

Åshild Therese Moen

Biokonservering – Screening av melkesyrebakterier fra spiseklare sjømatprodukter for antimikrobiell effekt mot *Aeromonas salmonicida* og *Brochothrix thermosphacta* og karakterisering av vekstkinetikk i vakuumpakket laks (*Salmo salar* L.)

Masteroppgave i Mat og teknologi

Veileder: Anita Nordeng Jakobsen

November 2020

Åshild Therese Moen

**Biokonservering – Screening av
melkesyrebakterier fra spiseklare
sjømatprodukter for antimikrobiell
effekt mot *Aeromonas salmonicida* og
Brochothrix thermosphacta og
karakterisering av vekstkinetikk i
vakuumpakket laks (*Salmo salar* L.)**

Masteroppgave i Mat og teknologi
Veileder: Anita Nordeng Jakobsen
November 2020

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



Kunnskap for en bedre verden

Forord

En spennende og lærerik reise er snart over. Covid19-pandemien satte en ufrivillig brems på arbeidet, men takket være tilrettelegging fra NTNU, kunne laboratoriearbeidet etter hvert fullføres. Prosessen har vært lang og krevende og til tider ensom, men den har gitt meg erfaring og faglig påfyll i et svært interessant og nytenkende område jeg ikke ville vært foruten.

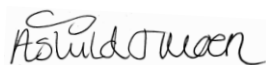
Masteroppgaven utgjør 45 studiepoeng, og er den avsluttende delen i det toårige masterstudiet, Mat og teknologi, ved institutt for bioteknologi og matvitenskap, fakultet for naturvitenskap ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet i Trondheim. Arbeidet startet høsten 2018 og ble fullført høsten 2020.

Først vil jeg rette en stor takk til Førsteamanuensis Anita Nordeng Jakobsen og Universitetslektor Sunniva Hoel for god veiledning, imøtekommenhet og engasjement gjennom den praktiske- og skriftlige arbeidsprosessen. Takk til ph.d. stipendiatene Jelena Stupar og Ingunn G. Holøymoen for samarbeidet og øvrig hjelp på laboratoriet. Takknemlighet rettes også til ansatte ved NTNU som bidro under sensorisk vurdering og til øvrige ansatte som har veiledet og svart på alle mine spørsmål på laboratoriet. Takk til medstudent Kristina Olsen for koselige telefonsamtaler, diskusjoner og godt samarbeid underveis i prosessen.

Jeg takker mine to nydelige og tålmodige barn, som har oppmuntret med klemmer og latter på tunge dager. Takk til mine foreldre for støttende ord gjennom prosessen og for avlastning på travle dager med barnepass og vedkløyving. Til sist vil jeg takke min kjære, Jo Morten – min klippe og omsorgsfulle pappa til våre barn, som har motivert meg, lest korrektur og stått på her hjemme for å gi meg mest mulig arbeidsro. Uten deg hadde dette aldri gått!

23. november 2020, Trondheim

Forfatter
Åshild Therese Moen



Abstract

Seafood products are among the most traded foods in the world and are often transported over large geographical distances. Fish are particularly exposed to microbial degradation, thus referred to as a perishable product with short shelf life. At the same time, there is a growing trend and demand for minimally processed and ready-to-eat food products, which makes it challenging in terms of maintaining safe food products with high-quality. One possible innovative approach is biopreservation – a preservation technology which consists of using microorganisms, selected for their antimicrobial properties, to prevent unwanted bacterial growth, without compromising the nutritional or sensory value of the product.

The aim of this study was to assess lactic acid bacteria from ready-to-eat seafood for their suitability as candidates in biopreservation of fish. In that regard, the growth of 100 isolates were examined at 15 °C in a tube experiment. 35 isolates from the genus *Leuconostoc*, *Weissella* and *Carnobacterium*, were screened for inhibitory effect against *Aeromonas salmonicida* and *Brochothrix thermosphacta*, in co-culture with fish-juice in a 96-well microplate format. *Leuconostoc* (no.406) and *Weissella* (no.328) were also inoculated in pre-rigor salmon, vacuumed, and stored at 4 °C for 21 days to assess microbial growth and sensory changes.

The results showed that 92 out of 100 lactic acid bacteria had growth at 15 °C. In the screening experiment, 27 out of 35 lactic acid bacteria had more than 3.0 log reduction (CFU/ml) against *Aeromonas salmonicida*, of which 23 isolates fully inhibited the growth. Against the target organism *B. thermosphacta*, 8 lactic acid bacteria showed good inhibitory effect (> 3.0 log reduction). The inoculation experiment indicated a rapid environmental adaptation for *Leuconostoc* (no.406) and *Weissella* (no.328) in vacuum-packed pre-rigor salmon at 4 °C and reached a microbial count of 7,48 and 5,80 log CFU/ml respectively on day 21. Sensory assessment indicated that there was little difference between the inoculated and non-inoculated samples. The screening method was well-functioning, but the incubation temperature for quantification for target organisms should be considered optimized. All genus (*Carnobacterium*, *Leuconostoc* and *Weissella*) were represented among those who showed good inhibition effect. 8 isolates of lactic acid bacteria are considered promising candidates for inhibition of both Gram-positive and Gram-negative spoilage bacteria in ready-to-eat fish.

Sammendrag

Sjømatprodukter er blant de mest omsatte matvarene i verden og fraktes ofte over store geografiske avstander. Fisk er spesielt utsatt for mikrobiell ødeleggelse og betegnes som et lettbederverlig produkt med kort holdbarhet. Samtidig er det en økende trend og etterspørsel etter minimalt prosesserte og spiseklare matprodukter, som gjør det utfordrende med tanke på opprettholdelse av trygge matprodukter av høy kvalitet. En mulig innovativ tilnærming er biokonservering – en konserveringsteknologi som innebærer bruk av mikroorganismer, valgt for deres antimikrobielle egenskaper, for å forhindre uønsket bakterievekst, uten at det går på bekostning av produktets ernæringsmessig- eller sensoriske verdi.

Hensikten med denne studien var å analysere melkesyrebakterier fra spiseklar sjømat for deres egnethet som kandidater i biokonservering av fisk. I den forbindelse, ble vekstegenskaper til 100 isolater undersøkt ved 15 °C i et rørforsøk. 35 isolater fra slektene *Leuconostoc*, *Weissella* og *Carnobacterium*, ble screenet for inhiberende effekt mot *Aeromonas salmonicida* og *Brochothrix thermosphacta*, i co-kultur med fiskejuice i et 96-brønns mikroplateformat. *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328) ble i siste fase inokulert i pre-rigor laks, vakuumert og lagret ved 4 °C i 21 dager, og evaluert for mikrobiell utvikling og sensoriske endringer.

Resultatene viste at 92 av 100 melkesyrebakterier vokste ved 15 °C. I screeningforsøket hadde 27 av 35 melkesyrebakterier en reduksjon på over 3,0 log CFU/ml mot *Aeromonas salmonicida*, hvorav 23 isolater inhiberte veksten fullstendig. Mot målorganismen *B. thermosphacta* viste 8 melkesyrebakterier god inhiberende effekt (> 3,0 log reduksjon). Inokuleringsforsøket indikerte en rask miljøtilpasning for *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328) i vakuumpakket pre-rigor laks ved 4°C, med henholdsvis kimtall på 7,48 og 5,80 log CFU/ml på dag 21. Sensorisk vurdering tydet på at det var liten forskjell mellom inokulerte og ikke-inokulerte prøvegrupper. Metoden for screeningforsøket fungerte godt, men inkuberingsstemperatur for kvantifisering for målorganismer bør vurderes noe optimalisert. Alle slektene (*Carnobacterium*, *Leuconostoc* og *Weissella*) var representert blant de som viste god inhiberingseffekt. 8 isolater vurderes som lovende kandidater med tanke på inhibering av både Gram-positive og Gram-negative forringelsesbakterier i spiseklar fisk.

Innhold

1	INTRODUKSJON	1
2	TEORETISK BAKGRUNN	4
2.1	FORRINGELSE AV SJØMAT	4
2.1.1	<i>Spesifikke forringelses organismer</i>	5
2.2	<i>AEROMONAS SALMONICIDA</i>	6
2.3	<i>BROCHOTHRIX THERMOSPACTA</i>	7
2.4	BIOKONSERVERING	7
2.5	MELKESYREBAKTERIER	8
2.5.1	<i>Bakteriosiner</i>	10
2.6	BARRIERETEKNOLOGI	12
2.7	READY-TO-EAT (SPISEKLARE) MATPRODUKTER	14
2.8	KRITERIER OG VURDERINGER FØR KOMMERSIELL BRUK AV MIKROORGANISMER MED ANTIMIKROBIELL EFFEKT	14
3	MATERIAL OG METODE	17
3.1	ISOLATER AV MELKESYREBAKTERIER	17
3.2	MELKESYREBAKTERIENES VEKSTEGENSKAPER VED 15 °C	17
3.3	MÅLORGANISMER	18
3.4	STANDARDISERING AV VEKST - OPTISK TETTHET (OD) MOT KIMTALL (CFU/ML)	19
3.5	UTVELGELSE AV MELKESYREBAKTERIER TIL SCREENING	21
3.6	TEST AV SELEKTIVE MEDIER FOR MELKESYREBAKTERIER OG MÅLORGANISMER	22
3.7	FREMSTILLING AV FISKEJUICE	22
3.8	SCREENING AV MELKESYREBAKTERIER – INHIBERINGSFORSØK I CO-KULTUR MED MÅLORGANISMER	23
3.9	INOKULERINGSFORSØK AV PRE-RIGOR LAKS MED UTVALGTE MELKESYREBAKTERIER	26
3.9.1	<i>Måling av pH i lakseprøver</i>	29
3.9.2	<i>Sensorisk vurdering av lukt og utseende</i>	29
3.10	DATABEHANDLING OG STATISTISKE ANALYSER	30
4	RESULTAT	31
4.1	MELKESYREBAKTERIENES VEKSTEGENSKAPER VED 15°C	31
4.1.1	<i>Melkesyrebakterier isolert fra sushi</i>	31
4.1.2	<i>Melkesyrebakterier isolert fra røykelaks</i>	32
4.1.3	<i>Melkesyrebakterier isolert fra gravlaks</i>	33
4.2	STANDARDISERING AV OD MOT KIMTALL FOR UTVALGTE ISOLATER VED KVANTIFISERING AV VEKST	34
4.3	TEST AV SELEKTIVE MEDIER FOR MELKESYREBAKTERIER OG MÅLORGANISMER	35
4.4	SCREENING AV MELKESYREBAKTERIER ETTER INHIBERENDE EGENSKAPER MOT UTVALGTE MÅLORGANISMER	37
4.4.1	<i>Aeromonas Salmonicida</i>	38
4.4.2	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	39
4.4.3	<i>Melkesyrebakterienes samlet inhiberingseffekt mot målorganismene</i>	40
4.5	INOKULERINGSFORSØK AV PRE-RIGOR LAKS MED UTVALGTE MELKESYREBAKTERIER	42
4.5.1	<i>Kvantifisering av melkesyrebakterier i laks</i>	42
4.5.2	<i>Kvantifisering av kimtall og hydrogensulfidproduserende bakterier i laks</i>	44
4.5.3	<i>Kvantifisering av aerobe kimtall og psykrofil flora i laks</i>	45
4.5.4	<i>Korrelasjon mellom kimtall på Jernagar og melkesyrebakterier på MRS Agar</i>	45
4.5.5	<i>Utvikling av pH i ikke-inokulerte og inokulerte lakseprøver</i>	46
4.5.6	<i>Sensorisk vurdering av lakseprøver på dag 8 og 15 i inokuleringsforsøket</i>	47
5	DISKUSJON	49
5.1	METODEUTVIKLING FOR BRUK AV MELKESYREBAKTERIER SOM BIKONSERVERENDE KULTUR I FISK	49
5.2	SCREENING AV MELKESYREBAKTERIER ETTER INHIBERENDE EGENSKAPER MOT UTVALGTE MÅLORGANISMER	53
5.3	INOKULERINGSFORSØK AV PRE-RIGOR LAKS MED UTVALGTE MELKESYREBAKTERIER	59

