forsøket. Grunnlaget for utvelgelsen var resultater av Lillebjerka (2019) og resultater fra upublisert materiale av Ph.d. stipendiat Jelena Stupar. Enkelte stammer hadde i tidligere forsøk gitt full inhibering av *Listeria innocua* og *Listeria monocytogenes*, mens andre har før til en reduksjon av *Escherichia coli* og *Staphylococcus aureus*. Dette viser at melkesyrebakteriene har hatt ønsket resultat mot både gram- positive, og gram- negative patogener. Det var derfor ønskelig å teste stammene på utvalgte Gram-negative forringelsesmikrobiota i sjømat, for å sjekke deres antimikrobielle spekter ytterligere.

3.5 Test av potensielt selektive medier for melkesyrebakterier og målorganismer

I forkant av screeningen etter inhiberende egenskaper hos melkesyrebakteriene ble de ulike mediene som skulle benyttes i forsøket testet. Mediene ble testet med både melkesyrebakterier og målorganismer for å dokumentere at disse ga optimale vekstforhold for den aktuelle stammen, men også for å kunne selektere eller differensiere mellom de ulike bakterieartene som skulle dyrkes i co-kultur under screeningen.

3.5.1. Melkesyrebakterier

De 35 utvalgte melkesyrebakteriene (fra frossen tilstand) ble strøket ut på MRS (Oxoid CM0361) og M17- agar (Oxoid CM0785) og inkubert anaerobt i 48 timer ved 25 °C. Stammer med dårlig vekst ble inkubert videre i til sammen 5 dager. Årsaken til testing av to ulike typer agar var lang lag-fase og lite kolonidannelse hos enkelte stammer på MRS under standardiseringstrinnet. Etter oppdyrking ble en koloni fra hver stamme podet over til nye plater for å sikre god vekst. Skålene ble inkubert anaerobt ved 25 °C 48 timer før avlesning.

3.5.2 Pseudomonas fluorescens

For *Pseudomonas fluorescens* (CCUG 1253) ble Pseudomonas agar base (PAB) (Oxoid CM559) tilsatt C-F-C supplement (Oxoid SR0103) testet som selektivt medie. *P. fluorescens* ble på forhånd oppformert på Brain Heart infusion agar (BHI) (Oxoid CM1136) under 48 timers anaerob inkubering ved 30 °C. De 35 melkesyrebakteriene ble oppformert på MRS under anaerob inkubasjon ved 25 °C før melkesyrebakterier og målorganismer ble strøket ut på PAB og inkubert aerobt ved 30 °C i 48 timer. Det forventes ingen forekomst av vekst på skåler tilsatt melkesyrebakterier.

3.5.3 Shewanella putrefaciens

For *S. putrefaciens* (CCUG 13452 DT) ble Jernagar (JA) (Oxoid CM0964) tilsatt 0,04% L-cystein benyttet som selektivt- eller differensielt medie og videre gi sorte kolonier ved vekst. Ved aerob inkubering vil svovelkilden som er til stede i mediet (fra L-cystein) reduseres til

hydrogensulfid og tilgjengeliggjøre svovelatomer stammen benytter i metabolismen. Sorte kolonier dannes ved at produsert H₂S reagerer med jernet i mediet og danner jernsulfid (FeS) (NMKL, 2006).

For å utelukke at melkesyrebakteriestammene ikke dannet sorte kolonier på JA, ble de 35 stammene testet for å utelukke at dette var tilfelle. Etter oppformering av *S. putrefaciens* på BHI- buljong ved 25°C og melkesyrebakterier i MRS-buljong ved 15°C i 48 timer ble OD målt på et tilfeldig utvalg melkesyrebakterier for å konstatere vekst. Videre ble alle 35 melkesyrebakteriene, samt målorganismen som referanse, fortynnet ned til minus 4-fortynning (9 ml peptonvann og 1 ml prøve), før 100 µl målorganismer og hver melkesyrebakteriestamme ble platet ut på 2 paralleller med jernagar tilsatt 0,04% L-cystein (Sigma -Aldrich W32635-100G). Skålene ble inkubert aerobt ved 25 °C i 48 timer, og kvantifisert.

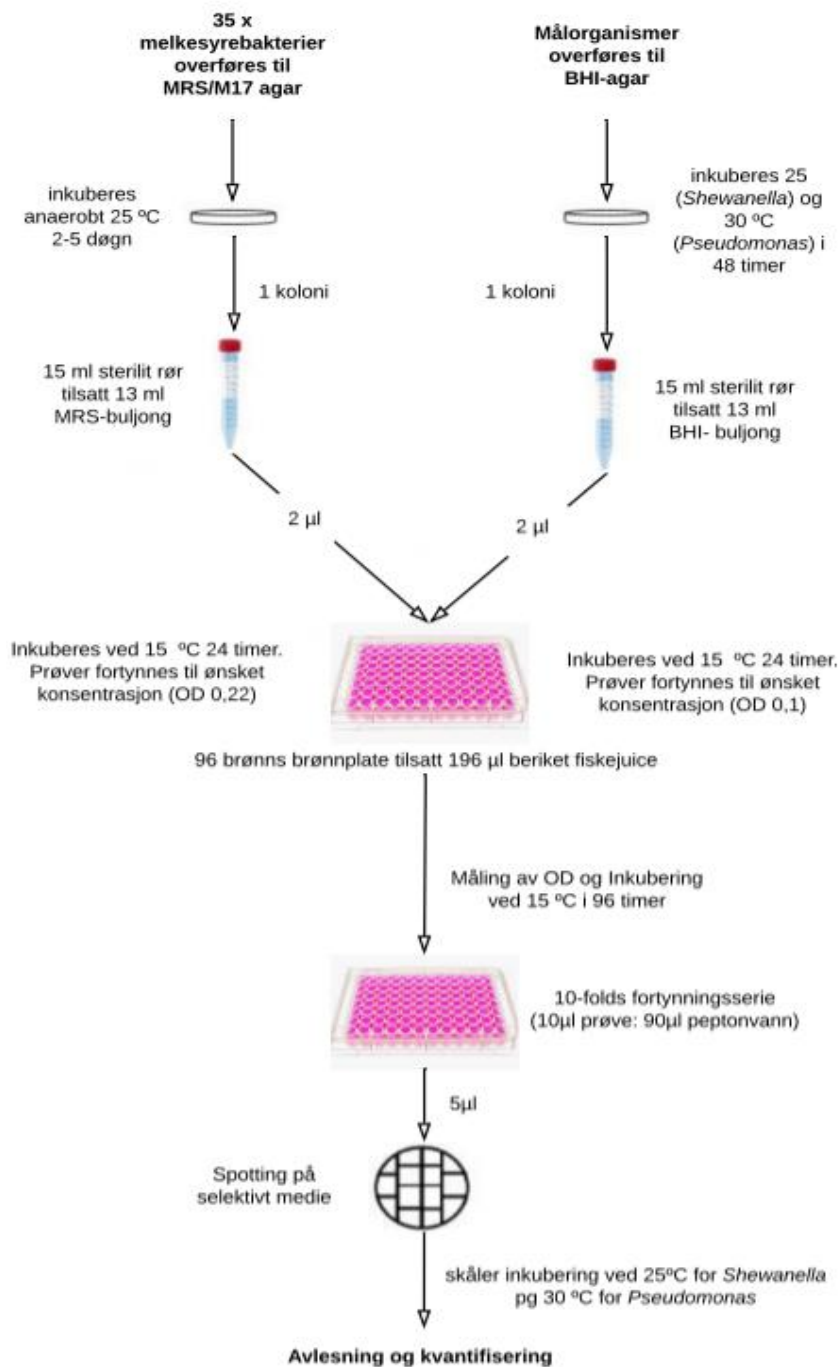
3.6 Screening av melkesyrebakteriers inhiberende effekt på utvalgte forringelsesmikrobiota

Målet med oppgaven var å screene et utvalg på 35 melkesyrebakterier (mulig beskyttende kultur) isolert fra sushi, røyka- og gravet laks fra ulike produsenter (A-H), for deres inhiberende egenskaper mot *S. putrefaciens* og *P. fluorescens* (målorganismer). Metoden ble utført som beskrevet i Wiernasz *et al.* (2017) og illustrert i figur 6.

Melkesyrebakteriene ble dyrket opp på MRS- agar (anaerobt ved 25 °C) og målorganismene (*S. putrefaciens* og *P. fluorescens*) ble dyrket opp på JA og PAB på henholdsvis 25 og 30 °C i 48 timer. En koloni fra hver stamme ble overført til hvert sitt rør tilsatt 13 ml MRS buljong for melkesyrebakterier og BHI-buljong for målorganismer. Rørene ble inkubert ved 15 °C i 24 timer.

Videre ble OD målt på samtlige bakteriekulturer. Det var avgjørende at kulturene besto av 10⁸ kde/ml for melkesyrebakteriene og 10⁴ kde/ml for målorganismer (Wiernasz *et al.*, 2017). For

å oppnå ønsket celletetthet ble melkesyrebakteriene fortennet ned til OD 0,22. For målorganismene ble kulturen fortennet til OD 0,1 som tilsvarer $8 \cdot 10^7$ kde/ml og videre fortennet 1:1000 (OD 0,001) til ønsket konsentrasjon på $8 \cdot 10^4$ kde/ml. Fortynninger ble utført ved bruk av MRS- og M17- buljong for melkesyrebakterier og BHI- buljong for begge målorganismene.



figur 6 Trinnvis beskrivelse av screening etter inhiberende egenskaper mot forringelsesorganismene *Shewanella putrefaciens* og *Pseudomonas fluorescens* (flytskjema: eget, modifisert av Lillebjerka 2019)

Neste steg i screeningen var å overføre melkesyre bakterier og målorganismer over i en 96-brønnsplate tilsatt beriket fiskejuice som visualisert i figur 7. 200 µl Fiskejuice (FJ) ble tilsatt i rad 1 og 11 som negativkontroll, og 196 µl ble tilsatt rad 2-10. Da det var avgjørende at alle brønnene inneholdt samme væskemengde (200 µl) ble det tilsatt 2 µl LAB + 2 µl BHI i rad nr. 3,5,7 og 9, og 2 µl LAB + 2 µl målstamme i brønn 4,6,8 og 10. 2 µl målorganisme og 2 µl MRS ble tilsatt i brønn 2 som positivkontroll. Bølgelengde for brønnplaten ble målt ved hjelp av BioTek PowerWave XS Microplate spektrofotometer (BioTek, USA), og brønnplaten inkubert ved 15 °C i 96 timer.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Fiske juice (FJ)	Target 196 µl FJ + 2 µl MRS 2 µl target	LAB 2 µl LAB+ 2 µl BHI	LAB + Target 2 µl + 2 µl	LAB 2 µl LAB+ 2 µl BHI	LAB + Target 2 µl + 2 µl	LAB 2 µl LAB+ 2 µl BHI	LAB + Target 2 µl + 2 µl	LAB 2 µl LAB+ 2 µl BHI	LAB + Target 2 µl + 2 µl	Fiske Juice (FJ)	tom
A	200 µl										200 µl	
B	200 µl										200 µl	
C	200 µl										200 µl	
D	200 µl										200 µl	
E	200 µl										200 µl	
F	200 µl										200 µl	
G	200 µl										200 µl	
H	200 µl										200 µl	

2- 10 tilsettes 196 µl fiskejuice

Figur 7 Mengdeoppsett for 96- brønnsplate for screening med tilsats av Målorganisme (target) som positivkontroll, fiskejuice som negativkontroll, samt brønner med melkesyrebakterier (LAB) alene og i co-kultur med målorganismen. Oppsettet er beregnet til 8 melkesyrebakteriestammer med 4 paralleller for hver stamme. (ABCD og EFGH)

Etter 96 timers inkubering ble OD målt for å sikre vekst og utelukke eventuell kontaminasjon. En 10- folds fortyningsserie i nye brønnplater ble utført på alle bakteriekulturene alene og i co-kultur (figur 8). Videre ble de ulike skålene som skulle benyttes til spotting tørket i tørkeskap ved 37 °C i ca. 30 minutter for å forhindre at spottene fløt ut. 5 µl av hver fortyning i serien ble spottet i to paralleller (A og B) på PAB, BHI og MRS. Melkesyrebakteriene alene ble spottet på MRS (-3 til -10) (figur 8), målorganismen i co-kultur ble spottet på selektiv agar (PAB eller JA) (-1 til -8), og målorganismen alene ble spottet på både selektiv agar og BHI (-3 til -10 på PAB og -1 til -8 på BHI). Fiskejuicen fungerte som negativkontroll og ble spottet på BHI (-3 til -10). Skålene ble inkubert ved 25 °C i 48 timer, hvorav skåler med melkesyrebakterier på

MRS/M17, ble inkubert under anaerobe forhold. Etter endt inkubering ble resultatet kvantifisert, og konsentrasjon på målorganismen alene og i co-kultur sammenlignet. All vekst over 50 kde/ml ble ansett som overgrodd (Wiernasz *et al.*, 2017).



Figur 8 til venstre: Fortynningsserier utført etter inkubering av melkesyrebakterier og målorganisme alene og i co-kultur ved 15 °C i 96 timer. Til høyre: mikrospotting av melkesyrebakterie ved tilsats av 5 µl prøvemateriale på MRS i fortynningsserie fra -3 til -10. skålene med melkesyrebakterier ble inkubert ved 25 °C i 48 timer (Bilde: eget)

De beregnede kimtallene ble log-transformert og verdiene fra co-kulturen ble sammenlignet med log-verdien for målorganismen dyrket opp på selektivt/differensielt medie alene. Følgende grenseverdier ble valgt: En log reduksjon på < 1,0 indikerte ingen hemmende effekt, en log-reduksjon på mellom 1,0-3,0 gir noe hemming, og verdier på > 3,0 viser en god hemmende effekt mot målorganismen (Wiernasz *et al.*, 2017).

3.6.1 Statistisk analyse

For å undersøke om det var signifikante forskjeller mellom renkultur av målorganisme (på selektivt/differensielt medie) og co-kultur ble det utført en enveis variansanalyse (ANOVA) etterfulgt av Tukey Test ($p < 0,05$) i Statistical Package for the Social Science (SPSS). Det ble også gjennomført en T-test for renkultur av målorganisme på selektivt medie og BHI for å undersøke om det var signifikante forskjeller mellom gruppene. Påviste ulikheter mellom renkultur på selektivt medie og BHI kan ha betydning fordi høyere log på BHI kan indikere hemming av målorganisme på selektivt medie.

3.7 Identifisering av melkesyrebakterier isolert fra spiseklar sjømat

For identifisering ble oppformerte stammer fra screeningprosessen benyttet. En god koloni fra hver skål ble overført til hvert sitt rør tilsatt 500 µl sterilt vann. Prøvene ble vortexet og sentrifugert ved 8000 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet og pelleten tatt vare på for videre bearbeiding bestående av ekstrahering og amplifisering av DNA.

DNA ekstrahering

For DNA ekstraheringen ble pelleten suspendert i 180 µl enzymatisk lysis buffer (av 20mM Tris-Cl, pH 8, 2mM sodium EDTA, 1.2% Triton® X- 100 og Lysosym). Videre ble DNA gjort tilgjengelig ved hjelp av Qiagens «*DNeasy Blood & Tissue Handbook*» og protokollene «*Pre-treatment for Gram- Positive Bacteria*» s. 45 og «*Purification of total DNA from animal tissue (spin column treatment)*» s. 28 fulgt. (Qiagen, 2006) Det ekstraherte DNAet ble oppbevart ved -20 °C.

Polymerase Chain Reaction

Ved kjøring av Polymerase Chain Reaction (PCR) ble 5 µl prøve av fra hver LAB-stamme tilsatt hver sin brønn med 45 µl mastermix som fremstilt i tabell 2. Mengdeforhold ble benyttet i henhold til Qiagens «*Taq PCR Handbook*» (Qiagen, 2010). Det ble i tillegg tilsatt 5 µl nukleasefritt vann og 45 µl mastermix i egen brønn for negativkontroll.

Tabell 2 Oppsett av mastermix for kjøring av PCR (Qiagen 2010)

Reagens	µl/prøve	sluttkonsentrasjon	
10x PCR Buffer	5	1x	(Qiagen: Cat 203205)
dNTP- mix, 10mM	1	200 µM for hver dNTP	(Qiagen: Cat 201900)
338F primer (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')	2	0,2 µM	(Sigma- Aldrich) (Muyzer, de Waal og Uitterlinden, 1993)
1492R primer(5'-ACGGYTACCTTGTTACGACT-3')	2	0,2 µM	(Sigma- Aldrich) (Turner <i>et al.</i> , 1999)
Hot Star taq DNA polymerase (enzym)	0,25	2,5 U/per reaksjon	(Qiagen: Cat 203205)
Nukleasefritt vann	34,75	-	-
Totalt	45	-	-

Amplifikasjon av DNA ble utført med 30 sykluser ved hjelp av BioRad C1000™ Thermal Cycler med syklusinnstillinger beskrevet i tabell 3.

Tabell 3 syklusinnstillinger for PCR av 16S rRNA gen

Syklusinnstillinger for bakterielt 16s rRNA gen					
Trinn	Syklus		Temperatur		Tid
1	Initiering	Aktiveringsfase for HotStar Taq DNA polymerase	95 °C	15 minutter	
2	Amplifisering	Denaturering	95 °C	1 minutt	30 sykluser
3		Hybridisering	58 °C	30 sekunder	
4		Polymerisering	72 °C	1 minutt	
5		Ekstra elongering	72 °C	5 minutter	
BioRad C1000™ Thermal Cycler					

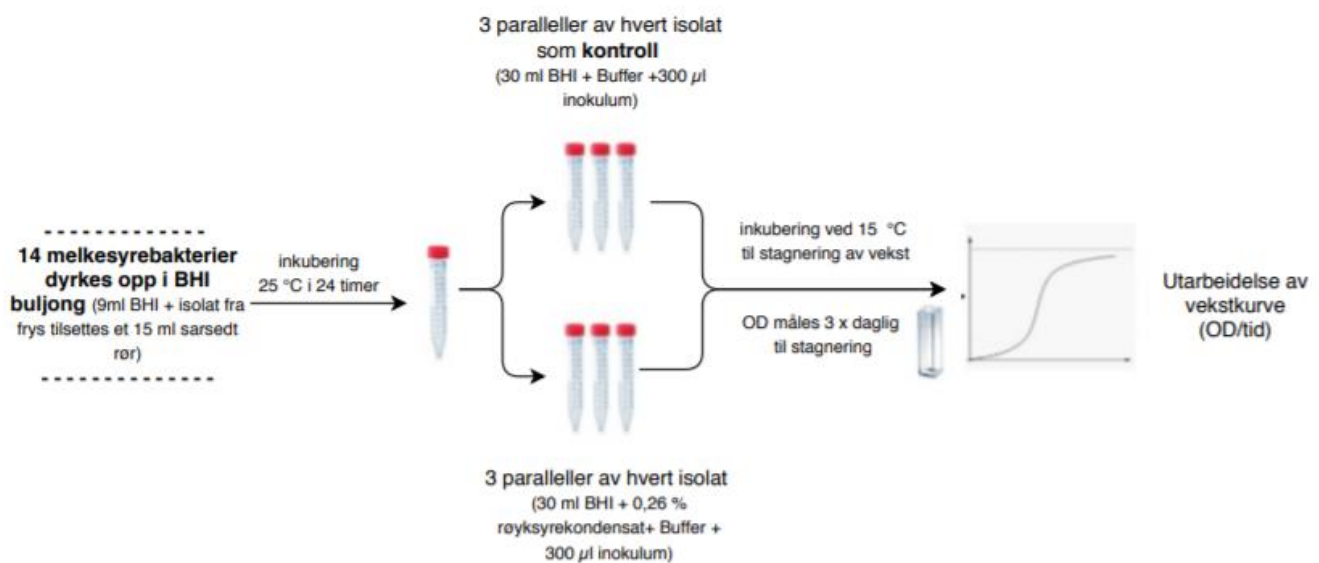
Gel elektroforesen ble kjørt med 1,5% agarosegel bestående av 1x TAE buffer og SeaKem® LE Agarose (Lonza: Cat: 5000) Mengdeforholdet ble tilpasset støpeformens størrelse. Videre ble løsningen tilsatt 8 µl GelRed Nucleic Acid stain (Qiagen: Cat 43003), før den ble helt i støpeformen. 15 µl av hvert PCR-templat (inklusive negativkontroll) ble tilsatt 2 µl egenprodusert loading dye, før 15 µl av hvert templat ble avsatt på gel. Første og siste brønn på gelen ble tilsatt 6 µl peqGold 100bp plus DNA Ladder (VWR: Cat 252020). Elektroforesen ble utført med 80 volt i 90 minutter. Etter endt elektroforese ble gelen avlest under UV-lys ved hjelp av Syngene™ G: Box, med tilhørende GeneSys, G: Box chemi-XRQ software med DNA fragmenter tilsvarende ca. 1000 basepar.

