

Økt holdbarhet på laks

Studier av superkjøling, salting og
biokonservering

Caroline Dybwad Høyen

Bioteknologi

Innlevert: mai 2017

Hovedveileder: Turid Rustad, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi og matvitenskap



Kunnskap for en bedre verden

Økt holdbarhet på laks

Studier av superkjøling, salting og
biokonservering

Caroline Dybwad Høyen

Bioteknologi

Innlevert: mai 2017

Hovedveileder: Turid Rustad, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

Forord

Denne masteroppgaven er del av det avsluttende arbeidet på 2-årig master i bioteknologi hos Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet ved institutt for bioteknologi og matvitenskap. Masteroppgaven er den del av et større prosjekt kalt SAFEFISHDISH ledet av Ifremer i Frankrike. Arbeidet med oppgaven startet høsten 2016 og ble avsluttet mai 2017.

Jeg vil gi en stor takk til veileder Professor Turid Rustad som har kommet med verdifulle innspill og hjelp underveis. Resten av gjengen som tilhører næringsmiddel-gruppen fortjener også en stor takk for å skape godt miljø fylt med positivitet på laben.

Så tilslutt til min kjære Johann som har gitt meg den lille ekstra støtten og vært der for meg når jeg har trengt det.

Trondheim 29. mai 2017

Caroline D. Høyen

Sammendrag

Konservering av mat både bevarer og øker holdbarheten til mat. Vanlige konserveringsmetoder er salting, tørking, røyking og syrekonservering, men i de siste årene har det dukket opp nye teknologier for å øke holdbarheten på mat. Forbrukernes vaner har også endret seg, og stiller krav til ferskere produkter og til mindre bruk av konserveringsmidler. Dette byr på en rekk utfordringer når flere hinder/barrierer som skal sørge for mattrygghet hos forbrukerne fjernes.

Målet med denne oppgaven var å se på effekt av kjølemetode (superkjøling og vanlig kjøling) og saltemetode (lakesalting og tørrsalting) på saltinnhold i laks etter røyking. I tillegg om beskyttende kulturer kan øke holdbarheten til laks ved biokonservering og om de beskyttende kulturene overlever superkjøling.

Det ble utført to forsøk. I det første forsøket var målet å se på effekt av kjølemetode (superkjøling og vanlig kjøling) og saltemetode (lakesalting og tørrsalting) på saltinnhold i laksen etter røyking. Det ble analysert tørrstoff, vann- og saltløselige proteiner, og saltinnhold. Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom tørrsaltet og lakesaltet prøver i tørrstoff, vanninnhold, eller vann- og saltløselige proteiner. Det ble derimot funnet en signifikant forskjell i saltinnhold hos lakesaltete og tørrsaltete prøver, og prøvene som var tørrsaltet ($2,22\% \pm 0,23$) inneholdt mer salt enn prøvene som var lakesaltet ($1,6\% \pm 0,49$)

I det andre forsøket ble laks dyppet i beskyttende bakteriekulturer av melkesyrebakteriene, *Lactococcus piscium* (PC1), *Leuconostoc gelidium* (PC2), *Carnobacterium ssp* (PC3) og *Vagococcus fluvialis* (PC4) for biokonservering. Det ble undersøkt om melkesyrebakterien klarte å hemme den spesifikke kvalitetsforringelses flora som er med på å redusere holdbarheten til laksen. Allerede fra start var kimtallet for aerobe bakterie i overkant høyt og fortsatte å øke etter 4, 11 og 17 lagringsdager. Utviklingen av mengden melkesyrebakterier i prøvene økte også jevnt. Det ble også påvist H₂S produserende bakterier i alle prøver (Kontroll gruppe, PC1, PC2, PC3 og PC4) etter 4 dager lagring.

Valg av saltemetode vil påvirke saltopptaket i laks, mens biokonservering med melkesyrebakterier har potensial, men effekten vil være minimal om prøvene allerede er høyt kontaminert av bakterier.

Abstract

Preservation of food both preserves and increases the shelf life. Common preservation methods are salting, drying, smoking and acid preservation, but in recent years new technologies have been developed to increase the shelf life of food. Consumers habits have also changed, which now demand fresher products and reduced use of preservatives. In addition to this, there has been more focus on the health risks of high salt intakes, and the amount of salt is therefore gradually reduced in several food products. It offers several challenges when removing barriers that ensure food safety for the consumer.

The aim of this thesis was to look at the possibility of increasing the shelf life of salmon dipped in four protective cultures, and in addition, look at how different salt methods and chilling methods affect smoked salmon.

Two experiments were made. In the first experiment, the aim was to look at the effect of chilling methods (super-chilling and conventional chilling) and salting methods (brine salting and dry salting) in the salmon after smoking. There were analysed dry matter, water- and salt soluble proteins, and salt content. No significant differences were found between samples that were dry salted and brine salted in dry matter, water content, lipid content, or water and salt soluble proteins. On the other hand, a significant difference in salt content was found in brine salted and dry salted samples. The dry salted samples ($2,22\% \pm 0,23$) had significantly more salt than the brine salted samples ($1,6\% \pm 0,49$).

In the second experiment, salmon was dipped in a protective culture of lactic acid bacteria, *Lactococcus piscium* (PC1), *Leuconostoc gelidium* (PC2), *Carnobacterium ssp* (PC3) and *Vagococcus fluvialis* (PC4) for biopreservation. It was investigated whether the lactic acid bacteria could inhibit the specific spoilage flora that contributes to reducing the shelf life of the salmon. Already from the start, the bacterial number of aerobic bacteria was high and continued to increase after 4, 11 and 17 days of storage. The growth of lactic acid bacteria in the samples also increased steadily. H₂S producing bacteria were also detected in all samples after 4 days of storage.

Selection of salting method affects salt content in smoked salmon, while biopreservation with lactic acid bacteria has potential, but the effect will be minimal if the samples are already highly

contaminated by bacteria. On the other hand, the protective cultures seemed to survive the super-chilling process.

INNHOOLD

1	INTRODUKSJON	1
1.1	<i>Bakgrunn</i>	1
1.2	<i>Muskelvevet i fisk</i>	3
1.2.1	Struktur og funksjon	3
1.3	<i>Mikrobiell aktivitet.....</i>	5
1.3.1	Mikroorganismer knyttet til fisk og sjømat	6
1.3.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	7
1.4	<i>Melkesyrebakterier.....</i>	9
1.4.1	<i>Lactococcus piscium.....</i>	9
1.4.2	<i>Leuconostoc gelidum.....</i>	9
1.4.3	<i>Vagococcus fluvialis</i>	9
1.4.4	<i>Carnobacterium maltaromaticum SF1944.....</i>	10
1.4.5	Biokonservering med melkesyrebakterier	10
1.5	<i>Konserveringsmetoder for lett preserverte fiskeprodukter</i>	14
1.5.1	Røyking av fisk.....	14
1.5.2	Tørr- og lakesalting	14
1.5.3	Superkjøling.....	15
2	MATERIALER OG METODER	16
2.1	<i>Materialer</i>	16
2.1.1	Forsøk 1	16
2.1.2	Forsøk 2	16
2.2	<i>Metoder.....</i>	17
2.2.1	Mikrobiologiske analyser.....	17
2.2.2	Dyping av laks	18
2.2.3	Proteinløselighet	21
2.2.4	Lipidekstraksjon.....	22
2.2.5	Volhard AOAC 937.09, 1990.....	22
2.2.6	Tørrstoff	22

3	RESULTATER OG DISKUSJON	23
3.1	<i>Forsøk 1</i>	23
3.1.1	Tørrstoff	23
3.1.2	Vanninnhold	24
3.1.3	Saltinnhold.....	25
3.1.4	Lipidinnhold.....	26
3.1.5	Vann- og saltløselige proteiner.....	27
3.2	<i>Kimtall i Dyppeløsning.....</i>	29
3.3	<i>Kimtallsutviklingen for laks lagret ved 0, 4, 11, og 17 lagringsdager.....</i>	30
4	KONKLUSJON.....	33
4.1	<i>Videre arbeid.....</i>	33
5	REFERANSER.....	34
	VEDLEGG	40

1 INTRODUKSJON

1.1 BAKGRUNN

Konservering av mat er en måte å bevare og øke holdbarheten til mat ved bruk av metoder som salting, tørking, røyking og syrekonservering. I de siste årene har det dukket opp nye teknologier for å øke holdbarheten på mat. Samtidig har forbrukernes matvaner også endret seg og det stilles i dag høye krav til ferskere produkter og til mindre bruk av konserveringsmidler. I tillegg til dette har det blitt mer fokus på helsefarene ved høyt saltinntak, og mengden med salt er derfor gradvis redusert i flere matvarer. Det byr på en rekke utfordringer når hinder/barrierer som skal gi mattrygghet til forbrukerne fjernes.

Mat og drikke har en holdbarhet som styres av mikrobiologisk og sensorisk kvalitet, i noen tilfeller også reologiske egenskaper. Ved bestemmelse av holdbarheten til et næringsmiddel er det viktig med en oversikt over hvilke faktorer som kan føre til kjemiske, fysiske og biologiske endringer som fører igjen til sensoriske endringer, og på denne måten begrenser holdbarheten/lagringstiden til næringsmiddelet. Alle produkter skal i utgangspunktet være trygge før konsum som standard, men det er de sensoriske kvalitetene som har direkte innvirkning på forbrukerkjøp (O'Sullivan, 2017). Codex Alimentarius definerer holdbarhet som den perioden hvor næringsmidlet opprettholder sin mikrobiologiske mattrygghet og egnethet ved en bestemt lagringstemperatur og eventuelt under spesifisert oppbevaring og håndtering.

Superkjøling, modifisert atmosfærepakking (MAP) og vakuumpakking, som brukes ofte i kombinasjon med hverandre, kan øke holdbarheten til en rekke matvarer som kjøtt og fisk. Ved kjølelagring får man dessuten en selektering av psykotrofe mikroorganismer som kan forringe kvaliteten på produktet. Spesielt frykter man psykotrofe patogene bakterier som kan vokse ved under kjøling, MAP eller vakuumpakking.

Dette masterprosjektet er en del av SAFEFISHDISH-prosjektet ledet av IFREMER i Frankrike sammen med flere samarbeidspartner fra industrien (Primex, Fjordalax) og forskningsinstitusjoner (NTNU, Nofima, Matis). Forringelse av sjømat styres av mikrobielle og biokjemiske aktiviteter som påvirkes av temperatur og lagringsforhold. Kontaminering av bakterier skjer under videreforedling og skyldes delvis bakterier som er naturlig tilstede på fisken og som kan spre seg videre under filetering og videre behandling, men også bakterier man finner på utstyr. Man ser

derfor på muligheter til å redusere aktiviteten til mikrobiota som fører til kvalitetstap og dermed forlenge holdbarheten. Målet til SAFEFISHDISH-prosjektet er å forbedre den mikrobielle- og sensoriske kvaliteten samt mattryggheten hos fisk fra slakting til forbruker. Prosjektet vil fokusere på oppdrettslaks og villfanget torsk. Det vil bli sett på nyere konserveringsmetoder som biokonservering og superkjøling.

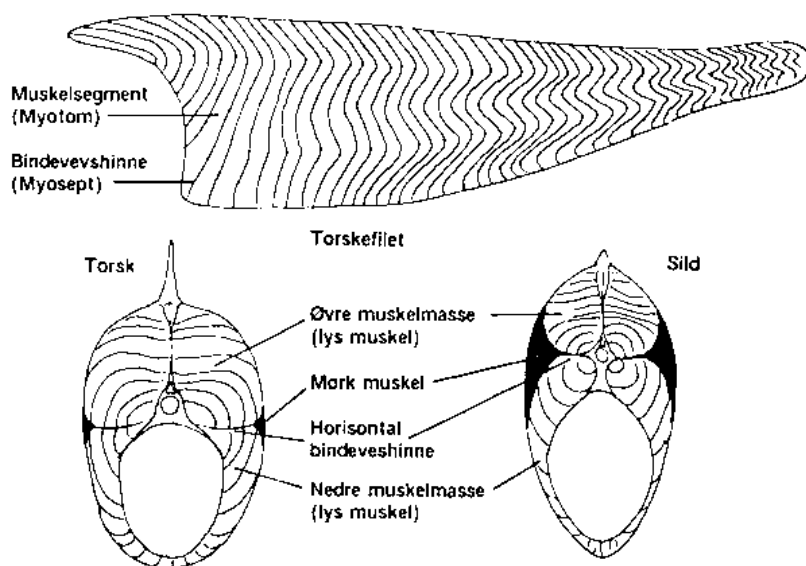
Målet med denne oppgaven var å se på effekt av kjølemetode (superkjøling og vanlig kjøling) og saltemetode (lakesalting og tørrsalting) på saltinnhold i laks etter røyking.

I det andre forsøket var målet å dyppe (biokonservere) laks i beskyttende kultur med melkesyrebakterier, *Lactococcus piscium* (PC1), *Leuconostoc gelidium* (PC2), *Carnobacterium ssp* (PC3) og *Vagococcus fluvialis* (PC4). Etter dyppingen ble laksen superkjølt og lagt i en steril beholder og lagret ved 4°C. Det ble tatt ut prøver for analyse etter 0, 4, 11, og 17 lagringsdager. Det vil da over lagringsperiode se om den beskyttende kulturen reduserer forekomsten av spesifikke forringelsesbakterier som reduserer kvaliteten og holdbarheten på laksen. Et av delmålene var også å se om bakteriene som ble benyttet overlevde superkjølingen.

1.2 MUSKELVEVET I FISK

1.2.1 Struktur og funksjon

Fiskens muskulatur består av tre ulike typer muskler: glatt muskulatur, hjertemuskulatur og tverrstripet skjelettmuskulatur. Glatt muskulatur finner man rundt innvoller og i blodkar. Det er den tverrstripet skjelett muskulaturens muskelmasse man til daglig omtaler som kjøtt eller filet. Muskelvevet deles inn i mørk muskulatur, lys muskulatur, og bindevev (Lynum, 1997). Den mørke muskelen har en brun/rød farge, mens den lyse er hvit med unntak av laks hvor den hvite muskelen er rød på grunn av fargestoffet astaxanthin. Mørk muskel ligger på utsiden av den lyse muskelen langs fileten (Figur 1.1).



Figur 1.1: Oppbyggingen av fiskemuskel. Øverste figur viser en langsgående filet og man ser tydelige hvordan muskelen er del av muskelsegmenter og bindevevshinner. Nederste figur viser tverrsnitt av fiskemuskel og hvor lys muskel og mørk muskel befinner seg (Lynum, 1997).

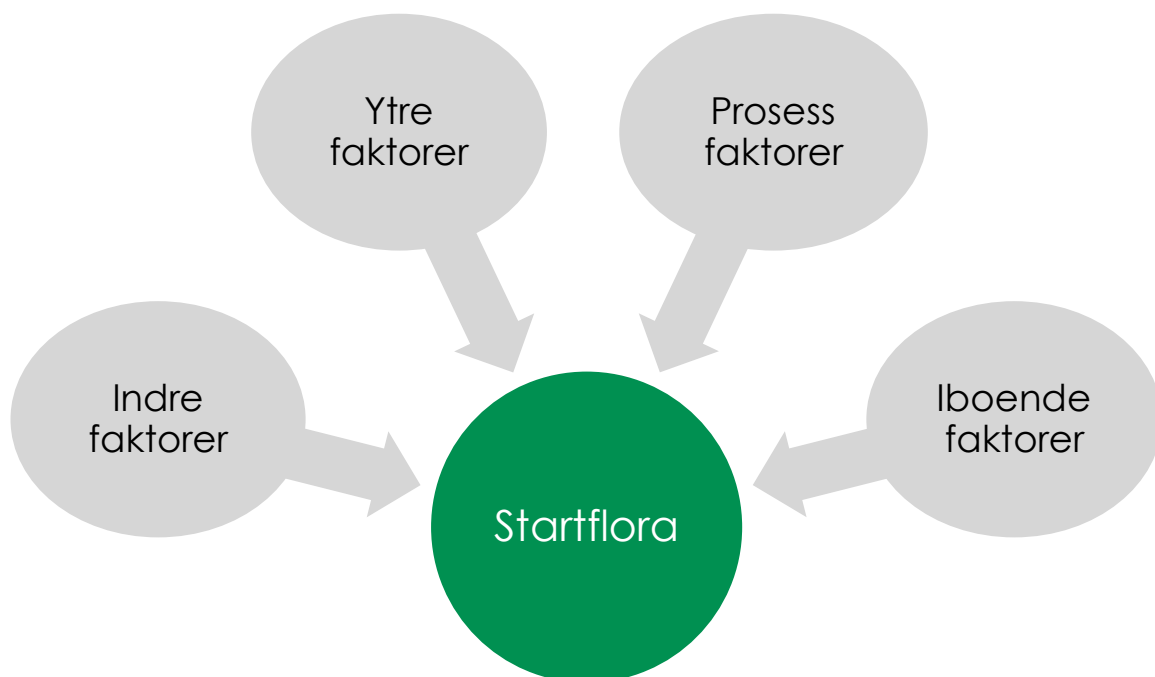
Fordelingen av lys og mørk muskulatur varierer med svømmeaktiviteten til de ulike artene. Pelagisk fisk som sild har mer mørk muskulatur enn for eksempel torsk. Mørk muskulatur inneholder et høyere nivå av lipider og myoglobin, og brukes til langvarig muskelarbeid og energien kommer fra aerob metabolisme og gir CO_2 og H_2O som sluttprodukter. Lys muskel brukes hovedsakelig til kort og intens muskelaktivitet. Energien kommer fra nedbrytingen av glykogen. På grunn av at ATP-energien kommer fra anaerob glykolyse kan kun denne muskelen jobbe intenst i korte perioder. Denne typen muskel har også lavere fettinnhold, men er rik på glykolytiske enzymer (Rustad, 2005).