5.4	SENSORISK VURDERING	62
6	KONKLUSJON	63
7	VIDERE PERSPEKTIV	64
	REFERANSER	65
	VEDLEGG	72

Vedlegg 1: Oversikt over alle melkesyrebakterieisolater

Vedlegg 2: Vekstegenskaper til fire isolater (OD₆₀₀ mot timer)

Vedlegg 3: Totalkim (hvite og svarte kolonier) kvantifisert på jernagar mot kimtall av melkesyrebakterier på MRS Agar

1 Introduksjon

Sjømat, spesielt fisk, er en naturlig del av kostholdet til mange mennesker. I tillegg er det en god kilde til flere viktige næringsstoffer, deriblant flerumettede fettsyrer som omega-3 (Domingo, 2007). Omega-3 fettsyrene inkluderer de marine fettsyrene eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA), som har vist seg å ha gunstig effekt mot hjerte- og karsykdommer (Nestel, 1990). Norske helsemyndigheter anbefaler at et inntak av flerumettede fettsyrer bør utgjøre 5-10 % av kostens energiinnhold, hvorav omega-3 bør utgjøre 1 energiprosent (Helsedirektoratet, 2016). Sjømat blir derfor sett på som et viktig bidrag til et helsemessig sunt og næringsrikt kosthold (Trondsen *et al.*, 2003).

Det globale konsumet av sjømat har økt med 1,5 % i gjennomsnitt per år (1961-2015) (FAO, 2018). I dag er sjømatprodukter blant de mest omsatte matvarene i verden (André, 2018; Tacon, 2020). Et viktig bidrag til denne økningen har vært akvakulturnæringen, som er den raskest voksende sektoren innenfor næringsmiddelproduksjon (FAO, 2018). Samtidig som etterspørselen etter fersk fisk og sjømat øker (Gálvez *et al.*, 2008; Anacarso *et al.*, 2014), forlenges stadig de geografiske avstander for transport av matprodukter, noe som både utfordrer og setter større krav til produktenes holdbarhet (Gálvez *et al.*, 2008; Aung og Chang, 2014). Tiden det tar fra et sjømatprodukt er fanget og klart for salg og de stadig lengre transportavstandene gir gode muligheter for mikrobiell vekst og eventuelle kryssforurensninger fra ulike kilder. Dette er faktorer som gjør det vanskeligere å opprettholde den gode hygieniske kvaliteten som kreves for fisk og sjømat (Gram og Huss, 1996). I tillegg ser man en økende etterspørsel og produksjon av spiseklare matprodukter (Ready-to-eat food) (Gálvez *et al.*, 2008; Anacarso *et al.*, 2014). Produktene er ofte lettprosesserte med kun få barrierer, og en fellesnevner er at de kan konsumeres direkte av konsumenten uten noen form for varmebehandling (Gorris og Tauscher, 1999). Eksempler på slike produkter innenfor sjømat er rakefisk, gravet eller røyket fisk, fiskepållegg, kokte reker, surimi, marinert ansjos og sushi (Pinto *et al.*, 2012; Gambarin *et al.*, 2012; Heir og Langsrud, 2014). Sistnevnte, sushi, består også ofte av rå fisk, eller i en kombinasjon med kokt ris og rå grønnsaker (Muscolino *et al.*, 2014). Sammensetningen av dette produktet gjør det til et glimrende substrat for bakterievekst, og god råvarekvalitet og gjennomgående kjølekjede er derfor spesielt viktig for

å ivareta kvaliteten på slike produkter (Gram og Huss, 1996; Pinto *et al.*, 2012; Muscolino *et al.*, 2014; Hoel *et al.*, 2015).

Sjømat regnes som svært lettbederverlig med forholdsvis kort holdbarhet (Dalgaard, 2000; Gram og Huss, 1996). Fisk er spesielt utsatt når det gjelder mikrobiell ødeleggelse (FAO, 2018), og spesifikke kvalitetsforringende bakterier (SSO) er ofte den dominerende årsaken til forringelse av de fleste produkter (Gram og Dalgaard, 2002). Fisk fra kalde eller tempererte vann er som oftest dominert av Gram-negative, psykrotrofe, psykrofile eller psykrotolerante bakterier, eksempelvis *Pseudomonas spp.*, *Shewanella spp.*, *Aeromonas sp.*, *Photobacterium sp.* men også Gram-positive *Brochothrix thermosphacta* kan forekomme. Bakteriene kan bidra til rask mikrobiell degradering av ferske og lett prosesserte, kjølelagrede fiskeprodukter (Gram og Huss, 1996; Gram og Dalgaard, 2002; Wiernasz *et al.*, 2020; Françoise, 2010; Abel, Rotabakk og Lerfall, 2019; Mamlouk *et al.*, 2012). Arter innenfor slekten *Aeromonas* har fått større oppmerksomhet i den siste tiden grunnet dens hyppige forekomst i matvarer og patogenitet hos både akvatiske organismer og mennesker (Ryder, Iddya og Ababouch, 2014; Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2018; Abd-El-Malek, 2017). Barrierer som lav lagringstemperatur, lite oksygen eller CO₂ i en modifisert atmosfære pakke (MAP) vil ikke nødvendigvis hindre vekst av *Aeromonas*-arter eller CO₂-tolerante bakterier, som *Lactobacillus spp.*, *Photobacterium phosphoreum* og *Brochothrix thermosphacta* (Granum, 2015; Neyts *et al.*, 2000; Sivertsvik, Rosnes og Kleiberg, 2003). Dette er med på å bidra til utfordringer innenfor dagens prosesserings- og konserveringsteknologier (Aung og Chang, 2014), og øker behovet for nye eller forbedrede løsninger for konservering av spiseklare fisk- og sjømatprodukter.

Biokonservering er en innovativ og alternativ strategi for konservering som har fått mye oppmerksomhet, og sees på som en metode som kan møte dagens mattrygghetsstandarder uten at det går på bekostning av næringsverdi eller sensorisk kvalitet (Leroi, 2010; Ghanbari *et al.*, 2013). Biokonservering defineres ifølge Stiles (1996) som en konserveringsmetode som kan gi forlenget holdbarhet og økt mattrygghet på matprodukter ved å bruke deres naturlige eller en kontrollert mikroflora og/eller deres antibakterielle produkter. Melkesyrebakterier er gode kandidater for biokonservering fordi de i tillegg til produksjon av bakteriosiner, produserer antimikrobielle metabolitter som melkesyre, eddiksyre og andre organiske syrer

(Leroi, 2011). I miljø hvor det konkurreres om næringsstoffer vil bakteriosinproduksjon være en stor fordel, da komponentene kan virke inhiberende for andre bakterieslekter (Dykes, 1995). Melkesyrebakterier isolert fra fisk og sjømat fra kalde farvann er ofte ekstra tilpasningsdyktige i forhold til blant annet lave temperaturer, høyere saltkonsentrasjoner og modifiserte atmosfære pakking, noe som gir økt potensiale for bruk i biokonservering (Ghanbari *et al.*, 2013). Bakteriene er også kjent for sin viktige rolle i produksjonsprosesser som fermentering innenfor både melk- og kjøttindustri, og mange ansees derfor som trygge å bruke i matproduksjon, hvor flere arter har fått statusen GRAS (Generally Recognized As Safe) av US Food and Drug Administration. Sett bort fra kjente fermenteringsprosesser er utnyttelsen av melkesyrebakterier i produkter av fisk fortsatt relativt liten, og behovet for mer forskning på dette området er derfor nødvendig.

Hensikten med denne studien var å analysere melkesyrebakterier fra spiseklar sjømat for deres egnethet som kandidater i biokonservering av fisk. I den forbindelse ble 100 melkesyrebakterier, isolert fra sushi, røyket- og gravet laks, analysert for deres vekstegenskaper ved 15°C, og et utvalg screenet for antimikrobiell effekt mot forringelsesbakteriene *Aeromonas salmonicida* og *Brochothrix thermosphacta*. I siste fase ble melkesyrebakterienes evne til å vokse i vakuumpakket pre-rigor laks ved 4°C evaluert ved karakterisering av vekstkinetikk og sensoriske vurdering.

2 Teoretisk bakgrunn

2.1 Forringelse av sjømat

Forringelse karakteriseres som enhver forandring av sensorisk verdi, som gjør matproduktet uakseptabelt for konsumenten. Slike forandringer kan være fysiske skader, kjemiske forandringer (oksidering eller fargeendring) eller uønsket lukt eller smak grunnet mikrobiell vekst og metabolisme i produktet (Gram *et al.*, 2002).

Forringelsesprosesser i et matprodukt er gjerne komplekst, men den vanligste årsaken er ofte grunnet mikrobiell aktivitet, som fører til at mengder med mat går tapt selv med dagens konserveringsteknologier (Gram *et al.*, 2002; Sivertsvik, Jeksrud og Rosnes, 2002). Fisk og sjømat betegnes som lettbederlige produkter med forholdvis kort holdbarhet (Gram og Huss, 1996) Dette har sammenheng med at fiskekjøttet har en forholdvis høy pH *post-mortem* og et høyt innhold av frie aminosyrer, i tillegg til trimetylaminoksid (TMAO) (Dalgaard, 2000), og høy vannaktivitet (a_w) (Sivertsvik, Jeksrud og Rosnes, 2002). Hovedårsaken til forringelse av fisk og sjømat er som regel forårsaket av mikrobiell vekst, men enzymatiske prosesser og oksidasjon av fettfraksjoner i fisk kan også bidra til uønskede sensoriske forandringer (Sivertsvik, Jeksrud og Rosnes, 2002).