Før sekvensering ble PCR- produktene rensert ved bruk av «GeneJET PCR Purification kit» (Thermo Scientific: Cat K0702). Utførelsen ble gjort i henhold til medfølgende manual «User Guide: GeneJET Purification Kit» s 4. produktene ble deretter kvantifisert på en micro-volumplate (take3-plate) ved hjelp av BioTek PowerWave XS Microplate spektrofotometer med tilhørende programvare Gen 5™ Software. 2 µl prøvemateriale ble tilsatt hver brønn og absorbans avlest ved en bølglengde på 260- og 280nm. En A260/280-ratio i området 1.8-2.0 ble ansett som akseptabelt med hensyn til renhet på DNA. (Held, 2001;

Teare *et al.*, 1997). En ratio under dette kan indikere nærvær av protein, fenol eller andre kontaminanter.

Før prøvene ble sendt til sekvensering, var det avgjørende at det rensede PCR-produktet hadde en konsentrasjon på mellom 20-80 ng/ μ l. Prøver med konsentrasjoner over 80 ng/ μ l etter kvantifiseringen ble fortynnet 1:1 med nukleasefritt vann. 5 μ l rensed PCR-produkt med riktig konsentrasjon ble overført til nye rør og tilsatt 5 μ l 338F primer (5 μ M) (Muyzer, de Waal og Uitterlinden, 1993) til en total mengde på 10 μ l. Sekvenseringen ble utført av Light Run, Eurofins Genomics (Tyskland), og videre sammenlignet med sekvenser fra nukleotiddatabasen- *Blast* fra National Center for Biotechnology information (NCBI) (NCBI, u.å.).

3.8 Melkesyrebakteriers vekstkinetikk under forhold tilsatt røyksyre kondensat



figur 9 trinnvis beskrivelse av testing av melkesyrebakterienes toleranse mot røyksyre kondensat under 15 °C inkubering til stagnering av vekst (figur: egen)

14 av 35 melkesyrebakterier ble valgt for videre undersøkelse av deres toleranse mot røyksyre kondensatet SmokEz VTABB ved tilsats av 0,26% røyksyre kondensat i mediet (Cat: RA12012 Bokken AS). Stammene ble fra frossen tilstand dyrket opp i 9 ml BHI ved 25 °C i 24 timer (figur 9). Etter inkubering ble 300 μ l inokulum tilsatt seks ulike rør (per stamme). tre

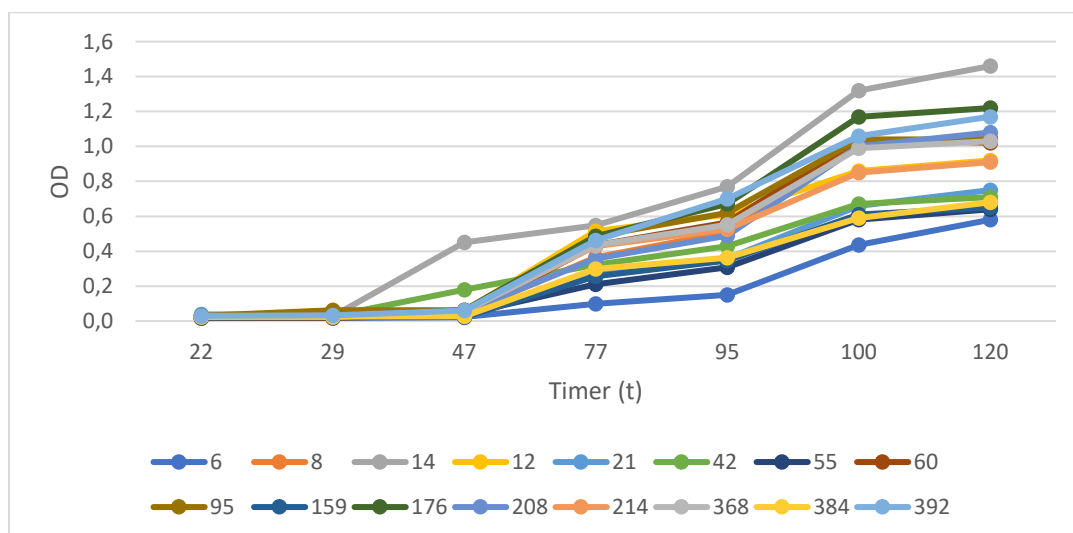
paralleller inneholdt 30 ml BHI tilsatt buffer og 0,26% røyksyre-kondensat. PH i mediet tilsatt røyksyre-kondensat ble justert ned til 6,7 slik at vekstforholdene skulle være så lik fiskejuicen benyttet under screeningprosessen som mulig. De siste tre parallellene inneholdt 30 ml BHI tilsatt buffer, og fungerte som kontroll. Rørene ble inkubert ved 15 °C og bølgelengde målt første gang etter 0 timer og videre tre ganger per døgn til stagnering av vekst. Ved stagnering ble pH for fem tilfeldige stammer målt.

Resultatene fra OD- målingene ble visualisert i vekstkurve, OD mot tid. Målingene ble deretter omgjort til kde/ml ved hjelp av labtools omgjøringskalkulator og formelen $OD_{600} av 1,0 = 8 \times 10^8$ kde/ml (Labtools, u.å.). ComBase predictor- DMFit- WEB Edition ble brukt for å modellere vekstvariasjonen til de ulike bakteriekulturene inklusive kontroller etter Baranyi and Roberts modellen (ComBase, 2020).

4. Resultat

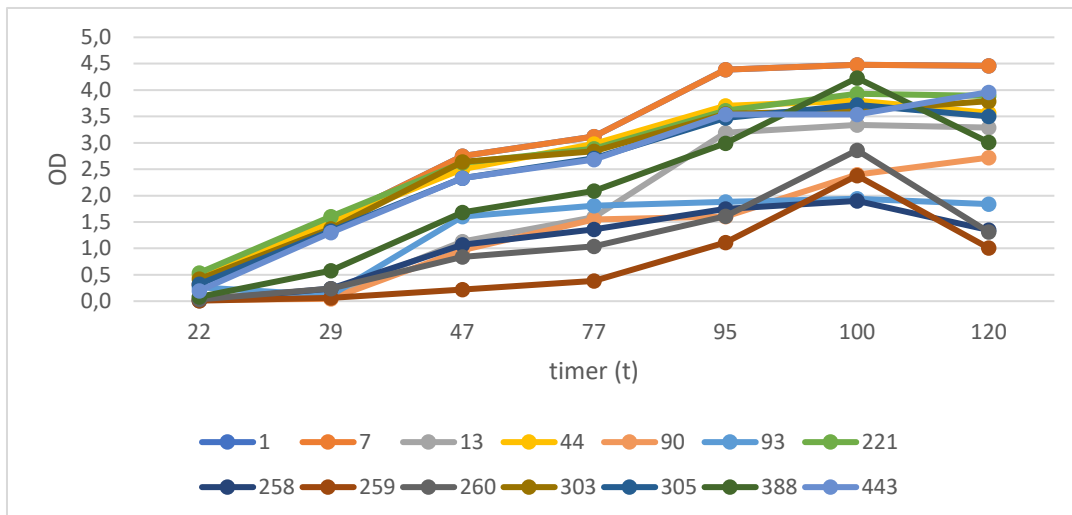
4.1 Melkesyrebakterienes vekstegenskaper ved 15 °C

Som et ledd i standardisering av cellekonsentrasjon, og videre arbeid ble vekstegenskapene til 100 melkesyrebakterier (isolert fra røykalaks, gravlaks og sushi) ved 15 °C undersøkt. Ved oppformering på MRS hadde 93 av 100 stammer vekst. Resterende stammer, hvorav en fra røykelaks (nr. 334), en fra gravlaks (nr. 248), og fire stammer fra sushi (nr. 45, 189, 194 og 75), ble ekskludert fra videre arbeid. Årsaken var manglende vekst ved 15 °C. Stamme nr. 75 hadde vekst, men ble fjernet grunnet mistanke om kontaminert bakterieisolat. For de resterende 93 melkesyrebakteriene ble det utformet vekstkurver basert på målinger av OD ved inkubering i MRS- buljong over en gitt tid (t) ved 15°C.



figur 10 Grafisk oversikt over vekstegenskapene til melkesyrebakterier isolert fra røykalaks presentert i OD (målt ved 600 nm) mot timer (t). dyrket opp i MRS-buljong ved 15 °C

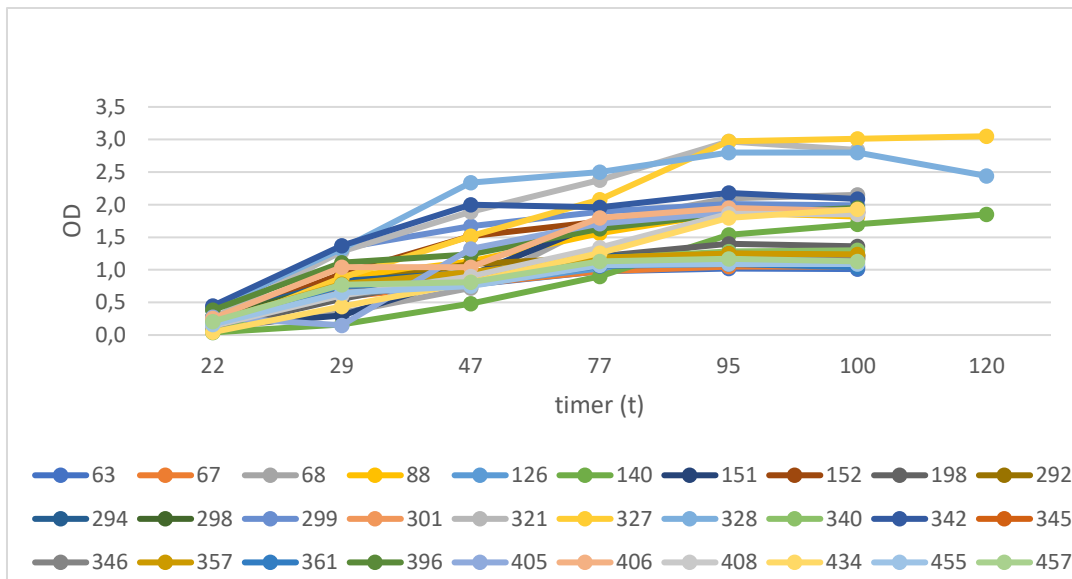
14 av 16 stammer illustrert i figur 10 hadde lengre lag-fase enn resten av utvalget på til sammen 30 stammer isolert fra røykalaks. Lag-fasen varte i over 47 timer før den eksponentielle fasen ble registrert startet etter 77 timer. De samme stammene oppnådde en lavere OD ved stagning som ikke oversteg 1,25.



figur 11 Grafisk oversikt over vekstegenskapene til melkesyrebakterier isolert fra røykalaks presentert i OD (målt ved 600 nm) mot timer (t). dyrket opp i MRS-buljong ved 15 °C

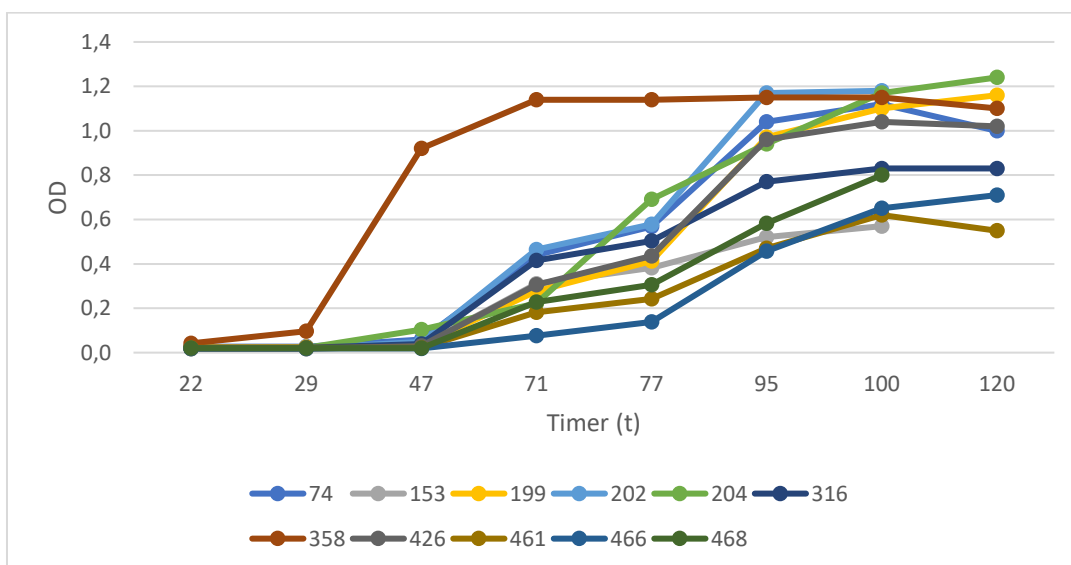
Stamme nr. 1, 44, 221, 303, 305, 388 og 443 illustrert i figur 11 kom inn i eksponentiell fase allerede ved første OD-måling etter 22 timer. Disse hadde ved stagnering en betraktelig høyere OD enn gruppen med lang Lag-fase. Alle stammene hadde nådd stasjonær fase mellom 77 og 100 timer, med en OD som varierte fra 0,535 (nr. 6) - 4,460 (nr. 1) ved siste måling.

Av de totalt 40 melkesyrebakteriene isolert fra sushi hadde 30 stk. (figur 12) kommet inn i eksponentiell fase etter henholdsvis 29 timers inkubasjon. De resterende 9 stammene (74, 153, 199, 202, 316, 426, 461, 466 og 468) hadde kommet inn i eksponentiell fase ved måling utført etter 71 timer. Slutt OD varierte på mellom 1,180 og 0,348. OD varierte fra 1,040 (stamme 361) til 3,050 (stamme 327) målt etter 100 og 120 timer.



figur 12 Grafisk oversikt over vekstegenskapene til melkesyrebakterier isolert fra sushi presentert i OD (målt ved 600 nm) mot timer (t). dyrket opp i MRS-buljong ved 15 °C

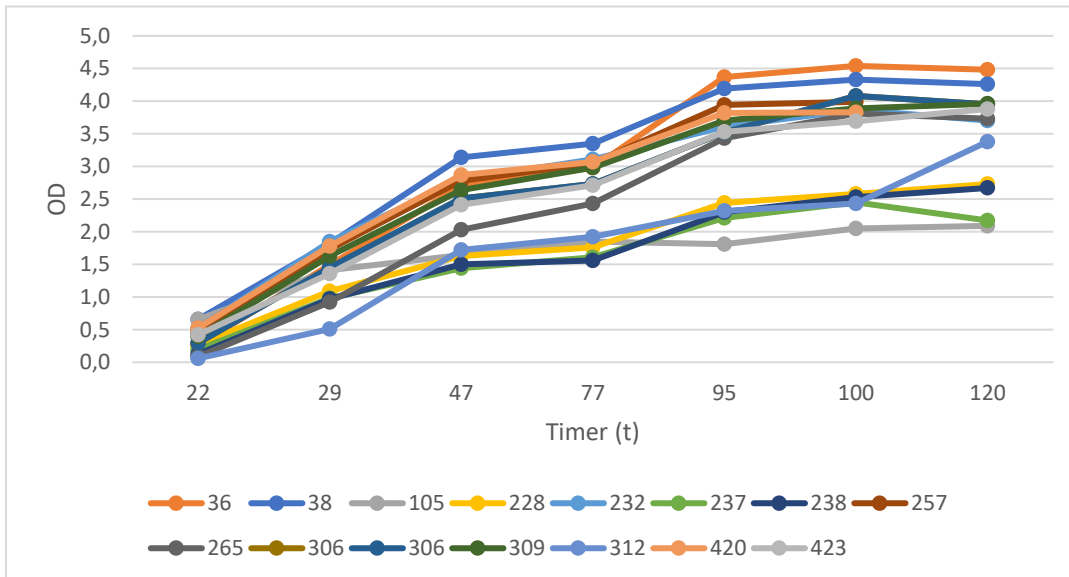
Stamme 358 skilte seg ut fra resten ved å ha en bratt vekstkurve mellom 29 og 47 timer, som videre stagnerte etter måling utført ved 77 timer (figur 13). Alle stammene fra sushi hadde nådd stasjonær fase mellom 100 og 120 timer, og hadde en OD fra 0,570 (nr. 153) og 3,050 (nr. 327).



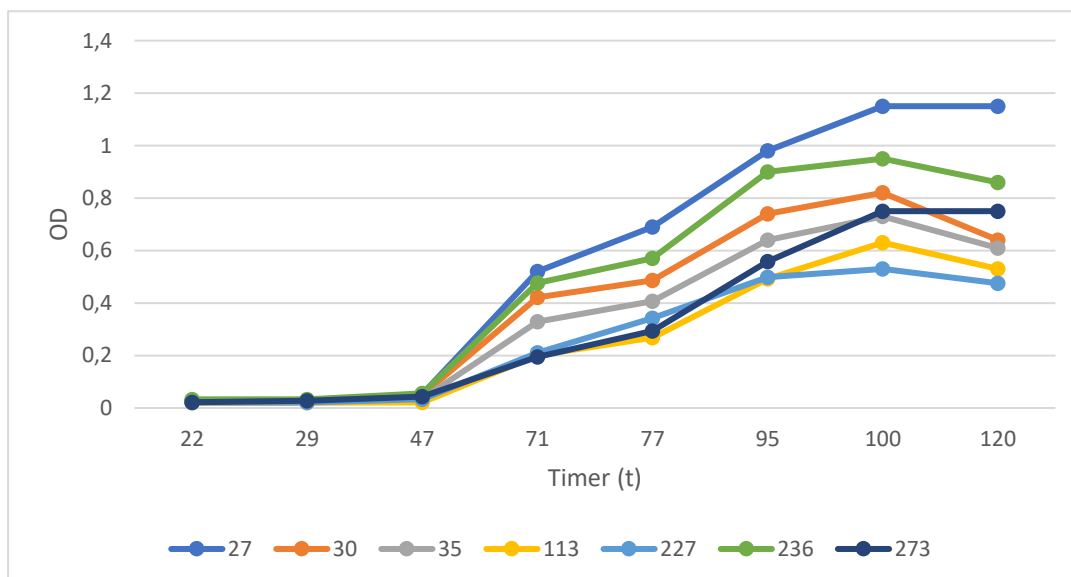
figur 13 Grafisk oversikt over vekstegenskapene til melkesyrebakterier isolert fra sushi presentert i OD (målt ved 600 nm) mot timer (t). dyrket opp i MRS-buljong ved 15 °C

15 av totalt 22 stammer isolert fra gravlaks hadde kommet inn i eksponentiell fase etter første OD-måling ved 29 timer (figur 14). De resterende stammene 27,30, 35, 113, 227 og 236 (figur

15) kom ikke inn i eksponentiell fase før etter 47 timer. De sistnevnte bar også preg av en lavere OD ved stagning som ikke overskred 1,2 ved siste måling etter 120 timer. Stamme 227 hadde laveste OD på 0,475. Stamme nr. 36, 38, 265, 306, 309 og 423 hadde høyest OD ved stagning og lå på mellom 3,880 (stamme 256) og 4,480 (stamme 36).



figur 14 Grafisk oversikt over vekstegenskapene til melkesyrebakterier isolert fra gravlaks presentert i OD (målt ved 600 nm) mot timer (t). dyrket opp i MRS-buljong ved 15 °C