Muskel proteinene kan deles inn etter løselighet og biologisk funksjon. Muskelproteinene knyttet til løselighet er sarkoplasmaproteinene, myofibrillproteinene og bindevevsproteinene. Sarkoplasmaproteinene kalles de vannløselige proteinene fordi de er løselige ved lav ionestyrke ($<0,3$ mM), og utgjør 20-30% av totalt muskelprotein. (Strasburg, Xiong, & Chiang, 2007)

Myofibrillene er saltløselige proteiner som er løselig ved høye ionestyrker ($>0,3$ M NaCl) og utgjør 50-60% av muskelprotein. I muskelvevet er den fysiologiske saltkonsentrasjonen ca. 0,15 M. Denne konsentrasjonen er lav nok for å hindre at myofibrillene løser seg og lekker ut i sarkoplasma. Myosin og aktin er de primære delene i tynne og tykke filamenter, og utgjør 65% av myofibrillene og 40% av totalt muskelprotein (Strasburg et al., 2007).

1.3 MIKROBIELL AKTIVITET

Næringsmidler inneholder en variert flora av mikroorganismer som både er tilstede naturlig og som blir tilført fra omgivelsene i ulike faser av produksjonen. Det er ikke alle mikroorganismene som vil vokse opp og formere seg i produktet. Mikrofloraen som vokser opp er avhengig av en rekke faktorer som gjelder egenskaper hos mikroorganismene, men også faktorer i næringsmidlet. Ut i fra næringsmidlet kan faktorene deles inn i fire: Indre-, ytre-, prosess-, og iboende faktorer (Figur 1.2) Indre faktorer er knyttet til næringsmidlets egenskaper som pH, bufferkapasitet, redokspotensial, vannaktivitet (a_w), næringsinnhold. Ytre faktorer er lagringsbetingelse som temperatur, fuktighet, tilgjengeligheten på gasser som oksygen og karbondioksid, i tillegg til kjemiske stoffer som er tilført som salter og konserveringsmidler. Prosessfaktorer er knyttet til hvilken behandling/konservering produktet skal gjennom. For eksempel om det er ferskt, saltet, tørket, tilsatt konserveringsmidler og lignende. Iboende faktorer påvirker hvilke mikroorganismer som kan vokse opp i næringsmidlet De fire nevnte faktorene kan påvirke hverandre, og kombinasjonen av ulike faktorene kan være høyere sammen, enn effekten av faktorene alene (Huis in't Veld, 1996).



Figur 1.2: Faktorer som er med på å avgjøre startfloraen i næringsmidlet ved å enten hindre eller stimulere vekst.

1.3.1 Mikroorganismer knyttet til fisk og sjømat

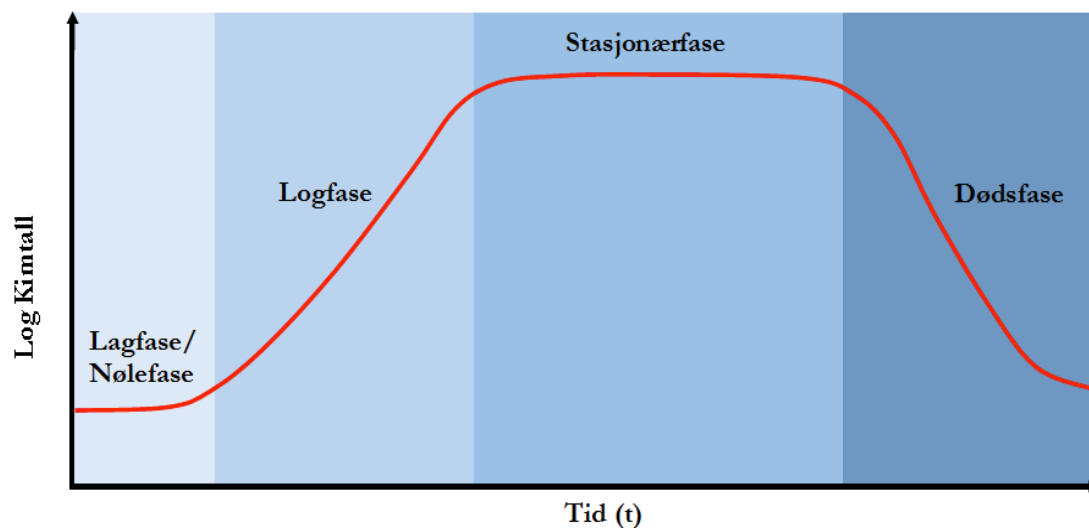
Mikrofloraen til fisk

Fiskekjøttet hos levende fisk er sterilt, men på gjellene, skinnet og i mage-tarm systemet er det en aktiv mikroflora. Mikrofloraen til fisk fra tempererte havområder består av gram-negative psykotrofe bakterier, mens mikrofloraen til fisk fra varmere farvann har av innslag fra gram-positive bakterier. Psykotrofe bakterier kan vokse ned mot 0°C men har et optimum rundt 25°C. Bakteriene i denne klassen tilhører gruppen proteobakterier som er en gruppe med gram-negative bakterier. Eksempler på bakterier er: *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Photobacterium*. I små mengder kan Gram-positive bakterier være tilstede som *Micrococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Clostridium* eller *Coryneforms* (Leroi & Joffraud, 2011).

Etter fiskens død stopper flere biokjemiske prosesser opp, blant annet kollapser immunsystemet og bakterier kan kontaminere fiskekjøttet. Videre prosessering som sløyning, fjerning av hodet, filetering og trimming, og bidra til å spre bakterien som er naturlig tilstede i fisken gjennom muskelvevet og akselerer forringelsen (Leroi & Joffraud, 2011).

Bakterievekst er karakterisert av at bakterier har en lagfase, logfase, stasjonærfase og dødsfase. I logfasen starter bakteriene å dele seg. Både lagfasen og logfase er avhengig av en rekke faktorer og lengden på fasene vil varieres med sammensetning, tilstanden til fisken, lagringstemperatur og type bakterie (Leroi & Joffraud, 2011).

Utviklingen av mikrofloraen i et næringsmiddel er avhengig av samspillet mellom den tilgjengelige mikrofloraen, og de kjemiske og fysiske forholdene i næringsmidlet, og dets omgivelser. Under påvirkning av miljøfaktorene skjer det en seleksjon blant kontaminantene og en mikroflora med et bestemt sett av egenskaper vokser opp. Denne gruppen kalles en oppblomstring og inkluderer både de spesifikke kvalitetsforringende organismene og andre mikroorganismer som ikke påvirker kvaliteten. Aktiviteten til mikroorganismene påvirkes av de indre og ytre faktorene hos næringsmidlet. Miljøet vil være i endring og dette medfører en endring i mikrofloraens sammensetning. Det vil dannes nye påfølgende oppblomstringer og selv om noen mikroorganismer ikke vokser opp, kan de vokse opp om forholdene endres til deres fordel (L Gram & Dalgaard, 2002; Huis in't Veld, 1996).



Figur 1.3: Generell vekstkurve for bakterier som deles inn i lagfase, logfase, stasjonærfase og dødsfase.

1.3.2 *Listeria monocytogenes*

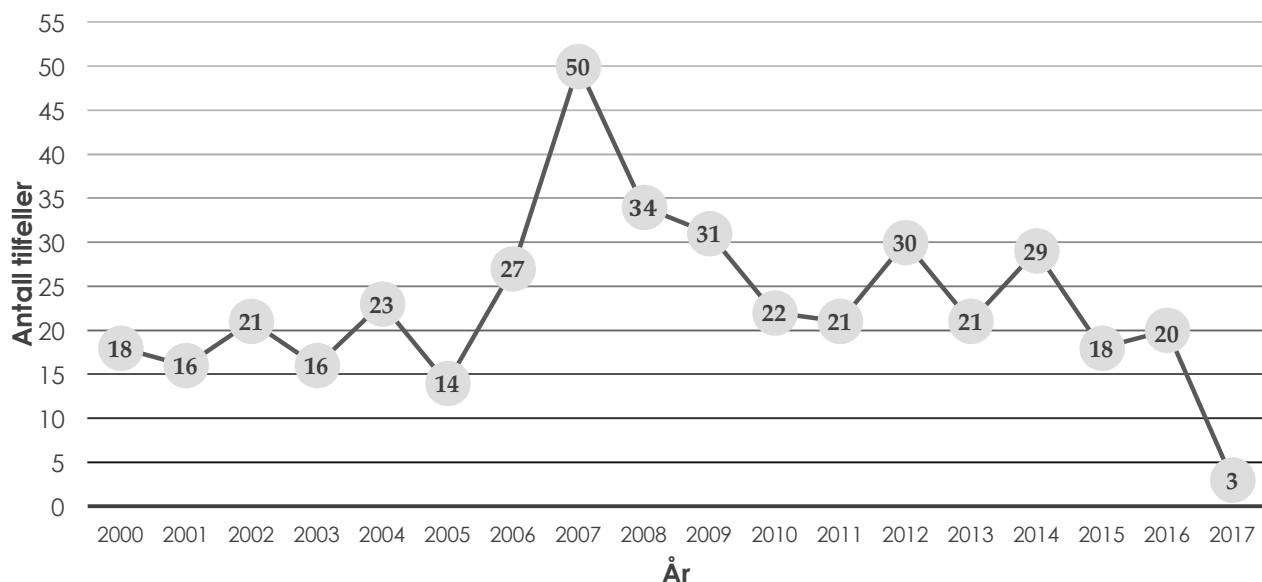
L. monocytogenes er en gram-positiv, kokkoid, ikke sporedannende stavbakterie som tilhører genus *Listeria*. I slekten er det to patogene arter *L. monocytogenes* og *L. ivanovii* med subspecies *ivanovii* og *londoniensis*. Det er i tillegg fire apatogene arter i slekten, *L. seelgeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* og *L. grayi*. For både dyr og mennesker er *L. monocytogenes* patogen (Rørvik, 2012).

L. monocytogenes er en hardfør art og kan vokse ned mot 0°C. Bakterien er også salttolerant og kan vokse i næringsmidler med 10% NaCl, men krever en vannaktivitet på større enn 0,92 ved 4°C for

å vokse. I tillegg vokser *L. monocytogenes* mellom pH 6 og 9, og vil ha gode vekstmuligheter i enkelte kjøtt- og fiskeprodukter, spesielt lett preserverte fiskeprodukter og spiseklare produkter (European Food Safety, European Centre for Disease, & Control, 2016; Porsby, Vogel, Mohr, & Gram, 2008). I tillegg kan *L. monocytogenes* danne biofilm på overflater av rustfritt stål, glass og plass, og kolonisere seg i produksjonsmiljøet. Derfor vil grundig rengjøring av overflate, utstyr og miljø være nødvendig (Rørvik, 2012).

I 2016 ble det registrert 20 tilfeller av listeriose i Norge (MISI, 2017) og totalt i EU ble det registrert 2 206 tilfeller (European Food Safety et al., 2016). I Norge rapporteres listeriosetilfeller til meldingssystem for infeksjonssykdommer (MSIS) som styres av folkehelseinstituttet.

Det har vært utbrudd av listeriose i ulike næringsmidler som meieriprodukter, kjøttprodukter, fisk og grønnsaker. I Norge har det vært få utbrudd knyttet til listeriose, men når man har et utbrudd er det en alvorlig sykdom og er det ofte dødsfall involvert. Listeriose rammer spesielt personer og eldre mennesker med nedsatt immunforsvar, men også farlig for barn og gravide i siste trimester. I 2007 var det et utbrudd av listeriose knyttet økologisk camembert (bløtost) på to sykehus i Oslo. 15 personer ble syke og tre døde, hvor et av dødsfallene var som følge av listeriose. For å forebygge mot listeriose er det veldig viktig å hindre kontaminering av næringsmidlet med denne bakterien, men også hindre veksten av bakterien under lagring (Folkehelseinstituttet, 2017; Rørvik, 2012)



Figur 1.4: Totalt antall Listeriose tilfeller i Norge i perioden 2000 til 2017 (European Food Safety et al., 2016).

1.4 MELKESYREBAKTERIER

Melkesyrebakterier består av en stor gruppe ikke-sporulerende gram positiv katalase og oksidase negative staver og kokker som produserer melkesyre som hovedmetabolitt fra fermentering av glukose. I tillegg er melkesyrebakterier aerotolerante og har komplekse næringskrav for aminosyrer og vitaminer. Melkesyrebakteriene består av slektene *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, og de mer periferere slektene *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus* og *Vagococcus* (Manivasagan, Venkatesan, & Kim, 2014).

1.4.1 *Lactococcus piscium*

L. piscium er en psykotrof melkesyrebakterie som tilhører slekten *Lactococcus* som består av 12 arter. *L. piscium* ble første gang isolert fra regnbueørret og i de senere årene har den blitt isolert fra en mengde ulike næringsmidler som fisk og kjøtt som er vakuumpakket eller med modifisert atmosfære lagret kjølig. Evne til å bederve næringsmidler avhenger av type stamme og type næringsmiddel (Saraoui, Leroi, Björkroth, & Pilet, 2016). *L. piscium* har blitt isolert fra spiseklare salater sammen med andre melkesyrebakterier som *Leuconostoc spp* (Pothakos, Devlieghere, Villani, Björkroth, & Ercolini, 2015).

1.4.2 *Leuconostoc gelidum*

L. gelidum er en psykotrof melkesyrebakterie som har heterofermentativ fermentering og blitt isolert fra kjøtt pakket med høye nivåer av CO₂. Den ble første gang beskrevet i 1989 (Hastings & Stiles, 1991). *Leuconostoc spp* har ofte blitt isolert fra næringsmidler uegnet for konsum og ved konsentrasjoner opp mot 10⁷ km/g. Bakterien produserer også ubehagelig lukt, former slim og misfarging, og kan formere seg under høye CO₂ konsentrasjoner (Pothakos, Snauwaert, De Vos, Huys, & Devlieghere, 2014). *L. gelidum* gror godt ved kjøleskap temperaturer, men ikke ved temperaturer høyere enn 35°C (Hastings & Stiles, 1991).

1.4.3 *Vagococcus fluvialis*

V. fluvialis er en kokki knyttet til slekten *Enterococcus* og har blitt isolert i fra sår på gris, storfe og katt. (Pot et al., 1994)

1.4.4 *Carnobacterium maltaromaticum* SF1944

Carnobacterium består av 9 slekter men kun *C. divergens* og *C. maltaromaticum* er oftest isolert fra miljøet og næringsmidler. De er ganske tolerante mot frysing og tining, samt høy trykk og kan vokse ved lave temperaturer (Leisner, Laursen, Prévost, Drider, & Dalgaard, 2007). De vokser fakultativt anaerobt og under økte CO₂ konsentrasjoner og er derfor ofte en del av mikrofloraen til vakuumpakket og modifisert atmosfære pakket kjøtt og sjømat (Laursen et al., 2005). *Carnobacterium* kan også metabolisere arginin, glukose og chitin (Leisner et al., 2007).