Hos levende eller helt fersk og usløyd fisk ansees fiskemuskelene som steril (Mukundan, Antony og Nair, 1986). Etter at fisken er blitt avlivet vil oksygentilførselen til cellene stoppe opp og energilageret tømmes ved nedbrytning av glukose. Nedbrytningsprosessene fører til muskelsammentrekninger og fisken ender opp *rigor mortis*. Den første lagringstiden av fersk fisk vil derfor bestå av autolytiske prosesser, som vil kunne påvirke konsistensen og smaken. Slutten av lagringsforløpet vil derimot være påvirket av bakteriell vekst, der det skjer spalting av TMAO og produksjon av andre metabolitter som aminosyrer, organiske syrer (Huss, 1988). Dette fører til illeluktende stoffer, slim og misfarging, og produktet vil ansees som uakseptabelt for forbruker (Gram og Huss, 1996). Graden av disse forandringene vil være svært temperaturavhengig, men lave temperaturer ned mot 0 °C vil kunne forsinke

prosessene (Ashie *et al.*, 1996; Sivertsvik, Jeksrud og Rosnes, 2002), og graden av en bakteriell kontaminasjon på et produkt og vekstbetingelser for forringelsesbakterier under lagring, vil ha betydning for den gjenværende holdbarheten til et sjømatprodukt (Dalgaard, 2000).

2.1.1 Spesifikke forringelses organismer

Alle matprodukter består av en egen iboende og karakteristisk mikroflora som vil være tilstede gjennom produktets produksjons- og lagringstid, og floraens sammensetning vil være en funksjon av både det rå materialet, produksjonsprosesser, konservering og lagringsbetingelser (Gram *et al.*, 2002). Fisk kan ofte nå et bakterietall på $10^7 - 10^8$ CFU/g under forringelsesprosesser, men ikke alle bakterier i denne mikrofloraen vil være såkalte aktive forringelsesbakterier (Gram og Huss, 1996). Kun bakterier som har evnen til å produsere metabolitter i høye nok konsentrasjoner, regnes som hovedårsaken til forringelse av et produkt, og dermed blir kalt for spesifikke forringelses bakterier (SSO). I starten av en forringelsesprosess vil det kun være et lavt antall SSO tilstede på fisken (Gram og Huss, 1996). H₂S-produserende bakterier kan være en indikator for å kunne si noe om forringelsespotensialet til en bakterie i et fiskeprodukt (Serio *et al.*, 2014), og en identifikasjon av SSO skjer gjennom å analysere deres evne til å produsere trimetylamin (TMA) og produksjon av H₂S (Gram og Dalgaard, 2002).

Bakteriefloraen som isoleres fra fisk er i stor grad stedsavhengig, og floraen på fiskens ytre (skinn og gjeller) vil ofte samsvare med floraen i fiskens habitat (Cahill, 1990). Fisk fra kalde eller tempererte vann er som oftest dominert av Gram-negative, psykrotrofe, psykrofile eller psykrotolerante bakterier, eksempelvis *Pseudomonas spp.*, *Shewanella spp.*, *Photobacterium sp.* (Gram og Huss, 1996; Gram og Dalgaard, 2002; Wiernasz *et al.*, 2020; Françoise, 2010; Abel, Rotabakk og Lerfall, 2019; Mamlouk *et al.*, 2012), og *Pseudomonas spp.* *Shewanella spp.* regnes som typiske SSO i kjølelageret fisk (Serio *et al.*, 2014). *Shewanella putrefaciens* vil kunne dominere i vakuumpakket fisk, samtidig vil denne pakkemetoden kunne favorisere vekst av CO₂-resistente og psykrotolerante marine bakterier som *Photobacterium phosphoreum* (Gram *et al.*, 2002). Gram-negative bakterier med respirasjon blir derimot ofte hemmet i vakuumpakket fisk, men ved eksempelvis tilsetning av lave NaCl-konsentrasjoner og

syre, sammen med kjølig lagring (eksempelvis som ved kald røyket laks), vil floraen kunne domineres av melkesyrebakterier (*Lactobacillus* og *Carnobacterium*), i tillegg til at *P. phosphoreum* and *psychrotrophic Enterobacteriaceae* kan forekomme (Gram og Dalgaard, 2002). Gram-negative forringelsesbakterier fra familien *Vibrionaceae*, som gjerne oppstår i fisk som er underkøkt eller ikke konservert, kan også utgjøre en trussel. Andre bakteriegrupper som ofte er relatert til forringelse av fisk er *Aeromonas spp.* og *Brochothrix Thermosphacta* (Ryder, Iddya og Ababouch, 2014; Mamlouk *et al.*, 2012; Pin, de Fernando og Ordóñez, 2002; Stohr *et al.*, 2001).

2.2 *Aeromonas salmonicida*

Aeromonas spp. er Gram-negative organismer som tilhører familien Aeromonadaceae og isoleres ofte fra vann, jord og matprodukter (Granum, 2015; Isonhood og Drake, 2002). De er oksidase positiv, glukosefermenterende, fakultativ anaerobe og flere kan bevege seg ved hjelp av polare flageller. Optimal veksttemperatur er beskrevet til å være rundt 28 °C, men mange stammer har egenskapen til å vokse ved temperaturer ned mot 5 °C eller lavere (Isonhood og Drake, 2002). *Aeromonas hydrophilia* er blant den viktigste patogene arten innenfor familien, og er beskrevet til å være hyppig blitt isolert fra blant annet reker og fisk (Granum, 2015; Neyts *et al.*, 2000). Andre arter innenfor *Aeromonas* har vist seg å kunne lett bederve ulike kjølevarer, deriblant kjøtt og fisk (Neyts *et al.*, 2000; Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2019). *Aeromonas salmonicida* og *Aeromonas trota* kan forkomme i MAP-pakket sjømat fra tropiske og varmere vann, hvor de er funnet i høye konsentrasjoner og blitt identifisert som en SSO. *A. salmonicida* virker å kunne tilpasse seg vekst under kjølelagring og normal atmosfære (Jakobsen *et al.*, 2020; Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2018; Provincial *et al.*, 2013) Lav temperatur og ingen eller lite oksygen som barriere vil nødvendigvis ikke kunne hindre vekst av *Aeromonas*-arter (Granum, 2015; Neyts *et al.*, 2000), og flere arter kan utgjøre en mikrobiell risiko i rå og spiseklare sjømatprodukter, spesielt om startkonsentrasjonen allerede er høy (Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2018). Don *et al.* (2018) fant ved en estimert holdbarhetsundersøkelse av reker, at *Aeromonas salmonicida* hadde et stort forringelsespotensial. I en studie av (Jakobsen *et al.*, 2020), ble også *A. salmonicida* vurdert som en potensiell forringelsesbakterie i vakuumpakket laks ved 4 °C.

2.3 *Brochothrix thermosphacta*

Brochothrix thermosphacta er en Gram-positiv, fakultativ anaerob og psykrotrof organisme, og en typisk matferringelsesbakterie som er beskrevet til å være spesielt hyppig i vakuumpakket kjøttprodukter (Kilcher, Loessner og Klumpp, 2010), og kan i tilfeller være den dominerende organismen (Borch og Molin, 1989). *B. thermosphacta* kan forårsake økonomiske tap innenfor matindustrien, på grunn av dens evne til å produsere metabolitter som forårsaker vond lukt, som vil være veldig avhengig av type matprodukt. I kald røkelaks, har stammen vist seg som potensiell produsent av uønskede smaker som blåmuggost (Illikoud *et al.*, 2019). Bakterien er også funnet i kokte MA pakkede reker (Fall *et al.*, 2010; Laursen, Leisner og Dalgaard, 2006). I reker er den kjent for å produsere uønskede-aromaer som smør og karamell, spesielt ved tilførsel av oksygen (Mamlouk *et al.*, 2012) I kjøttprodukter har det blitt funnet at glukose var det substratet som *B. thermosphacta* favoriserte (Russo *et al.*, 2006). Under aerobe forhold kan *B. thermosphacta* produsere bland annet aceton, eddiksyre og 3-metylbutanol (Russo *et al.*, 2006). Det har blitt gjort forsøk på biokonservering av *B. thermosphacta*. *Lactobacillus curvatus* CRL705 er bakteriosinproduserende, og både stammen og bakteriosinet den produserer (lactocin 705 og lactocin AL 750) har vist seg å være effektive inhiberende mot *B. thermosphacta* (Castellano og Vignolo, 2006).

2.4 Biokonservering

Biokonservering er en innovativ teknologi innenfor konservering som kan benyttes for å øke mattryggheten og/eller forlenge holdbarheten til ulike matprodukter gjennom å redusere risikoen for uønsket mikrobiell vekst (Matamoros *et al.*, 2009). I følge (Stiles, 1996) defineres biokonservering som en konserveringsmetode som gir forlenget holdbarhet og økt mattrygghet for matprodukter gjennom å benytte deres naturlige eller kontrollerte mikroflora og/eller deres antibakterielle metabolitter. I prinsippet består det av å eksempelvis inokulere (påføre eller tilsette) et råstoff eller matprodukt utvalgte bakteriestammer for å hemme utvikling av uønskede bakterier (Matamoros *et al.*, 2009), Den beskyttende bakteriekulturen kan i tillegg til å utkonkurrerer uønsket bakterievekst, syntetisere metabolske produkter, deriblant bakteriosiner som har antibakteriell virkning, og bakteriosiner kan derfor også

tilsettes uten selve produksjonsstammen (Stiles, 1996). I miljø hvor det konkurreres om næringsstoffer vil bakteriosinproduksjon være en stor fordel, da de kan virke inhiberende for andre bakterieslekter (Dykes, 1995). Hvordan den konserverende biokulturen eller substansen skal benyttes er viktig å tenke på. I følge Gálvez *et al.* (2014) har det for bakteriosinene nisin, psicocin, divercin og sakacin blitt testet ulike appliseringsmåter, som å mikse kulturen eller substratet med produktets matriks, ved å spraye eller injisere eller ved å påføre det på en plastikkfilm eller coating som har kontakt med produktet (Gálvez *et al.*, 2014). Konseptet biokonservering er fortsatt nytt og heller ikke særlig akseptert enda hos ulike matprodusenter. Det er fortsatt flere utfordringer knyttet til biokonservering, og mye er fortsatt uprøvd innenfor denne teknologien. innenfor flere områder kreves det fortsatt mye forskning før kommersialisering, spesielt innenfor konservering av fisk- og sjømat og spiseklare produkter.

2.5 Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier (MSB) er en mangfoldig gruppe bakterier som defineres som Gram-positive, ikke-sporedannende og katalase-negative bakterier, som produserer melkesyre som hovedprodukt fra karbohydrater ved fermentering (Schleifer *et al.*, 1995; Papadimitriou *et al.*, 2016). De er vanligvis ubevegelige og består både av kokker deriblant *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* og staver som *Lactobacillus*, *Carnobacterium* og *Bifidobacterium* (Vuyst og Vandamme, 1994). MSB er svært komplekse i forhold til næringskrav, og krever både karbohydrater, aminosyrer, peptider, nukleinsyrederivater og vitaminer for optimal vekst (König og Fröhlich, 2017). Flere arter innenfor familien har imidlertid tilpasset seg et bredt spekter av ulike miljøforhold, og mange MSB er både aerotolerante, syretolerante, salttolerante (Papadimitriou *et al.*, 2016).