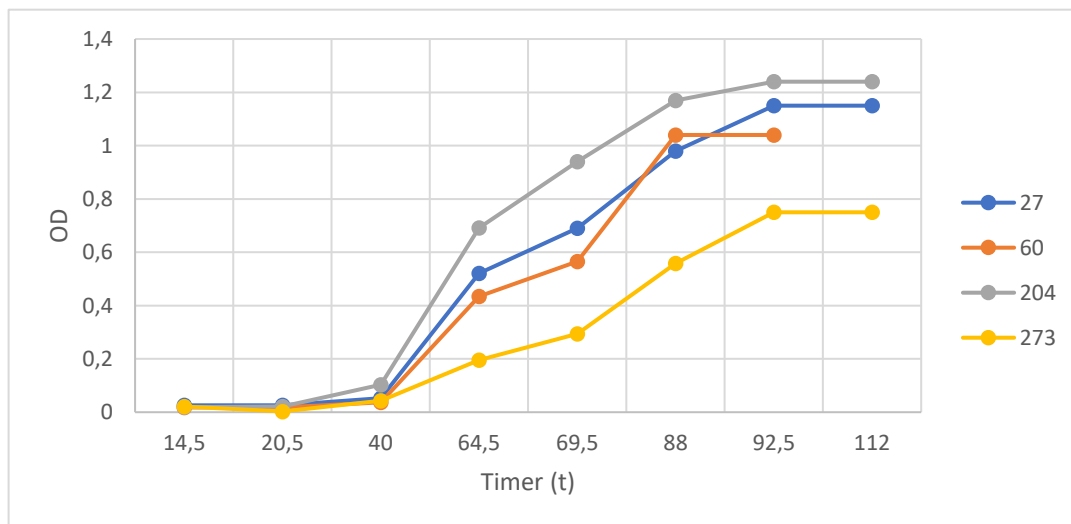


figur 15 Grafisk oversikt over vekstegenskapene til melkesyrebakterier isolert fra gravlaks presentert i OD (målt ved 600 nm) mot timer (t). dyrket opp i MRS-buljong ved 15 °C

4.2 Standardisering av bakteriekulturenes cellekonsentrasjon – OD mot kde/ml

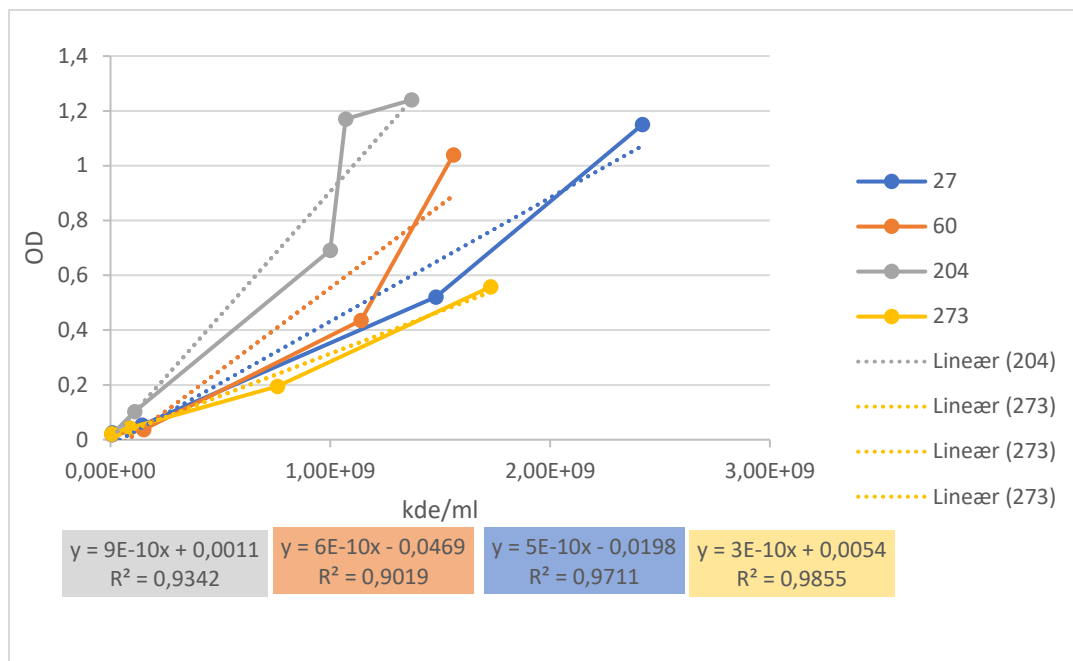
For å standardisere prosedyrene for melkesyrebakteriene ble det utarbeidet en standardiseringskurve (OD mot kde/ml) som skulle benyttes til å fastsette en startkonsentrasjon (basert på OD- målinger) som var lik for alle stammene.

Seks stammer med relativt like vekstegenskaper ble valgt for utarbeidelse av standardiseringskurven. Grunnet kontaminering og unormal vekstkurve ble stamme nr. 75 og 90 ekskludert fra det videre arbeidet. Resultatene ble registret og grafisk visualisert som vist i figur 16 (OD mot tid) og figur 17 (OD mot kde/ml).



figur 16 vekstegenskaper ved 15 °C for utvalgte melkesyrebakterier isolert fra røykalaks, gravlaks og sushi for standardisering av OD

Alle stammene hadde en lag-fase på rundt 40 timer. Veksten av stamme 60 endte på en OD på 1,02 etter 88 timer. Stamme 27, 60 og 273 stagnerte alle etter 92,5 timer men hadde noe ulik slutt-OD. Stamme nr. 273 endte opp med lavest OD på 0,75 og stamme nr. 204 endte opp med høyest OD på 1,24 ved siste måling.



Figur 17 vekstegenskaper OD mot kde/ml ved 15 °C for utvalgte melkesyrebakterier isolert fra røykalaks, gravlaks og sushi for standardisering av OD.

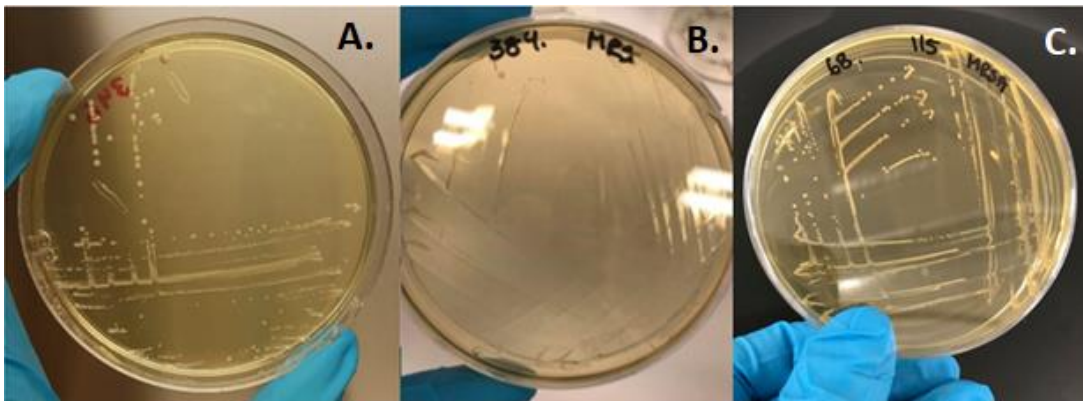
I grafen som viser OD mot kde/ml (figur 17) ser man stammene i eksponentiell fase hvor stamme nr. 204 endte på den laveste verdien på $1,37 \cdot 10^9$ kde/ml og stamme nr. 27 på $2,42 \cdot 10^9$ kde/ml ved siste uttak henholdsvis ved dag 4 og 5.

For standardiseringen av OD ble ligningen $Y = Ax + B$ (med konsentrasjon: $X = 5 \cdot 10^8$) løst for alle stammene i tabell 17, og en gjennomsnittlig OD beregnet. Stamme 27, 60 204 og 273 hadde en OD på henholdsvis 0,20, 0,22, 0,45 og 0,16, som ga en gjennomsnittlig OD på $0,26 \pm 0,03$ (valgt avvik på 10%). Siden det er flere som forsker på melkesyrebakterier som biokonserverende faktor i spiseklare sjømatprodukter (Lillebjerka, 2019, ph.d. stipendiat Jelena Stupar og masterstudent Åshild T. Moen) ble det i stedet valgt å benytte OD 0,22 for melkesyrebakteriene i det videre arbeidet for å oppnå sammenlignbare resultater.

4.3 Test av potensielt selektive medier for melkesyrebakterier og målorganismer

4.3.1 Melkesyrebakterier

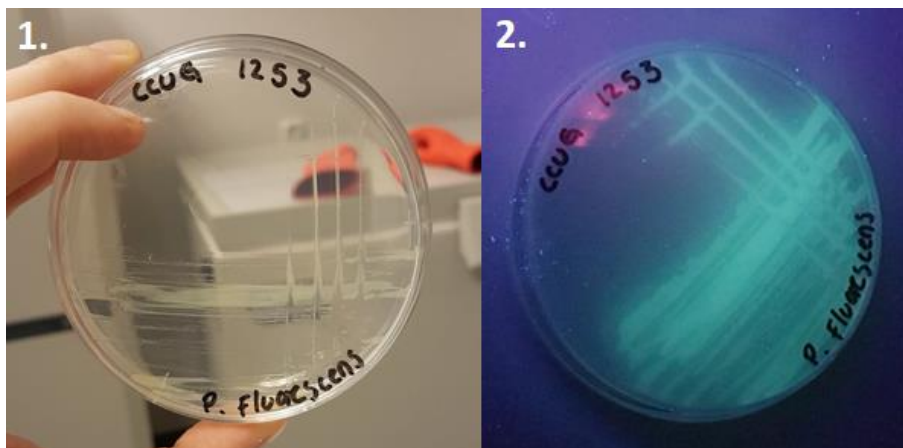
I forkant av screeningen av melkesyrebakteriene måtte de ulike stammene testes på egnede medier for å dokumentere at disse ga gunstige vekstforhold for den aktuelle bakterien og at disse også kunne skilles melkesyrebakterie og målorganisme fra hverandre i co-kultur. Etter anaerob inkubering av melkesyrebakteriene (25 °C i 48 t) på MRS- og M17-agar, kom det frem at stammene som hadde dårlig vekst på MRS under standardiseringen hadde bedre vekst på M17 (figur 18a). Det ble derfor benyttet M17- agar til stammene med dårlig vekst og MRS til det resterende utvalget under screeningen (vedlegg 2). Størsteparten av melkesyrebakteriene hadde hvite/gule kolonier av grei størrelse (figur 18c). Noen få stammer, spesielt de med dårlig vekst på MRS, hadde mer glassaktige og mindre kolonier enn resten (figur 18b).



Figur 18 Melkesyrebakterie strøket ut på M17 (A), utypisk vekst av melkesyrebakterie på MRS (B), typisk vekst av melkesyrebakterier på MRS (C). Alle inkubert anaerobt ved 25 °C i 24 timer. Bilde: eget

4.3.2 Pseudomonas fluorescens

For *P. fluorescens* ble PAB tilsatt C-F-C supplement testet som selektivt medie. Resultatene ga som figur 19 viser tilfredsstillende vekst av *P. fluorescens* ved inkubering på 30 °C i 48 timer. Skålene strøket ut med melkesyrebakterier ble på samme måte som målorganismen inkubert aerobt. Det ble det ikke dokumentert vekst på noen av skålene med melkesyrebakterier, som vil si at mediet er selektivt for *P. fluorescens* og kan benyttes videre i screeningprosessen.



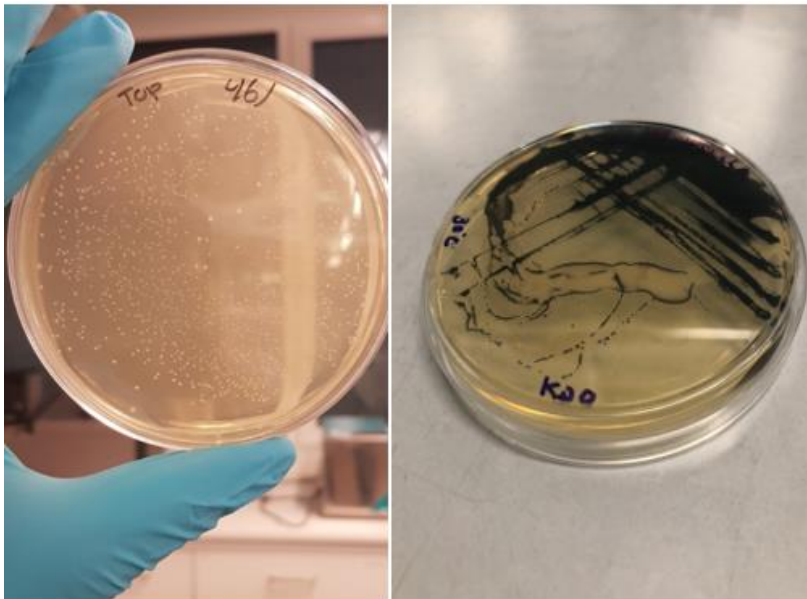
Figur 19 Bilde 1: *P. fluorescens* på PAB tilsatt c-f-c- supplement Etter 24 timers anaerob inkubering ved 30°C. Bilde 2: *P. fluorescens* under UV-lys etter 48 timers inkubering ved 30°C. (bilde: eget)

4.3.3 Shewanella putrefaciens

Etter 48 timer inkubering ved 25 °C av *Shewanella* og melkesyrebakterier på jernagar (tilsatt 0,04 % L-cystein), viste resultatene vekst av både målorganismen og melkesyrebakterier. Under testing av medie ble det strøket ut to paralleller av målorganismen (en med og en uten topplag), for å undersøke eventuelle ulikheter i vekst. Skålene uten topplag ga gode, tellbare kolonier som lett kunne skilles fra hverandre. Skålen tilsatt topplag var overgrodd og fortynninger som ville blitt spottet under screeningen ville ikke kunne skilles.

Sorte kolonier ble observert på skålen strøket ut med *S. putrefaciens* og hvite kolonier ble observert på skålene strøket ut med melkesyrebakterier (figur 20). Det kan derfor konkluderes med at Jernagar tilsatt 0,04% L-cystein ikke bare fremmer vekst av *S. putrefaciens* men også

melkesyre bakterier. Disse vil imidlertid kunne skilles ved at målorganismen danner sorte kolonier ved produksjon av H₂S ved tilsats av L-cystein som svovelkilde.



Figur 20 t. v Melkesyrebakterier (her stamme nr. 461) på Jernagar tilsatt 0,04 % L-cystein etter 48 timers inkubering ved 25 °C. t. h *Shewanella putrefaciens* etter 48 timers inkubering ved 25 °C. (bilde: eget)

4.4 Screening av melkesyrebakteriers inhiberende effekt på utvalgte forringelsesmikrobiota

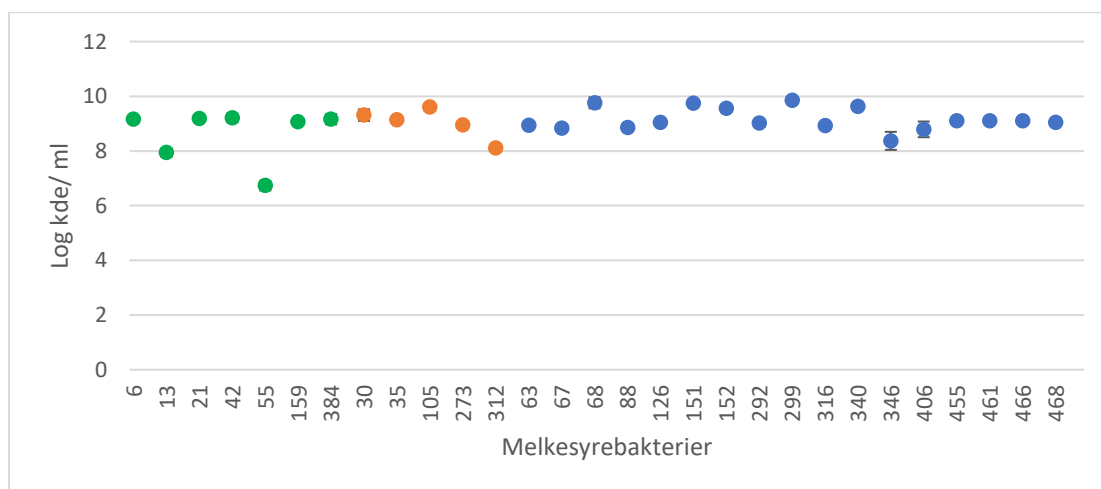
Hensikten med oppgaven var å screene et utvalg melkesyrebakterier isolert fra røykalaks, gravlaks og sushi for deres inhiberende egenskaper mot målorganismene *S. putrefaciens* og *P. fluorescens*. 35 melkesyrebakterier (7 fra røykalaks, 6 fra gravlaks og 22 fra sushi) ble etter standardisering valgt ut for videre testing på grunnlag av god vekst og lovende resultater av Lillebjerka (2019) og upublisert materiale av Ph.d. stipendiat Jelena Stupar. Noen av stammene hadde gitt full inhibering av *Listeria innocua* og *Listeria monocytogenes*, mens andre har før til en reduksjon av *Escherichia coli*.

Screeningen innebar oppformering (alene og i co-kultur) i beriket fiskejuice av laks ved 15 °C i 96 timer (i 96- brønnsplate), før mikrosporting av melkesyrebakterier og målorganismer (på MRS, BHI og selektivt/differensielt medie) inkubert ved 25 °C i 48 timer før kvantifisering.

4.4.1 Pseudomonas fluorescens

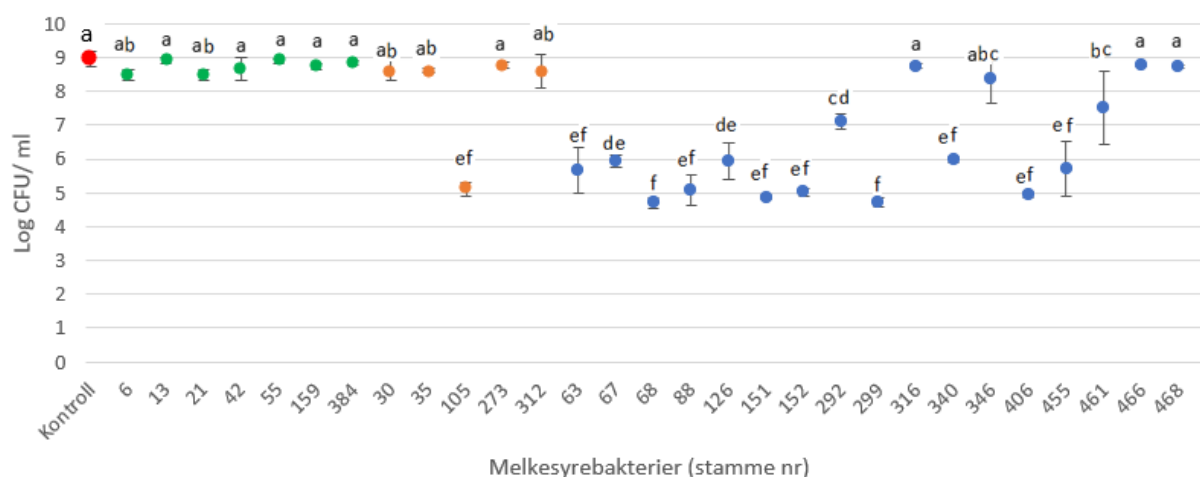
I forkant av screening ble *P. fluorescens* og 35 utvalgte melkesyrebakterier oppformert på henholdsvis PAB tilsatt C-F-C supplement og MRS/M17 og videre podet over til BHI-buljong for målorganismen og MRS/M17- buljong for melkesyrebakterier. Rørene ble inkubert ved 15 °C i 24 timer. På grunn av dårlig vekst på seks av melkesyrebakteriene i buljong ved 15 °C ble kun 29 stammer tatt med videre i forsøket.

Stammene ble oppformert i brønnplate (alene og i co-kultur) tilsatt fiskejuice inkubert ved 15 °C i 96 timer, mikroskottet (på MRS/M17, BHI og PAB) og videre inkubert ved 25 °C i 48 timer før kvantifisering. 29 melkesyrebakterier (isolert fra røyket laks (grønn), grava laks (oransje) og sushi (blå)) ble spottet på MRS for å dokumentere vekst i fiskejuicen for å sikre at en eventuell hemming i co-kultur var reell. Alle 29 stammer hadde vekst med et spenn fra 6,73 (stamme nr. 55) til 9,86 (stamme nr. 299) log kde/ml (figur 21) uavhengig av bakterienes opphav.