1.4.5 Biokonservering med melkesyrebakterier

Biokonservering referer til bruken av naturlig eller kontrollert mikroflora og deres antimikrobielle metabolitter for å hindre uønsket bakterievekst (Stiles, 1996). Melkesyrebakterier (LAB) blir ofte brukt ved biokonservering på grunn man finner dem som en del av den naturlige mikrofloraen til mange næringsmidler. LAB kan konkurrere ut forringelsesbakterier ved at de produserer antimikrobielle metabolitter som, organiske syrer, diacetyl, aceton, hydrogen peroksid, reuterin, reutericyclin og soppdrepende peptider (Ghanbari, Jami, Domig, & Kneifel, 2013).

Valget av bakterier for å benytte til biokonservering er basert på syv kriterier spesielt for sjømatprodukter av torsk eller laks (Wiernasz et al., 2017):

1. Antimikrobiell aktivitet
2. Endringspotensial
3. Motstandsdyktighet mot chitosan
4. Overleve en superkjølingsprosess
5. Kryssinhibering
6. Produksjonen av biogene aminer (histamin, tyramin)
7. Antibiotikaresistens

C. maltaromaticum SF1994, *L. piscium* EU2229, *L. gelidum* EU2249 og *V. Fluvialis* CD264 har vist å kunne brukes til biokonservering med bakgrunn på at de kan kombineres med chitosan coating, overleve frysing og superkjøling, men har også antimikrobiell aktivitet (Wiernasz et al., 2017).

Fisk og sjømat er kategorisert som lett bederlige næringsmidler. Sjømat har variert nærings sammensetning som gir et ideelt miljø for vekst og formering av kvalitetsforringende mikroorganismer og vanlige matbårne patogene bakterier (Dalgaard, Madsen, Samieian, &

Emborg, 2006) Patogene bakterier funnet i sjømat kan kategoriseres i tre hovedgrupper (Ghanbari et al., 2013):

- 1) Bakterier som er naturlig tilstede i mikrofloraen til fisk, som *Clostridium botulinum*, patogene *Vibrio* spp., *Aeromonas hydrophila*.
- 2) Enteriske bakterier er tilstede på grunn av fekal- eller miljø kontaminasjon, som *Salmonella* spp., *Shigella* spp., patogene *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus*.
- 3) Bakteriell kontaminasjon under prosessering, lagring eller bearbeiding for konsum, som *Bacillus cereus*, *Listeria Monocytogenes*, *Staph. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Cl. botulinum*, *Salmonella* spp

Tilstedeværelsen av mikroorganismer i ferske produkter utgjør ikke den største faren fordi nivåene av mikroorganismer er lave og ikke kan forårsake sykdom, men også fordi produktet skal gjennomgå en varmebehandling før spising. Det virkelige faren er relatert til produkter hvor bakterier vokser under lagring, og er spist rå eller utilstrekkelig tilberedt (tabell 1.1) (Ghanbari et al., 2013).

Biokonservering ved bruk av melkesyrebakterier er en alternativ måte å møte standardene for å kontrollere mikrobiell forringelse. Samtidig skal det heller ikke ha negativ innvirkning på den sensoriske kvaliteten til produktet. Melkesyrebakterier har GRAS-status (generally recognized as safe av US Food and Administration) og er akseptert til bruk som beskyttende kultur for å øke holdbarheten i sjømat produkter. Spesielt frykter man *L. monocytogenes* som kan vokse i lett-prosesserte fiskeprodukter og spiseklare produkter selv om dem lagres kjølig, og det er gjort flere studier for å se om melkesyrebakterie kan hemme aktiviteten til *L. monocytogenes* (Ghanbari et al., 2013; Leroi F, 2010).

Tabell 1.1

Bakterier som kan utgjøre en fare i fisk og sjømatprodukter. Hentet fra Ghanbari et al. (2013)

Bakterie	Identifisert i produkt	Referanse
<i>Aeromonas spp</i>	Fisk, skalldyr	Fernandes, Flick, and Thomas (1998); Isonhood and Drake (2002)
<i>Clostridium botulinum Type E</i>	Sporer på overflaten, i tarmen, på gjellene (Ørret, sild, laks); Vakuum pakke røkte fiskeprodukter, fermentert fisk, saltet fisk	Haagsma (1991);(Hatheway, 1995);(Sramova & Benes, 1998); (Johnson, 2000)
<i>Cl. perfringens</i>	Torsk, tunfisksalat, kokt laks	Aschfalk and Müller (2002); Hewitt et al. (1986); Khatib et al. (1994)
<i>Echerichia coli</i>	Fersk fisk, tunfisk paste, saltet lakserogn, prosessert sjømat	Asai et al. (1999); Ayulo, Machado, and Scussel (1994); Calo-Mata et al. (2008); Piérard et al. (1999); Semanchek and Golden (1998)
<i>Listeria monocytogenes</i>	Utbredt, 3-10% menneskelig bærer; sjeldent i sjøvann, oftere i ferskvann og oppdrettsfisk, kald røkte produkter, saltede fiskeprodukter, varm røkte fiskeprodukter, rå fisk, reker, muslinger, østers.	Alves, De Martinis, Destro, Vogel, and Gram (2005); Beaufort et al. (2007); Calo-Mata et al. (2008); Gudmundsdóttir et al. (2005); Hoffman, Gall, Norton, and Wiedmann (2003); Ling, Goh, Wang, Neo, and Chua (2002); Miettinen and Wirtanen (2005); Thimothe, Nightingale, Gall, Scott, and Wiedmann (2004); Zunabovic, Domig, and Kneifel (2011)
<i>Salmonella spp</i>	I tarmen (Tilapia og karpe), reker, muslinger, alaska pollock; ål og malle, røkt kveite, tørka ansjos.	Heinitz, Ruble, Wagner, and Tatini (2000); Ling et al. (2002); Olgunoğlu (2012)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kontaminering fra smitta personer, fersk fisk og fiskefilet (<i>Cynoscion leiarchus</i>), røkt fisk	Ayulo et al. (1994); Eklund, Peterson, Poysky, Paranjpye, and Pelroy (2004)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Skalldyr, krepsdyr på skjellet/skin, gjellene, tarmen, fiskeballer, fritert makrell (<i>Scomber scombrus</i>), tunfisk (<i>Thymnus thymnus</i>), og sardiner (<i>Sardina pilchardu</i>)	Baffone, Pianetti, Bruscolini, Barbieri, and Citterio (2000); Calo-Mata et al. (2008); Daniels et al. (2000)
<i>V. cholera</i> Serovar O1 og O139	Reker, skalldyr, akkar, sjømat, ukokt fisk, marinade sevice (<i>Cilus gilberti</i>)	Calo-Mata et al. (2008); Kam, Leung, Ho, Ho, and Paul Saw (1995)

Melkesyrebakterier i fisk og sjømatprodukter

Enkelte slekter av melkesyrebakterier, som *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* og *Lactococcus* har blitt isolert fra mikrofloraen til fersk- og saltvannsfisk. I tillegg har melkesyrebakterier blitt isolert fra lett-prosesserte fiskeprodukter (LFFP) og semi-prosesserte fiskeprodukter (SPFP). LFFP er fiskeprodukter som har fått en mild behandling og har lavt saltinnhold (under 5% i vannfasen) og enkelte fiskeprodukter kan være røkt eller tilsatt konserveringsmidler. pH er også høy (over 5), produktene kan pakkes under vakuum og krever å oppbevares og distribueres kjølig. Denne gruppen inneholder høyverdig delikatesseprodukter som kald røkt laks, gravet eller marinert fisk, og skalldyr i lake, og som spises som de er uten noe mer behandling.

I vakuum pakka kald røkt laks dominerer slektene av melkesyrebakteriene *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* og *Carnobacterium* (Gancel 1997)

Flere studier har påvist at *Carnobacterium* er veldig vanlig å finne i kjølte ferske og lett preservert sjømat, men ved en høyere temperatur (15-25°C). Andre arter som enterococcus kan dominere i den mikrobielle fordervelses flora i sjømat (Ghanbari et al., 2013; Isonhood & Drake, 2002).

SPFP har høyere saltinnhold (over 6% i vannfasen), pH under 5 og tilsatt konserveringsmidler. Produkter som dette er saltet og/eller marinert som sild, ansjos og kaviar (Mejlholm & Dalgaard, 2013).

TABELL 1.2

Melkesyrebakterier isolert fra ready-to-eat sjømatprodukter. Hentet fra Ghanbari et al. (2013)

Produkt type	Melkesyrebakterie	Referanse
Kald røkt laks	<i>C. divergens</i>	Leroi, Joffraud, Chevalier, and Cardinal (1998)
	<i>C. piscicola/maltaromaticum</i>	(González-Rodríguez, Sanz, Santos, Otero, & García-López, 2002; Leroi et al., 1998; Olofsson, Ahrné, & Molin, 2007; Paludan-Müller, Dalgaard, Huss, & Gram, 1998)
	<i>Ent. Faecalis</i>	González-Rodríguez et al. (2002)
	<i>Ent. Spp</i>	Lyhs, Björkroth, Hyytiä, and Korkeala (1998)
	<i>Lb. alimentaris</i>	Leroi et al. (1998)
	<i>Lb. casei ssp. tolerans</i>	(González-Rodríguez et al., 2002)
	<i>Lb. coryneformis</i>	
	<i>Lb. curvatus</i>	(González-Rodríguez et al., 2002; Jørgensen, Dalgaard, & Huss, 2000; Lyhs, Björkroth, & Korkeala, 1999; Truelstrup Hansen & Huss, 1998)
	<i>Lb. debrueckii ssp. delbrueckii</i>	González-Rodríguez et al. (2002)
	<i>Lb. farciminis</i>	Leroi et al. (1998)
	<i>Lb. homohiochii</i>	González-Rodríguez et al. (2002)
	<i>Lb. planatarum</i>	(Gancel, Dziarszinski, & Tailliez, 1997; González-Rodríguez et al., 2002; Hansen & Huss, 1998; Lyhs et al., 1999)
	<i>Lb. pentosus</i>	Gancel et al. (1997)
	<i>Lb. sakei</i>	(González-Rodríguez et al., 2002; Jørgensen et al., 2000; Leroi et al., 1998; Lyhs et al., 1999; Truelstrup Hansen & Huss, 1998)
<i>Lc. spp</i>	Paludan-Müller et al. (1998)	
<i>Leuconostoc carnosum</i>	(Hansen & Huss, 1998)	
<i>Leuc. citreum</i>	Lyhs et al. (1999)	
<i>Leuc. gelidium</i>	Hansen and Huss (1998)	
<i>Leuc. mesenteroides</i>	Hansen and Huss (1998); Lyhs et al. (1999)	
<i>Weisella kandleri</i>	González-Rodríguez et al. (2002)	

1.5 KONSERVERINGSMETODER FOR LETT PRESERVERTE FISKEPRODUKTER

Det finnes mange konserveringsmetoder. De mer tradisjonelle konserveringsmetodene er tørking, røyking, salting og syrekonservering, men det finnes nyere konserveringsmetoder som superkjøling og biokonservering. I dette kapitlet fokuserer det på røyking, superkjøling, lake- og tørrsalting på fisk. Biokonservering har blitt gjennomgått i kapittel 1.4.5

1.5.1 Røyking av fisk

Røyking er en tradisjonell metode for å konservere og ofte i kombinasjon med salting og tørking. Mest vanlig i Norge er røkt laks eller ørret, men det er mulig å røyke andre fiskearter også. Røyking gir et produkt som har karakteristisk smak og tekstur, på grunn av dannelsen av mange ulike aromaforbindelser. Forbindelser som dannes under røyking er organiske syrer, alkoholer, karbonyler, hydrokarboner og fenoler. (Sampels, 2015) Man skiller mellom kald- og varmrøyking, og i dette kapitlet vil kun kaldrøyking omtales. Kaldrøyking skjer ved en temperatur under 30°C og som nevnt i kombinasjon med salting, tørking og konserverende stoffer fra røyken. Den lave temperaturen benyttes for å hindre at muskelproteinene denatureres. (Hemmer et al., 2006)

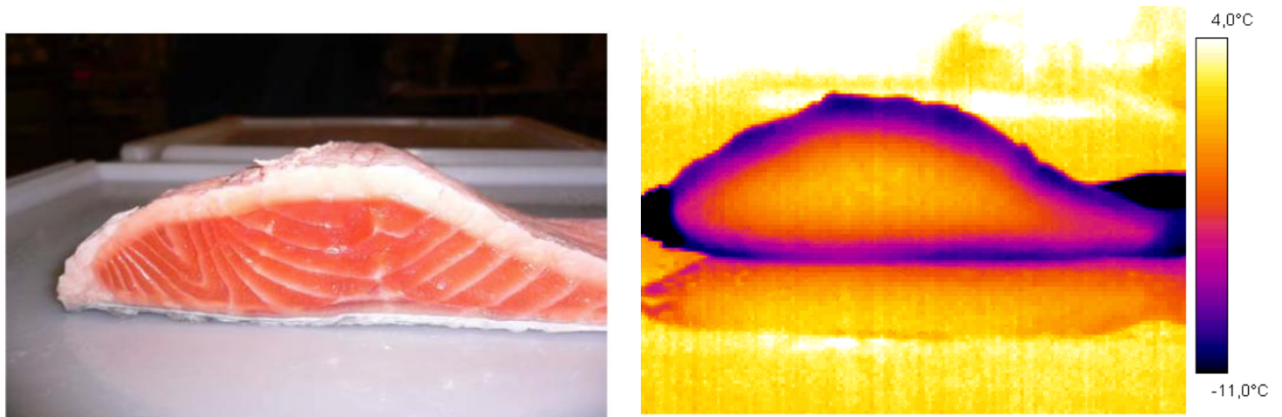
1.5.2 Tørr- og lakesalting

Tørrsalting vil si å gni inn et produkt med salt eller legge kjøtt, fisk eller fileter lagvis med salt imellom. Når fisk tørrsaltes vil vann og ekstraktivstoffer trekkes ut ved osmose og salt trekke inn i produktet. Væsken vil lekke ut til produktet er mettet med salt, og man får i tillegg et lite vekttap. Saltinntrengingen vil være størst i starten og det vil være høyest saltkonsentrasjon på overflaten i forhold til det indre. Det sies at røykelaksfilet skal ligge i salt like mange døgn som vekten av stykket i kilogram og vannes ut i like mange timer. (Hemmer et al., 2006)

Lakesalting legges næringsmidlet i en lake med en bestemt saltkonsentrasjon. For høy saltkonsentrasjonen medfører at muskelproteinene denaturer og mister sine funksjonelle egenskaper. Eksempelvis for fisk som lakesaltes, vil den trekke til seg både vann og salt og man får en vektøkning. Det vil etterhvert skje en likevekts tilstand mellom lake og fisk, hvor fisk og lake har lik konsentrasjon av oppløste stoffer. (Hemmer et al., 2006)

1.5.3 Superkjøling

Superkjøling har i litteraturen blitt omtalt som, deep chilling, light freezing, supercooling eller partial ice formation. Definisjonen for superkjøling varierer også med litteraturen. I denne oppgaven blir superkjøling definert som lagring av fisk ved frysepunktene -1°C til -2°C , og samtidig ved denne temperaturen vil noe av vannet fortsatt være flytende (Kaale & Eikevik, 2015) For å oppnå superkjøling benytter man en impingement fryser som skallfryser fisken slik som figur 1.4 viser. Ved superkjøling vil 20-50% av vannet være frosset og gi produktet et indre reservoar av is, hvilket gjør det mulig å bruke mindre is under transport av laks (Gallart-Jornet, Rustad, Barat, Fito, & Escriche, 2007)



Figur 1.5: Superkjølte laksefileter. (Rotabakk, 2009)

2 MATERIALER OG METODER

2.1 MATERIALER

2.1.1 Forsøk 1

Fersk oppdrettslaks (*Salmo salar*) ble levert av Grieg Seafood. Laksen ble lake- og tørrsaltet og røkt ved institutt for bioteknologi og matvitenskap. Totalt 12 fileter, hvor seks ble lakesaltet (18% lakekonsentrasjon) og seks ble tørrsaltet, og deretter tre fileter fra hver kjølemetode ble enten lakesaltet eller tørrsaltet (Tabell 2.1).

Behandling	Fisk:salt	Tid (t)	Superkjølt	Tradisjonell kjølemetode
Lakekonsentrasjon, 18%	1:3	5	3	3
Tørrsalting	1:0,5	3	3	3

Filetene som ble lakesaltet ble snudd en gang i løpet av tiden dem lå til salting og etter 5 timer ble dem skylt ren med destillert vann og tørket lett. Videre lagt på kjølerom (4°C) for å tørke til neste dag.

Filetene for tørrsalting ble dekt med salt og lagt på kjølerom for 3 timer salting. Etterpå ble saltet skylt av med destillert vann og fileten lagt på kjølerom (4°C) for å tørke til neste dag.