Melkesyrebakteriers taksonomi har lenge vært diskutert. Det har blitt foreslått at de er en heterogen gruppe bakterier, hvor en universell definisjon kan være vanskelig. Melkesyrebakterier har generelt et lavt G+C-innhold (50 % mol), men har også blitt beskrevet til å nå opptil 57 mol % G+C (Papadimitriou *et al.*, 2016). Nyere genotypiske metoder gjennom 16S rRNA-gen har ført til at melkesyrebakterier hovedsakelig er plassert i ordenen

Lactobacillales i klassen Bacilli av phylum, Firmicutes, men at eksempelvis *Bifidobacterium* ikke lenger tilhører denne gruppen (König og Fröhlich, 2017; Calo-Mata *et al.*, 2008b; Papadimitriou *et al.*, 2016).

Melkesyrebakterier kan være homofermentative, som har melkesyre som hovedprodukt under fermentering av karbohydrater (eksempelvis glukose), og heterofermentative, som i tillegg til melkesyre produserer produkter som etanol og karbondioksid (CO₂), samt andre organiske syrer som eksempelvis eddiksyre (Holzapfel og Wood, 2012; Calo-Mata *et al.*, 2008b). På grunn av denne egenskapen er melkesyrebakterier mye brukt innen næringsmiddelproduksjon av fermenterte produkter som yoghurt, ost, kjøtt- og fiskeprodukter og surkål. Produksjon av melkesyre og eddiksyre resulterer i en pH-synking som ofte gir en konserverende effekt og forlengelse av holdbarheten. Melkesyre er ofte den organiske syren som det dannes mest av. Dette kan være et problem for matindustrien, spesielt ved produksjon av kjøtt, da kun en lav konsentrasjon av den er akseptabel med tanke på sensorisk kvalitet (Lücke, 2000). I tillegg til å ha en viktig konserverende rolle, er de også viktig med tanke på utvikling av organoleptiske kvaliteter som smak, aroma og tekstur i fermenterte produkter (van de Guchte *et al.*, 2002; Stiles, 1996). Melkesyrebakterier er derfor svært viktig i fermenteringsprosesser innenfor både melk- og kjøttindustri, og mange blir sett på som trygge å bruke i mat og har derfor fått statusen GRAS (Generally Recognized As Safe) av US Food and Drug Administration (FDA) (Silva *et al.*, 2002). I tillegg til produksjon av antimikrobielle metabolitter som melkesyre, eddiksyre og andre organiske syrer, produserer melkesyrebakterier også bakteriosiner (se kap. 2.4.1), som gjør de til gode kandidater for biokonservering (Leroi, 2011).

Melkesyrebakterier har blitt isolert fra en rekke ulike matprodukter, deriblant rå fisk og sjømat (Ringø og Holzapfe, 2000; Ringø *et al.*, 2001; Hoel *et al.*, 2015; Dalgaard, 2000; Calo-Mata *et al.*, 2008a). Flere studier har sett på melkesyrebakterier som mulig biokonserverende kultur i sjømatprodukter. Melkesyrebakteriene *Carnobacterium maltaromaticum*, *C. divergens*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc gelidum* og *Lactococcus piscium* har blitt beskrevet til å kunne forhindre vekst av patogener som *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* i ulike

sjømatprodukter (Matamoros *et al.*, 2009) Arter innenfor *Carnobacterium* blitt sett på som potensiell konserverende kultur for å hemme både vekst av forringelsesbakterier og patogene arter, men kan også selv være forringende i kjølelagret fisk og kjøtt (Laursen, Leisner og Dalgaard, 2006). *Lactococcus piscium* er ifølge Fall *et al.* (2010) en lovende stamme for å opprettholde kvaliteten på lettkonserverte sjømatprodukter, da den hadde en 4,1 log CFU/ml reduksjon av *B. thermosphacta* i en co-kultur med rekejuice, og hvor inhiberingen varte i 21 dager. I en annen studie utført av Laursen, Leisner og Dalgaard (2006) kom de frem til at *Carnobacterium maltaromaticum* som beskyttende kultur tilsatt i høy konsentrasjon i kokte, pillede reker i MAP, ikke klarte å redusere veksten av *B. thermosphacta* i stor nok grad, heller ikke utsette sensorisk forringelse. Inhibering av forringelsesbakterier knyttet til blant annet sjømat er forholdsvis sjeldent rapportert i forhold til inhibering av patogener (Fall *et al.*, 2010), noe som gjør det høyst aktuelt å se på biokonservering av forringelsesbakterier.

Det er likevel noen utfordringer knyttet til bruken av melkesyrebakterier. I tillegg til at de er komplekse i forhold til næringskrav, bør det helst benyttes melkesyrebakterier isolert fra samme råstoffkilde som skal konserveres (Pilet og Leroi, 2011; Leroi, 2011). Dette vil kunne gi økt sjanse for vekst og overlevelse av kulturen fordi bakteriene vil være mer tilpasset råstoffets matriks/miljø (Pilet og Leroi, 2011; Leroi, 2011). Flere melkesyrebakterier er også selv forbundet med forringelse, og i noen tilfeller kan de være årsaken til uønsket vondt lukt og smak, samt degradering av tekstur (Pilet og Leroi, 2011).

2.5.1 Bakteriosiner

Bakteriosiner er små peptider eller proteiner som syntetiseres ribosomalt og kalles primære metabolitter, da de blant annet inngår i den primære vekstfasen i metabolismen (Zacharof og Lovitt, 2012). Både Gram-negative og Gram-positive bakterier produserer bakteriosiner, men det er melkesyrebakterier som har fått størst oppmerksomhet rundt bakteriosinproduksjon (Gálvez *et al.*, 2014; Stiles, 1996), blant annet fordi substansene kan benyttes som naturlige konserveringsmidler (Gálvez *et al.*, 2014). Bakteriosiner deles ofte inn i 3 hovedklasser:

- Klasse 1 er modifiserte peptider som inneholder lanthionin (eksempelvis nisin)

- Klasse 2 er ikke-modifiserte peptider uten lanthionin (eksempelvis pediocin)
- Klasse 3 består av store proteiner som er varmelabile (eksempelvis enterolisin)

(Yang *et al.*, 2014)

Det har lenge vært spekulert i begrensningene ved bruk av bakteriosiner og dens antibakterielle aktivitet. De fleste bakteriosiner som produseres av MSB fungerer slik at de i moden eller aktive form har en antibakteriell effekt mot et smalt spekter av nært beslektede bakterier (Stiles, 1996). Dette kan forklare hvorfor det er relativt få studier som viser at bakteriosinproduserende MSB-stammer hemmer Gram-negative bakterier (Chahad *et al.*, 2012). Stevens, K. A. *et al.* (1991) og Li, Montalban-Lopez og Kuipers (2018) forklarer at det ytre membranlaget til de Gram-negative bakteriene er ugjennomtrengelig, og bakteriosiner blokkeres fra å trenge gjennom. På den andre siden er Hanlin *et al.* (1993) positiv til at bakteriosiner alene, men kanskje spesielt i kombinasjon med flere vil kunne ha god effekt mot et bredere spekter av Gram-positive bakterier, både forringende og patogene. Nisin er det bakteriosinet som virker å fungere mot flere arter innenfor Gram-positive bakterier (Stiles, 1996; Li, Montalban-Lopez og Kuipers, 2018).

I den senere tid har det i Anacarso *et al.* (2014) sine funn imidlertid vist seg at inokulering av *Lactobacillus pentosus*, en bakteriosin-produserende stamme, hemmer utviklingen av patogener, deriblant *A. hydrophilia* på fersk laksefilet. Resultatene kan sammenlignes med funnene til (Zhang *et al.*, 2010), hvor pentocin, et bakteriosin isolert fra *L. pentosus*, begrenset veksten av blant annet *Pseudomonas fluorescens* under kjølelagring av svinekjøtt. I studien til (Matamoros *et al.*, 2009) hvor *Leuconostoc gelidum* viste seg å ha inhiberende aktivitet mot målstammene *Lactobacillus farciminis* og *Listeria monocytogenes*, ble det videre funnet at denne aktiviteten stoppet ved tilsats av proteinase K, og kan tyde på at *Leuconostoc gelidum* produserer et bakteriosin-hemmende komponent (Matamoros *et al.*, 2009). Dette kan tyde på at noen bakteriosiner eller bakteriosinproduserende melkesyrebakterier likevel kan benyttes for å hemme Gram-negative bakterier, og at det derfor trengs ytterligere kunnskap om flere bakteriosiner og i hvilken grad de kan benyttes til biokonservering av ulike sjømatprodukter.

2.6 Barriereteknologi

Barriereteknologi er et konsept som brukes når en kombinasjon av eksisterende og/eller nye konserveringsmetoder benyttes i den hensikt å skape en serie av konserverende faktorer (barrierer/hinder), for oppnå en «multitarget» konservering (Gorris og Tauscher, 1999). Dagens kunnskap om mikrobiell vekst i matprodukter og deres prosesser, deriblant interaksjoner mellom bakterier, deres stressreaksjoner og nedbrytningsprosesser, gjør at vi i dag kan benytte ulike metoder eller barrierer for å stoppe eller begrense disse prosessene, og på den måten styre holdbarheten og mattryggheten på en «multitarget» og kontrollert måte (Singh og Shalini, 2016). Konseptet med barriereteknologi har eksistert i mange år gjør det mulig for matprodusenter å produsere trygge, stabile, næringsrike, smakfulle matprodukter på en økonomisk lønnsom måte (Gorris og Tauscher, 1999). Hensikten med barrierene er å gjøre det vanskelig for mikroorganismene å overkomme hver enkelt barriere, slik at produktet kan holdes stabilt gjennom holdbarhetstiden og dermed hindre at produktet blir farlig å spise og/eller går tapt (Gorris og Tauscher, 1999). Eksempler på slike barrierer kan være kontroll av temperatur (høy eller lav), vannaktivitet (a_w), surhet (pH), redokspotensial og konserveringsmidler som for eksempel nitrat, sorbat og sulfitt (Leistner, 2000).