Figur 21 Vekst av 29 melkesyrebakterier isolert fra røyket laks (grønn), grava laks (oransje) og sushi (blå). Resultatene er oppgitt i gjennomsnittlige (n= 4) LOG-verdier inklusive +/- 10 % standardavvik (vertikal markering). Stammene ble inkubert ved 15 °C i 96 timer i 96- brønnsplate og videre spottet på MRS. Skålene ble inkubert anaerobt ved 25 °C i 48 timer

P. fluorescens alene oppformert på BHI ble utført for å kontrollere at veksten ikke ble hemmet på den selektive mediet (PAB), og at en eventuell hemming i co-kultur faktisk skyldtes melkesyrebakterierenes aktivitet og ikke mediet. Resultatene fra kvantifiseringen viste et høyere kimtall på PAB enn på BHI med en gjennomsnittlig verdi på henholdsvis 9,0 log kde/ml og 8,7 log kde/ml, med (p= 0,004) etter utført T-test.



figur 22 Vekst av *P. fluorescens alene* (Rød) og i co-kultur med alle 29 melkesyrebakterier isolert fra røyket laks (grønn), gravlaks (Oransje) og sushi (blå). Resultatene er oppgitt i gjennomsnittlige LOG-verdier (n=4) inklusive +/- standardavvik (vertikale markeringer på akse). Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller i kimtall mellom isolatene. Stammene ble inkubert ved 15 °C i 96 timer i 96- brønners brønn og videre spottet på målselektiv agar (*Pseudomonas* agar tilsatt C-F-C supplement). Skålene ble inkubert ved 25 °C i 48 timer.

Resultatene av *P. fluorescens alene* (rød) og i co-kultur med 29 melkesyrebakterier (isolert fra røyket laks (grønn), gravlaks (Oransje) og sushi (blå)) ble sammenlignet opp mot hverandre (figur 22). Resultatet av ANOVA og Tucky- test ($p < 0,05$) ga en signifikans på ($p = 0,0$), noe som indikerer forskjeller mellom gruppene.

Screeningen av utvalgte melkesyrebakterier viste at 14 av 29 stammer (48,3%) hadde inhiberende egenskaper i middels eller stor grad (tabell 4). En log reduksjon på $< 1,0$ indikerte ingen hemmende effekt (rød), en log-reduksjon på mellom 1,0-3,0 gir noe hemming (gul), og verdier på $> 3,0$ viser en god hemmende effekt (grønn) mot målorganismen (Wiernasz *et al.*, 2017).

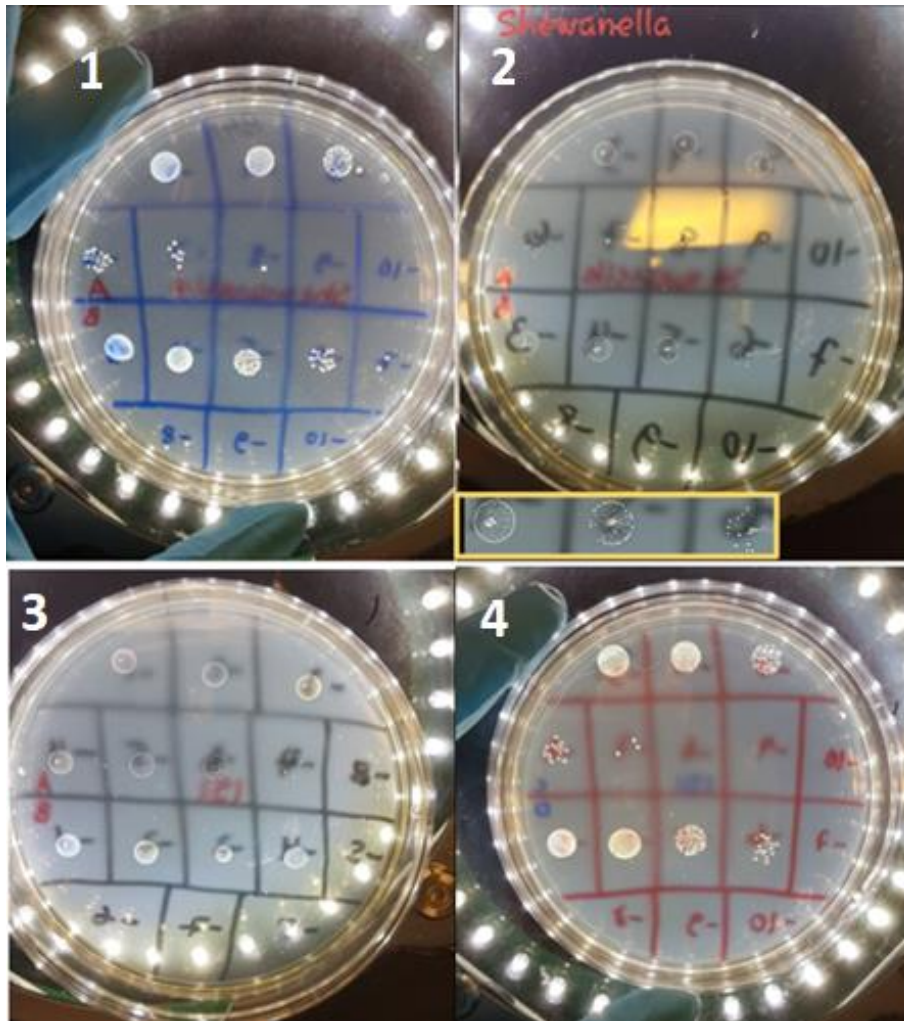
13 av 14 stammer med inhiberende effekt hadde sushi som opprinnelse, og den siste stammen (nr. 105) var isolert fra gravlaks. inhiberingen ga en gjennomsnittlig log-reduksjon på 3,4 log kde/ml.

Tabell 4 Oversikt over utvalgte melkesyrebakterier (LAB) isolert fra røykalaks, gravlaks og sushi, samt deres grad av hemmende effekt (vekstreduksjon) mot *P. fluorescens* oppgitt i log kde/ml. En log reduksjon på < 1,0 indikerte ingen hemmende effekt (rød), en log-reduksjon

LAB-STAMMER	PRODUKT	<i>P. FLUORESCENS</i>	LAB-STAMMER	PRODUKT	<i>P. FLUORESCEN</i>
6	Røykalaks	<1,0	88	Sushi	3,7
13	Røykalaks	<1,0	126	Sushi	3,4
21	Røykalaks	<1,0	151	Sushi	4,5
42	Røykalaks	<1,0	152	Sushi	4,3
55	Røykalaks	<1,0	292	Sushi	1,7
159	Røykalaks	<1,0	299	Sushi	4,6
384	Røykalaks	<1,0	316	Sushi	<1,0
30	Gravlaks	<1,0	340	Sushi	2,9
35	Gravlaks	<1,0	346	Sushi	<1,0
105	Gravlaks	3,7	406	Sushi	3,9
273	Gravlaks	<1,0	455	Sushi	3,1
312	Gravlaks	<1,0	461	Sushi	1,3
63	Sushi	3,2	466	Sushi	<1,0
67	Sushi	2,9	468	Sushi	<1,0
68	Sushi	4,6	-	-	-

4.4.2 *Shewanella putrefaciens*

Under screening ble *S. putrefaciens* overført til 96- brønnsplate alene og i co-kultur med de ulike melkesyrebakteriene. Brønnplaten ble inkubert ved 15 °C i 96 timer før OD ble målt og resultatet av oppformeringen ble spottet på MRS/M17, BHI og JA og til slutt inkubert ved 25 °C. OD- målingen etter 96 timers inkubering (vedlegg 1) viste lite eller ingen økning av OD i brønner tilsatt *S. putrefaciens* alene i fiskejuice ved 15 °C (vedlegg 1). Det ble allikevel valgt å fullføre spottingen for å undersøke om det kunne være vekst og en eventuell inhibering i co-kulturen ved oppdyrking på skål.



figur 23 **bilde 1:** *S. putrefaciens* på BHI inkubert ved 25 °C i 48 timer. **Bilde 2:** *S. putrefaciens* på Jernagar tilsatt 0,04% L-cystein inkubert aerobt ved 25 °C i 48 timer. **Bilde 3:** *S. putrefaciens* i co-kultur med melkesyrebakterie nr. 151 på JA tilsatt 0,04% L-cystein inkubert ved 25 °C i 48 timer. **Bilde 4:** Melkesyrebakterie nr. 151 alene på MRS inkubert anaerobt ved 25 °C i 48 timer. Bilde 1,2, og 4 er spottet i fortynningsserier fra -3 til -10. Bilde 3 er spottet i fortynningsserie fra -1 til -8

Ved avlesning etter 48 timer hadde melkesyrebakteriene spottet på MRS/M17 og skålene med *S. putrefaciens* spottet på BHI god vekst og tellbare kolonier som vist i figur 23 bilde 1 og 4. Kontrollen (målorgsanismen) ga videre hvite kolonier på det selektive mediet (JA) som vist i figur 23 bilde 2. Noe som var overraskende med tanke på sort kolonidannelse ved testing i forkant. Skålene med co-kultur hadde også kun hvite kolonier (figur 23 bilde 3).

Det var en tydelig forskjell mellom renkultur av *S. putrefaciens* spottet på BHI og JA. Koloniene på BHI var betydelig større enn på det selektive mediet, som var små og ikke kvantifiserbare.

I tillegg var koloniene på det selektive mediet hvite uavhengig av om stammene var i co-kultur eller ikke, noe som gjør at det ikke kan selekteres for hverken melkesyrebakterier eller målorganisme. Det kunne derfor ikke dokumenteres om melkesyrebakteriene hadde noen inhiberende effekt på *S. putrefaciens*.

4.5 Identifisering av melkesyrebakterier isolert fra spiseklar sjømat

I forbindelse med screeningen av melkesyrebakterier for inhiberende egenskaper mot målorganismene *S. putrefaciens* og *P. fluorescens* ble DNA-templat fra 21 av til sammen 35 melkesyrebakterie sendt til Light Run, Eurofins Genomics (Tyskland) for sekvensering. De resterende 14 stammene ble tidligere identifisert av masterstudent Astrid Lillebjerka (Lillebjerka, 2019). Før sending ble det ekstraherte DNAet kvantifisert og stammer med konsentrasjon høyere enn 80 ng/μl ble fortynnet 1:1. Resultatene viste at alle stammene hadde renhetstall innenfor 1.8 og 2.0, og ble dermed klassifisert som rene PCR produkter.

Av de 21 stammene sendt til sekvensering kom 20 stammer tilbake med en sekvens med lengde på mellom 1014 og 1123 basepar (bP) (tabell 5). Stamme 346 ble ikke identifisert grunnet. Ved blasting av sekvenseringsresultatene i NCBI's nukleotiddatabase ble 9,5 % klassifisert som *Carnobacterium spp.*, 14,3 % ble klassifisert som *Weissella spp.* og 66,6% klassifisert som *Leuconostoc spp.* Stammene hadde en identifiseringsprosent (ID %) på mellom 99,6 og 100%. Av de 14 stammene som allerede var identifisert var 7,1 % identifisert som *Leuconostoc* og 92,9 % identifisert som *Carnobacterium spp.*

Selv om det er usikkerhet rundt artsidentifikasjonen i påvisningen av de ulike melkesyrebakteriestammene er det sannsynlig at stammene identifisert som *Carnobacterium spp* kan være av artene *C. gallinarum*, *C. divergens* og *C. maltaromatikum*. Stammene identifisert som *Leuconostoc* kan være av artene *L. Citreum*, *L. lactis*, *L. mesentorides* og *L. gelidum* og stammene identifisert som *Weissella* kan være av arten *W. viridescens* eller *W. helenica*.

Tabell 5 Resultater fra blasting av melkesyrebakteriesekvenser isolert fra røykalaks, gravlaks og sushi, med tilhørende query cover % (prosentvis likhet mellom pP- fragment og NCBI sekvens), Identifikasjonsprosent (ID%) og baseparlengde (bP) stammer uthevet i grått er stammer sendt til sekvensering. Resterende er stammer identifisert av Lillebjerka (2019) stammer markert med (-) ble ikke identifisert. *: mulig artsidentifikasjon (ikke konstatert)

Isolert fra	Stamme	Identifikasjon	Arts- ID*	Query cover %	ID %	bP
Røykalaks	6	<i>Carnobacterium spp.</i>	gallinarum	99	99,8	880
	13	<i>Carnobacterium spp.</i>	maltaromaticum	99	100	1027
	21	<i>Carnobacterium spp.</i>	divergens	99	99,9	1098
	42	<i>Carnobacterium spp.</i>	maltaromaticum	99	99,8	1016
	55	<i>Carnobacterium spp.</i>	gallinarum	100	99,8	929
	159	<i>Carnobacterium spp.</i>	gallinarum	99	99,8	869
Gravlaks	384	<i>Carnobacterium spp.</i>	-	99	99,9	978
	30	<i>Carnobacterium spp.</i>	maltaromaticum	99	99,9	1040
	35	<i>Carnobacterium spp.</i>	maltaromaticum	99	99,7	1083
	105	<i>Leuconostoc spp.</i>	citreum	99	100	1042
	227	<i>Carnobacterium spp.</i>	gallinarum	100	99,6	940
	273	<i>Carnobacterium spp.</i>	divergens	99	99,9	877
Sushi	312	<i>Weissella spp.</i>	hellenica	99	100	1045
	63	<i>Leuconostoc spp.</i>	lactis	98	100	1025
	67	<i>Leuconostoc spp.</i>	lactis	98	100	1025
	68	<i>Leuconostoc spp.</i>	mesenteroides	98	100	1046
	88	<i>Leuconostoc spp.</i>	gelidum	98	100	1030
	126	<i>Leuconostoc spp.</i>	lactis	99	99,7	1123
	151	<i>Leuconostoc spp.</i>	mesenteroides	99	99,9	1041
	152	<i>Leuconostoc spp.</i>	gelidum	99	99,6	1107
	153	<i>Carnobacterium spp.</i>	-	100	99,8	962
	292	<i>Leuconostoc spp.</i>	Lactis	99	99,9	1028
	298	<i>Leuconostoc spp.</i>	laktis	99	99,81	1043
	299	<i>Leuconostoc spp.</i>	mesenteroides	98	99,91	1014
	316	<i>Carnobacterium spp.</i>	maltaromaticum	98	99,91	1105
	327	<i>Weissella spp.</i>	viridenscens	99	100	1041
	328	<i>Weissella spp.</i>	viridenscens	99	99,9	1027
	340	<i>Leuconostoc spp.</i>	citreum	99	99,9	1030
346	-	-	-	-	-	
358	<i>Leuconostoc spp.</i>	lactis	99	99,8	986	
406	<i>Leuconostoc spp.</i>	gelidum	99	99,9	1028	
455	<i>Leuconostoc spp.</i>	lactis	98	99,91	1126	
461	<i>Carnobacterium spp.</i>	gallinarum	99	100	988	
466	<i>Carnobacterium spp.</i>	-	100	99,7	1025	
468	<i>Carnobacterium spp.</i>	divergens	100	99,9	877	

4.6 Melkesyrebakteriers vekstkinetikk under forhold tilsatt røyksyre kondensat

Resultatene fra screening etter inhiberende egenskaper viste at 14 av totalt 35 melkesyrebakterier hadde middels eller god inhiberende effekt på målorganismen *P. fluorescens*. Det ble ut fra dette valgt å undersøke stammene ytterligere ved å teste deres vekstegenskaper ved tilsats 0,26% SMOKEZ VTABB røyksyre kondensat i mediet.

Vekstkurven for de ulike stammene med og uten tilsats av røyksyre kondensat (figur 24) viser at røyksyre kondensatet hadde en hemmende effekt på nesten alle melkesyrebakteriene. Flere stammer bar preg av en forlenget lag-fase, og noen oppnådde en lavere cellekonsentrasjon ved stagnering. Flere stammer (nr. 68, 88, 105, 126, 152, 299 og 406) nådde imidlertid tilnærmet lik cellekonsentrasjon som kontrollen (uten røyksyre kondensat), men på et senere tidspunkt.

Av stammene inhibert av røyksyre kondensatet ble stamme nr. 67, 292, 340, 455 og 461 hemmet mest med en forlenget lag- fase som endte opp i en betydelig lavere cellekonsentrasjon enn kontrollen ved stagnering.



Figur 24 Sammenligning av vekst (OD600) i kulturer med (rød) og uten (blå) tilsatt 0,26% røyksyre-kondensat (SmokeZ VTABB) i BHI inkubert ved 15 °C frem til stagnering av vekst oppgitt i OD mot timer (t). Topptekst i graf angir nummerering av de aktuelle stammene. Resultatene er et gjennomsnitt av n=3 paralleller.

Ingen isolater ble fullstendig hemmet ved tilsats av røyksyre-kondensat. Sluttmåling ved stagnering ble utført mellom 51 og 70,5 timer etter inkubering ved 15 °C. Samtlige kontroller vokste uten detekterbar lag-fase (tabell 6). For stammene tilsatt røyksyre-kondensat varierte lag-fasen fra ca. 4 timer til neste 18 timer, for utenom én stamme (nr. 299) som vokste uten detekterbar lag-fase som kontrollene.

Tabell 6 Melkesyrebakterienes toleranse for tilsats av 0,26% røyksyre kondensat (SmokeZ VTABB) i mediet ved 15 °C plottet inn i ComBase. $\mu_{max}(1/h)$: Maks veksthastighet i eksponentiell fase, Y_{max} : sluttkonsentrasjon ved i stasjonær fase, SE: standardfeil. NL (no lag) i tabellen = ingen lagfase

STAMME	PARALLELL	RØYKSYRE %	μ_{MAX} (1/H)	LAG- FASE(H)	Y_{MAX} (LOG KDE/ML)	SE
63	Kontroll	0,26	0.11 ± 0.013	NL	8,65±0,005	0,010
	Prøve	0,26	0,066±0,026	17,33±3,67	8,58±0,054	0.093
67	Kontroll	0,26	0,11±0,012	NL	8,67±0,025	0,056
	Prøve	0,26	0,04±0,004	17,64 ± 2,24	8,42±0,040	0,548
68	Kontroll	0,26	0,089±0,001	NL	8,90±0,006	0,0109
	Prøve	0,26	0,072 ± 0,015	9,442 ± 2,911	8,92±0,074	0,105
88	Kontroll	0,26	0,082±0,003	NL	8,93±0,017	0,0319
	prøve	0,26	0,09±0,01	9,87 ± 1,04	8,88±0,028	0,0452
105	Kontroll	0,26	0,09±0,004	NL	8,88±0,017	0,0338
	Prøve	0,26	0,06±0,02	6,04 ± 4,15	8,88±0,077	0,109
126	Kontroll	0,26	0,09±0,004	NL	8,76±0,013	0,025
	Prøve	0,26	0,08±0,02	15,17 ± 2,24	8,72±0,041	0,071
151	Kontroll	0,26	0,10±0,007	NL	8,86±0,030	0,066
	Prøve	0,26	0,06±0,003	3,78 ± 1,21	8,82±0,019	0,026
152	kontroll	0,26	0,14±0,006	NL	8,83±0,008	0,017
	prøve	0,26	0,06±0,006	9,32 ± 2,02	8,82±0,055	0,066
292	Kontroll	0,26	0,12±0,01	NL	8,74±0,027	0,591
	Prøve	0,26	0,05±0,01	15,02 ± 1,77	8,55±0,046	0,054
299	Kontroll	0,26	0,10 ± 0,045	NL	8,85±0,021	0,047
	Prøve	0,26	0,10±0,045	NL	8,68±0,099	0,219
340	Kontroll	0,26	0,12±0,006	NL	8,77±0,008	0,019
	Prøve	0,26	0,06±0,004	15,75±1,26	8,60±0,004	0,043
406	Kontroll	0,26	0,10±0,01	NL	8,84±0,038	0,062
	Prøve	0,26	0,096±0,010	7,46±1,14	8,86±0,026	0,036
455	Kontroll	0,26	0,12 ± 0,01	NL	8,63±0,009	0,021
	Prøve	0,26	0,05 ± 0,002	13,53 ± 1,05	8,51±0,020	0,029
461	Kontroll	0,26	0,11± 0,009	NL	9,20±0,035	0,075
	Prøve	0,26	0,05±0,02	13,43±1,04	9,09±0,024	0,034

pH i mediet tilsatt røyksyre kondensat ble på forhånd regulert til pH 6,7. I tillegg ble det målt pH ved stagnering hos et lite utvalg stammer for å undersøke om endring i pH kan være en årsak til inhibering av vekst. For slutt-pH ble kun 5 av 14 stammer målt. Kontrollene hadde en gjennomsnittlig pH på 6,7 og rørene tilsatt røyksyre kondensat hadde en pH på 6,6. Selv om 5 stammer ikke er representativt for utvalget var forskjellen i pH liten. Det antas derfor at det ikke vil ha noen påvirkning på det endelige resultatet.