Neste dag ble filete røkt. Først 2,5 timers tørking ved 22-23°C, og deretter tre timer røyking (Kerres smoke-air showsmoker cabinet) ved 22-25°C på bøkeflis. Prøver fra de tykkeste delene av laksen ble skjært ut og lagt i en zip-lock pose og frosset ned ved -80°C

2.1.2 Forsøk 2

Bakteriekulturer av melkesyrebakteriene, *Lactococcus piscium* EU2229 (PC1), *Leuconostoc gelidium* EU2249 (PC2), *Carnobacterium ssp* SF1994 (PC3) og *Vagococcus fluvialis* CD264 (PC4) ble levert fra Ifremer Frankrike september 2016.

Bakteriene ble videre dyrket opp i elliker buljong ved 22°C i 24 timer i inkubatorskap. 1 ml fra hver av oppdyrket bakterier ble overført til et cryorør sammen med 1 ml elliker buljong med 20% glyserol. Bakteriene ble frosset ned ved -80°C for senere bruk.

For selve dyppingen av laks ble det kjøpt inn laks fra Ravnkloa fisk og skalldyr AS. Opprinnelsen til laksen var fra et oppdrettsanlegg til Lerøy på Hitra og slaktet 3. april, og laksen ble innkjøpt 7 april.

2.2 METODER

2.2.1 Mikrobiologiske analyser

Forarbeid

I forkant av dyppingen var det viktig å finne riktig mengde bakterier før dypping av laks. Bakteriene ble dyrket opp og utsådd på plater, samtidig som absorbans ble målt ved bestemte tidspunkt sammen for å sørge for at man minst hadde 10^9 bakterier. 100ul fortynnet bakteriekultur ble overført på ferdiglagde plater med elliker buljong tilsatt 1,5% agar.

Medium og fortynningsløsning

Fortynningsløsning

8,5 g NaCl

1 g Pepton

Tilsatt 1000 ml destillert vann og pH justert til 7, deretter autoklavert ved 121,5 i 20 min.

Elliker buljong

De fire stammene med melkesyrebakterier ble dyrket opp i Elliker buljong (Oxoid). Elliker buljong ble laget ved å veie 24,25 g pulver til 500 ml destillert vann i en EM-kolbe. Deretter ble det autoklavert ved 121,5°C i 20 min.

Nitritt actidione polymyxin agar (NAP agar)

For selektiv bestemmelse av melkesyrebakterier i næringsmidler ble mediet nitritt actidione polymyxin agar benyttet slik som beskrevet av Davidson and Cronin (1973). Følgende ingredienser ble veid ut til 970 ml destillert vann:

10 g Pepton

10 g Peptonized milk (Oxoid LP32)

10 g Gjærekstrakt

7,5 g Glukose

2,5 g	Beef ekstrakt
0,575 g	MgSO ₄ 7H ₂ O
0,05 g	MnSO ₄ 4H ₂ O
1,0 g	Tween 80
15 g	Agar

Alle ingrediensene ble løst opp og pH justert til 6,1 ved 50°C, og autoklavert ved 121,5°C i 20 minutter. Til 97 ml NAP-agar ble 1 ml av hver løsning (a, b og c) tilsatt.

a. 0,1%	Actidione (cycloheximide)
	0,05 g Acitidione
	50 ml Destillert vann
b. 0,03%	Polymyxin
	0,015 g Polymyxin
	50 ml Dest.vann
c. 6,0%	Natriumnitritt (NaNO₂)
	0,3 g Natriumnitritt
	5 ml Destillert vann

Bestemmelse av H₂S-produserende bakterier

Kimtall ble utført på jern-agar som beskrevet av Gram L, Trolle G, and Huss H. H (1987) med noen modifikasjoner. I stedet for 0,5% NaCl ble konsentrasjonen opp justert til 1%. 990 ml medium ble autoklavert ved 121,5°C i 20 min og etter autoklaving tilsatt 10 ml 4% filter-sterilisert L-cystein-HCl. Medium ble avkjølt i vannbad ved 45°C for videre prosedyre, hvor 1 ml fortynt prøveekstrakt ble overført til petriskålen og innstøpt med jern-agar.

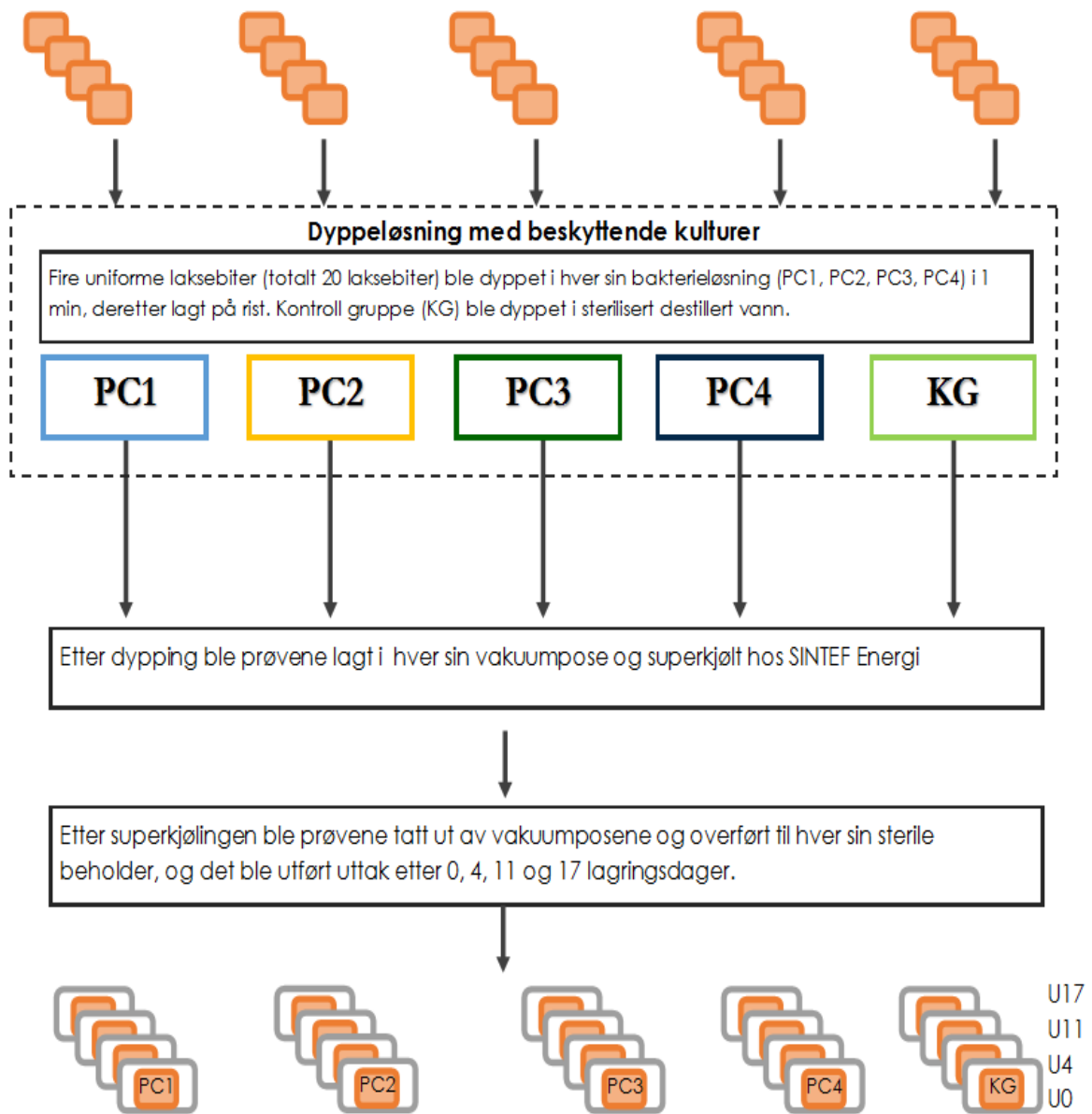
2.2.2 Dypping av laks

Bakteriekulturer ble dyrket opp ved 22°C i 24 timer. 2,5 ml bakteriekultur ble overført til 250 ml målekolbe og tilsatt kjølig sterilt destillert vann til 250 ml merket. Totalt ble fire dyppeløsninger laget for de utvalgte melkesyrebakteriene: *Lactococcus piscium* EU2229 (PC1), *Leuconostoc gelidium* EU2249 (PC2), *Carnobacterium ssp* SF1944(PC3) og *Vagococcus fluvialis* CD264 (PC4). For kontroll gruppen (KG) ble en laks dyppet i sterilisert destillert vann (figur 2.1).

For bestemmelse av antall melkesyre bakterier i bakteriekultur og dyppeløsning ble det laget en fortynningsserie av bakteriekulturene og dyppingsløsning:

- 100 μ l fra hver løsning til dypping og bakteriekultur tilsatt i hvert sitt rør med 10 ml fortynningsløsning
- Deretter ble fortynningen laget i a) videre overført til et nytt rør med 10 ml fortynningsløsning
- Tilslutt ble 1 ml tatt fra rørene i b) og tilsatt i nytt rør med 9 ml fortynningsløsning
- 100 μ l ble tatt fra fortynningene fra b) og c) og ble tilsatt på NAP-plater og inkubert ved 20°C for 2-7 dager.

Totalt 20 uniforme biter av laks med skinn ble kuttet opp aseptisk. Fire biter ble dyppet i hver sin dyppeløsning med beskyttende bakterie.



Figur 2.1: Flytskjema for utførelsen av dypping forsøket på laks.

2.2.3 Proteinløselighet

Bio-rad

Bestemmelse av mengde protein ble utført på den vann- og saltløselige fraksjonen. Bovine gamma globulin (Bgg) ble brukt som standard. Standardkurven ble laget ved å benytte stockløsningen med Bgg (1,5 mg/mL) og det ble laget en fortynningsserie (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 mg/mL) slik som vist i tabell 2.2. Hver fortynning ble tilsatt mengden med Bgg og vann slik som vist i tabell deretter tilsatt 5 mL fortynnet fargereagens (1 del konsentrat + 4 deler destillert vann). (Bradford, 1976)

Tabell 2.2

Oppsettet for standardkurven for bestemmelse av mengden protein

Standardkonsentrasjon (mg/mL)	0 (Blank)	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5
µl standard Bgg	0	20	40	60	80	100
µl vann	100	80	60	40	20	0

Vannløselige proteiner

Vannløselige proteiner ble ekstrahert etter metode beskrevet av Hultmann and Rustad (2002) som er en modifisert metode av Anderson and Ravesi (1968) og Licciardello et al. (1982).

0,05M Fosfatbuffer med og uten 0,6M KCl ble laget etter tabell 2.3 og justert til pH 7.

Tabell 2.3 Buffer uten salt brukes ved ekstraksjon av vannløselige proteiner, den med salt brukes til saltløselige proteiner

Komponent	Buffer uten salt	Buffer med salt (g)
	Mengde veid inn (g)	
KH ₂ PO ₄	6,8045	6,8045
NaOH	1,164	1,164
KCl		44,736
Dest. vann	Til 1 liter	

Omtrent 4 gram fisk ble veid ut fra hver prøve og tilsatt 80 mL 0,05M fosfatbuffer. Deretter homogenisert i 30 sekunder med Ultra Turrax. Deretter sentrifugert ved 4°C, 8000g i 20 minutter. Supernatanten ble filtrerte gjennom glass til 100 mL målekolbe. Volumet ble justert til 100 mL med buffer og dette var den vannløselige fraksjonen. Bestemmelsen av mengde protein med Biorad-metoden ble utført med 3 paralleller for hver prøve.

Saltløselige proteiner

For saltløselige proteiner ble dette utført ved å tilsette 80 mL 0,05M fosfat buffer med KCl (0,6M) til bunnfallet som var igjen etter ekstraksjonen av vannløselige proteiner. Samme prosedyre som beskrevet over ble utført og man får ut den saltløselige fraksjonen. Mengden med saltløselige proteiner ble bestemt med Bio-rad metoden

2.2.4 Lipidekstraksjon

Lipidekstraksjonen ble gjort etter en modifisert utgave av «Bligh and Dyer» (Bligh mfl 1959). Oppskriften ble halvert og 2,5 g laks ble veid ut i sentrifugekopper og tilsatt 8 mL destillert vann, 10 mL kloroform og 20 mL metanol. Dette ble homogenisert i 2 min med ultra thurax. Etter 2 min ble 10 mL kloroform tilsatt og homogenisert i 30 sek og tilslutt ble det tilsatt 10 mL destillert vann. Sentrifugekoppene ble satt i sentrifuge og sentrifugert i 10 min ved 9000 rpm. 2 mL av kloroformfasen ble overført til et glassrør og veid. Glassrøret hadde på forhånd blitt veid og satt til avdamping under N₂-gass ved 50°C i 10-30 min. Alt arbeid bli utført i avtrekkskap og kjemikaliene stod på is.

2.2.5 Volhard AOAC 937.09, 1990

5 g oppmalt laks (2,5 g laks for prøvene som var tørrsaltet/lakesaltet) ble veid ut. Deretter ble 250 ml destillert vann tilsatt til prøven i en EM-kolbe. Dette ble satt på røring for 45 minutter, og etterpå ble prøven filtrert gjennom glassull.

For titreringen ble 20 ml av den filtrerte prøven tilsatt i et begerglass og tilsatt 5-10 ml 0,1M AgNO₃. Deretter ble 2,5 ml jernindikator tilsatt, og latt stå i 10 minutter for utfelling. Bunnfallet fra utfellingen ble fjernet ved å filtrere gjennom papirfilter. Prøven ble tilsatt titrert mot 0,1M NH₄SCN til fargeomslag (Rød-brun farge), og ml titrant ble notert ned.

2.2.6 Tørrstoff

2 g prøve ble veid inn i en forhåndsveid aluminiumsform og satt i varmeskap ved 105°C i et døgn. Etterpå ble formen med prøvene veid og vekt notert ned.

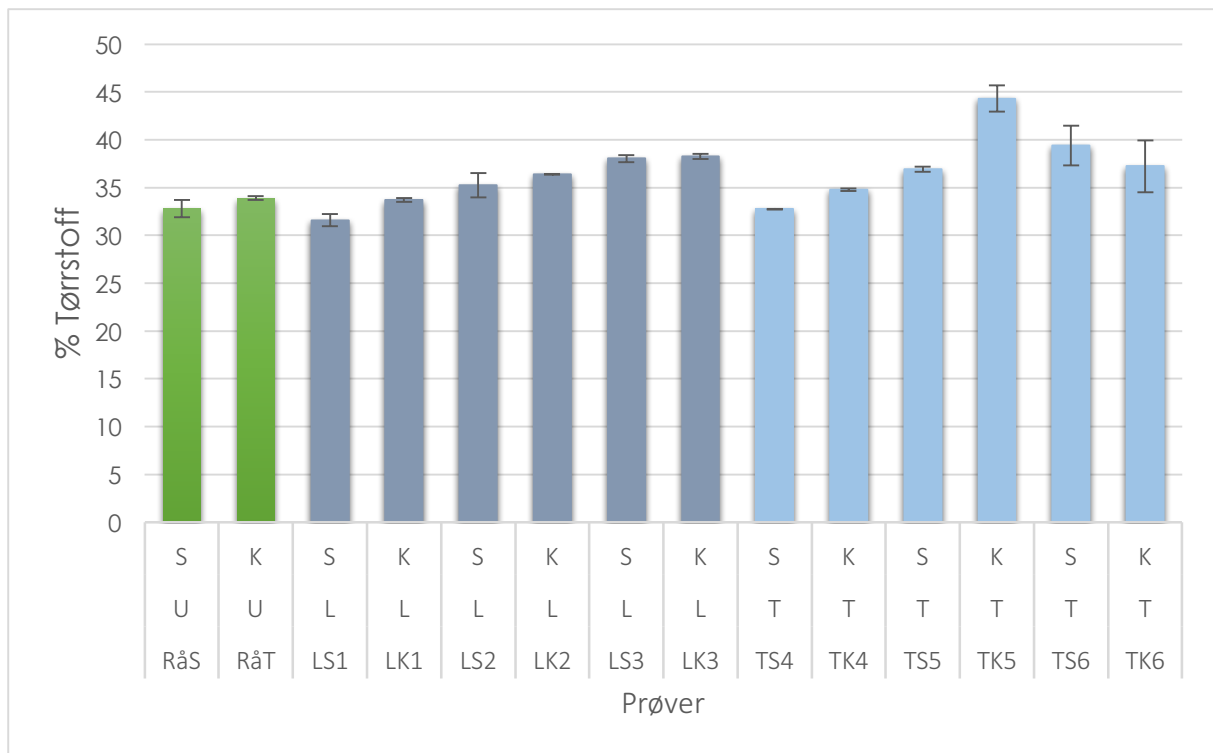
3 RESULTATER OG DISKUSJON

3.1 FORSØK 1

I det første forsøket ble det undersøkt effekten av kjølemetode (Superkjøling/kjøling) og saltemetode (lakesalting/tørrsalting) på røkt laks. Analyser som ble utført var tørrstoff, vann- og saltløselige proteiner, fettinnhold og saltinnhold.