Kvalitetsdegradering under lagring er et kjent problem, som både er relatert til temperatur og lagringstid (Huss, 1988). Dette er to kritiske faktorer som bør avveies, også av forbruker. Fryseteknologi ved lave temperaturer (-30-40 °C) er i utgangspunktet en god lagringspraksis, men med tanke på sensoriske kvaliteter er det ikke alle produkter som egnes for det. Kjølelagring har derimot noen begrensninger, spesielt når det kommer til oksidering av lipider (Secci og Parisi, 2016; Huss, 1988). Dette gjør at flere fiskearter, spesielt fettrike, vil kunne ha en holdbarhetsbegrensning ved kjølelagring, på maks syv dager (Secci og Parisi, 2016). Hoel, Vadstein og Jakobsen (2018) oppdage at lakseprøver i kontakt med surgjort ris, ga et pH-fall i prøvene, og at *Aeromonas salmonicida* viste dårligere bakteriell overlevelse i disse prøvene. Effekten sank imidlertid ved temperaturjusteringer fra 4 °C til 8 °C, noe som belyser viktigheten av gjennomgående god kjølelagring (Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2018). Modifisert atmosfærepakking (MAP) er også en barriere som kan benyttes til å forlenge holdbarheten til fiskeprodukter, men denne pakkemetoden vil også være avhengig av temperatur, fiskeart,

fettinnhold, bakteriekonsentrasjon ved start, gassblanding og forholdet mellom volumet til gassen og produktet (Sivertsvik, Jeksrud og Rosnes, 2002). Sivertsvik, Jeksrud og Rosnes (2002) beskriver videre at selv om MAP er en bedre metode i motsetning til pakking under luft, vil MAP, sammenlignet med vakuumballasje, gi forholdsvis lik holdbarhet. I vakuumpakker, kan for eksempel metabolisme av *B. thermosphacta* gi uønsket lukt grunnet restoksygen (Remenant *et al.*, 2015). *B. thermosphacta* har også evnen til å vokse under anaerobe forhold, men veksten kan reduseres ved pH-verdier under 5,8, noe som gjør at denne bakterier er blitt assosiert med forringelse av kjøttprodukter på et tidlig stadium, da kjøttprodukter gjerne har høyere pH (McClure *et al.*, 1993; Remenant *et al.*, 2015).

En kombinasjon av flere barrierer vil derfor være gunstig for å øke konserveringseffekten, noe som også kan bidra til at intensiteten av den enkelte konserveringsteknikken kan senkes, samtidig som at bakterietallet holdes på et trygt nivå og kvaliteten ivaretas (Gorris og Tauscher, 1999). I den grad kan konkurransedyktige mikroorganismer tilsettes som ekstra barrierer, og eksempelvis melkesyrebakterier kan være aktuelle (Leistner, 2000). Borch og Molin (1989), som i sin studie så på aerob vekst av kulturer med blant annet stammer som *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, fant at alle stammene vokste godt aerobt foruten *Carnobacterium divergens*, noe som også tyder på at melkesyrebakterier kan benyttes i ved pakkemetoder med oksygen til stede. Det er viktig at barrierene justeres til et optimalt nivå som sikrer at produktet er trygt å spise, men også tar hensyn til produktets kvalitet, da for høy eller lav intensitet kan ha en positiv eller negativ effekt avhengig av produkt (Leistner, 2000). Nedkjøling til en for lav temperatur kan eksempelvis gi kjøle- eller frostskafer på et plantebasert produkt, men forlenge holdbarheten om kjøleeffekten justeres til et moderat nivå (Leistner, 2000). I produkter som eksempelvis fermenterte pølser, hvor dannelse av syre er en viktig faktor og barriere, bør den endelige pH i produktet være lav nok til å inhibere patogene bakterier, men ikke så lav at det går på bekostning av produktets smak og aroma (Leistner, 2000; Matamoros *et al.*, 2009). For matindustrien vil det å se på muligheten for flere barrierer i kombinasjon, kunne gi større fleksibilitet innenfor ulike produkter samtidig som at mattryggheten og holdbarhetstiden ivaretas (Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2018).

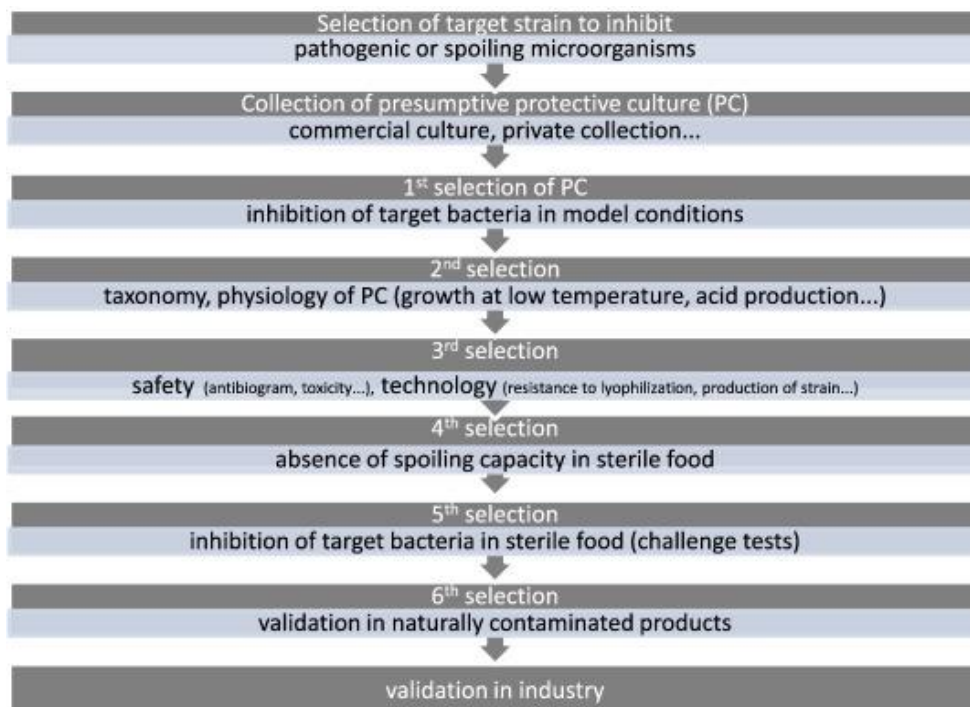
2.7 Ready-to-eat (spiseklare) matprodukter

I tillegg til at konsumenter krever høykvalitetsprodukter som har et mest mulig «naturlig» utseende, og med lite tilsetningsstoffer, vil de også gjerne ha produkter som trenger liten eller ingen tilberedning, før de kan konsumeres. Dette har videre ført til introduksjon av «ready-to-eat» (spiseklare eller spiseferdige) produkter, som er lettvinte og raske matprodukter hvor kun mild konserveringsteknologi er benyttet (Gorris og Tauscher, 1999). I næringsmiddelhygieneforskriften defineres spiseferdige næringsmidler 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» (Næringsmiddelhygieneforskriften, 2008, art. 2 g). For spiseklare produkter er gjennomgående god kjølekjede helt essensielt, da det ofte er den eneste barrieren som bidrar til at produktene er trygge å spise etter produksjon (Gorris og Tauscher, 1999). I en studie av Hoel *et al.* (2015) hvor den mikrobiologisk kvalitet i spiseklar rå sushi ble undersøkt, ble det trukket frem at dårlig temperaturkontroll underveis i kjølekjeden var en viktig årsak til kvalitetstapet av produktet gjennom lagringstiden. I en senere studie, hvor mesofile *Aeromonas salmonicida* ble undersøkt i et eksperimentelt forsøksoppsett (nigiri sushi system) med laks og ris, viste det seg at kjølelagring alene ikke var en god nok barriere for å hemme vekst av mesofile *A. salmonicida* på rå laks (Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2018). Dette er med på å bevise at spiseklare produkter som eksempelvis sushi er svært sensitive når det gjelder temperaturavvik (Hoel *et al.*, 2015; Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2018; Gorris og Tauscher, 1999), og at flere barrierer for å holde produktet trygt og stabilt for forbruker bør muligens vurderes.

2.8 Kriterier og vurderinger før kommersiell bruk av mikroorganismer med antimikrobiell effekt

Selektering av egnede melkesyrebakterier for biokonservering er en lang prosess, og det er flere kriterier som avgjør om en biokonserverende kultur kan være egnet. Derfor må en bakteriene eller kulturen, av eksempelvis melkesyrebakterier, vurderes nøye gjennom flere steg, før selektering (Leroi *et al.*, 2015).

Leroi *et al.* (2015) beskriver i sin studie hvilke kriterier som er viktig før selektering av biokonserverende kultur gjennom 6 ulike trinn (figur 2.1). Etter å ha valgt hvilken målorganisme som man ønsker å inhibere (forringelses - eller patogen organisme), må det samles inn et utvalg av mulig beskyttende isolater. Deretter kan første selektering eller utvelgelse utføres gjennom inhibering av målorganismen i et kontrollert oppsett (trinn 1). Trinn 2 handler om å samle informasjon om taksonomisk og fysiologiske data, som eksempelvis syreproduksjon eller evnen til vekst ved lav temperatur. I tillegg må det selekteres for i forhold til antibiotikaresistans, patogenitet eller produksjon av giftige molekyler, for å forsikre om at kulturen ikke vil utgjøre noen helserisiko (trinn 3). I tillegg må den biokonserverende kulturen vurderes om den vil påvirkes av ulike produksjonsfaktorer som eksempelvis frysetørking. Den aktuelle stammen må også testes i et sterilt matmiljø, for å vurdere dens eventuelle forringelsesevne (trinn 4). Deretter kan antimikrobiell effekt mot uønskede målorganismer kan analyseres, i en co-kultur i et sterilt miljø, eksempelvis fiskejuice (trinn 5). Til slutt, må kulturen eller stammen testes i laboratorieskala i et naturlig kontaminert matprodukt (trinn 6), før eventuell implementering i industriell skala (Leroi *et al.*, 2015).



Figur 2.1 Strategi for selektering av biokonserverende kulturer for å forbedre kvalitet og mattrygghet for matprodukter kilde: figur hentet fra Leroi *et al.* (2015).

En annen faktor å ta hensyn til ved utarbeiding av bakteriedrepende barrierer og prosesser, men også i mikrobiologiske studier, er forskjeller innenfor ulike bakteriestammer (Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2018; Aryani et al., 2015). En viktig kilde til dette er fenotypiske forskjeller blant stammer innenfor samme art (Lianou og Koutsoumanis, 2013). Slike variabler kan utgjøre en forskjell mellom anslått oppførsel til en stamme kontra det som faktisk blir observert (Aryani et al., 2015). Spesielt vil dette kunne påvirke forsøksmodeller innenfor biokonservering ved anvendelse av co-kulturer, og videre risikoestimeringer av matprodukter (Buchanan og Bagi, 1997). Eksempler på dette kan være bakterienes vekstrate i forskjellige miljøer og med ulike påvirkninger kan gjøre stammene stresset. Det vil derfor være aktuelt å teste stammenes stressresponser mot eksempelvis forandringer i pH, saltkonsentrasjon (NaCl) eller temperatur (Lianou og Koutsoumanis, 2013). Lianou og Koutsoumanis (2013) påpeker at dette er noe som bør undersøkes, og tas til etterretning ved ulike forsøksoppsett. Dette kan gi en viss pekepinn på stammens (es) robusthet, noe som er viktig til en eventuell industriell bruk.