5. Diskusjon

5.1 Melkesyrebakterienes vekstegenskaper ved 15 °C

En av kriteriene for å kunne benytte melkesyrebakterier til å forlenge holdbarheten til spiseklar sjømat, er evnen å kunne tilpasse seg et miljø med lavere temperatur (Leroi *et al.*, 2015). Det var derfor ønskelig å undersøke om et utvalg miljøisolater (33 stammer fra røykalaks, 23 stammer fra gravlaks og 44 stammer fra sushi) var anvendbare i kjølte produkter. På grunn tidsbegrensninger ble ikke vekstegenskaper ved 4 °C, som er normal kjøleskapstemperatur ved lagring av spiseklar sjømat undersøkt. Som ett ledd i utvelgelsen av egnede melkesyrebakterier til biokonservering ble stammenes vekstegenskaper testet ved 15 °C, for å bekrefte at disse også kunne vokse i temperaturer under optimumstemperatur på 20-35°C (Ahmed, Kanwal og Ayub, 2006).

93 av 100 stammer vokste ved 15 °C. Stammene med manglende vekst etter 120 timer ble ekskludert fra det videre arbeidet. Optisk tetthet (OD_{600}) ble målt to ganger per dag og vil ikke gi et nøyaktig tidspunkt for når overgangen fra lag- til eksponentiell fase og fra eksponentiell-til stasjonær fase inntreffer. Det vil allikevel være tilstrekkelig antall målinger for et visuelt bilde av stammenes vekstegenskaper. Det ble observert at nesten 50 % av stammene bar preg av en lengre lag-fase på opp til 47 timer sammenlignet med stammene som kom inn i eksponentiell fase etter første OD-måling (22 t.) (figur 10). Det ble i tillegg registrert at disse også hadde en gjennomsnittlig lavere OD ved stagnering av vekst. Baranyi og Roberts (1994) forklarer lag-fasen som den tiden det tar før bakteriene tilpasser seg sitt nye miljø, noe som i dette tilfelle kan skyldes stress på grunn av temperaturendringen fra fryst tilstand (-80 °C) og videre inkubering ved 25 °C. De samme stammene trengte nemlig også lengre tid (opp til 5 dager) på å oppnå samme resultat ved oppformering på skål, sammenlignet med stammene med kortere lag, som ble inkubert i kun 48 timer.

Det er i teorien kjent at skadede celler trengte lengre tid på å komme ut av lagfasen (Bertrand, 2019). Det kan derfor tenkes at stammene med forlenget lag-fase var skadet som følge av frysing, og dermed trengte tid på å reparere cellene. Fryseskader kan også settes i sammenheng med lav OD ved stagnering av vekst hos samme gruppe, da bakterier som

reparerer cellene også krever energi. Næringen i mediet blir dermed brukt opp ved et tidligere tidspunkt, enn hvis stammen hadde kommet raskt inn i eksponentiell fase. For å undersøke om stammene kunne være preget som følge av frysingen kunne det blitt kjørt et ekstra trinn med ompoding i nytt medie, og ny inkubering ved 15 °C for å kuldeadaptere kulturen ved samme betingelser som under forsøket før bruk.

5.2 Metodeutvikling

5.2.1 Standardisering av bakteriekulturenes cellekonsentrasjon – OD mot kde/ml

Målet med standardiseringen var å dyrke melkesyrebakterier og målorganismer i co-kultur med et tilnærmet likt forholdstall i konsentrasjon mellom stammene. For å oppnå ønsket konsentrasjon på 10^8 kde/ml for melkesyrebakteriene (Wiernasz *et al.*, 2017) ble det utarbeidet en standardkurve for å finne OD-verdien som tilsvarte ønsket cellekonsentrasjon hos melkesyrebakteriene. For å finne OD tilsvarende 10^4 kde/ml for målorganismene ble det benyttet en cellekalkulator (Labtools, u.å.). Valget for utarbeidelse av standardkurve for melkesyrebakteriene ble tatt på grunnlag av at dette var miljøisolater man på forhånd visste lite om. I tillegg var det ønskelig å utvikle en metode som kunne brukes mot flere målorganismer ut over denne studien. Det ville derfor være hensiktsmessig og opparbeide en god protokoll. Dette ville ikke være hensiktsmessig for målorganismene og det ble av den grunn besluttet å benytte cellekalkulator for beregning av ønsket cellekonsentrasjon, noe som viste seg å fungere bra.

Av utvalget på 6 melkesyrebakterier ble bare 4 stammer benyttet, da det ene isolatet var kontaminert og det andre isolatet ga resultater som avvek fra forventet vekstkurve (resultater ikke vedlagt). Et mulig årsak til avviket kan være grunnet eksperimentell unøyaktighet hvor det kan diskuteres om prøven kan ha blitt kontaminert under bearbeiding. Det kan også være en sammenheng mellom avviket og en eventuell klumping av celler, som følge av mangelfull/ for dårlig blanding av bakteriekultur (Sigmaaldrich, u.å.).

Det kan i ettertid vurderes om antallet på 6 stammer var i underkant for å kunne representere det totale utvalget på 93 stammer, selv om disse representerte alle miljø (røykalaks, gravlaks og sushi). Årsaken er at stammene hadde tilnærmet like vekstegenskaper i form av kort lag-fase og lik cellekonsentrasjon ved stagnering, når det i ettertid viste seg at det totale utvalget (93 stammer) hadde større variasjon i lag og sluttkonsentrasjon enn først antatt. Dette indikerer at den standardiserte OD-verdien ikke nødvendigvis er representativ for hele utvalget.

Resultatet av standardiseringen viste at en konsentrasjon på $5,0 \cdot 10^8$ kde/ml (ønsket startkonsentrasjon) tilsvarer en OD-verdi på $0,26 \pm 0,03$ (10% tillatt avvik) for melkesyrebakteriene. Det ble imidlertid valgt å benytte en OD på 0,22 under det videre arbeidet med screeningen, for å oppnå sammenlignbare resultater med Lillebjerka, 2019 og upublisert materiale av masterstudent Åshild T. Moen og ph.d. stipendiat Jelena Stupar. Cellekalkulatoren (Labtools, u.å.) viste at OD 0,26 tilsvarte $2 \cdot 10^8$ kde/ml og OD 0,22 tilsvarte $1,76 \cdot 10^8$, noe som er innenfor ønsket konsentrasjon på 10^8 kde/ml.

Totalt sett vurderes oppsettet som egnet, da det gir reproducerbare resultater og har et fast forholdstall mellom målorganisme og melkesyrebakterie. Ved fremtidige standardiseringer ville det imidlertid blitt benyttet mer tid og flere stammer for å oppnå en OD-verdi som representerte variasjonen i utvalget.

5.2.2 Test av potensielt selektive medier for melkesyrebakterier og målorganismer

For å kunne skille melkesyrebakterie og målorganisme i co-kultur, og for å sikre at de hadde gunstige vekstforhold under screeningen etter inhiberende egenskaper, ble stammene testet på selektive eller differensielle medier.

Melkesyrebakteriene ble dyrket opp på MRS (anaerobt ved 25 °C i 2-5 døgn), som er designet for å fremme vekst av arter av *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* og *Leuconostoc*. (ThermoScientific, u.å.-c). Det kan i ettertid tyde på at bruken av MRS som vekstmedie kan være årsaken til dårlig vekst hos enkelte stammer i form av små glassaktige kolonier (figur

18b), da disse i ettertid ble identifisert som *Carnobacterium spp.* For stammene med dårlig vekst på MRS ble det valgt å teste ut M17- agar under samme vekstbetingelser som MRS, noe som viste seg å ha god effekt. Resultatene viste tydelige kolonier av god størrelse etter 48 timers inkubering (figur 18 A), selv om mediet i utgangspunktet er tiltenkt melkesyrebakterier isolert fra melkeprodukter (ThermoScientific, u.å.-b). Stammene med dårlig kolonidannelse på MRS-agar under medietesting var alle preget av en lengre lag-fase under testing av vekstegenskaper ved 15 °C (figur 10,13 og 15). Melkesyrebakteriene ble testet på JA og PAB for å dokumentere eventuell vekst og om de eventuelt kunne differensieres fra målorganismene. Stammene artet seg som hvite kolonier av på JA (figur 20) og hadde fravær av vekst på PAB.

For *S. putrefaciens* ble JA tilsatt 0,04% L-cystein testet som egnet medie. Målet var å oppnå sorte kolonier som følge av at bakterien danner H₂S ved nedbrytning av thiosulfat og/eller L-cystein og videre utfelling av FeS (NMKL, 2006). Gram, Trolle og Huss (1987) dokumenterte at tilsats av L-cystein i jernagar var nødvendig for påvisning av H₂S i *Alteromonas putrefaciens* (nå *S. putrefaciens*) ved høy temperatur (20 °C). Inkuberingen i denne studien forløp aerobt ved 25 °C i 48 timer.

Som forventet ble det observert sort kolonidannelse ved endt inkubering. Lignende resultater ble også påvist av Jørgensen og Huss (1989) og Serio *et al.* (2014) som begge fikk påvist sorte kolonier under samme vekstbetingelser. Etter bare 12 timers inkubering hadde stammen i studien overaskende god vekst. Det hadde ikke utviklet seg flere kolonier etter 48 timer, men koloniene var betydelig større enn tidligere. I forbindelse med videre arbeid var det dermed avgjørende at skålene spottet med målorganismen (alene og i co-kultur) ble sjekket jevnlig, for å ikke oppnå spotter som ikke kunne kvantifiseres.

Det var ikke uventet at melkesyrebakteriene hadde vekst på JA siden dette er et rikt medium og inkubasjonsbetingelsene var gunstige. Det var dermed uventet at veksten var såpass god under aerobe forhold siden melkesyrebakterier er anaerobe, men aerotolerante organismer (König og Fröhlich, 2017). Påstanden om at vekst av melkesyrebakterier kan forekomme på JA isolert fra ferske- og lettprossesert fisk (NMKL, 2006), bekrefter resultatene siden stammene

i denne studien er miljøisolater fra røykalaks, gravlaks og sushi. Ut ifra oppnådde resultater kan man konkludere med at JA ikke fungerer som et selektivt medie for *S. putrefaciens* men likevel egnet for formålet da det differensierte mellom melkesyrebakterier (hvite kolonier) og *S. putrefaciens* (sorte kolonier).

For *P. fluorescens* ble PAB tilsatt C-F-C supplement valgt som mulig selektivt medie på grunnlag av anbefalingen for selektiv isolering av *Pseudomonas* spp fra kjølte matvarer (*ThermoScientific, u.å.-a*). Inkubering på 30 °C i 48 timer ga tilfredsstillende vekst i form av lys, strågul vekst, som også hadde fluoriserende effekt ved bruk av UV-lys (figur 19). Det var i tillegg som forventet ingen vekst av melkesyrebakterier på noen av skålene, som bekrefter at mediet selekterer for *P. fluorescens*. Hadde det allikevel vist seg å være vekst av melkesyrebakterier ville disse lett kunne skilles fra målorganismen ved hjelp av UV-lys.

5.3 Screening av melkesyrebakteriers inhiberende effekt på utvalgte forringelsesmikrobiota

Hovedmålet med oppgaven var å screene et utvalg melkesyrebakterier isolert fra røykalaks, gravlaks og sushi, fra ulike produsenter (A-H) for deres biokonserverende effekt på forringelsesbakteriene *S. putrefaciens* og *P. fluorescens*. Metodeoppsettet for screening etter biokonserverende faktorer mot *P. fluorescens* i fiskejuice var godt egnet. Både målorganismen og melkesyrebakterier alene hadde vekst i fiskejuicen ved 15 °C. Oppdyrking i fiskejuice i 96 timer resulterte i et kimtall som varierte fra 8,2-8,9 kde/ ml for *P. fluorescens* (uten uteliggere) og 6,73 til 9,86 for melkesyrebakteriene. Et fravær av inhibering av målorganismen ville dermed ikke skyldes fravær av vekst hos hverken målorganisme eller beskyttende kultur.

Den eneste utfordringen var ikke kvantifiserbare kolonier etter 48 timers inkubering av *P. fluorescens* spottet alene og i co-kultur på PAB. Skålene ble valgt avlest etter i underkant av 24 timer, da koloniene etter 48 timer var så store at de fløt inn i hverandre. Det ble ikke registrert flere kolonier etter 48 timer enn ved 24 timer. Lillebjerka (2019) opplevde lignende resultater ved spotting av *E. coli* på VRBA og BHI hvor det var vanskelig å fastsette

inkubasjonstid før kvantifisering av samme årsak. Det kan derfor se ut til at det ikke er alle medier og stammer som er like godt egnet for spotting, og at det videre kan føre til utfordringer knyttet opp mot utførelse av en allerede fastsatt metodikk. Standardisering av inkubasjonstid ved bruk av spotteteknikk burde allikevel vært optimalisert på forhånd. Man kunne da fått en bedre innblikk i vekstforløpet og unngått ekstra arbeid med overgrodde skåler under selve screeningprosessen.

P. fluorescens dyrket alene ble kvantifisert på både PAB og BHI for å undersøke at det selektive mediet ikke hemmet målorganismen, og dermed bekreftet at en eventuell inhibering faktisk skyldtes melkesyrebakterienes aktivitet og ikke mediet. Resultatene fra kvantifiseringen av *P. fluorescens* alene viste et høyere kimtall på PAB enn på BHI på henholdsvis 9,0 log- kde/ml og 8,7 log- kde/ml ($p = 0,004$). Dette betyr at det er signifikante forskjell mellom de ulike gruppene. Årsaken til forskjellen var ett brønnplateoppsett som viste høyere kimtall for halvparten av brønnene med målorganisme dyrket alene. Årsaken til dette er ikke verifisert, men kan skyldes pipettering eller annen eksperimentell unøyaktighet. Dersom disse kimtallene betraktes som uteliggere i utvalget er det ikke signifikant forskjell mellom *P. fluorescens* på de ulike mediene ($p=0,102$).

Siden uteliggere i oppsettet utgjør et såpass liten del i forhold til det totale bildet vurderes systemet allikevel til å være egnet basert på resterende data. Det at det er signifikante forskjeller trenger heller ikke være av betydning. Ettersom det var det selektive mediet som hadde høyere kimtall, kan det fortsatt konkluderes med at PAB ikke hadde noen hemmende effekt på *P. fluorescens* sammenlignet med BHI.

For å vurdere resultatene av screeningen ble det valgt følgende grenseverdier basert på reduksjon i kimtall: en log-reduksjon på $< 1,0$ ga ingen inhibering, en log-reduksjon mellom 1,0 og 3,0 ga middels inhibering og verdier $> 3,0$ ble ansett som en god inhiberende effekt (Wiernasz *et al.*, 2017). 14 av 29 melkesyrebakterier viste seg å ha inhiberende egenskaper i middels eller stor grad med en gjennomsnittlig log-reduksjon på 3,4. For *P. fluorescens* ble det funnet at ingen av stammene isolert fra røykalaks, og bare stamme nr. 105 fra gravlaks hadde en inhiberende effekt ($\geq 3,0$ log-reduksjon). Stammene 63, 68, 88, 126, 151, 152, 299, 406 og 455 isolert fra sushi hadde en god inhiberende effekt, og stamme nr. 67, 292, 340 og

461 hadde middels inhiberende effekt mot *P. fluorescens*. Det at en stamme har middels hemmende effekt mot *P. fluorescens* forkaster ikke muligheten for at de kan ha en bedre inhiberende effekt mot annen mikrobiota. Stammene med både middels og god effekt burde arbeides videre med for å undersøke om de kan ha hemmende effekt mot flere gram-negative eller gram-positive bakterier isolert fra spiseklar sjømat.

Studien av Lillebjerka (2019) dokumenterte at flere av melkesyrebakteriene benyttet i denne studien også hadde en inhiberende effekt mot en eller flere patogene mikroorganismer (*Listeria innocua*, *Escherichia coli* og *Staphylococcus aureus*). En av stammene som skiller seg ut er stamme nummer 461. Denne hadde middels inhiberende effekt mot *P. fluorescens* og var hos Lillebjerka, 2019 den eneste stammen med god inhiberende effekt hos samtlige målorganismer. Ut fra resultatene ser man at stammen kan ha et økt potensiale som en mulig biokonserverende faktor mot både patogene og forringelsesmikrobiota spiseklar sjømat og har i tillegg vist å ha inhiberende effekt hos både G+ og G- mikrobiota.

Av stammene med hemmende effekt ble 13 stk. identifisert som *Leuconostoc* spp. og en som *Carnobacterium* spp (tabell 5). Stammer av *Leuconostoc* spp. er vanligvis benyttet som startkultur ved fermentering av kjøtt, melk og grønnsaker (Akbar, Ali og Anal, 2016), men har også blitt isolert fra ulike sjømatprodukter som blant annet fersk -og kaldrøkt laks, og kokte, rensede reker (Hansen, Gill og Hussa, 1995; Matamoros *et al.*, 2009; Gómez-Sala *et al.*, 2015). *Leuconostoc mesenteroides* er påvist å ha god bakteriosinproduksjon og produserer blant annet bakteriosinene leucocin A og mesenterocin 5, som har vist seg å være svært aktiv mot *L. monocytogenes* (Daba *et al.*, 1991; Calo-Mata *et al.*, 2008). Mesenterocin 5 har i tillegg vist å ha ingen inhiberende aktivitet mot flere melkesyrebakterier og vist seg å være varmestabilt i 30 minutter ved 100 °C (Daba *et al.*, 1991). Egenskaper som kan komme godt med som en eventuell biokonserverende faktor i spiseklare sjømatprodukter.

Matamoros *et al.* (2009) dokumenterte at *L. piscum* og *L. geleidum* forhindret uønsket odør og forlenget holdbarheten og til kaldrøkt laks ved 14 og 28 dager, hvor kontrollen var totalt forringet. Samme studie viste også at *Leuconostoc* hadde en hemmende effekt på 2 log for *L. monocytogenes* og *S. aureus* (Matamoros *et al.*, 2009). Det er derfor ikke overaskende at

stammene studien viser til resultater som kan gjøre dem til en mulig kandidat i biokonservering av spiseklar sjømat.

Stammene uten inhiberende effekt mot målorganismen, ble identifisert som *Carnobacterium* spp. og *Weissella* spp noe som var noe uventet, spesielt da *Carnobacterium* har vist lovende resultater når det kommer til inhibering av ulike G+ og G- mikroflora som *L. monocytogenes*, *S. aureus* *Pseudomonas* spp og *Shewanella* spp. (Brillet *et al.*, 2005; Wiernasz *et al.*, 2017; Wiernasz *et al.*, 2020; Matamoros *et al.*, 2009). På den annen side er arter av *Carnobacterium* også kjent for å produsere bakteriosiner (carnobacteriosin, piscicolin og divergicin) som er mest spesifikke på gram positive bakterier (Leisner *et al.*, 2007), noe som kan være grunnen til fravær av aktivitet mot gram- negative *P. fluorescens*.

Årsaken til de ulike stammenes inhiberende effekt ble ikke undersøkt i denne studien. Melkesyrebakterier er konkurrerende organismer, som har evnen til å senke pH i miljøet rundt seg ved produksjon av organiske syrer (Stiles, 1996). *Leuconostoc* og *Carnobacterium* er kjent for å produsere melkesyre, og *Leuconostoc* blir ofte benyttet som startkultur for syrning av ulike meieriprodukter (Ju, Kim og Lee, 2016). *Weissella* har også blitt dokumentert å produsere melkesyre, og har potensiale som både startkultur og til bruk i biokonservering. Stammer av *Weissella* er imidlertid lite studert da den enda ikke har fått GRAS- status grunnet enkelte stammers evne til å produsere biogene aminer og har vist antibiotika resistens (Fessard og Remize, 2017; Kang, Yeu og Hong, 2019)

pH i fiskejuicen som før inokulering ble målt til 6,7. ble ikke videre undersøkt etter 96 timers inkubering. *P. fluorescens* har et optimalt forhold for vekst ved pH > 5,8, og vil ved lavere verdier ha en redusert veksthastighet (Andreani og Fasolato, 2017). Det er også påvist at en lav pH fremmer bakteriosinproduksjon (Rodgers, 2001).