3.1.1 Tørrstoff

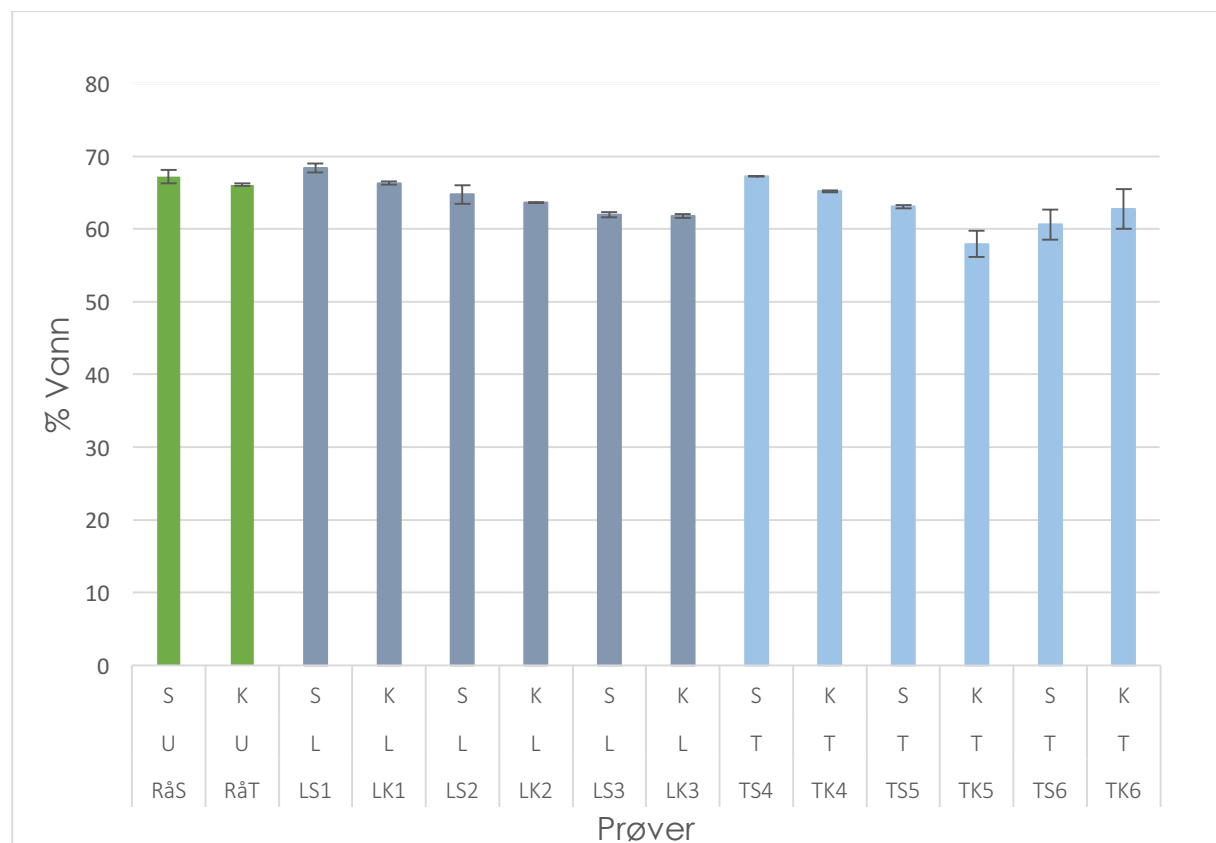
Tørrstoff er det som er igjen når alt vannet er fjernet. Det er ikke stor variasjon mellom prøvene og man skulle forventet at tørrstoffet var høyere for prøvene som var saltet. For tørrstoff (Figur 3.1) ble det ikke funnet noen signifikante ($p \leq 0,05$) forskjeller mellom prøvene som var lakesaltet ($35,5 \pm 2,6$), tørrsaltet ($37,6 \pm 4,0$), og RåS/RåK ($33,4 \pm 0,8$), selv om det er antydning til at prøvene som er tørrsaltet er noe høyere enn prøvene som er lakesaltet.



Figur 3.1: Tørrstoff innholdet i laks. S = superkjølt, K=Kjølt, U=ubehandlet, L=lakesaltet, Rå= ikke røkt. Alle verdier er vist som gjennomsnitt \pm standardavvik (n=2)

3.1.2 Vanninnhold

Vanninnholdet er beregnet ut i fra tørrstoffinnholdet hos prøvene, og det kan hos oppdrettslaks variere mellom ca. 60-65% avhengig av lipidinnholdet (Erikson, Misimi, & Gallart-Jornet, 2011). Det er nesten tilsvarende som er funnet i dette studiet, hvor vanninnholdet hos RåS var $67,2\% \pm 0,9$, RåT $66,1\% \pm 0,2$, og for prøver som var tørrsaltet $62,8\% \pm 3,3$ og lakesaltet $64,5\% \pm 2,6$. Avhengig av saltemetode som brukes på laks vil vann lekke ut og salt tas opp. Hos lakesalting vil fiskefilet ta opp vann og salt før det utligner seg, men også proteiner kan lekke ut lakenet i løpet av prosessen. For tørrsalting vil saltingen medføre at vann og ekstraktivstoffer trekkes ut ved osmose og siden fileten mister vann opplever man også et vekttap. Laks som er lakesaltet vil gi et produkt med mer vektutbytte siden det tar opp mer vann, men i lakekonsentrasjoner mellom 4-18% (Gallart-Jornet, Barat, et al., 2007b). I dette studiet fremkom det ingen klar signifikant forskjell i vanninnhold hos prøvene som var lakesaltet og tørrsaltet, selv om lakesaltet var litt høyere enn både tørrsaltet og RåS/RåK, men vanninnholdet vil som sagt påvirkes av lipidinnholdet.

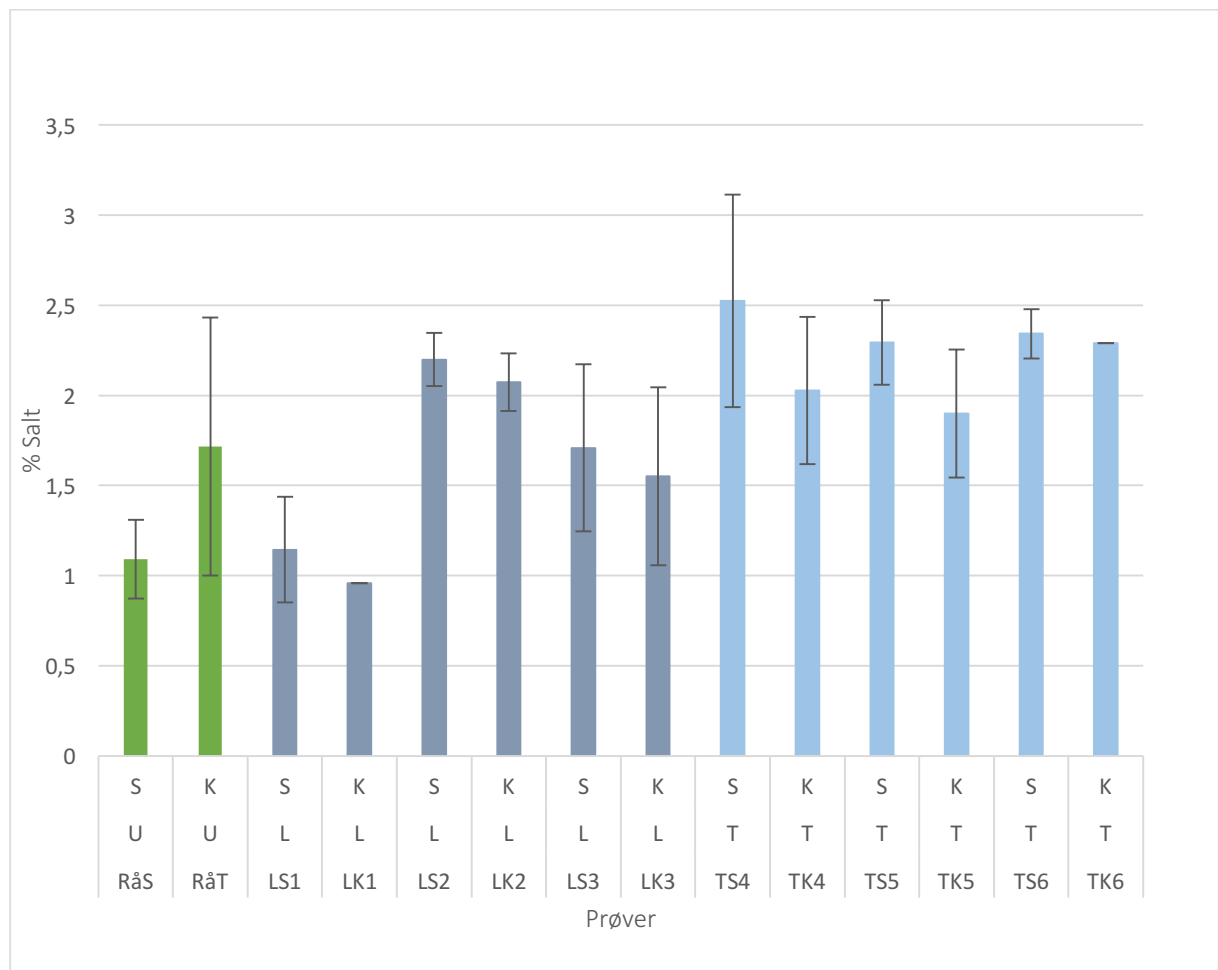


Figur 3.2: % Vann i laks. S = superkjølt, K=Kjølt, U=ubehandlet, L=lakesaltet, Rå= ikke røkt. Alle verdier er vist som gjennomsnitt ± standardavvik (n=2)

3.1.3 Saltinnhold

Målet var å ha et saltinnhold på 8,5 % og som tilsvarer omtrent 10% salt i vannfasen i prøvene gitt at vanninnholdet er 70%. I dette forsøket var det ingen prøver som hadde så høyt saltinnhold. Det høyeste saltinnhold ble målt til $2,5\% \pm 0,5$ for prøven TS4 (Figur 3.3).

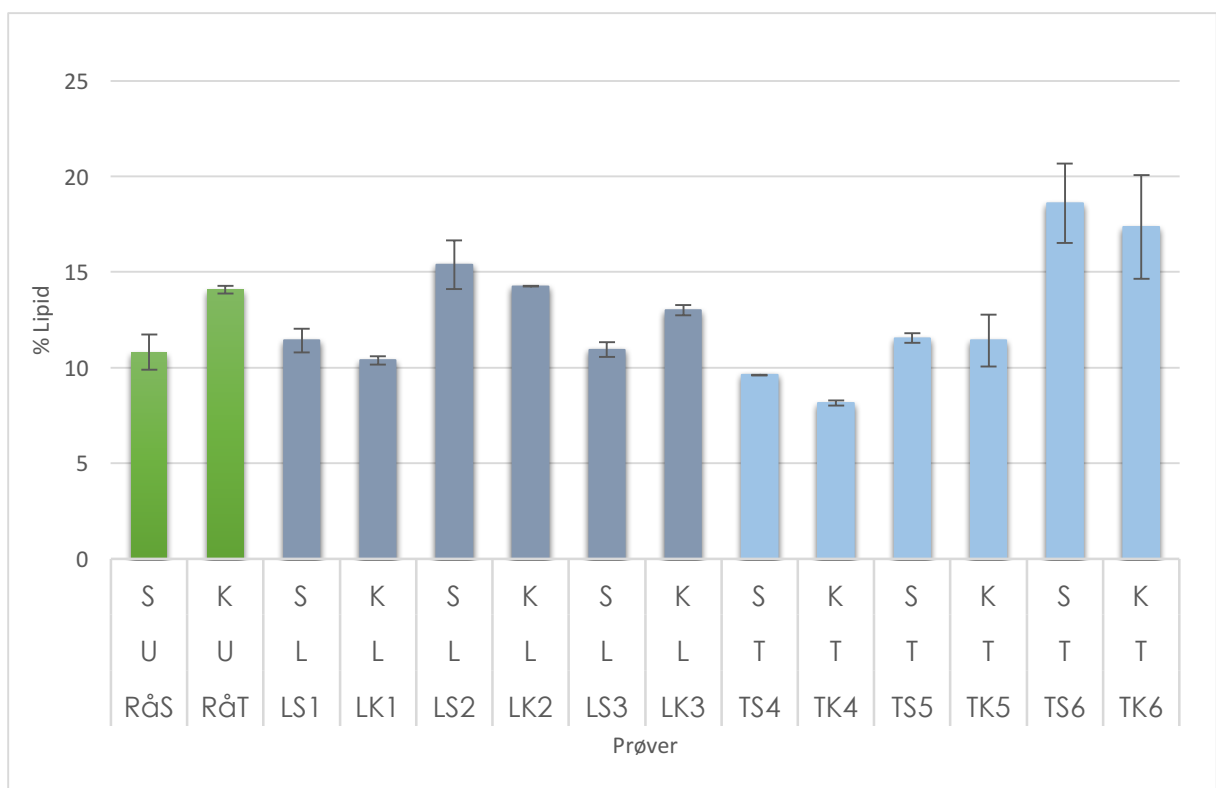
For prøvene som var lakesaltet var saltinnholdet $1,6\% \pm 0,5$ og for prøver som var tørrsaltet $2,2\% \pm 0,2$, og for prøvene som ikke var saltet RåS $1,1\% \pm 0,2$ og RåT $1,7\% \pm 0,7$. Det ble også funnet ut at prøvene som ble tørrsaltet var signifikant høyere ($p \leq 0,05$) enn prøvene som var lakesaltet, RåS og RåK. Noe som er tilsvarende som Gallart-Jornet, Barat, et al. (2007b) fant og prøvene som tørrsaltes tar opp salt raskere enn prøvene som er lakesaltet. Derimot vil laks som lakesaltes ha mer vektutbytte, enn laks som er tørrsaltet. Saltopptaket i fisk vil også variere med art, muskeltype, størrelse, lipidinnhold, saltemetode, lakekonsentrasjon, frysing og tining (Gallart-Jornet, Barat, et al., 2007a; Martínez-Alvarez & Gómez-Guillén, 2013). Hvorfor RåS og RåK har så høyt saltinnhold selv om dem ikke er saltet er uvisst. Det kan ha vært noe som har skjedd under analysen.



Figur 3.3 % salt i laks. S = superkjølt, K=Kjølt, U=ubehandlet, L=lakesaltet, Rå= ikke røkt. Alle verdier er vist som gjennomsnitt ± standardavvik (n=3)

3.1.4 Lipidinnhold

Lipidinnholdet varierer i alle prøvene, og det ble heller ikke funnet noen signifikante forskjeller. Det er normalt at lipidinnholdet variere fra 2%-19%, også fra hvilken del på laksen man analyserer lipidinnhold fra vil være med å påvirke resultatet (Katikou, Hughes, & Robb, 2001). Selv om det i dette studiet ble tatt ut prøver fra de tykkeste delene, vil det være individuelle forskjeller siden ikke alle prøvene er fra samme laks. De prøvene som er fra samme laks er RåS og RåK, og prøvene med samme nummerering fra 1-6. Det ser ut som fettinnholdet endres i liten grad av både saltemetode og kjølemetode. Prøvene som er fra samme laks som LS1/LK1, LS2/LK2, LS3/LK3, TS4/TK4, TS5/TK5 og TS6/TK6 er det ikke mye som skiller mellom dem.