3 Material og metode

3.1 Isolater av melkesyrebakterier

I denne studien ble det benyttet 100 isolater av melkesyrebakterier isolert fra sjømat gjennom prosjektet Røkt, gravet og rå – regional sjømatkvalitet (RFFMidt-209055). Stammene er isolert fra sushi (n=44), gravet laks (n=23) og røyket laks (n=33) fra ulike produsenter av spiseklare sjømatprodukter (A-H) (vedlegg 1). Isolatene har vært fryselagret i glycerolmedium i et mikrobanksystem ved minus 80 °C i 5 år. De 100 isolatene ble benyttet i et vekstforsøk ved 15 °C, der hovedmålet var å vurdere deres egnethet mot biokonservering og samle data om vekstegenskaper for standardisering til videre arbeid. Et utvalg på 35 isolater ble videre screenet for veksthemmende egenskaper mot målorganismene *Aeromonas salmonicida* og *Brochothrix thermosphacta*. Av de 35 ble to melkesyrebakterier inokulert i pre-rigor laks i et lagringsforsøk ved 4 °C i totalt 21 dager. Oversikt over stamme-identifikasjon for de 35 melkesyrebakteriene benyttet i brønnplateoppsettet er presentert i tabell 3.2.

3.2 Melkesyrebakterienes vekstegenskaper ved 15 °C

Som en del av screeningen av melkesyrebakterieisolatenes egnethet som biokonserverende kultur i fisk og sjømat, var det ønskelig å undersøke isolatenes vekstegenskaper ved en temperatur lavere enn melkesyrebakterienes optimumstemperatur. Det ble derfor valgt å bruke 15 °C som inkubasjonstemperatur for oppformering av bakteriekulturer, for spektrofotometrisk måling av celletetthet, og senere ved kvantifisering av kimtall (CFU/ml) og screening av hemmende egenskaper mot målorganismene.

De 100 melkesyrebakteriene ble overført fra fryst tilstand til hver sin petriskål med De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar (Oxoid CM0361), ved å aseptisk stryke ut 1 perle fra hvert cryorør (figur 3.1). Platene ble inkubert anaerobt (BD Gaspak Ez 260001) ved 25 °C i 48-72 timer etter metode fra NMKL nr. 140 (2007). Ved behov ble enkelte stammer inkubert lengre (opptil 120 timer). Etter inkubering ble én synlig koloni fra hver petriskål plukket og inokulert aseptisk i hvert sitt sterile Sarstedt rør tilsatt 13 ml MRS-buljong (Oxoid CM0359).

Bakteriesuspensjonen ble blandet og inkubert aerobt ved 15 °C. Måling av optisk tetthet (OD₆₀₀) ble utført to ganger per dag ved et spektrofotometer (Shimadzu UV 1800 Shimadzu, Tyskland). MRS-buljong ble benyttet som referanseløsning ved kalibrering og ved nødvendig fortykning av kulturer. Målingene pågikk til kulturene nådde stasjonærfase etter fire-fem dagers vekst.

3.3 Målorganismer

Aeromonas (A.) salmonicida og *Brochothrix (B.) thermosphacta* ble benyttet som målorganisme (target), for å analysere melkesyrebakterienes inhiberende eller biokonserverende effekt. Begge målorganismene er forringelsesorganismer, som typisk kan oppstå som et resultat av kontaminering som kan bidra til forringelse av sjømatprodukter. I tillegg er begge organismene forholdsvis lite utforsket innenfor konseptet biokonservering. Målorganismene med ID, deres selektive medier og vekstbetingelser er oppført i tabell 3.1. Ved forkultivering av målorganismene ble Brain Heart Infusion (BHI) Agar (Oxoid CM1136) benyttet, ved inkubasjonstemperatur 30-37 °C i 24 timer for *A. salmonicida* og 20 °C 24-48 timer for *B. thermosphacta*.

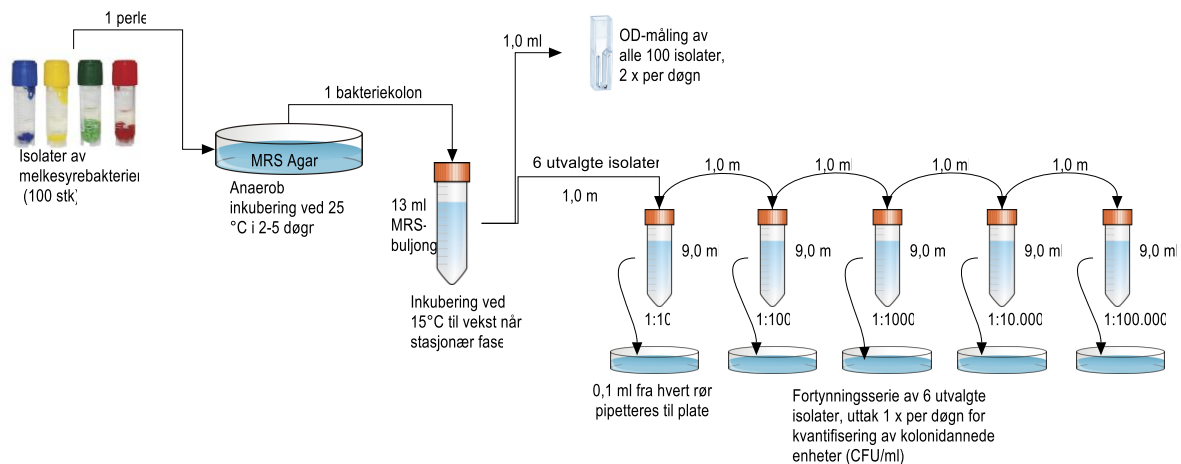
Tabell 3.1 Målorganismer benyttet i oppgaven, ID, medium og deres dyrkningsforhold. * indikerer endret inkubasjonstemperatur for *B. thermosphacta*, valgt på grunnlag av kvantifiseringsproblemer etter mistanke om kontaminert stamme.

	Art og ID	Gram +/-	Selektivt medium	Inkuberingsbetingelser	Referanse
MÅLBAKTERIER	<i>Brochothrix thermosphacta</i> (CCUG 35132)	+	STAA Agar Base (Oxoid CM0881) tilsatt STA Selective Supplement (SR0162E)	20 °C i 48 t 25 °C i 48 timer*	(Oxoid, 2016)
	<i>Aeromonas salmonicida</i> SU2 (Miljø sushi)	-	Stivelses Ampicillin Agar (SAA) tilsatt 10 mg/L agarsubstrat sterilfiltrert ampicillin (Sigma-Aldrich A9393-5G)	37 °C i 24 timer	(NMKL nr. 150, 2004)

3.4 Standardisering av vekst - optisk tetthet (OD) mot kimtall (CFU/ml)

Hensikten med standardiseringen var å finne OD-verdi som tilsvarte ønsket konsentrasjon av melkesyrebakterier og målorganismer i inhiberingsassayet for å sikre et reproducerbart forholdstall mellom organismene i alle forsøk. Ønsket startkonsentrasjon var 10^8 CFU/ml for melkesyrebakteriene og 10^4 CFU/ml for målorganismene (Wiernasz *et al.*, 2017). Standardiseringen ble utarbeidet ved å bruke oppnådde data og beregninger fra OD-måling og kimtall (CFU/ml) til å lage standardkurver. På bakgrunn av antall melkesyrebakterier ble det vurdert som for krevende å standardisere alle 100. Det ble derfor valgt ut 6 isolater, og utvelgelsen ble gjort på bakgrunn av observert vekst, morfologi (kokk- eller stavformet) og opphav.

To isolater fra hver av produktkategoriene, sushi, gravet og røyket laks, henholdsvis isolat nr. 75, 204, 27, 273, 60 og 90, ble dyrket i MRS-buljong ved 15 °C og vekst ble kvantifisert ved standard platespredningsteknikk, parallelt med spektrofotometrisk måling (figur 3.1). Før kvantifisering ble melkesyrebakteriene oppformert på MRS Agar.



Figur 3.1 Flytskjema over kvantifisering av bakteriekultur ved OD_{600} og standard platespredningsteknikk for standardisering av melkesyrebakterienes vekst ved 15 °C, OD mot CFU/ml (figur: egen)

For å få sammenlignbart grunnlag ble det laget to paralleller for hver av de 6 isolatene. 0,1 ml fra hver parallell ble strøket ut på MRS Agar og inkubert anaerobt ved 25 °C i 72-120 timer. Bakterietelling ble foretatt etter 48 timer og ved 72-120 timer. Uttak til kvantifisering av kimtall ble gjort én gang per døgn, og frem til stagnering av vekst. Grunnet avvikende resultat for to av isolatene (nr. 75 og 90), ble resultatene fra kun 4 isolater benyttet videre.

OD-målinger (y-verdier) ble plottet inn i et linjediagram mot tilhørende kimtallsberegninger (CFU/ml) (x-verdier) for det gitte tidspunktet. Ligningen ($Y = Ax + B$) for trendlinjer i eksponentiell fase for de fire isolatene ble løst for ønsket konsentrasjon (X) på $5,0 \times 10^8$ CFU/ml, som ga en gjennomsnittlig OD-verdi $\pm 10\%$ avvik. Kvantifisering ved OD₆₀₀ og kimtall (CFU/ml) av melkesyrebakterieisolatene ble gjort i samarbeid med to andre medstudenter (Astrid Lillebjerka og Kristina Olsen).

På grunn av for dårlig datagrunnlag ble ikke veksten til målorganismene *A. salmonicida* og *B. thermosphacta* standardisert. For standardisert konsentrasjon ble det isteden benyttet empiriske formler for konvertering av OD₆₀₀ til CFU/ml. Denne kalkulatoren er etablert av Labtools (u.å.) og gir en konsentrasjon på $8,0 \times 10^7$ CFU/ml ved OD₆₀₀ 0,1. For å oppnå $8,0 \times 10^4$ CFU/ml ble bakteriesuspensjonen fortynnet 1:1000 før videre bruk.

3.5 Utvelgelse av melkesyrebakterier til screening

Av 92 melkesyrebakterier, ble 35 av valgt ut for videre screening etter inhiberende egenskaper mot målorganismene *A. salmonicida* og *B. thermosphacta* (tabell 3.2). Utvelgelsen ble gjort på bakgrunn av tidligere oppnådde resultater fra upublisert materiale av Ph.d. stipendiat Jelena Stupar og publisert masteroppgave av Lillebjerka (2019), hvor flere av de 35 utvalgte isolatene viste gode hemmende egenskaper mot blant annet *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* og *Escherichia coli*. 34 av 35 isolater ble identifisert av (Lillebjerka, 2019) (grå utheving) og (Olsen, 2020) (ingen utheving) under deres masteroppgavearbeid (tabell 3.2). Resultatet fra identifikasjonen indikerte at 16 isolater tilhører slekten *Carnobacterium*, 15 *Leuconostoc*, og 3 *Weissella*.