Screeningen av *S. putrefaciens* bød på flere utfordringer. Etter 96- timers inkubering i brønnplate ved 15 °C viste ingen brønner tilsatt *S. putrefaciens* alene en økning av OD. Dette kan tyder på dårlige vekstforhold i fiskejuicen, noe som var uventet siden *S. putrefaciens* er ansett som en de vanligste forringelsesbakteriene i kjølelagret fisk- og sjømat (Paździor, 2016;

Gram, Trolle og Huss, 1987). Det ble imidlertid valgt å fullføre spottingen, da det muligens kunne være vekst, og en eventuell inhibering i co-kulturen på differensielt medie.

Etter spotting (inkubert ved 25 °C i 48 timer) hadde skålene med *S. putrefaciens* alene og i co-kultur vekst i form av hvite kolonier på JA (figur 23 bilde 2 og 3), noe som var overaskende med tanke på sorte kolonier ved test av JA ved 25 °C. Dette betyr at melkesyrebakterier og målorganisme allikevel ikke kunne skilles fra hverandre ved oppdyrking i co-kultur som først antatt. Det ble også observert forskjeller mellom spotting av målorganisme på JA og BHI (figur 21 bilde 1 og 4), hvor det virket som om stammen hadde bedre vekstbetingelser i BHI enn på differensielt medie. Det kan derfor se ut som om bruk av JA hemmer vekst av *S. putrefaciens* i noen grad.

Veksten av *S. putrefaciens* ble i ettertid undersøkt ved ny utstrykning på JA, og inkubert ved samme betingelser som i brønnplaten (15 °C) for å verifisere resultatet. Resultatene viste på nytt hvite kolonier til tross av tilsats av L-cystein og innholdet av tiosulfat som svovelkilde i mediet. Det kan dermed antas at stammen har fravær av H₂S produksjon ved 15 °C. Lignende resultater ble dokumentert av Undrum (2015) med fravær av H₂S produksjon fra enkelte stammer av *S. putrefaciens* på JA tilsatt L-cystein inkubert ved 15 °C. Andre studier viser også til tilsvarende resultater på *Shewanella*, dog med en høyere inkuberingstemperatur (Dalgaard, 1995; Serio *et al.*, 2014). Det kan allikevel tenkes at stammen produserer H₂S under andre betingelser som høyere temperatur eller på andre egnede medier, siden sort kolonidannelse på JA for H₂S produserende organismer anbefales en inkuberingstemperatur på 20- 25 °C.

En av årsaken til ikke-synlig vekst i brønnplate tilsatt fiskejuice kan være at stammens metabolske aktivitet er for lav til å kunne reproduseres ved gitt temperatur (Andreani og Fasolato, 2017). Her kan stress ved for rask temperaturendring fra 25 til 15 °C være en mulig faktor (Bertrand, 2019). På den annen side er *Shewanella putrefaciens* kjent som en SSO i både ferske og spiseklare, kjølelagrede sjømatprodukter (Powell og Tamplin, 2012; Gram og Huss, 1996; Speranza *et al.*, 2013), og skal i utgangspunktet være rustet for å tåle temperaturer helt ned i 0 °C. Stammen benyttet i denne studien er en referansestamme opprinnelig isolert fra smør (CCUG, u.å.b). Det kan derfor hende at den egenproduserte fiskejuicen ikke hadde gode vekstforhold siden stammen hadde vekst på JA ved 15 °C. Stammens vekstbetingelser ved 15

°C burde på samme måte som melkesyrebakteriene også ha blitt testet på egnet medie før screeningprosessen. NMKL metode nr. 184 anbefaler å benytte dekklag for å unngå bleking av kolonier (NMKL, 2006), noe som i screeningprosessen ikke var mulig, da topplag førte til at spottene spredte seg på hele skålen og ikke var kvantifiserbar.

Hovedutfordringen med metodeoppsettet var hovedsakelig manglende vekst av *S. putrefaciens* i fiskejuice, og videre hvit kolonidannelse ved spotting av kulturen på egnet medie begge inkubert ved 15 °C. For å oppnå et fungerende system kan det være ideelt å benytte en annen stamme isolert fra sjømat, da denne muligens vil ha bedre vekstbetingelser ved lavere temperaturer og være bedre tilpasset fiskejuice som medie enn en referansestamme ville hatt. Videre måtte det ha blitt sett på andre muligheter for å skille melkesyrebakteriene fra målorganismen, ved å enten benytte et annet medie som påviser utfelling av FeS eller et medie som selekterer spesifikt for *S. putrefaciens*.

Det må tas i betraktning at studien bare tar for seg en liten del av arbeidet for å finne en egnet stamme som kan fungere som en biokonserverende faktor i spiseklar sjømat (Leroi *et al.*, 2015). I forbindelse med videre arbeid vil det være hensiktsmessig å teste stammenes vekstegenskaper ved temperaturer under 15 °C, siden spiseklare sjømatprodukter oppbevares ≤ 4 °C (EFSA, 2015). I tillegg vil det være nødvendig å undersøke hvilke metabolitter stammene produserer. Dette vil være ideelt med tanke på stammenes mulige antimikrobielle evner, men det kan samtidig ikke utelukkes at det ikke produseres metabolitter forbundet med forringelse. Arter av *Carnobacterium*, *Weissella* og *Leuconostoc* også har vist å ha forringende egenskaper ved lav temperatur i form av ubehagelig lukt, smak og slimdannelse (Dalgaard, P. *et al.*, 2003; Lyhs, 2002; Hansen og Huss, 1998; Comi, 2017). *Carnobacterium* har i tillegg evnen til og produserer biogene aminer av typen tyramin som har blitt påvist i vakuumpakket gravlaks hvor også *Weissella* har blitt identifisert (Emborg *et al.*, 2002; Jay, Loessner og Golden, 2008).

De ulike stammenes toleranse for ulike prosessparametere bør også undersøkes. Da med tanke på deres toleranse for høyere temperatur (under eksempelvis røyking), deres toleranse ovenfor salt, senkning i pH og vannaktivitet (a_w), samt deres toleranse ovenfor røyking eller tilsats av rensert, kondensert røyk. Vet man hvordan de ulike stammene oppfører seg under

overnevnte parametere får man også en indikasjon på når disse eventuelt kan tilsettes produktet. Om en stamme viser seg å ikke tolerere høy temperatur kan den allikevel benyttes ved å tilføres produktet etter en eventuell varmebehandling.

5.4 Identifisering av melkesyrebakterier isolert fra spiseklar sjømat

Det var på forhånd ingen informasjon tilgjengelig for de ulike melkesyrebakteriene som ble benyttet i oppgaven foruten om at de var isolert ulike produkter (røykalaks, gravlaks og sushi), fra ulike produsenter. En identifisering var dermed ønskelig for å lettere kunne vurdere dem som potensielt egnede stammer i biokonservering av spiseklar sjømat. 14 av 35 stammer var allerede identifisert av Lillebjerka (2019).

Av 35 stammer sendt til sekvensering kom 34 stk. tilbake med sekvenser (tabell 5). Dette indikerer at prosedyren for isolering av DNA og rensing ved hjelp av *GeneJET PCR Purification kit* fungerte godt, og at målt absorbans samsvarte med renhet på DNA-produktet. Stammene fra sekvenseringen ble identifisert som *Carnobacterium* (45,7 %), *Leuconostoc* (42,9 %) og *Weissella* (8,3 %) med > 99,6 % sikkerhet. Dette var overaskende med tanke på at melkesyrebakterier ved flere anledninger har blitt isolert fra fersk -og spiseklar sjømat. Eksempler på dette er stammer av *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, og *Lactobacillus* (Leroi, 2010; Ghanbari *et al.*, 2013; Truelstrup Hansen, Røntved og Henrik Huss, 1998).

7 av 35 stammer isolert fra røykalaks (produsent D, E, F, G og H) ble identifisert som *Carnobacterium*. Dette samsvarer med funnene av Leroi *et al.* (1998) hvor bakterien viste seg å være en del av den dominerende floraen ved endt holdbarhet i samme produkt. Andre studier viser også til lignende resultater hvor *Carnobacterium* ble isolert fra vakuumpakket, kaldrøkt laks (Paludan-Müller *et al.*, 1998; González-Rodríguez *et al.*, 2002). 7 av 35 stammer isolert fra gravlaks (produsent D, E, F og G) ble identifisert som *Carnobacterium* og *Leuconostoc* og 20 av 35 stammene isolert fra sushi (produsent A, B og C) ble identifisert som *Carnobacterium*, *Leuconostoc* og *Weissella*. Alle er melkesyrebakterier forbundet med vakuumpakket, gravede fiskeprodukter lagret ved kjøleskapstemperatur (Leisner *et al.*, 1994;

Calo-Mata *et al.*, 2008) *Carnobacterium* og *Weissella* er også tidligere isolert fra fersk sushi fra dagligvare (Hoel, Jakobsen og Vadstein, 2017). I og med at sushi er et sammensatt produkt bestående ulike typer rå fisk, kokte/rå grønnsaker og ris er det vanskelig å dokumentere hvor stammene i denne studien opprinnelig kommer fra. *Leuconostoc* er isolert fra både vegetabiler og fisk (Akbar, Ali og Anal, 2016). Det kan også tenkes at hygiene under produksjon av sushi kan være kilde til kontaminasjon, på grunn av hyppig håndtering (Hoel, Jakobsen og Vadstein, 2017).

Under fangst, håndtering og prosessering kan fisk og sjømat kontamineres av et bredt spekter av mikroorganismer (Gram og Huss, 1996). Det var derfor noe overraskende at det var såpass lite variasjon mellom artene når melkesyrebakteriene er isolert fra flere ulike produkter og i tillegg fra ulike produsenter. Spesielt med tanke på sushi, som er et produkt bestående av flere elementer (ris, grønnsaker, fisk etc.). På den annen side er det ingen informasjon om når stammene ble isolert fra de ulike produktene. Det vil si om produktene var lagret over tid eller relativt nyproduserte, noe som kan være av betydning, siden pH, nærings sammensetning, atmosfære og mikrofloraen er varierende gjennom hele produktets levetid (Gram og Dalgaard, 2002). Mens noen stammer er til stede fra start, vil andre kunne vokse opp som sekundærflora i produktet og veksten av primærfloraen avtar (Robertson, 2009). Ble stammene isolert ved et tidlig tidspunkt i lagringsprosessen vil kanskje oppformering av enkelte stammer ikke kommet like godt i gang, og den dominerende floraen ved det gitte tidspunkt vil dermed være lettere å isolere.

En annen faktor som kan ha påvirkning er de ulike prosessparametere ved produksjon av de ulike produktene (Gram og Dalgaard, 2002) . For røykalaks ble 7 av 7 arter identifisert som *Carnobacterium*, og siden det er det eneste produktet som er røyket og varmebehandlet, kan det tenkes at dette var den eneste bakterien som tålte denne type behandling. Stammene identifisert er i tillegg bare et utvalg på 35 av til sammen 100 stammer, så det er heller ikke utenkelig at noen av de resterende stammene også kan være av andre arter.

5.5 Melkesyrebakteriers vekstkinetikk under forhold tilsatt røykdyrekondensat

De 14 stammene som hadde inhiberende effekt i middels eller høy grad mot *P. fluorescens* ble ansett som de mest lovende kandidatene for biokonservering av spiseklar sjømat. Det var derfor ønskelig å undersøke deres potensiale som biokonserverende faktor ytterligere. Dette ble gjort gjennom testing av stammenes vekstegenskaper i BHI ved tilsats av 0,26 % røyksyre-kondensat. For at stammene skal kunne fungere som en fremtidig beskyttende kultur i biokonservering av kaldrøkt laks produsert med rensert kondensert røyk, må de blant annet ha evnen til å tolerere de ulike komponentene til stede i røyksyre-kondensatet (Leroi *et al.*, 2015).

Røyksyre-kondensat inneholder antimikrobielle komponenter (karboksylsyrer, fenoler og organiske syrer) som har resultert i en forlenget lag- fase hos gram- positive bakterier (Lingbeck *et al.*, 2014; Milly, 2003). Dette ser også ut til å være tilfelle her, da røyksyre-kondensatet hadde en hemmende effekt på nesten alle stammene i form av en forlenget lag- fase, og hos enkelte en lavere cellekonsentrasjon enn kontrollen ved stagnering (figur 24). Røyksyre-kondensatet førte allikevel ikke til fullstendig inhibering av vekst hos noen av stammene, og stamme nr. 68, 88, 105, 126, 152, 299 og 406 (alle *Leuconostoc* spp.) endte opp med tilnærmet lik cellekonsentrasjon som kontrollen. Jo raskere den beskyttende kulturen kommer inn i eksponentiell fase- jo større er kjangsen for at den skal kunne lykkes som biokonserverende faktor (Donnelly, Ziegler og Acton, 1982). Dette betyr at sistnevnte stammer kan ha potensiale, så lenge veksten ikke blir betydelig hemmet.

Basert på stammenes vekstegenskaper i BHI tilsatt røyksyre-kondensat anses stamme nr. 299 å være den mest egnede kandidat, med ingen detekterbar lag og med lik cellekonsentrasjon som kontrollen (tabell 6). Denne burde dermed undersøkes videre. I og med at stammen opprinnelig ble isolert fra sushi kan det tenkes at den også har evnen til å tolerere lavere pH i produktet. Bruk av syrnet ris ($\text{pH} \leq 4,6$) i sushi fungerer som en av flere barrierer mot mikrobiell vekst ved å senke pH i produktet (Hoel, Jakobsen og Vadstein, 2017).

Det er påvist at bruk av røyksyre-kondensat kan redusere pH i produktet sammenlignet med tradisjonell røyking (Valø, Jakobsen og Lerfall, 2020). PH i mediet ble dermed regulert til 6,7 for å få tilnærmet like betingelser som i fiskejuicen. Ved måling av pH på 5 stammer ved stagnering av vekst, viste resultatene en gjennomsnittlig pH på 6,7 (kontroll) og 6,6 (prøve tilsatt røyksyre-kondensat), som er en endring på 0,1 for prøvene tilsatt røyksyre-kondensat. Lignende resultater ble observert av Donnelly, Ziegler og Acton (1982) med en uendret slutt-pH ved tilsats av anbefalt mengde røyksyre-kondensat i produkt. I denne studien ble pH ble målt for å undersøke om syredannelse kunne være årsak til en eventuell veksthemming. Bruk av så få stammer vil ikke være representativt for utvalget, men vil allikevel kunne gi et indikasjon på eventuelle variasjoner i gruppen. Selv om endringen i pH er liten og den eksponentiell vekst ble forsinket hos størstedelen av stammene, skal det ikke utelukkes at endringen ikke skyldes produksjon av organiske syrer (Stiles, 1996).

6. Konklusjon

Denne studien screenet et utvalg melkesyrebakterier for deres biokonserverende egenskaper mot forringelsesbakteriene *S. putrefaciens* og *P. fluorescens* ved oppdyrking av melkesyrebakterier og målorganismer i co-kultur og kvantifisert ved hjelp av mikrospotting. I den forbindelse ble vekstegenskapene til 100 melkesyrebakterier ved 15 °C undersøkt og screeningmetoden optimalisert ved utarbeidelse av standardkurve (DO mot kde/ml) for melkesyrebakteriene og testing av selektivt/ differensielt medie for melkesyrebakterier og målorganismer. Melkesyrebakteriene ble identifisert og stammene med inhiberende egenskaper mot *P. fluorescens* ble inkludert i et rørforsøk for å dokumentere deres vekstkinetikk under forhold tilsatt 0, 26% røyksyre-kondensat.

Det ble funnet at 93 av 100 stammer hadde vekst ved 15 °C, selv om noen bar preg av en forlenget lag-fase og lavere cellekonsentrasjon ved endt inkubering. 35 stammer ble videre screenet grunnet lovende resultater ved tidligere studier. Oppsettet for screeningen etter inhiberende egenskaper for *P. fluorescens* fungerte godt. 14 av 35 stammer hadde hemmende effekt på *P. fluorescens*, hvorav 4 stammer hadde middels inhiberende effekt, med en reduksjon på mellom 1,0- 3,0 log kde/ml, og 10 stammer hadde god inhiberende effekt med en reduksjon på > 3,0 log kde/ml. Deres biokonserverende egenskaper mot andre G - og G + bakterier burde dermed undersøkes videre. Oppsettet for *S. putrefaciens* fungerte ikke som ønsket med fravær av vekst i fiskejuice og manglende H₂S produksjon på JA ved 15 °C, noe som må undersøkes nærmere ved videre arbeid med stammen.

Melkesyrebakteriene ble identifisert som *Carnobacterium spp*, *Leuconostoc spp*. og *Weissella spp.*, hvor 13 stammer av *Leuconostoc* og én stamme av *Carnobacterium* hadde hemmende effekt. Ved tilsatt røyksyre-kondensat ble alle stammene, for utenom én (nr. 299), hemmet i form av en forlenget lag-fase. Stamme nummer 299 hadde ingen registrert lag og endte opp med samme cellekonsentrasjon som kontrollen. Den ansees derfor som en god kandidat som fremtidig biokonserverende faktor i kaldrøkt laks (røyket med røyksyre-kondensat), og bør studeres videre.

7. Referanseliste

- Abbas, K., Saleh, A. og Saeed, M. (2009) The relationship between water activity and fish spoilage during cold storage: A review, *J. Food Agric. Environ.*, 7.
- Ahmed, T., Kanwal, R. og Ayub, N. (2006) Influence of temperature on growth pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus acidophilus*, *Biotechnology*, 5(4), s. 481-486.
- Akbar, A., Ali, I. og Anal, A. (2016) Industrial perspectives of lactic acid bacteria for biopreservation and food safety, *Journal of Animal & Plant Sciences*, 26(4).
- Andreani, N. A. og Fasolato, L. (2017) Chapter 2 - *Pseudomonas* and Related Genera, i Bevilacqua, A., Corbo, M. R. og Sinigaglia, M. (red.) *The Microbiological Quality of Food*. Woodhead Publishing, s. 25-59.
- Bakkal, S., Riley, M. A. og Robinson, S. M. (2012) *Bacteriocins of aquatic microorganisms and their potential applications in the seafood industry*. INTECH Open Access Publisher.
- Baranyi, J. og Roberts, T. A. (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food, *International Journal of Food Microbiology*, 23(3), s. 277-294. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0).
- Bertrand, R. L. (2019) Lag phase is a dynamic, organized, adaptive, and evolvable period that prepares bacteria for cell division, *Journal of bacteriology*, 201(7), s. e00697-00618.
- Blackburn, C. d. W. (2006) Introduction, i Blackburn, C. d. W. (red.) *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing, s. xvii-xxiii.
- Boskou, G. og Debevere, J. (1998) In vitro study of TMAO reduction by *Shewanella putrefaciens* isolated from cod fillets packed in modified atmosphere, *Food Additives & Contaminants*, 15(2), s. 229-236.
- Bossis, E. *et al.* (2000) The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision.
- Bozaris, I. S., Stamatiou, A. P. og Nychas, G. J. E. (2013) Microbiological aspects and shelf life of processed seafood products, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(5), s. 1184-1190. Tilgjengelig fra: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.5873>.
- Brillet, A. *et al.* (2005) Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon, *International Journal of Food Microbiology*, 104(3), s. 309-324. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.012>.
- Buege, J. A. og Aust, S. D. (1978) [30] Microsomal lipid peroxidation, i Fleischer, S. og Packer, L. (red.) *Methods in Enzymology*. Academic Press, s. 302-310.
- Byun, J.-W. *et al.* (1997) Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys olivaceus*), *The Journal of general and applied microbiology*, 43(5), s. 305-308.
- Caldera, L. (2014) Identification and characterization of Specific Spoilage Organisms (SSOs) in different food matrices. Tilgjengelig fra: https://air.unimi.it/retrieve/handle/2434/230015/299627/phd_unimi_R09151.pdf.
- Calo-Mata, P. *et al.* (2008) Current Applications and Future Trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the Biopreservation of Aquatic Food Products, *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), s. 43-63. doi: 10.1007/s11947-007-0021-2
- Castro, M. P. *et al.* (2011) Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production, *Meat Science*, 87(4), s. 321-329. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.11.006>.
- CCUG (u.å.b) CCUG 13452 DT - *Shewanella putrefaciens*. Tilgjengelig fra: <https://www.ccug.se/strain?id=13452&s=0&p=2&sort=cc&collection=qualitycontrol&records=75&t>.
- ComBase (2020) ComBase online DMFit: ComBase.cc. Tilgjengelig fra: <https://browser.combase.cc/DMFit.aspx>.