Figur 3.4: % Lipid i laks. S = superkjølt, K=Kjølt, U=ubehandlet, L=lakesaltet, Rå= ikke røkt. Alle verdier er vist som gjennomsnitt ± standardavvik (n=3)

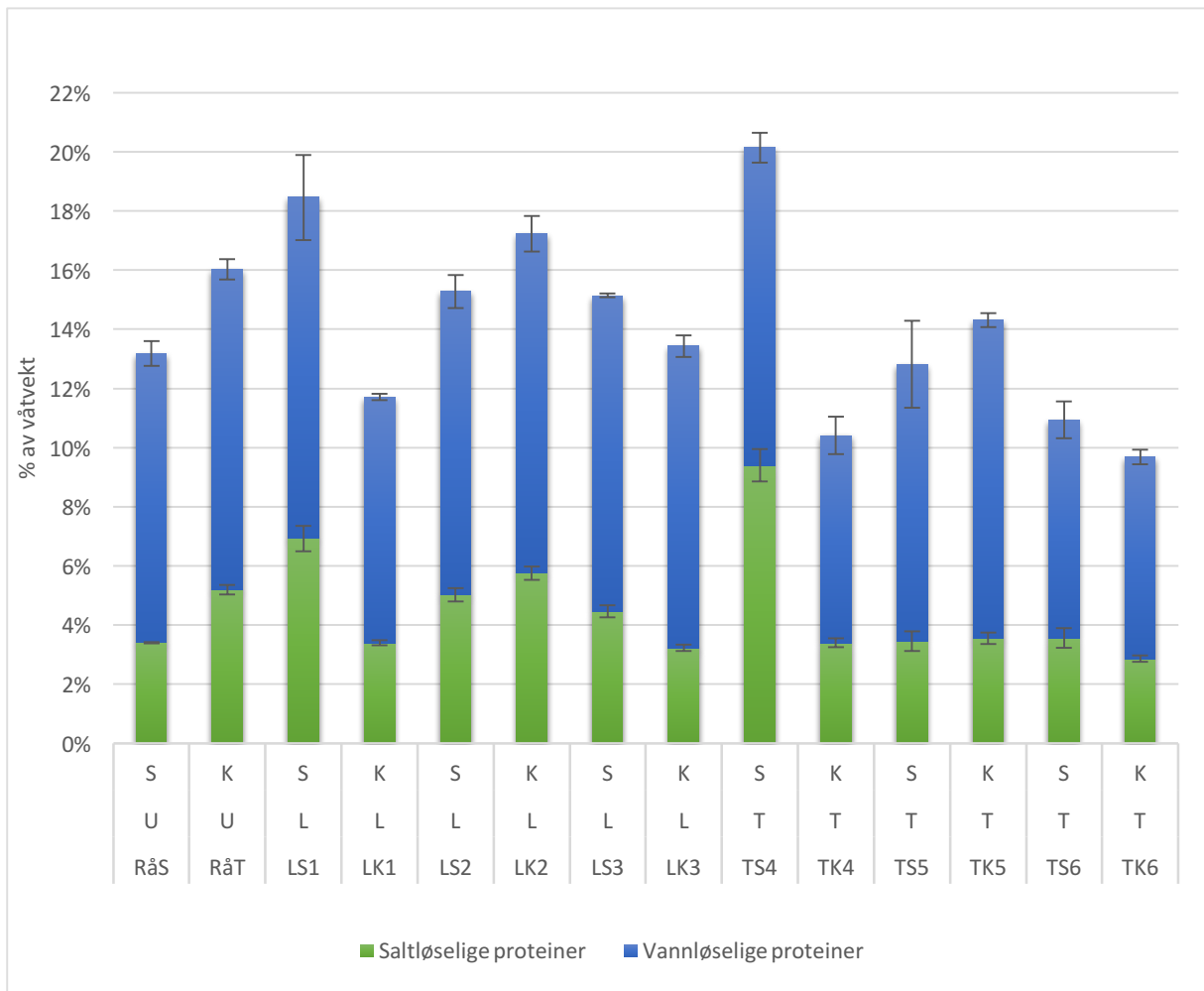
3.1.5 Vann- og saltløselige proteiner

Alle prøvene har tidligere blitt fryst og noe frysedenaturering vil skje i løpet av tiden prøvene lå i fryser, men bortsett fra det har prøvene blitt behandlet likt, men med ulike salte- og kjølemetoder. Resultatet for vann- og saltløselige proteiner viser at det varierer mellom prøvene som er ubehandlet, superkjølt/kjølt og lakesaltet/tørretsaltet. De vannløselige proteiner varierer fra $6,8\% \pm 0,3$ til $11,5\% \pm 1,4$ i prøvene, mens for saltløselige proteiner fra $2,9\% \pm 0,1$ til $9,4\% \pm 0,5$ (Figur 3.4). Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller i bruk av saltemetode eller kjølemetode mellom gruppene.

Proteinene i fisk sier mye om funksjonelle egenskapene som muskelproteinene har. Muskelproteinene vil ved salting vise en tendens til å ha økt løselighet ved økende saltkonsentrasjon på grunn av en salting-inn effekt. Ved å fortsette å tilsette salt reduserer løseligheten på grunn av salting-ut effekt som en følge av protein denaturering. Protein denaturering er med på å redusere mange av de funksjonelle egenskapene muskelproteinene, som vannbindingsevne og tekstur (Martínez-Alvarez & Gómez-Guillén, 2013).

For prøver som er tørretsaltet vil det være mer protein denaturering på overflaten på grunn av saltet. Saltet trekker ut vann som er med på å redusere de funksjonelle egenskapene som vannbindingsevne og tekstur reduserer løseligheten til myofibrillene som er saltløselige proteiner. Hvis det er mer proteindenaturering i prøver som er tørretsaltet burde man se en reduksjon i saltløselige proteiner. For prøvene TK4, TS5, TK5, TS6 og TK6 er noe lavere i forhold til enkelte av prøvene som er lakesaltet, men det er ikke funnet noen signifikant forskjell. Det er også funnet at mengden saltløselige proteiner vil bli redusert i løpet av lagringstiden (Gallart-Jornet, Rustad, et al., 2007).

For vannløselige proteiner er det som nevnt ikke funnet noen signifikante forskjeller for prøvene som enten var superkjølt eller kjølt, men det har i en studie av Gallart-Jornet, Rustad, et al. (2007) blitt observert at mengden vannløselige proteiner øker når prøvene lagres på is eller superkjøles, og

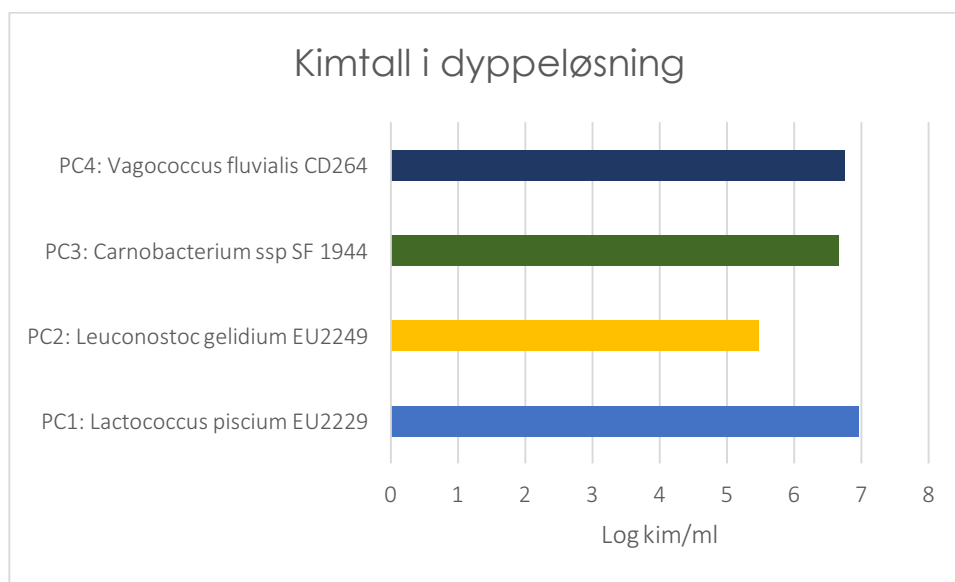


Figur 3.5: Vann- og saltløselige proteiner i røkt laks. S = superkjølt, K=Kjølt, U=ubehandlet, L=lakesaltet, Rå= ikke røkt. Alle verdier er vist som gjennomsnitt ± standardavvik (n=3)

3.2 KIMTALL I DYPPELØSNING

I denne studien har laks blitt dyppet i hver sin beskyttende kultur (PC1, PC2, PC3, PC4), og melkesyrebakteriene er valgt på grunn av deres antimikrobielle egenskaper mot spesifikke kvalitetsforringelses organismer (SSO) og enkelte patogene bakterier. I tillegg til var det en kontroll gruppe (KG) med prøver som kun ble dyppet i sterilisert destillert vann.

Bakterieløsningene med de fire ulike melkesyrebakteriene ble fortynnet til 10^{-6} og 10^{-7} . Til tross for det, var alle petriskålene ved fortynningene 10^{-6} og 10^{-7} overgrodd. Det anbefales at man benytter kolonitall som ligger mellom 25 til 250 for utregning av kimtall. Det er da estimert at det er over 10^{10} kim/ml med utgangspunkt at det er over 250 kolonier i hver petriskål. Det var ønskelig med minst 10^9 med bakterier i bakterieløsningene enten inkubert ved 17°C i 48 timer eller 22°C i 24 timer. For dyppeløsningen ville sluttfortynningen omtrent være 10^{-7} . Kimtallet for dyppeløsningene PC1, PC2, og PC4 lå ganske nær den ønskelige mengden bakterier 10^7 kim/ml (Figur 3.6). Kimtallet for PC2 var over 10^5 kim/ml og noe lavere enn for PC1, PC3, PC4. Det vil naturlig være variasjon i vekst for melkesyrebakteriene, og ved tidligere forsøk for å finne riktig absorpsjons knyttet til riktig mengde bakterie, har melkesyrebakterie hatt ulik veksthastighet. På selve dagen forsøket ble utført måtte man bare anta at man oppnådde riktig mengde bakterie på bakgrunn på tidligere forsøk.



Figur 3.6: Antall beskyttende bakterier i dyppeløsningen for *Lactococcus piscium* EU2229 (PC1), *Leuconostoc gelidium* EU2249 (PC2), *Carnobacterium ssp* SF1944(PC3) og *Vagococcus fluvialis* CD264 (PC4).

3.3 KIMTALLSUTVIKLINGEN FOR LAKS LAGRET VED 0, 4, 11, OG 17 LAGRINGS-DAGER

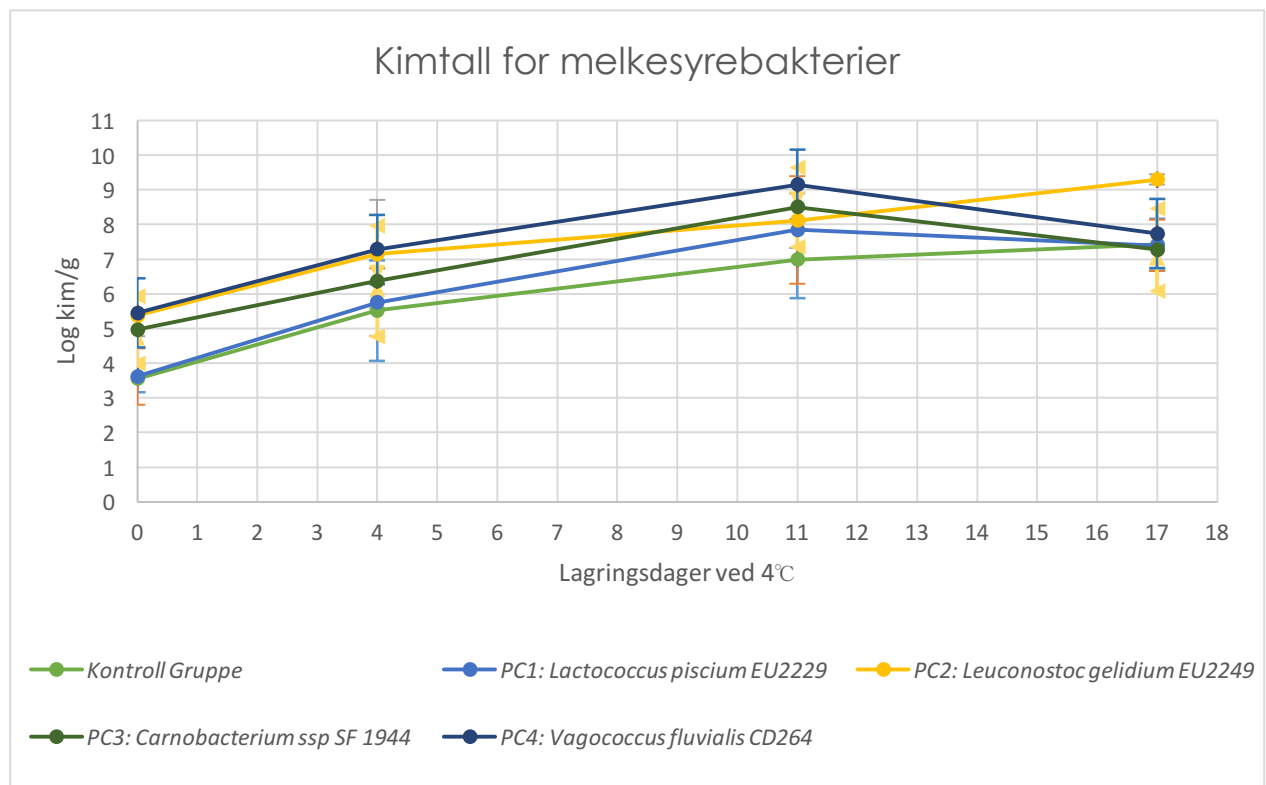
Kontroll gruppen (KG) var ikke dyppet i noen beskyttende kultur, men melkesyre bakterier finnes naturlig som en del av mikrofloraen til fisk. I utgangspunktet skal kimtallet for melkesyre bakterier være lavest for KG enn for PC1, PC2, PC3 og PC4 som er dyppet i beskyttende kultur. Kimtallet for KG ved 0 til 17 lagringsdager utviklet seg fra 10^3 kim/g til 10^7 (Figur 3.7). KG inneholdt mindre melkesyre bakterier enn PC2, PC3 og PC4, utenom PC1 som er omtrent lik som KG ved dag 0, men utover dag 4, 11 og 17 er flere melkesyre bakterier tilstede i prøvene som er dyppet.

Fra 0 lagringsdager til 11 lagringsdager øker mengden for med melkesyre bakterier i alle prøver dyppet i beskyttende kultur, for PC1 fra 10^3 kim/g til 10^7 kim/g, PC2 fra 10^4 kim/g til 10^8 kim/g, PC3 fra 10^4 kim/g til 10^8 kim/g, og for PC4 10^5 kim/g til 10^9 kim/g. Etter 17 lagringsdager er det en nedgang i mengden melkesyre bakterier for PC1, PC3 og PC4, utenom PC2 som har økt til 10^9 kim/g.