Tabell 3.2 Melkesyrebakterier benyttet under screening etter inhiberende egenskaper mot målorganismene *A. salmonicida* og *B. thermosphacta*. Stammene ble identifisert av (Lillebjerka, 2019) (grå utheving) og Olsen (2020) (ingen utheving) under deres masteroppgavearbeid med samme tema, med en identifikasjonsprosent fra 99,6-100 %. Uidentifiserte stammer er markert med (-). Stjerne (*) viser til en mulig, ikke konstatert, artsidentifikasjon. Understrekede isolater (nr. 406 og 328) ble valgt ut til inokulering av pre-rigor laksefilet.

Stamme-ID	Bakteriestamme	Arts-ID*	Kilde
MELKESYREBAKTERIER			
6	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>gallinarum</i>	Røyket laks
13	<i>Carnobacterium</i>	<i>maltaromaticum</i>	Røyket laks
21	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>divergens</i>	Røyket laks
42	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>maltaromaticum</i>	Røyket laks
55	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>gallinarum</i>	Røyket laks
159	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>gallinarum</i>	Røyket laks
384	<i>Carnobacterium</i> sp.	-	Røyket laks
30	<i>Carnobacterium</i>	<i>maltaromaticum</i>	Gravet laks
35	<i>Carnobacterium</i>	<i>maltaromaticum</i>	Gravet laks
105	<i>Leuconostoc</i> sp	<i>citreum</i>	Gravet laks
227	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>gallinarum</i>	Gravet laks
273	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>divergens</i>	Gravet laks
312	<i>Weissella</i>	<i>hellenica</i>	Gravet laks
63	<i>Leuconostoc</i> sp	<i>lactis</i>	Sushi
67	<i>Leuconostoc</i> sp	<i>lactis</i>	Sushi
68	<i>Leuconostoc</i> sp	<i>mesenteroides</i>	Sushi
88	<i>Leuconostoc</i> sp.	<i>gelidum</i>	Sushi
126	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>	Sushi
151	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	Sushi
152	<i>Leuconostoc</i>	<i>gelidum</i>	Sushi
153	<i>Carnobacterium</i> sp.	-	Sushi
292	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactis</i>	Sushi
298	<i>Leuconostoc</i>	<i>laktis</i>	Sushi
299	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	Sushi
316	<i>Carnobacterium</i>	<i>maltaromaticum</i>	Sushi
327	<i>Weissella</i>	<i>viridescens</i>	Sushi
328	<i>Weissella</i>	<i>viridescens</i>	Sushi
340	<i>Leuconostoc</i>	<i>citreum</i>	Sushi
346	-	-	Sushi
358	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>	Sushi
406	<i>Leuconostoc</i>	<i>gelidum</i>	Sushi
455	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>	Sushi
461	<i>Carnobacterium</i>	<i>gallinarum</i>	Sushi
466	<i>Carnobacterium</i> sp.	-	Sushi
468	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>divergens</i>	Sushi

3.6 Test av selektive medier for melkesyrebakterier og målorganismer

Før screening etter inhiberende egenskaper ble alle melkesyrebakterier forsøkt dyrket opp på målorganismenes selektive medier (tabell 3.1). Hensikten var å avdekke melkesyrebakterienes evne til å vokse på mediene, og for å eventuelt differensiere mellom melkesyrebakterier og målorganismer som dyrkes i co-kultur under screeningen. For å sikre at mediene også ga optimale vekstforhold for den aktuelle målorganismen, ble *A. salmonicida* og *B. thermosphacta* dyrket på sine respektive selektive medier, og veksten sammenlignet med vekst på BHI Agar. Metoden for kvantifisering av bakterier under screeningen («plate-spotting») ble også utprøvd, for å finne ut om kvantifisering av mikrokoloniene innenfor hver enkelt spott var mulig på de ulike mediene.

3.7 Fremstilling av fiskejuice

For fremstilling av steril fiskejuice ble det tatt utgangspunkt i metode beskrevet av Wiernasz *et al.* (2017), med enkelte modifikasjoner nevnt nedenfor. 500 gram Atlaterhavslaks (*salmo salar* L.) av typen Salma® (belly- og backloins) ble delt opp og mikset sammen med 1 liter destillert vann i en blender (Robot coupe Blixer 6.V.V.). Blandingen ble deretter kokt i 2 minutter, og først filtrert gjennom et vanlig dørslag før filtrering gjennom et foldefilter (Schleicher & Schuell Ref. No. 311 647) (figur 3.2). Den filtrerte fiskejuicen ble sterilisert i Scottflasker (500 ml) ved 100 °C i 30 minutter. Sterile fiskejuice ble så overført til i sterile 150 ml begre med lokk (Deltalab 409726) og lagret ved minus 42 °C.



Figur 3.2 Fremstilling av steril fiskejuice som substrat til screening av melkesyrebakterier mot målorganismer. Fra venstre mot høyre: koking av laksemasse, filtrering av kokt masse, ferdige filtrert fiskejuice (foto: Kristina Olssen)

Før videre bruk ble fiskejuicen tint i kjøleskap (4°C), og tilsatt 10 ml fosfatbuffer, bestående av 50:50 av 1 M K₂HPO₄ (Merck 1051011000) og 1 M KH₂PO₄ (Merck 1048731000) målt til pH 6,7, 1 g D-glukose (Merck 1.08342.1000) og 1,5 g NaCl (VWR 27810295). Den berikede fiskejuicen ble sterilfiltrert gjennom et 0,45 µm cellulose acetat sprøytefilter (VWR 514-0063) og oppbevart ved 4 °C.

3.8 Screening av melkesyrebakterier – inhiberingsforsøk i co-kultur med målorganismer

35 melkesyrebakterieisolater ble screenet etter inhiberende egenskaper mot målorganismene *A. salmonicida* og *B. thermosphacta*. For oppdyrking ble de 35 utvalgte isolatene overført til MRS Agar og målorganismene på BHI Agar, og inkubert ved sine respektive inkubasjonsbetingelser som beskrevet tidligere. For å sikre gode vekstvilkår i kulturen, ble positive skåler podet om til nye agarplater og inkubert på nytt, før 1 koloni fra hver ble overført til MRS- og BHI-buljong for henholdsvis melkesyrebakterier og målorganismer. Rørene ble inkubert ved 15 °C til ønsket OD-verdi på 0,22 for melkesyrebakterier og 0,1 for målorganismer var oppnådd. Suspensjoner med OD-verdier høyere enn overnevnte ble fortynnet (i MRS- eller BHI-buljong) og målt på nytt før bruk.

Kultivering av co-kulturen ble utført i en 96-brønns mikroplate (VWR 732-2719) etter metoden beskrevet av Wiernasz *et al.* (2017) (figur 3.3). Brønner med co-kultur ble tilsatt 196 µl beriket fiskejuice, 2 µl av både fortynnet suspensjon av melkesyrebakterie og målorganisme, som ga et totalvolum på 200 µl per brønn (figur 3.3). Det ble også inkludert positiv- og negativkontroller, henholdsvis brønner enten tilsatt suspensjon av melkesyrebakterie eller målorganisme (target) og brønner med kun beriket fiskejuice (200 µl). For brønner med kun målorganisme, ble samme mengde fiskejuice (196 µl) tilsatt, men i tillegg til fortynnet suspensjon av målorganisme ble 2 µl ren MRS-buljong tilsatt. Dette for å oppnå likt forhold i pH og volum i brønnene. For melkesyrebakterie alene, ble 2 µl ren BHI-buljong tilsatt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Fiske-juice	Target 196 µl FJ + 2 µl Target + 2 µl MRS	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	
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	

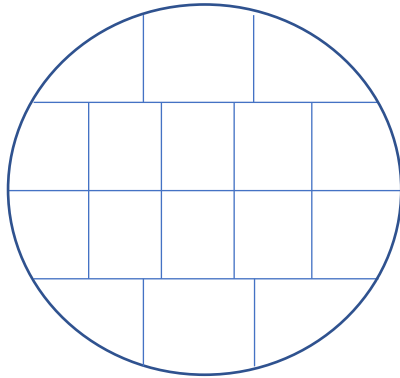
Figur 3.3 Brønnplateoppsett i 96-brønns mikroplate for screening av melkesyrebakterier (LAB) med positiv- og negativkontroller. Oppsettet er laget slik at det kan screene 8 ulike melkesyrebakterier à 4 paralleller (A-D og E-H) og 1 målorganisme (Target) per plate. (figur: egen)

- Kolonne 1 og 11 ble tilsatt 200 µl beriket fiskejuice (FJ) (negativkontroll)
- Kolonne 2 ble tilsatt kun suspensjon av målorganisme i 196 µl fiskejuice og 2 µl ren MRS-buljong (positivkontroll)
- 3, 5, 7, 9 ble tilsatt kun suspensjon av melkesyrebakterie i 196 µl fiskejuice og 2 µl ren BHI-buljong (positivkontroller)
- 4, 6, 8, 10 ble tilsatt 196 µl fiskejuice + co-kultur med 2 µl målorganisme + 2 µl LAB suspensjon

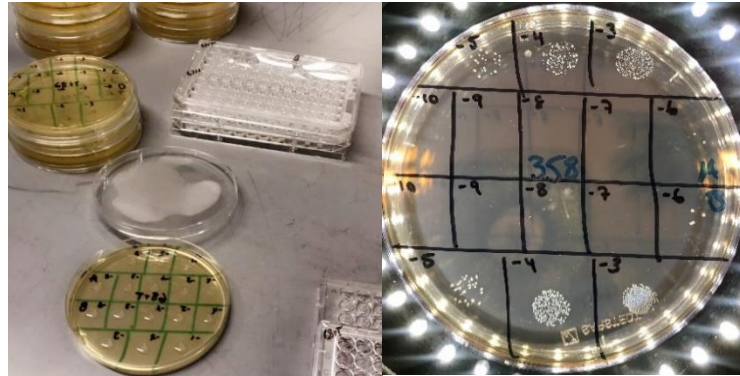
Hver prøve hadde 4 paralleller, tilsvarende en halv kolonne i brønnplaten. Brønnplateoppsettet (figur 3.3). Det totale volumet for hver enkelt brønn gjør at det skjer ytterligere en 100x fortytning, og startkonsentrasjon for kulturen blir 10^6 CFU/ml for melkesyrebakteriene og 10^2 CFU/ml for målbakteriene. Brønnplatene ble inkubert ved 15 °C i 96 timer. Både før og etter endt inkubering, ble OD₆₀₀ i brønnplatene målt ved et BioTek PowerWave XS Microplate spektrofotometer (BioTek, USA).