- Comi, G. (2017) Chapter 8 - Spoilage of Meat and Fish, i Bevilacqua, A., Corbo, M. R. og Sinigaglia, M. (red.) *The Microbiological Quality of Food*. Woodhead Publishing, s. 179-210.
- Cotter, P. D., Hill, C. og Ross, R. P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food, *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), s. 777-788.
- Crowley, S., Mahony, J. og van Sinderen, D. (2013) Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives, *Trends in food science & technology*, 33(2), s. 93-109. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.07.004>.
- Daba, H. *et al.* (1991) Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*, *Appl Environ Microbiol*, 57(12), s. 3450-3455. Tilgjengelig fra: <https://aem.asm.org/content/aem/57/12/3450.full.pdf>.
- Dalgaard, P. (1995) Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish, *International Journal of Food Microbiology*, 26(3), s. 319-333. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00137-U](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00137-U).
- Dalgaard, P. *et al.* (2003) Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 C and 25 C, *Journal of Applied Microbiology*, 94(1), s. 80-89. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01806.x>.
- Dalgaard, P. *et al.* (2003) Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0°C and 25°C, *Journal of Applied Microbiology*, 94(1), s. 80-89. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01806.x.
- Datta, S. (2013) Rigor mortis and fish spoilage, *Manual on Fish Processing and Value Added Fish Products*. Mahapatra, BK, Pailan, GH, Datta, S., Sardar, P., and Munilkumar, S.(Eds.). India: Director, Central Institute of Fisheries Education Mumbai, s. 27-38.
- Derby, H. og Hammer, B. (1931) Bacteriology of butter IV. Bacteriological studies on surface taint butter, *Research Bulletin (Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station)*, 11(145), s. 1.
- Donnelly, L. S., Ziegler, G. R. og Acton, J. C. (1982) Effect of Liquid Smoke on the Growth of Lactic Acid Starter Cultures used to Manufacture Fermented Sausage, *Journal of food science*, 47(6), s. 2074-2075. doi: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb12953.x.
- EFSA (2015) Scientific and technical assistance on the evaluation of the temperature to be applied to pre-packed fishery products at retail level, *European Food Safety Authority*. Tilgjengelig fra: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4162> (Hentet: 22.05-2020).
- EFSA Dietetic Products, N. og Allergies (2014) Scientific Opinion on health benefits of seafood (fish and shellfish) consumption in relation to health risks associated with exposure to methylmercury, *EFSA journal*, 12(7), s. 3761.
- Emborg, J. *et al.* (2002) Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2° C, *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), s. 790-799. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01588.x>.
- FDA, F. D. A. (2019) *Generally Recognized as Safe (GRAS)*. www.fda.gov. Tilgjengelig fra: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/> (Hentet: 08.02.19).
- Fessard, A. og Remize, F. (2017) Why are *Weissella* spp. not used as commercial starter cultures for food fermentation?, *Fermentation*, 3(3), s. 38. doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation3030038>.
- FHI (2019) *Utbrudd av smittsomme sykdommer i Norge i 2018. Årsrapport. Vevbasert system for utbruddsvarsling (Vesuv)*. (2019). www.fhi.no: Nasjonalt Folkehelseinstitutt.
- Fletcher, G. *et al.* (2002) Spoilage of king salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) fillets stored under different atmospheres, *Journal of food science*, 67(6), s. 2362-2374.
- FN (2020) *FNs bærekraftsmål*. Tilgjengelig fra: <https://www.fn.no/Om-FN/FNs-baerekraftsmaal>.
- García, P. *et al.* (2010) Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins, *Trends in food science & technology*, 21(8), s. 373-382.

- Gedela, S. *et al.* (2007) Effect of Inhibitory Extracts Derived from Liquid Smoke Combined with Postprocess Pasteurization for Control of *Listeria monocytogenes* on Ready-to-Eat Meats†, *Journal of Food Protection*, 70(12), s. 2749-2756. doi: 10.4315/0362-028x-70.12.2749.
- Ghaly, A. E. *et al.* (2010) Fish spoilage mechanisms and preservation techniques, *American Journal of Applied Sciences*, 7(7), s. 859. Tilgjengelig fra: <https://blog.ub.ac.id/henisusanti14/files/2013/10/2010Fish-Spoilage-Mechanisms-and-Preservation-Techniques-Review-.pdf>.
- Ghanbari, M. og Jami, M. (2013) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: a promising approach to seafood biopreservation, *Lactic acid bacteria-R & D for food, health and livestock purposes. InTech*.
- Ghanbari, M. *et al.* (2013) Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – A review, *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), s. 315-324. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.039>.
- Gokoglu, N. og Yerlikaya, P. (2015) *Seafood chilling, refrigeration and freezing: Science and technology*. John Wiley & Sons.
- Gómez-Sala, B. *et al.* (2015) Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products, *European Food Research and Technology*, 241(3), s. 341-356. doi: 10.1007/s00217-015-2465-3.
- González-Rodríguez, M. a.-N. *et al.* (2002) Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level, *International Journal of Food Microbiology*, 77(1-2), s. 161-168. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00048-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00048-X).
- Gould, G. W. (1996) Industry Perspectives on the Use of Natural Antimicrobials and Inhibitors for Food Applications, *Journal of Food Protection*, 59(13), s. 82-86. doi: 10.4315/0362-028x-59.13.82.
- Gram, L., Trolle, G. og Huss, H. H. (1987) Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures, *International Journal of Food Microbiology*, 4(1), s. 65-72. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90060-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90060-2).
- Gram, L., Wedell-Neergaard, C. og Huss, H. H. (1990) The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*), *International Journal of Food Microbiology*, 10(3), s. 303-316. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(90\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(90)90077-1).
- Gram, L. (1991) Inhibition of Mesophilic Spoilage *Aeromonas* Spp. on Fish by Salt, Potassium Sorbate, Liquid Smoke, and Chilling, *Journal of Food Protection*, 54(6), s. 436-442. doi: 10.4315/0362-028x-54.6.436.
- Gram, L. og Huss, H. H. (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products, *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), s. 121-137. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01134-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01134-8).
- Gram, L. og Dalgaard, P. (2002) Fish spoilage bacteria—problems and solutions, *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), s. 262-266. doi: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00309-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00309-9).
- Gram, L. *et al.* (2002) Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 78(1), s. 79-97. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00233-7).
- Hage, Ø. (2019) Aldri har Norge solgt mer sjømat, og nå vil kineserne ha norsk fisk, *Fiskeribladet*. Tilgjengelig fra: <https://fiskeribladet.no/nyheter/?artikkel=67836> (Hentet: 01.04-2020).
- Hansen, L. T., Gill, T. og Hussa, H. H. (1995) Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold-smoked salmon, *Food Research International*, 28(2), s. 123-130. doi: [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(95\)90795-C](https://doi.org/10.1016/0963-9969(95)90795-C).
- Hansen, L. T. og Huss, H. H. (1998) Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses, *Food Research International*, 31(10), s. 703-711.
- Haraldsen, i. (2011) 25 prosent rett i søpla, *Norges forskningsråd*, 30.03.2020.
- Hattula, T. *et al.* (2001) Use of Liquid Smoke Flavouring as an Alternative to Traditional Flue Gas Smoking of Rainbow Trout Fillets (*Oncorhynchus mykiss*), *LWT - Food Science and Technology*, 34(8), s. 521-525. doi: <https://doi.org/10.1006/fstl.2001.0794>.
- Hau, H. H. og Gralnick, J. A. (2007) Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*, *Annual Review of Microbiology*, 61(1), s. 237-258. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093257.

- Held, P. (2001) *Nucleic Acid Purity Assessment Using A260/A280 Ratios*. Tilgjengelig fra: <https://www.biotech.com/resources/application-notes/nucleic-acid-purity-assessment-using-a260/a280-ratios/> (Hentet: 23.04 2020).
- Hoel, S., Jakobsen, A. N. og Vadstein, O. (2017) Effects of storage temperature on bacterial growth rates and community structure in fresh retail sushi, *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), s. 698-709. doi: 10.1111/jam.13527.
- Huis in't Veld, J. H. J. (1996) Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview, *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), s. 1-18. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01139-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01139-7).
- Huss, H. H. (1994) *Assurance of seafood quality*. Food & Agriculture Org.
- Janda, J. M. og Abbott, S. L. (2007) 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls, *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), s. 2761-2764. doi: 10.1128/jcm.01228-07.
- Jay, J. (2003) A review of recent taxonomic changes in seven genera of bacteria commonly found in foods, *Journal of Food Protection*, 66(7), s. 1304-1309.
- Jay, J. M., Loessner, M. J. og Golden, D. A. (2008) *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media.
- Jenkins, C. *et al.* (2012) Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice, *Journal of medical microbiology*, 61(4), s. 483-488.
- Jeppesen, V. F. og Huss, H. H. (1993) Characteristics and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish products, *International Journal of Food Microbiology*, 18(4), s. 305-320. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90153-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90153-8).
- Ju, S. Y., Kim, J. H. og Lee, P. C. (2016) Long-term adaptive evolution of *Leuconostoc mesenteroides* for enhancement of lactic acid tolerance and production, *Biotechnology for biofuels*, 9(1), s. 240. doi: 10.1186/s13068-016-0662-3
- Jørgensen, B. R. og Huss, H. H. (1989) Growth and activity of *Shewanella putrefaciens* isolated from spoiling fish, *International Journal of Food Microbiology*, 9(1), s. 51-62. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(89\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(89)90037-8).
- Kang, M.-S., Yeu, J.-E. og Hong, S.-P. (2019) Safety Evaluation of Oral Care Probiotics *Weissella cibaria* CMU and CMS1 by Phenotypic and Genotypic Analysis, *Int J Mol Sci*, 20(11), s. 2693. doi: 10.3390/ijms20112693
- Kim, M. og Chun, J. (2014) Chapter 4 - 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server, i Goodfellow, M., Sutcliffe, I. og Chun, J. (red.) *Methods in Microbiology*. Academic Press, s. 61-74.
- Korber, D. R., Mangalappalli-Illathu, A. K. og Vidović, S. (2009) 6 - Biofilm formation by food spoilage microorganisms in food processing environments, i Fratamico, P. M., Annous, B. A. og Gunther, N. W. (red.) *Biofilms in the Food and Beverage Industries*. Woodhead Publishing, s. 169-199.
- König, H. og Fröhlich, J. (2017) Lactic Acid Bacteria, i König, H., Uden, G. og Fröhlich, J. (red.) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Cham: Springer International Publishing, s. 3-41.
- Labtools (u.å.) E. coli Cell Culture Concentration from OD600 Calculator. labtools.us. Tilgjengelig fra: <http://www.labtools.us/bacterial-cell-number-od600/>.
- Langille, M. G. I. *et al.* (2013) Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences, *Nature Biotechnology*, 31(9), s. 814-821. doi: 10.1038/nbt.2676.
- Leal, C. R. L., Prates, R. A. og de Araújo, S. A. (2019) Automated Colony Counter for Single Plate Serial Dilution Spotting, *Progress in Pattern Recognition, Image Analysis, Computer Vision, and Applications*, s. 410.
- Leblanc, L. *et al.* (2001) Do stresses encountered during the smoked salmon process influence the survival of the spoiling bacterium *Shewanella putrefaciens*?, *Letters in applied microbiology*, 30(6), s. 437-442. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00738.x>.

- Leisner, J. J. *et al.* (1994) Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed sugar-salted fish, *Journal of Applied Bacteriology*, 76(5), s. 417-423. doi: [10.1111/j.1365-2672.1994.tb01097.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01097.x).
- Leisner, J. J. *et al.* (2007) Carnobacterium: positive and negative effects in the environment and in foods, *FEMS microbiology reviews*, 31(5), s. 592-613. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00080.x>.
- Leistner, L. (1994) Further Developments in the Utilization of Hurdle Technology for Food Preservation, i Fito, P., Mulet, A. og McKenna, B. (red.) *Water in Foods*. Amsterdam: Pergamon, s. 421-432.
- Leistner, L. og Gorris, L. G. M. (1995) Food preservation by hurdle technology, *Trends in food science & technology*, 6(2), s. 41-46. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)88941-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88941-4).
- Leistner, L. (2000) Basic aspects of food preservation by hurdle technology, *International Journal of Food Microbiology*, 55(1), s. 181-186. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6).
- Leroi, F. *et al.* (1998) Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C, *International Journal of Food Microbiology*, 39(1), s. 111-121. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00126-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00126-8).
- Leroi, F. (2010) Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products, *Food Microbiology*, 27(6), s. 698-709. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.016>.
- Leroi, F. (2011) Biopreservation of lightly preserved seafood products, 4. Tilgjengelig fra: <https://archimer.ifremer.fr/doc/00057/16784/14238.pdf>.
- Leroi, F. *et al.* (2015) Selection of bioprotective cultures for preventing cold-smoked salmon spoilage, *International Journal of Food Microbiology*, 213, s. 79-87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.005>.
- Lianou, A., Panagou, E. Z. og Nychas, G. J. E. (2016) 1 - Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, i Subramaniam, P. (red.) *The Stability and Shelf Life of Food (Second Edition)*. Woodhead Publishing, s. 3-42.
- Lillebjerka, A. (2019) *Biokonservering - Screening av melkesyrebakterier for inhibering av patogene bakterier i sjømat*, NTNU. Tilgjengelig fra: <https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/2616825>.
- Lingbeck, J. M. *et al.* (2014) Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation, *Meat Science*, 97(2), s. 197-206. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.02.003>.
- Lovdata (2019a) *Forskrift om aroma og næringsmiddel ingredienser med aromagivende egenskaper til anvendelse i og på næringsmidler (aromaforskriften)*. Lovdata.no. Tilgjengelig fra: [https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2011-06-06-669?q=\(EF\)%202065/2003](https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2011-06-06-669?q=(EF)%202065/2003).
- Lovdata (2019b) *Forskrift om næringsmiddelhygiene (næringsmiddelhygieneforskriften)*. Lovdata.no. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1623>.
- Lunestad, B. T. og Rosnes, J. T. (2008) 16 - Microbiological quality and safety of farmed fish, i Lie, Ø. (red.) *Improving Farmed Fish Quality and Safety*. Woodhead Publishing, s. 399-427.
- Lyhs, U. (2002) Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00634-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00634-1).
- Lyu, F. *et al.* (2017) Changes of membrane fatty acids and proteins of *Shewanella putrefaciens* treated with cinnamon oil and gamma irradiation, *Bioresources and Bioprocessing*, 4. doi: [10.1186/s40643-017-0140-1](https://doi.org/10.1186/s40643-017-0140-1).
- Løvdal, T. (2015) The microbiology of cold smoked salmon, *Food Control*, 54, s. 360-373. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.025>.
- Macé, S. *et al.* (2012) Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR–TTGE, *Food Microbiology*, 30(1), s. 164-172. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.013>.
- Masniyom, P. (2011) Deterioration and shelf-life extension of fish and fishery products by modified atmosphere packaging, *Songklanakarinn Journal of Science & Technology*, 33(2).

- Matamoros, S. *et al.* (2009) Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon, *Journal of Food Protection*, 72(2), s. 365-374. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.2.365>.
- Mattilsynet (2016) Tilsyn- spiseferdig sjømat, *Tilsyn med sjømatvirksomheter som håndterer spiseferdige produkter*. Tilgjengelig fra: <https://sjomatnorge.no/wp-content/uploads/2016/06/Prosjektplan-tilsyn-spiseferdig-sj%C3%B8mat-2016.pdf>.
- Mignard, S. og Flandrois, J. P. (2006) 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment, *Journal of Microbiological Methods*, 67(3), s. 574-581. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.009>.
- Miller, A. *et al.* (1973) Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, and an *Achromobacter* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 26(1), s. 18-21. Tilgjengelig fra: <https://aem.asm.org/content/aem/26/1/18.full.pdf>.
- Milly, P. J. (2003) *Antimicrobial properties of liquid smoke fractions*, uga.
- Min, B. og Ahn, D. (2005) Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products-A review, *Food Science and Biotechnology*, 14(1), s. 152-163. Tilgjengelig fra: https://scholar.google.no/scholar?hl=no&as_sdt=0%2C5&q=Mechanism+of+lipid+peroxidation+in+meat+and+meat+products-A+review&btnG=.
- Muhialdin, B. *et al.* (2011) Biopreservation of food by lactic acid bacteria against spoilage fungi, *Annals. Food Science and Technology*, 12, s. 45-57.
- Mukundan, M. K., Antony, P. D. og Nair, M. R. (1986) A review on autolysis in fish, *Fisheries Research*, 4(3), s. 259-269. doi: [https://doi.org/10.1016/0165-7836\(86\)90007-X](https://doi.org/10.1016/0165-7836(86)90007-X).
- Muñoz-Olivas, R. (2004) Screening analysis: an overview of methods applied to environmental, clinical and food analyses, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(3), s. 203-216. doi: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(04\)00318-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(04)00318-8).
- Murray, B. (2019) *Pseudomonas as a spoilage organism*. Tilgjengelig fra: <https://www.mb-labs.com/resources/pseudomonas-spoilage-organism/> (Hentet: 19.12.2019 2019).
- Muyzer, G., de Waal, E. C. og Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl Environ Microbiol.*, 59(3), s. 695-700. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7683183>.
- NCBI (u.å.) Nucleotide blast. Tilgjengelig fra: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LC=blasthome (Hentet: 23.04-2020).
- Nes, I. F., Diep, D. B. og Holo, H. (2007) Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*, *Journal of bacteriology*, 189(4), s. 1189-1198.
- NMKL (2006) Kimtal og spesifikke fordærvelsesbakterier i fisk og fiskevarer. (b. nr. 185). Nordisk metodikomité for næringsmidler.
- Norges-sjømatråd (2020) *Tidenes start på sjømatåret – eksporten av norsk sjømat økte med 15 prosent*. Tilgjengelig fra: <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/tidenes-start-pa-sjomataret--eksporten-av-norsk-sjomat-okte-med-15-prosent/>.
- Oliveira, G. B. d. *et al.* (2015) Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?, *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), s. 313-321.
- Ouattara, B. *et al.* (1997) Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms, *International Journal of Food Microbiology*, 37(2), s. 155-162. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00070-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00070-6).
- Pakchung, A. A., Soe, C. Z. og Codd, R. (2008) Studies of Iron-Uptake Mechanisms in Two Bacterial Species of the *Shewanella* Genus Adapted to Middle-Range (*Shewanella putrefaciens*) or Antarctic (*Shewanella gelidimarina*) Temperatures, *Chemistry & biodiversity*, 5(10), s. 2113-2123.