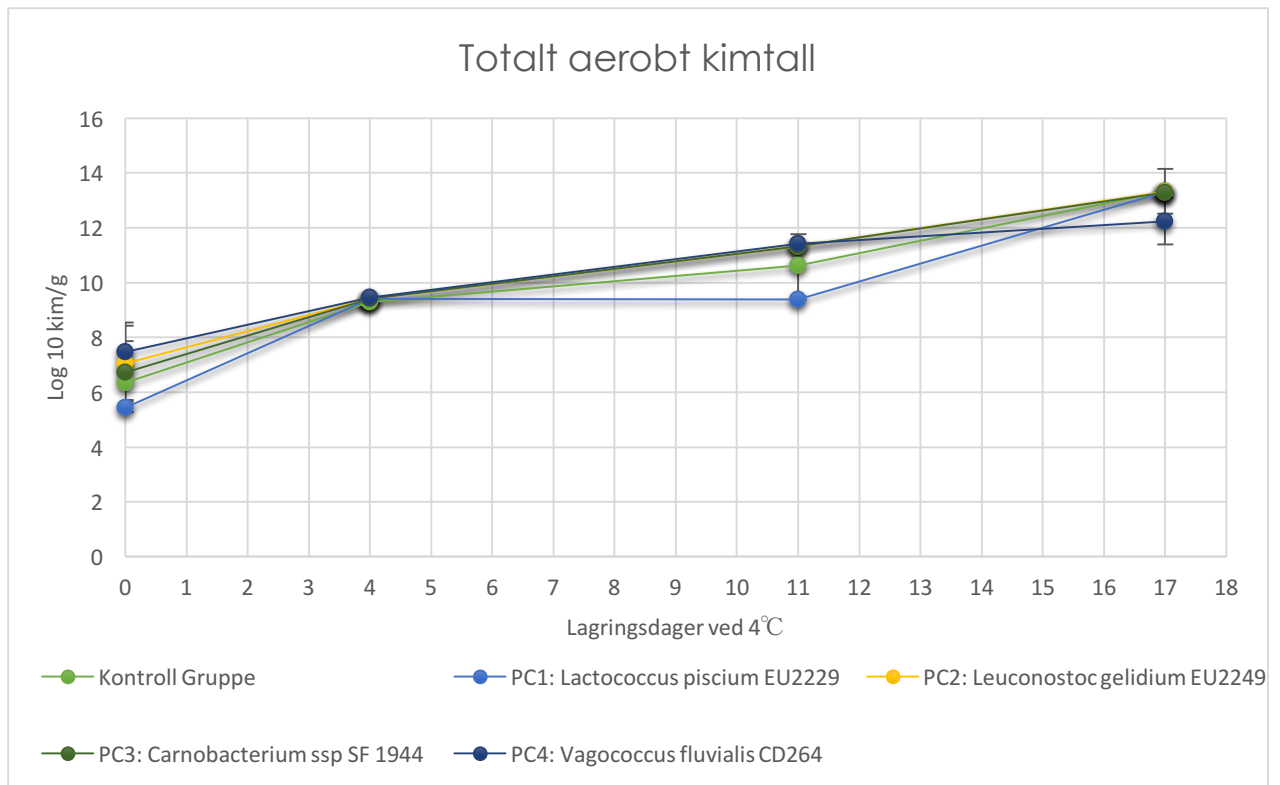
For totale aerobe bakterier var det veldig høyt kimtall fra dag 0 hos alle prøvene som varierte fra 10^5 kim/g til 10^7 kim/g, og etter dag 17 lå det over 10^{12} kim/g for alle prøvene KG, PC1, PC2, PC3 og PC4. I en studie av Sivertsvik, Rosnes, and Kleiberg (2003) var totalt aerobt kimtall under 10^2 kim/g hos laks lagret kjølig ved 4°C under luft og etter 20 dagers lagringstid var kimtallet over 10^8 kim/g. Dette gir en sterk indikasjon på at kimtallet i denne studien er høyere enn normalt. Under dyppingen av prøvene ble ikke skinnen fjernet, og har da med stor sannsynlighet blitt overført flere bakterier enn bare melkesyre bakterier. Det ble dyppet tilsammen fire biter laks i hvert sitt begerglass med dyppeløsning av PC1, PC2, PC3 og PC4, som også vil være med på å overføre flere bakterier til neste bit som dyppes. Selv om melkesyre bakteriene har antimikrobielle egenskaper virker det som dette ble litt stor belastning for dem. Det forteller også at hvis råstoffet har lav kvalitet hygienisk (høyt kimtall) så er det usikkert om en beskyttende kultur er til hjelp. Biokonservering har vist å være mer effektiv hvis det benyttes på produkter som er lavt kontaminert med bakterier (Brillet, Pilet, Prevost, Cardinal, & Leroi, 2005)

Mikrofloraen i prøvene vil mest sannsynlig domineres av gram-negative psykotrofe bakterier som *Shewanella* sp, *Aeromonas* sp, *Photobacterium* sp, *Enterobacteriaceae* eller *Brochothrix thermosphacta*. Etter å ha vært lagret i 11 og 17 dager ble det observert slim på overflaten til alle prøvene og veldig ubehagelig lukt. (L Gram & Dalgaard, 2002; Lone Gram & Huss, 1996; Leroi, 2014)

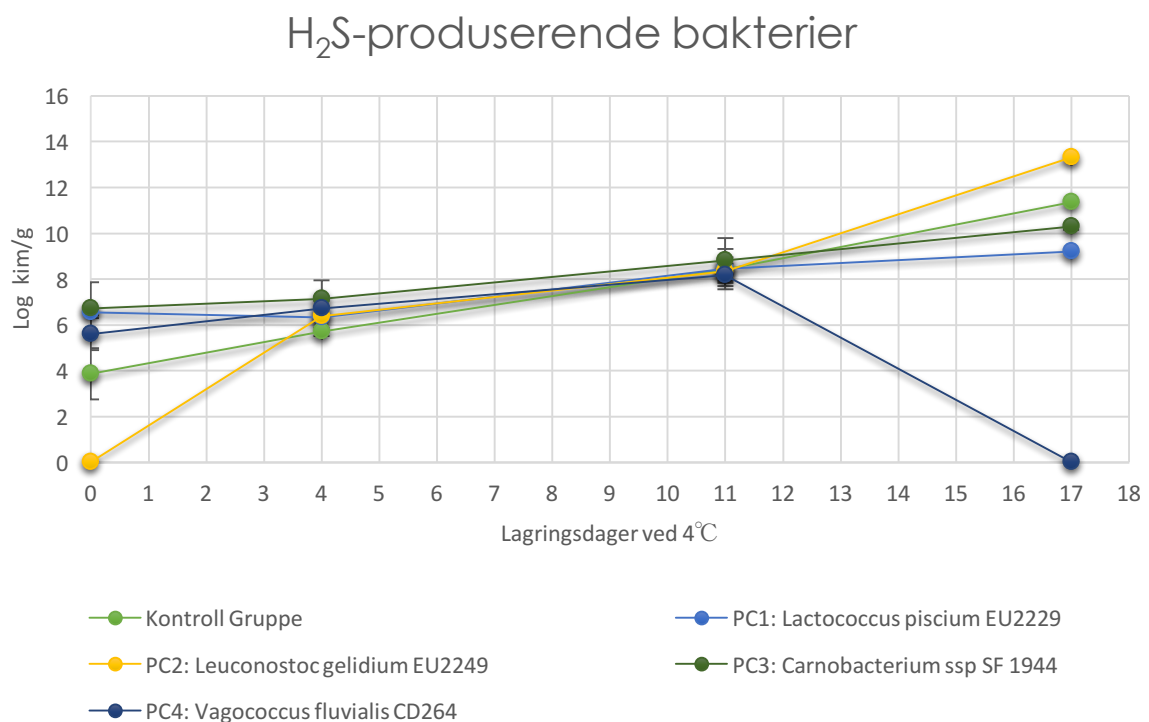
Man hadde ønsket å se at utviklingen av H₂S produserende bakterier flatet ut. Allerede fra start er kimtallet høyt for KG, PC1, PC3 og PC4, utenom PC2 (Figur 3.9). H₂S produserende bakterier var mellom 10³ og 10⁶ kim/g på dag 0. På dag 17 var det fortsatt H₂S produserende bakterier tilstede i PC1, PC2, PC3 og KG. Siden KG ikke er dyppet i forventet man at denne ville være høyere, men som tidligere nevnt ble prøvene dyppet med skinnet på og dette kan ha påvirket resultatet. Typiske bakterier som produserer H₂S er gram-negative bakterier som *Shewanella putrefaciens* og *S. putrefaciens*-like organismer (Emborg, Laursen, Rathjen, & Dalgaard, 2002).



Figur 3.7: Kimtallsutviklingen av melkesyrebakterier i dyppet laks med bakteriekulturene *Lactococcus piscium* EU2229 (PC1), *Leuconostoc gelidium* EU2249 (PC2), *Carnobacterium* ssp SF1944 (PC3) og *Vagococcus fluvialis* CD264 (PC4), og ikke-dyppet laks (KG) lagret ved 4°C og uttak etter 0, 4, 11, og 17 dager. Alle verdier er vist som gjennomsnitt ± standardavvik (n=3)



Figur 3.8: Merk beregningen i er basert på estimer for Kimtallsutviklingen for aerobe bakterier i dyppet laks med bakteriekulturene *Lactococcus piscium* EU2229 (PC1), *Leuconostoc gelidium* EU2249 (PC2), *Carnobacterium* ssp SF1944(PC3) og *Vagococcus fluvialis* CD264 (PC4), og ikke-dyppet laks (KG) lagret ved 4°C og uttak etter 0, 4, 11, og 17 dager. Alle verdier er vist som gjennomsnitt ± standardavvik



Figur 3.9: H₂S produserende bakterier dyppet laks med bakteriekulturene *Lactococcus piscium* EU2229 (PC1), *Leuconostoc gelidium* EU2249 (PC2), *Carnobacterium* ssp SF1944(PC3) og *Vagococcus fluvialis* CD264 (PC4), og ikke-dyppet laks (KG) lagret ved 4°C og uttak etter 0, 4, 11, og 17 dager. Alle verdier er vist som gjennomsnitt ± standardavvik.

4 KONKLUSJON

Dette studiet ble det funnet at prøver som var tørrsaltet inneholdt signifikant mer salt enn prøvene som var laksesaltet uavhengig om laksen var kjølt eller superkjølt. Det ble heller ikke observert noe forskjell i tørrstoff, vanninnhold, lipidinnhold eller salt- og vannløselige proteiner hos prøvene som var lakesaltet og tørrsaltet.

Det er også en del utfordringer knyttet biokonservering av laks. Spesielt viktig å få til riktig antall bakterier opp i bakteriekulturene som benyttes til å lage dyppeløsningene. Forsøket har også vist at skal man dyppe laks så må skinnet tas av ettersom skinnet har egen mikroflora som vil overføres til resten av prøven. Selv om de beskyttende bakteriekulturene har antimikrobielle egenskaper var det lite som tydet på at mikrofloraen som forårsaker forringelse ble hemmet, men derimot økte for hvert uttak som ble gjort. En av grunnene er at det allerede fra start var et veldig høyt kimtall hos laksen på grunn av den ble dyppet med skinnet på. Selv om laksen ble superkjølt og lagret kjølig kan bakterier som forårsaker forringelse vokse, fordi det vil være en oppblomstring av psykotrofe bakterier. Hvis laksen hadde blitt dyppet uten skinn ville resultatet kanskje vært annerledes. I dette studiet kom det ikke tydelig frem om melkesyre bakterier kan hemmet forringelsesflora eller ikke, men man vet at dem overlevde superkjøling.

4.1 VIDERE ARBEID

For biokonservering av laks ville det vært interessant å sett på hvordan de beskyttende kulturene hadde taklet å bli lagret ved -2°C etter å ha blitt superkjølt, i kombinasjon med andre konserveringsmetoder som vakuumpakking eller modifisert atmosfære. I tillegg utføre flere molekylær genetiske analyser for sekvensering og finnet ut mer om de ulike egenskaper melkesyrebakteriene har. Selv om melkesyre bakterie er tiltenkt som beskyttende kulturer, så er det også viktig å vite under hvilke forhold kan dem ha negativ effekt på råstoffet. For videre arbeid på laks er å se nærmere på å benytte andre saltkonsentrasjoner for både lake- og tørrsalting for røkt laks.

5 REFERANSER

- Alves, V. F., De Martinis, E. C. P., Destro, M. T., Vogel, B. F., & Gram, L. (2005). Antilisterial activity of a *Carnobacterium piscicola* isolated from Brazilian smoked fish (*Surubim* [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from surubim. *Journal of Food Protection*, *68*(10), 2068-2077.
- Anderson, M. L., & Ravesi, E. M. (1968). Relation between protein extractability and free fatty acid production in cod muscle aged in ice. *J. Fish Res. Bd. Canada*, *25*(10), 2059-2206.
- Asai, Y., Murase, T., Osawa, R., Okitsu, T., Suzuki, R., Sata, S., . . . Watanabe, H. (1999). Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from processed salmon roe associated with the outbreaks in Japan, 1998, and a molecular typing of the isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Kansenshogaku zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, *73*(1), 20-24.
- Aschfalk, A., & Müller, W. (2002). Clostridium perfringens toxin types from wild-caught Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), determined by PCR and ELISA. *Canadian Journal of Microbiology*, *48*(4), 365-368. doi:10.1139/w02-015
- Ayulo, A. M. R., Machado, R. A., & Scussel, V. M. (1994). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, *24*(1-2), 171-178. doi:10.1016/0168-1605(94)90116-3
- Baffone, W., Pianetti, A., Bruscolini, F., Barbieri, E., & Citterio, B. (2000). Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. *International Journal of Food Microbiology*, *54*(1-2), 9-18. doi:10.1016/S0168-1605(99)00189-0
- Beaufort, A., Rudelle, S., Gnanou-Besse, N., Toquin, M. T., Kerouanton, A., Bergis, H., . . . Cornu, M. (2007). Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Letters in Applied Microbiology*, *44*(4), 406-411. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02096.x
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1), 248-254. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brillet, A., Pilet, M.-F., Prevost, H., Cardinal, M., & Leroi, F. (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), 309-324. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.012>
- Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., de Miguel, T., Pascoal, A., & Barros-Velazquez, J. (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), 43-63. doi:10.1007/s11947-007-0021-2
- Dalgaard, P., Madsen, H. L., Samieian, N., & Emborg, J. (2006). Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) - Effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(1), 80-95. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02905.x
- Daniels, N. A., Mackinnon, L., Bishop, R., Altekruze, S., Ray, B., Hammond, R. M., . . . Slutsker, L. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *Journal of Infectious Diseases*, *181*(5), 1661-1666. doi:10.1086/315459
- Davidson, C. M., & Cronin, F. (1973). Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. *Appl Microbiol*, *26*(3), 439-440.

- Eklund, M. W., Peterson, M. E., Poysky, F. T., Paranjpye, R. N., & Pelroy, G. A. (2004). Control of Bacterial Pathogens during Processing of Cold-Smoked and Dried Salmon Strips. *Journal of Food Protection*, 67(2), 347-351.
- Emborg, J., Laursen, B. G., Rathjen, T., & Dalgaard, P. (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), 790-799. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01588.x
- Erikson, U., Misimi, E., & Gallart-Jornet, L. (2011). Superchilling of rested Atlantic salmon: Different chilling strategies and effects on fish and fillet quality. *Food Chemistry*, 127(4), 1427-1437.
- European Food Safety, A., European Centre for Disease, P., & Control. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), e04634-n/a. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- Fernandes, C. F., Flick, G. J., & Thomas, T. B. (1998). Growth of inoculated psychrotrophic pathogens on refrigerated fillets of aquacultured rainbow trout and channel catfish. *Journal of Food Protection*, 61(3), 313-317.
- Folkehelseinstituttet. (2017). Listeriose - veileder for helsepersonell. Retrieved from <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/listeriose---veileder-for-helsepers/-meldings-og-varslingsplikt> Lastet ned 02.05.2017
- Gallart-Jornet, L., Barat, J. M., Rustad, T., Erikson, U., Escriche, I., & Fito, P. (2007a). A comparative study of brine salting of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Engineering*, 79(1), 261-270. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.01.053>
- Gallart-Jornet, L., Barat, J. M., Rustad, T., Erikson, U., Escriche, I., & Fito, P. (2007b). Influence of brine concentration on Atlantic salmon fillet salting. *Journal of Food Engineering*, 80(1), 267-275.
- Gallart-Jornet, L., Rustad, T., Barat, J. M., Fito, P., & Escriche, I. (2007). Effect of superchilled storage on the freshness and salting behaviour of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Food Chemistry*, 103(4), 1268-1281.
- Gancel, F., Dzierszinski, F., & Tailliez, R. (1997). Identification and characterization of *Lactobacillus* species isolated from fillets of vacuum-packed smoked and salted herring (*Clupea harengus*). *Journal of Applied Microbiology*, 82(6), 722-728.
- Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2013). Seafood biopreservation by lactic acid bacteria - A review. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 315-324. doi:10.1016/j.lwt.2013.05.039
- González-Rodríguez, M. N., Sanz, J. J., Santos, J. A., Otero, A., & García-López, M. L. (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), 161-168. doi:10.1016/S0168-1605(02)00048-X
- Gram L, Trolle G, & 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), 65-72. doi:10.1016/0168-1605(87)90060-2
- Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria—problems and solutions. *Current opinion in biotechnology*, 13(3), 262-266.
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 121-137.
- Gudmundsdóttir, S., Gudbjörnsdóttir, B., Lauzon, H. L., Einarsson, H., Kristinsson, K. G., & Kristjánsson, M. (2005). Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 101(1), 41-51.
- Hansen, L. T., & Huss, H. H. (1998). Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. *Food Research International*, 31(10), 703-711.

- Hastings, J. W., & Stiles, M. E. (1991). Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. *J Appl Bacteriol*, 70(2), 127-134.
- Hatheway, C. L. (1995). Botulism: The present status of the disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 195, 55-75.
- Heinitz, M. L., Ruble, R. D., Wagner, D. E., & Tatini, S. R. (2000). Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. *Journal of Food Protection*, 63(5), 579-592.
- Hemmer, E., Askim, M., Karlsen, H., Lynum, L., Nordeng, A., & Nybraaten, G. (2006). *Næringsmiddellære Råstoff, produksjons- og ferdigvarekunnskap: Yrkeslitteratur AS*.
- Hewitt, J. H., Begg, N., Hewish, J., Rawaf, S., Stringer, M., & Theodore-Gandi, B. (1986). Large outbreaks of *Clostridium perfringens* food poisoning associated with the consumption of boiled salmon. *Journal of Hygiene*, 97(1), 71-80. doi:10.1017/S0022172400064366
- Hoffman, A. D., Gall, K. L., Norton, D. M., & Wiedmann, M. (2003). *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish. *Journal of Food Protection*, 66(1), 52-60.
- Huis in't Veld, J. H. J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 1-18. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01139-7](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(96)01139-7)
- Hultmann, L., & Rustad, T. (2002). Textural changes during iced storage of salmon (*Salmo salar*) and cod (*Gadus morhua*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 11(3-4), 105-123.
- Haagsma, J. (1991). Pathogenic anaerobic bacteria and the environment. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 10(3), 749-764.
- Isonhood, J. H., & Drake, M. (2002). *Aeromonas* species in foods. *Journal of Food Protection*, 65(3), 575-582.
- Johnson, E. A. (2000). *Clostridium botulinum*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1.
- Jørgensen, L. V., Dalgaard, P., & Huss, H. H. (2000). Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2448-2453. doi:10.1021/jf9909407
- Kam, K. M., Leung, T. H., Ho, Y. Y. P., Ho, N. K. Y., & Paul Saw, T. A. (1995). Outbreak of *Vibrio cholerae* 01 in Hong Kong related to contaminated fish tank water. *Public Health*, 109(5), 389-395. doi:10.1016/S0033-3506(95)80012-3
- Katikou, P., Hughes, S. I., & Robb, D. H. F. (2001). Lipid distribution within Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Aquaculture*, 202(1), 89-99.
- Khatib, R., Naber, M., Shellum, N., Ashton, L., Knowles, K., Giardina, V., & Wilson, F. M. (1994). A Common Source Outbreak of Gastroenteritis in a Teaching Hospital. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 15(8), 534-535. doi:10.1086/646972
- Kaale, L. D., & Eikevik, T. M. (2015). The influence of superchilling storage methods on the location/distribution of ice crystals during storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Control*, 52, 19-26.
- Laursen, B. G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P., & Leisner, J. J. (2005). *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Syst Appl Microbiol*, 28(2), 151-164.
- Leisner, J. J., Laursen, B. G., Prévost, H., Drider, D., & Dalgaard, P. (2007). *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *Fems Microbiology Reviews*, 31(5), 592-613. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00080.x
- Leroi, F. (2014). Role of Bacteria in Seafood Products *Seafood Science* (pp. 458-482): CRC Press.
- Leroi F. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*, 27(6), 698-709. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.016>
- Leroi, F., & Joffraud, J.-J. (2011). Microbial Degradation of Seafood *Aquaculture Microbiology and Biotechnology, Volume Two* (pp. 47-72): Science Publishers.

- Leroi, F., Joffraud, J.-J., Chevalier, F., & Cardinal, M. (1998). Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *International Journal of Food Microbiology*, 39(1–2), 111-121. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00126-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00126-8)
- Licciardello, J. J., Ravesi, E. M., Lundstrom, R. C., Wilhelm, K. A., Correia, F. F., & Allsup, M. G. (1982). TIME- TEMPERATURE TOLERANCE AND PHYSICAL-CHEMICAL QUALITY TESTS FOR FROZEN RED HAKE. *Journal of Food Quality*, 5(3), 215-234. doi:10.1111/j.1745-4557.1982.tb00745.x
- Ling, M. L., Goh, K. T., Wang, G. C. Y., Neo, K. S., & Chua, T. (2002). An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium, DT104L linked to dried anchovy in Singapore. *Epidemiology and Infection*, 128(1), 1-5.
- Lyhs, U., Björkroth, J., Hyytiä, E., & Korkeala, H. (1998). The spoilage flora of vacuum-packaged, sodium nitrite or potassium nitrate treated, cold-smoked rainbow trout stored at 4°C or 8°C. *International Journal of Food Microbiology*, 45(2), 135-142. doi:10.1016/S0168-1605(98)00160-3
- Lyhs, U., Björkroth, J., & Korkeala, H. (1999). Characterisation of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout using ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*, 52(1-2), 77-84. doi:10.1016/S0168-1605(99)00117-8
- Lynum, L. (1997). *Fiske som Råstoff: holdbarhet og kvalitetsikring*. 2. Utgave Tapir forlag
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., & Kim, S.-K. (2014). Lactic Acid Bacteria in Seafood Products: Current Trends and Future Perspectives *Seafood Science* (pp. 182-201): CRC Press.
- Martínez-Alvarez, O., & Gómez-Guillén, C. (2013). Influence of mono- and divalent salts on water loss and properties of dry salted cod fillets. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 387-394. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.04.013>
- Mejlholm, O., & Dalgaard, P. (2013). Development and validation of an extensive growth and growth boundary model for psychrotolerant *Lactobacillus* spp. in seafood and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 244-260. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.013
- Miettinen, H., & Wirtanen, G. (2005). Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout. *International Journal of Food Microbiology*, 104(2), 135-143. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.01.013
- MISI, f. (2017). MSIS-statistikk. from Folkehelseinstituttet <http://www.msis.no/> Lastet ned 04.02.2017
- O'Sullivan, M. G. (2017). Chapter 6 - Shelf Life and Sensory Quality of Foods and Beverages *A Handbook for Sensory and Consumer-Driven New Product Development* (pp. 103-123): Woodhead Publishing.
- Olgunoğlu, I. (2012). Salmonella in fish and fishery products. *Salmonella - A dangerous foodborne pathogen*, 91-109.
- Olofsson, T. C., Ahrné, S., & Molin, G. (2007). The bacterial flora of vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 7°C, identified by direct 16S rRNA gene analysis and pure culture technique. *Journal of Applied Microbiology*, 103(1), 109-119. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03216.x
- Paludan-Müller, C., Dalgaard, P., Huss, H. H., & Gram, L. (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), 155-166. doi:10.1016/S0168-1605(97)00133-5
- Piérard, D., Crowcroft, N., De Bock, S., Potters, D., Crabbe, G., Van Loock, F., & Lauwers, S. (1999). A case-control study of sporadic infection with O157 and non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Epidemiology and Infection*, 122(3), 359-365. doi:10.1017/S0950268899002289

- Porsby, C. H., Vogel, B. F., Mohr, M., & Gram, L. (2008). Influence of processing steps in cold-smoked salmon production on survival and growth of persistent and presumed non-persistent *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3), 287-295.
- Pot, B., Devriese, L. A., Hommez, J., Miry, C., Vandemeulebroecke, K., Kersters, K., & Haesebrouck, F. (1994). Characterization and identification of *Vagococcus fluviialis* strains isolated from domestic animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(4), 362-369. doi:10.1111/j.1365-2672.1994.tb03436.x
- Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J., & Ercolini, D. (2015). Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Science*, 109, 66-74. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.014
- Pothakos, V., Snauwaert, C., De Vos, P., Huys, G., & Devlieghere, F. (2014). Psychrotrophic members of *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum* and *Lactococcus piscium* dominate at the end of shelf-life in packaged and chilled-stored food products in Belgium. *Food Microbiology*, 39, 61-67. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.005
- Rotabakk, B. T. (2009). *Superkjøling i kombinasjon med pakking Nofima-presentasjon*. http://sjomatnorge.no/wp-content/uploads/importedfiles/7Superkjøling_pakking.pdf
- Rustad, T. (2005). *Muskelvevet i kjøtt og fisk*.
- Rørvik, L. M. (2012). *Listeria monocytogenes*. In P. E. Granum (Ed.), *Matforgifning Næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner* (3 ed.): Høyskoleforlaget.
- Sampels, S. (2015). The effects of processing technologies and preparation on the final quality of fish products. *Trends in Food Science & Technology*, 44(2), 131-146. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.003
- Saraoui, T., Leroi, F., Björkroth, J., & Pilet, M. F. (2016). *Lactococcus piscium*: a psychrotrophic lactic acid bacterium with bioprotective or spoilage activity in food—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 121(4), 907-918.
- Semanchek, J. J., & Golden, D. A. (1998). Influence of growth temperature on inactivation and injury of *Escherichia coli* O157:H7 by heat, acid, and freezing. *Journal of Food Protection*, 61(4), 395-401.
- Sivertsvik, M., Rosnes, J. T., & Kleiberg, G. H. (2003). Effect of Modified Atmosphere Packaging and Superchilled Storage on the Microbial and Sensory Quality of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets. *Journal of Food Science*, 68(4), 1467-1472. doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb09668.x
- Sramova, H., & Benes, C. (1998). Occurrence of botulism in the Czech Republic. *Zpravy CEM (SZU Praha)*, 7, 395-397.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70(2-4), 331-345. doi:10.1007/BF00395940
- Strasburg, G., Xiong, Y. L., & Chiang, W. (2007). Physiology and chemistry of edible muscle tissues. In K. L. P. Srinivasan, Damodaran, Owen R. Fennema (Ed.), *Fennema's Food Chemistry* (4 ed.): CRC Press.
- Thimothe, J., Nightingale, K. K., Gall, K., Scott, V. N., & Wiedmann, M. (2004). Tracking of *Listeria monocytogenes* in Smoked Fish Processing Plants. *Journal of Food Protection*, 67(2), 328-341.
- Truelstrup Hansen, L., & Huss, H. H. (1998). Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses. *Food Research International*, 31(10), 703-711. doi:10.1016/S0963-9969(99)00049-6
- Wiernasz, N., Cornet, J., Cardinal, M., Pilet, M.-F., Passerini, D., & Leroi, F. (2017). Lactic acid bacteria selection for biopreservation as a part of hurdle technology approach applied on seafood. *Frontiers in Marine Science*.
- Zunabovic, M., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2011). Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture

environments - A review. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 351-362.
doi:10.1016/j.lwt.2010.08.005

VEDLEGG

Vedlegg A: Resultater fra vann- og saltløselige proteiner, tørrstoff, lipidinnhold, vanninnhold og saltinnhold

Vedlegg B: Kimtall for melkesyrebakterier, aerobe bakterier og H₂S-produserende bakterier

Prøve	Prøve- navn	Salte- metode	Kjøle- metode	Saltløselige proteiner (SS)	Vannløselige e proteiner (WS)	Ekstra- herbare proteiner (Exp)	%lipid	% Tørrstoff	% Salt	% Vann
Rålags S4	RÅS	U	S	3,40 %	9,78 %	13,18 %	10,807	32,798	1,090	67,20
Rålags T4	RÅT	U	K	5,19 %	10,84 %	16,03 %	14,091	33,898	1,717	66,10
B1F10S	LS1	L	S	6,92 %	11,53 %	18,46 %	11,414	31,577	1,1438	68,42
B1F10T	LK1	L	K	3,40 %	8,31 %	11,71 %	10,375	33,697	0,9564	66,30
B2F08S	LS2	L	S	5,02 %	10,26 %	15,28 %	15,390	35,224	2,1986	64,78
B2F08T	LK2	L	K	5,75 %	11,49 %	17,24 %	14,260	36,362	2,0727	63,64
B3F07S	LS3	L	S	4,46 %	10,69 %	15,15 %	10,936	38,030	1,7089	61,97
B3F07T	LK3	L	K	3,23 %	10,21 %	13,43 %	13,004	38,232	1,5505	61,77
B4F09S	TS4	T	S	9,40 %	10,75 %	20,14 %	9,616	32,729	2,5238	67,27
B4F09T	TK4	T	K	3,39 %	7,02 %	10,41 %	8,156	34,778	2,0265	65,22
B5F05S	TS5	T	S	3,45 %	9,37 %	12,82 %	11,538	36,913	2,2932	63,09
B5F05T	TK5	T	K	3,54 %	10,77 %	14,31 %	11,425	44,30	1,8985	57,94
B6F06S	TS6	T	S	3,57 %	7,37 %	10,93 %	18,590	39,394	2,3416	60,61
B6F06T	TK6	T	K	2,86 %	6,82 %	9,68 %	17,355	37,226	2,2897	62,77

Figur 1: Gjennomsnittsverdier for analysene som er utført og grunnlaget for resultatet. S = superkjølt, K=Kjølt, U=ubehandlet, L=lakesaltet, Rå= ikke røkt.

Tabell 1: Grunnlaget for beregning av kimtall for melkesyrebakterier

Prøve	Uttak	Gram prøve	Kimtall (Gj.snitt)	Fort.	Kim/g prøve
KG	0	9,61	38,33	1	3589,30
KG	4	11,25	41,33	0,01	330628,46
KG	11	11,15	119,67	0,001	9659539,36
KG	17	10,39	30,33	0,0001	26275011,79
PC1	0	8,86	40,67	1	4129,53
PC1	4	8,86	56,00	0,01	569144,25
PC1	11	9,02	70,00	0,0001	69825436,41
PC1	17	11,05	30,33	0,0001	24714828,90
PC2	0	10,09	26,67	0,01	237835,70
PC2	4	8,83	136,67	0,001	13926788,12
PC2	11	10,72	15,33	0,00001	128742151,86
PC2	17	11,28	249,00	0,00001	1986754966,89
PC3	0	8,09	8,33	0,01	92693,30
PC3	4	8,92	230,67	0,01	2326441,42
PC3	11	10,76	37,67	0,00001	314921130,37
PC3	17	11,39	237,00	0,001	18726295,83
PC4	0	10,10	31,50	0,01	280618,05
PC4	4	7,65	162,67	0,001	19126504,06
PC4	11	8,69	136,33	0,00001	1411642890,01
PC4	17	12,15	7,33	0,00001	54315176,15

Tabell 2: Grunnlaget for beregningene for aerobt kimtall

Prøve	Dag	Gram prøve	Gram prøve/ml	Kimtall (Gj.snitt)	Beregnet kimtall kim/g
KG	0	9,61	0,107	239,33	2240972,13
KG	4	11,25	0,125	250,00	1999768915,59
KG	11	11,15	0,124	53,00	42781803831,53
KG	17	10,39	0,115	250,00	21655229497309,90
PC1	0	8,86	0,098	27	274173,53
PC1	4	8,86	0,098	250,00	2540822548,95
PC1	11	9,02	0,100	250,00	2493765586,03
PC1	17	11,05	0,123	250,00	20369364475828,40
PC2	0	10,09	0,112	129,00	11505301,75
PC2	4	8,83	0,098	250,00	2547583192,74
PC2	11	10,72	0,119	250,00	209905682380,05
PC2	17	11,28	0,125	250,00	19947339024974,10
PC3	0	8,09	0,090	48,00	5339133,87
PC3	4	8,92	0,099	250,00	2521432173,47
PC3	11	10,76	0,120	250,00	209018449361,80
PC3	17	11,39	0,127	250,00	19753476611883,70
PC4	0	10,10	0,112	33,33	29695032,02
PC4	4	7,65	0,085	250,00	2939524189,02
PC4	11	8,69	0,097	250,00	258858720662,68
PC4	17	12,15	0,135	235,67	1745492251857,83

Tabell.3: Grunnlaget for beregningene for H₂S-produserende bakterier

Prøve		Gram prøve	Kimtall (Gj.snitt)	Fort.	Kim/g prøve
KG	0	9,61	78,00	1,0	7303,45
KG	4	11,25	6,33	0,001	506608,13
KG	11	11,15	33,00	0,00001	266377269,14
KG	17	10,39	2,67	0,000000001	230989114637,97
PC1	0	8,86	3,50	0,00010	3554101,32
PC1	4	8,86	21,33	0,00100	2168168,58
PC1	11	9,02	27,67	0,00001	275976724,85
PC1	17	11,05	2,00	0,0000001	1629549158,07
PC2	0	10,09	0,00	0,000	1,00
PC2	4	8,83	24,33	0,001	2479647,64
PC2	11	10,72	25,33	0,00001	212704424,81
PC2	17	11,28	250,00	0,000000001	19947339024974,10
PC3	0	8,09	48,00	0,001	5339133,87
PC3	4	8,92	13,33	0,00010	13447638,26
PC3	11	10,76	80,00	0,00001	668859037,96
PC3	17	11,39	2,50	0,000000010	19753476611,88
PC4	0	10,10	43,67	0,01	389004,92
PC4	4	7,65	45,33	0,00100	5330337,20
PC4	11	8,69	14,00	0,00001	144960883,57
PC4	17	12,15	0,00	0,00000	1,00