- Paludan-Müller, C. *et al.* (1998) Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum-and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 C, *International Journal of Food Microbiology*, 39(3), s. 155-166.
- Paździor, E. (2016) *Shewanella putrefaciens* – a new opportunistic pathogen of freshwater fish, 60(4), s. 429. doi: <https://doi.org/10.1515/jvetres-2016-0064>.
- Piard, J. og Desmazeaud, M. (1991) Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products, *Le lait*, 71(5), s. 525-541.
- Powell, S. M. og Tamplin, M. L. (2012) Microbial communities on Australian modified atmosphere packaged Atlantic salmon, *Food Microbiology*, 30(1), s. 226-232. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.002>.
- Qiagen (2006) DNeasy Blood and tissue handbook. www.qiagen.com. Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/cn/resources/resourcedetail?id=6b09dfb8-6319-464d-996c-79e8c7045a50&lang=en>.
- Qiagen (2010) Taq PCR Handbook (3. utg.). Tilgjengelig fra: <https://www.qiagen.com/it/resources/resourcedetail?id=c73208eb-a83e-40c4-a9b6-ea5c4c94b9f4&lang=en>.
- Ramanathan, L., Das, N. P. og Li, Q.-T. (1994) Studies on lipid oxidation in fish phospholipid liposomes, *Biological trace element research*, 40(1), s. 59-70. Tilgjengelig fra: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02916821>.
- Raposo, A. *et al.* (2017) Food Spoilage by *Pseudomonas* spp.—An Overview, *Food Borne Pathogens and Antibiotic Resistance*. Tilgjengelig fra: https://books.google.no/books?hl=no&lr=&id=B5a7DQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA41&dq=Food+Spoilage+by+Pseudomonas+spp.%E2%80%94An+Overview+&ots=aJA73KW7dy&sig=eBasB7hCU TDapsjp4brYw-XBCg&redir_esc=y#v=onepage&q=Food%20Spoilage%20by%20Pseudomonas%20spp.%E2%80%94An%20Overview&f=false.
- Rawat, S. (2015) Food Spoilage: Microorganisms and their prevention, *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4), s. 47-56.
- Regjeringen (2019) *Landbruks- og matministeren på Krafttak mot matsvinn*. Tilgjengelig fra: <https://www.regjeringen.no/no/aktuelt/landbruks--og-matministeren-pa-krafttak-mot-matsvinn/id2667894/>.
- Robertson, G. L. (2009) *Food packaging and shelf life: a practical guide*. CRC Press.
- Rodgers, S. (2001) Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures—a review, *Trends in food science & technology*, 12(8), s. 276-284. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00093-0).
- Rusmana, I., Suwanto, A. og Mubarik, N. (2020) Organic acid produced by lactic acid bacteria from bekasam as food biopreservatives, i *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, s. 012003.
- Serio, A. *et al.* (2014) A survey on bacteria isolated as hydrogen sulfide-producers from marine fish, *Food Control*, 39, s. 111-118. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.003>.
- Sieuwert, S. *et al.* (2008) A simple and fast method for determining colony forming units, *Letters in applied microbiology*, 47(4), s. 275-278.
- sigmaaldrich (u.å) *Sanger DNA Sequencing Steps and Method*. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/sanger-sequencing.html> (Hentet: 31.05 2020).
- Sigmaaldrich (u.å.) *Common Cell Culture Problems: Poor Cell Growth*. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-culture/poor-cell-growth.html> (Hentet: 05.06 2020).
- Singh, S. og Shalini, R. (2016) Effect of hurdle technology in food preservation: a review, *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(4), s. 641-649.
- Smid, E. J. og Gorris, L. G. M. (1999) *Natural Antimicrobials for Food Preservation*. Horticulture and Food Research Institute of New Zealand: Marcel Dekker, Inc.

- Sofos, J., Maga, J. og Boyle, D. (1988) Effect of ether extracts from condensed wood smokes on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus*, *Journal of food science*, 53(6), s. 1840-1843.
- Speranza, B. *et al.* (2013) Use of Desirability Approach to Predict the Inhibition of *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens* and *Photobacterium phosphoreum* in Fish Fillets Through Natural Antimicrobials and Modified Atmosphere Packaging, *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), s. 2319-2330. doi: 10.1007/s11947-012-0889-3.
- Stiles, M. E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2), s. 331-345. doi: 10.1007/bf00395940.
- Stiles, M. E. og Holzapfel, W. H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), s. 1-29. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0).
- Subramaniam, P. og Wareing, P. (2016) *The stability and shelf life of food*. Woodhead Publishing.
- Suñen, E., Aristimuño, C. og Fernandez-Galian, B. (2003) Activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout stored at 4 °C, *Food Research International*, 36(2), s. 111-116. doi: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00115-1).
- Teare, J. *et al.* (1997) Measurement of nucleic acid concentrations using the DyNA Quant™ and the GeneQuant™, *Biotechniques*, 22(6), s. 1170-1174. Tilgjengelig fra: <https://www.future-science.com/doi/pdf/10.2144/97226pf02>.
- ThermoScientific (u.å.-a) Culture Media Supplements- PSEUDOMONAS AGAR BASE. Tilgjengelig fra: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=SR0103&cat=&c=UK&lang=EN (Hentet: 23.04-2020).
- ThermoScientific (u.å.-b) M17 agar, *Dehydrated Culture Media*. Tilgjengelig fra: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0785&sec=&org=82&c=UK&lang=EN.
- ThermoScientific (u.å.-c) MRS- agar (De Man, Rogosa, Sharp), *Dehydrated Culture Media*. Tilgjengelig fra: http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0361&org=82.
- Thomas, P. *et al.* (2015) Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples, *Biotechnology Reports*, 8, s. 45-55. doi: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.003>.
- Troller, J. og Stinson, J. (1981) Moisture requirements for growth and metabolite production by lactic acid bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 42(4), s. 682-687.
- Truelstrup Hansen, L., Røntved, S. D. og Henrik Huss, H. (1998) Microbiological quality and shelf life of cold-smoked salmon from three different processing plants, *Food Microbiology*, 15(2), s. 137-150. doi: <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0148>.
- Turner, S. *et al.* (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis 1, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), s. 327-338.
- Undrum, E. (2015) *Identifisering og karakterisering av hydrogensulfidproduserende bakterier fra prosesseringsanlegg for laks*, Norwegian University of Life Sciences, Ås.
- Valø, T., Jakobsen, A. N. og Lerfall, J. (2020) The use of atomized purified condensed smoke (PCS) in cold-smoke processing of Atlantic salmon-Effects on quality and microbiological stability of a lightly salted product, *Food Control*, 112, s. 107155. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107155>.
- Velasco, J., Dobarganes, C. og Márquez-Ruiz, G. (2010) 1 - Oxidative rancidity in foods and food quality, i Skibsted, L. H., Risbo, J. og Andersen, M. L. (red.) *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages*. Woodhead Publishing, s. 3-32.
- Vergès, M. C. (2018) *Biopreservation of foodstuffs: Mechanisms and application*. Univerite Paris-Saclay: Institut national de la recherche agronomique.
- Vinderola, G. *et al.* (2019) *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. Crc Press.

- Visciano, P. *et al.* (2006) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fresh and Cold-Smoked Atlantic Salmon Fillets, *Journal of Food Protection*, 69(5), s. 1134-1138. doi: 10.4315/0362-028x-69.5.1134.
- Visciano, P. *et al.* (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processed by traditional flue gas smoking and by liquid smoke flavourings, *Food and Chemical Toxicology*, 46(5), s. 1409-1413. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.001>.
- WHO (2020) *Estimating the burden of foodborne diseases*. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-diseases>.
- Wiernasz, N. *et al.* (2017) Lactic acid bacteria selection for biopreservation as a part of hurdle technology approach applied on seafood, *Frontiers in Marine Science*, 4, s. 119. doi: <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00119>.
- Wiernasz, N. *et al.* (2020) Salmon gravlax biopreservation with lactic acid bacteria: A polyphasic approach to assessing the impact on organoleptic properties, microbial ecosystem and volatile composition, *Frontiers in Microbiology*, 10, s. 3103. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03103>.
- Yang, S.-C. *et al.* (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals, *Frontiers in Microbiology*, 5, s. 241.

Vedlegg 1- OD-måling av målorganismer etter 96 t. inkubering i brønnplate ved 15 °C

Shewanella putrefaciens (OD₆₀₀)

Kjøring 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	0,067	0,066	0,073	0,083	0,1	0,075	0,102	0,095	0,128	0,041	-
B	0,04	0,069	0,057	0,057	0,076	0,071	0,078	0,055	0,106	0,093	0,04	-
C	0,04	0,064	0,051	0,053	0,084	0,076	0,069	0,058	0,11	0,101	0,041	-
D	0,04	0,064	0,05	0,05	0,065	0,059	0,073	0,05	0,123	0,085	0,042	-
E	0,04	0,061	0,056	0,053	0,07	0,068	0,058	0,055	0,094	0,098	0,04	-
F	0,04	0,069	0,057	0,058	0,095	0,064	0,052	0,052	0,1	0,128	0,04	-
G	0,042	0,084	0,055	0,093	0,142	0,157	0,051	0,054	0,141	0,151	0,041	-
H	0,04	0,127	0,1	0,136	0,16	0,178	0,082	0,093	0,193	0,3	0,04	-
	Fiskejuice	target	LAB	co-kultur	LAB	co.kultur	LAB	co-kultur	LAB	co-kultur	fiskejuice	

Kjøring 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	0,07	0,123	0,048	0,184	0,094	0,244	0,306	0,445	0,39	0,039	-
B	0,04	0,073	0,2	0,05	0,16	0,176	0,312	0,263	0,45	0,403	0,04	-
C	0,04	0,072	0,177	0,047	0,293	0,159	0,252	0,28	0,456	0,452	0,04	-
D	0,04	0,072	0,22	0,047	0,274	0,16	0,281	0,245	0,436	0,423	0,04	-
E	0,04	0,072	0,245	0,196	0,152	0,143	0,234	0,269	0,172	0,165	0,04	-
F	0,04	0,072	0,26	0,185	0,172	0,185	0,345	0,275	0,163	0,215	0,04	-
G	0,041	0,071	0,183	0,305	0,16	0,18	0,27	0,298	0,188	0,189	0,04	-
H	0,04	0,073	0,28	0,246	0,226	0,207	0,355	0,304	0,197	0,144	0,04	-
	Fiskejuice	target	LAB	co-kultur	LAB	co.kultur	LAB	co-kultur	LAB	co-kultur	fiskejuice	

Kjøring 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,042	0,072	0,227	0,15	0,242	0,238	0,057	0,04	0,065	0,047	0,047	-
B	0,46	0,071	0,131	0,145	0,159	0,189	0,076	0,07	0,073	0,047	0,048	-
C	0,042	0,083	0,248	0,157	0,217	0,224	0,091	0,183	0,106	0,047	0,047	-
D	0,047	0,136	0,197	0,133	0,202	0,148	0,063	0,137	0,073	0,047	0,047	-
E	0,039	0,093	0,226	0,171	0,123	0,043	0,111	0,041	0,067	0,048	0,047	-
F	0,04	0,1	0,252	0,149	0,104	0,04	0,099	0,04	0,068	0,047	0,047	-
G	0,041	0,074	0,163	0,173	0,077	0,041	0,087	0,042	0,077	0,047	0,047	-
H	0,041	0,056	0,154	0,226	0,061	0,04	0,052	0,04	0,06	0,047	0,047	-
	Fiskejuice	target	LAB	co-kultur	LAB	co.kultur	LAB	co-kultur	LAB	co-kultur	fiskejuice	

Kjøring 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,041	0,057	0,216	0,219	0,064	0,083	0,121	0,106	0,236	0,099	0,04	-
B	0,041	0,072	0,275	0,242	0,109	0,172	0,154	0,129	0,307	0,19	0,04	-
C	0,041	0,06	0,265	0,255	0,221	0,091	0,146	0,105	0,275	0,25	0,04	-
D	0,041	0,06	0,245	0,278	0,162	0,165	0,094	0,1	0,283	0,253	0,041	-
E	0,04	0,061	0,269	0,249	0,147	0,117	0,22	0,142	0,186	0,119	0,04	-
F	0,04	0,061	0,233	0,264	0,107	0,123	0,197	0,144	0,155	0,137	0,04	-
G	0,041	0,064	0,252	0,214	0,099	0,079	0,229	0,171	0,087	0,087	0,04	-
H	0,041	0,065	0,238	0,217	0,07	0,064	0,178	0,087	0,066	0,078	0,04	-
	Fiskejuice	target	LAB	co-kultur	LAB	co.kultur	LAB	co-kultur	LAB	co-kultur	fiskejuice	

Pseudomonas fluorescens (OD₆₀₀)

Kjøring 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,042	1,329	0,564	0,986	0,519	1,202	0,587	1,275	-	-	0,040	0,048
B	0,040	1,331	0,554	1,060	0,574	1,152	0,677	1,324	-	-	0,040	0,047
C	0,042	1,347	0,590	0,917	0,533	1,146	0,681	1,276	-	-	0,040	0,048
D	0,041	1,296	0,593	0,928	0,718	1,154	0,676	1,345	-	-	0,040	0,047
E	0,040	1,312	0,870	1,306	0,570	1,321	0,752	1,273	-	-	0,041	0,047
F	0,040	1,276	0,708	1,170	0,596	1,335	0,704	1,314	-	-	0,040	0,047
G	0,041	1,332	0,774	1,039	0,577	1,334	0,778	1,319	-	-	0,040	0,047
H	0,041	1,264	0,802	1,364	0,533	1,234	0,758	1,239	-	-	0,040	0,048
	Fiskejuice	Målorganisme LAB		LAB + T	LAB	LAB+T	LAB	LAB+T	LAB	LAB+T	Fiskejuice	

Kjøring 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,040	1,356	0,621	1,344	0,499	1,215	0,662	1,327	0,427	0,366	0,042	0,048
B	0,040	1,346	0,440	1,380	0,501	1,276	0,519	1,370	0,353	0,420	0,041	0,047
C	0,040	1,354	0,523	1,398	0,508	1,345	0,725	1,380	0,353	0,443	0,041	0,047
D	0,040	1,348	0,490	1,421	0,477	1,365	0,628	1,319	0,361	0,416	0,040	0,047
E	0,042	1,337	0,477	1,393	0,453	1,387	0,406	1,502	0,702	0,739	0,040	0,047
F	0,041	1,355	0,559	1,445	0,323	1,419	0,551	1,447	0,720	0,855	0,040	0,048
G	0,041	1,370	0,737	1,433	0,253	1,314	0,538	1,435	0,778	0,852	0,041	0,046
H	0,040	1,399	0,615	1,408	0,331	1,342	0,423	1,443	0,745	0,845	0,040	0,049
	Fiskejuice	målorganisme LAB		LAB + T	LAB	LAB+T	LAB	LAB+T	LAB	LAB+T	Fiskejuice	

Kjøring 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,041	1,283	0,357	0,541	0,730	0,559	0,801	0,823	0,250	0,723	0,039	0,043
B	0,040	1,414	0,584	0,546	0,989	0,695	0,812	0,794	0,280	0,681	0,040	0,044
C	0,044	1,235	0,507	0,502	0,934	0,804	0,850	0,741	0,145	0,794	0,040	0,039
D	0,042	1,228	0,633	0,520	0,700	0,744	0,847	0,776	0,359	0,762	0,040	0,041
E	0,041	1,204	0,798	0,577	0,535	1,041	0,618	0,647	0,271	0,841	0,041	0,037
F	0,040	1,320	0,786	0,815	0,651	0,595	0,755	0,595	0,203	0,782	0,040	0,037
G	0,041	1,238	0,752	0,569	0,405	1,059	0,715	0,537	0,183	0,910	0,040	0,038
H	0,040	1,313	0,793	0,718	0,409	0,470	0,712	0,646	0,235	0,805	0,041	0,038
	Fiskejuice	målorganisme LAB		LAB + T	LAB	LAB+T	LAB	LAB+T	LAB	LAB+T	Fiskejuice	

Kjøring 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,04	1,214	0,517	1,285	0,619	0,611	0,707	0,728	0,365	0,534	0,04	0,036
B	0,04	1,159	0,524	1,276	0,608	0,603	0,701	0,746	0,467	0,747	0,04	0,037
C	0,041	1,276	0,359	1,269	0,671	0,614	0,782	0,788	0,701	0,682	0,041	0,036
D	0,042	1,236	0,271	1,256	0,644	0,695	0,776	0,746	0,524	0,928	0,041	0,038
E	0,041	1,575	0,726	0,731	0,842	0,862	0,778	0,828	0,042	0,044	0,04	0,038
F	0,044	1,248	0,677	0,804	0,788	0,792	0,694	0,798	0,042	0,042	0,041	0,039
G	0,042	1,238	0,873	0,828	0,8	0,834	0,843	0,8	0,042	0,046	0,041	0,037
H	0,042	1,281	0,873	0,695	0,924	0,847	0,822	0,886	0,043	0,045	0,04	0,044
	Fiskejuice	målorganisme LAB		LAB + T	LAB	LAB+T	LAB	LAB+T	LAB	LAB+T	Fiskejuice	

Vedlegg 2 – Melkesyre bakterier isolert fra røykalaks, gravlaks og sushi

Stamme – ID	Stav/kokk	Farge	Produkt	Produ-sent	Stamme – ID	Stav/kokk	Farge	Produkt	Produ-sent
1	S	Blå	Røykelaks	E	245	S	Rød	Sushi	C
6*	S	Blå	Røykelaks	E	246	S	Lyseblå	Gravlaks	F
7	S	Blå	Røykelaks	E	248	S	Grønn	Gravlaks	F
8	S	Blå	Røykelaks	H	257	S	Grønn	Gravlaks	G
12	S	Blå	Røykelaks	H	258	S	Lyseblå	Røykelaks	G
13	S	Blå	Røykelaks	H	259	K	Lyseblå	Røykelaks	G
14	S	Blå	Røykelaks	H	260	S	Lyseblå	Røykelaks	G
21*	S	Blå	Røykelaks	H	265	S	Lyseblå	Gravlaks	F
27	S	Blå	Gravlaks	E	273*	S	Lyseblå	Gravlaks	F
30*	S	Blå	Gravlaks	E	292	S	Lyseblå	Sushi	A
35*	S	Blå	Gravlaks	E	294	S	Lyseblå	Sushi	A
36	S	Blå	Gravlaks	E	298	S	Lyseblå	Sushi	A
38	S	Blå	Gravlaks	E	299	K	Lyseblå	Sushi	A
42*	S	Blå	Røykelaks	D	301	S	Lyseblå	Sushi	A
44	S	Blå	Røykelaks	D	303	S	Gul	Røykelaks	D
45	S	Blå	Røykelaks	D	305	S	Rød	Røykelaks	D
55*	S	Grønn	Røykelaks	D	306	S	Rød	Gravlaks	D
60	S	Blå	Røykelaks	E	309	S	Rød	Gravlaks	D
63	S	Blå	Sushi	A	312	S	Gul	Gravlaks	D
67	S	Blå	Sushi	A	316*	S	Gul	Sushi	B
68	K	Blå	Sushi	A	321	S	Lyseblå	Sushi	B
74	S	Blå	Sushi	B	327	S	Gul	Sushi	B
75	S	Blå	Sushi	B	328	S	Gul	Sushi	B
88	K	Blå	Sushi	B	340	S	Rød	Sushi	C
90	S	Blå	Røykelaks	F	342	K	Rød	Sushi	C
93	K	Blå	Røykelaks	F	344	S	Rød	Sushi	C
95	S	Blå	Røykelaks	F	345	S	Rød	Sushi	C
105	K	Gul	Gravlaks	D	346	S	Gul	Sushi	C
113	S	Gul	Gravlaks	D	357	S	Grønn	Sushi	C
126	K	Gul	Sushi	A	358	S	Rød	Sushi	C
140	S	Grønn	Sushi	B	361	S	Grønn	Sushi	C
151	K	Grønn	Sushi	A	368	S	Grønn	Røykelaks	F
152	K	Gul	Sushi	A	384*	S	Grønn	Røykelaks	E
153	S	Gul	Sushi	A	388	S	Lyseblå	Røykelaks	E
159*	S	Grønn	Røykelaks	F	392	S	Grønn	Røykelaks	E
176	S	Gul	Røykelaks	E	396	S	Rød	Sushi	B
189	K	Grønn	Røykelaks	F	405	K	Rød	Sushi	B
194	S	Grønn	Røykelaks	F	406	K	Rød	Sushi	B
198	S	Gul	Sushi	A	408	S	Rød	Sushi	B

Vedlegg 2 side 2 av 2

199	S	Lyseblå	Sushi	A	420	S	Gul	Gravlaks	D
202	S	Gul	Sushi	A	423	S	Rød	Gravlaks	D
204	S	Gul	Sushi	A	426	S	Rød	Sushi	A
208	S	Grønn	Røykelaks	E	434	S	Rød	Sushi	A
214	K	Grønn	Røykelaks	F	443	S	Rød	Røykelaks	D
221	S	Lyseblå	Røykelaks	E	452	K	Rød	Sushi	C
227	S	Lyseblå	Gravlaks	D	455	S	Rød	Sushi	C
228	S	Rød	Gravlaks	D	457	S	Rød	Sushi	C
232	S	Gul	Gravlaks	D	461	S	Rød	Sushi	C
236	S	Gul	Gravlaks	D	466*	S	Rød	Sushi	A
237	S	Gul	Gravlaks	F	468*	S	Rød	Sushi	A
238	S	Gul	Gravlaks	F					

100 melkesyrebakterieisolater fra røykelaks, gravlaks og sushi. Stammene markert med stjerne (*) ble dyrket opp på M17- agar, og resterende stammer i mørk grønn ble dyrket opp på MRS- agar under screening etter inhiberende egenskaper.