Etter 96 timer ved 15 °C ble produktet av kulturen fortynt i en 10-folds fortytningsserie med peptonvann (Pepton Oxoid LP0034 + 8,5 g/L NaCl) i en 96-brønns mikroplate (10 µl produkt i 90 µl peptonvann) for kvantifisering av kimtall etter vekst i co-kultur. Fortyninger ble gjort ved hjelp av en elektronisk multipipette (VWR 613-5421). Isteden for vanlig platespredningsteknikk ble fortytningene spottet ved metoden Serial dilution spotting («plate spotting»), en metode som muliggjør flere prøver eller paralleller på samme agarplate, og dermed sparer både tid og kostander forbundet med utstyr. Agarplaten deles inn i soner (figur

3.4), slik at for eksempel rader (horisontalt) kan representere ulike bakterieisolater eller paralleller og kolonner fortynningsgrader (figur 3.5).



Figur 3.4 Inndeling av petriskåler for "plate-spotting" (figur: eget)



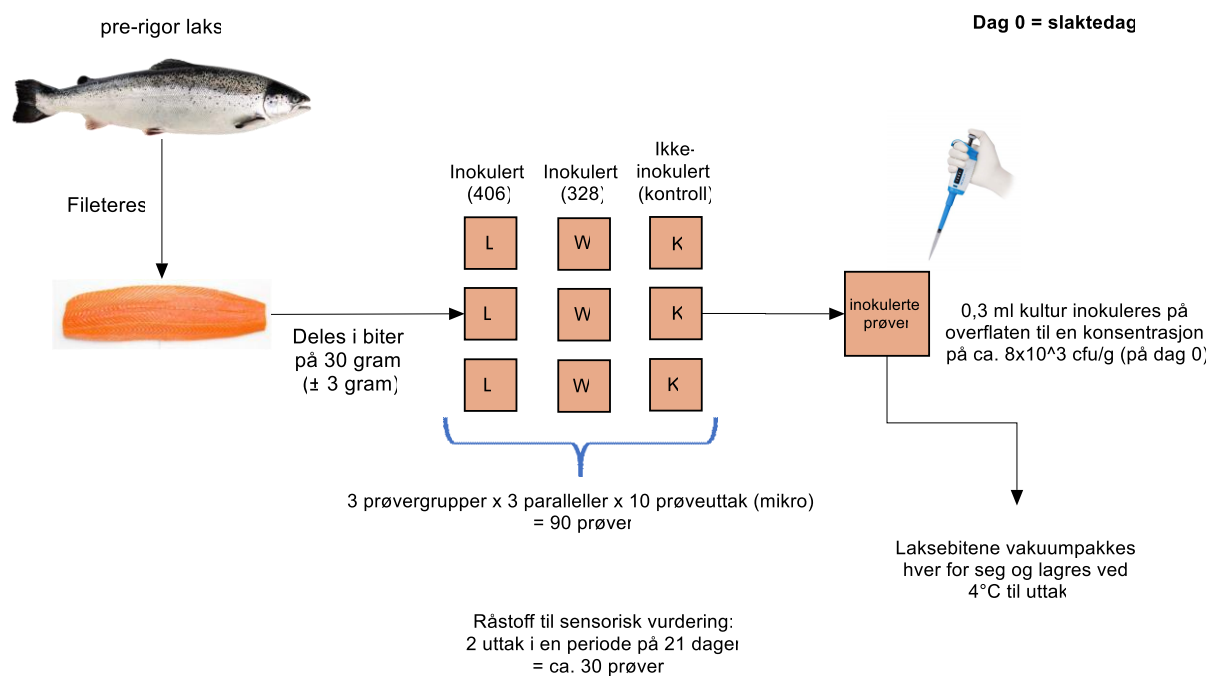
Figur 3.5 Til venstre plate-spotting av fortynnet co-kultur (*B. thermosphacta* + stamme nr. 68), 5 μ l per spott på STAA Agar fra -1 til -8. Til høyre plate av isolat nr. 358 på MRS Agar inkubert ved 25 °C i 48 timer. (foto: eget)

5 μ l av hver fortynning (co-kultur) ble spottet (figur 3.5) på selektivt agarmedium for den aktuelle målorganismen (SAA for *A. salmonicida* og STAA Agar for *B. thermosphacta*), og inkubert ved sine respektive inkubasjonsbetingelser (tabell 3.1). Positivkontroll med kun målorganisme ble spottet både på selektivt medium og BHI Agar, og positiv kontroll med kun melkesyrebakterie på MRS Agar (25 °C i 48-120 timer) (figur 3.5). Kvantifisering av både co-kultur og ren kultur ble gjort for å få sammenlignbare resultater av kolonidannede enheter, og grunnlag for å undersøke effekten av inhiberingen. Negativkontroll (kun fiskejuice) ble spottet på BHI Agar og inkubert ved 30 °C i 24-48 timer. Alle petriskåler med medium ble på forhånd tørket i et tørkeskap ved 30 °C i minimum 1 time før bakteriesuspensjoner ble spottet. Dette ble gjort for at spottende skulle tørke raskt inn og ikke flyte utover, og dermed lettere skille spottene fra hverandre på platen og få korrekt telling. Størrelsen på mikrokoloniene i hver spott kan variere ut ifra type agarmedium, tørketid og organisme som dyrkes fram, som igjen vil kunne påvirke hvor mange kolonier per spott som kan telles (Thomas *et al.*, 2015). I dette screeningassayet ble spotter med over 50 kolonier ansett som overgrodd (Wiernasz *et al.*, 2017). Etter inkuberingsperioden ble alle kolonier telt og gjennomsnitt av kintall for paralleller regnet ut.

3.9 Inokuleringsforsøk av pre-rigor laks med utvalgte melkesyrebakterier

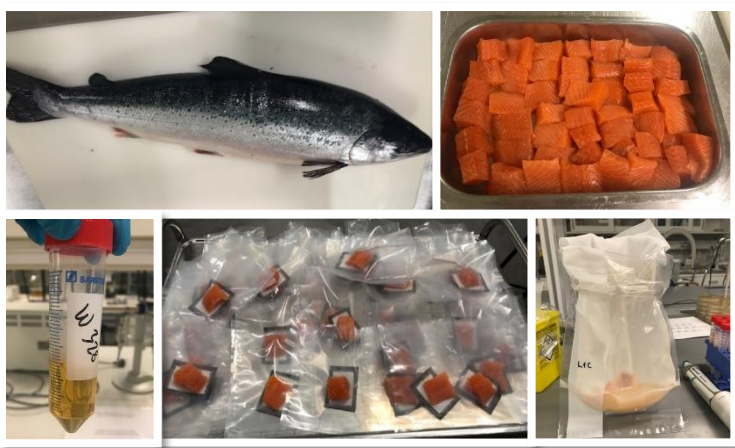
På bakgrunn av inhiberingsegenskapene mot målorganismene *A. salmonicida* og *B. thermosphacta* ble to isolater, nr. 406 fra slekten *Leuconostoc* og nr. 328 fra *Weissella*, valgt ut for inokuleringsforsøk i pre-rigor laksefilet.

Hel laks (pre-rigor) ble bestilt og hentet hos Lerøy Midt (Jøsnøya, Hitra) og transportert til Trondheim på is. For å eliminere mest mulig bakgrunnsflora var det viktig at fisken var helt fersk og videre prosessering ble gjort innen 24 timer. Den hele laksen ble filetert og delt opp i totalt 120 fiskebiter à 30 gram (± 3 gram) på slaktedagen (dag 0), som illustrert i figur 3.6. Det ble fordelt 90 biter til mikrobiologisk kvantifisering og pH og 30 biter til sensorisk vurdering. Alt av utstyr (skjærebrett, kniver, bakker etc.) og overflater ble desinfisert før bruk. For å unngå for mye mørkt fiskekjøtt og fiskebein i prøvene ble hovedsakelig fiskens backloin benyttet.



Figur 3.6 Flytskjema over dag 0 for inokuleringsforsøk av pre-rigor laksefilet inokulert med *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328) til en konsentrasjon på 8×10^3 CFU/g, vakuumpakket og lagret ved 4 °C (± 1 °C) (figur: egen).

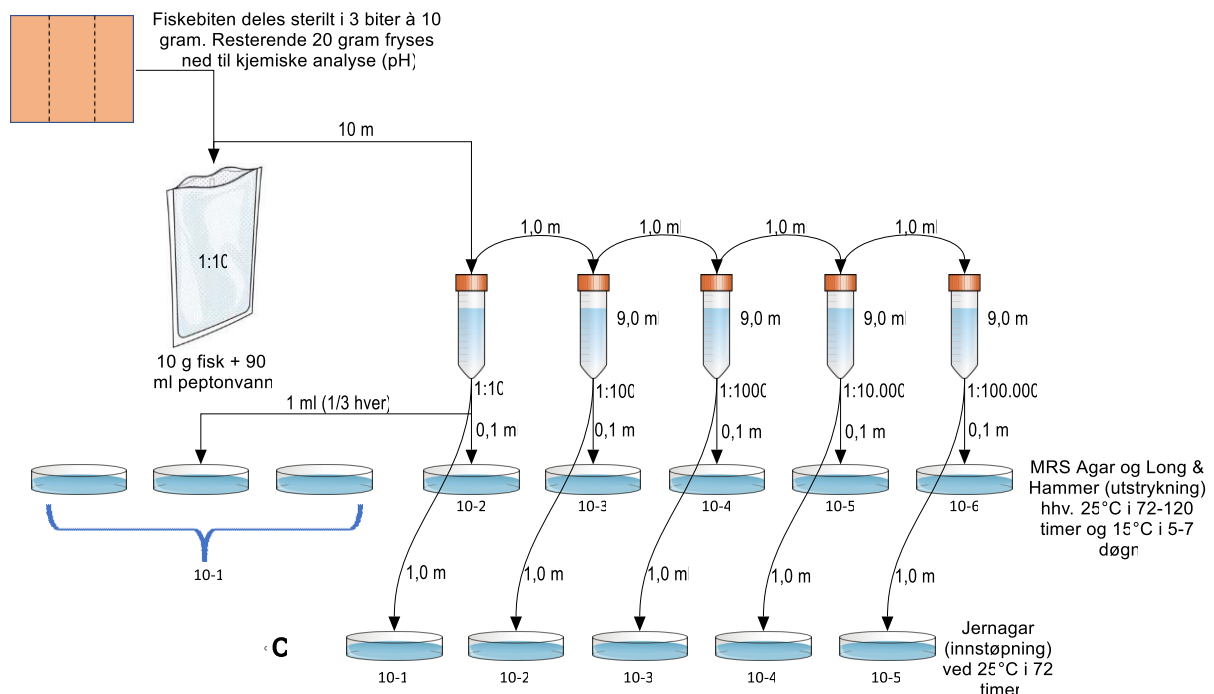
Fiskebitene ble randomisert fordelt på tre prøvegrupper, en ikke-inokulert gruppe (kontrollprøver) og to inokulerte prøvegrupper inokulert med isolat nr. 406 (L) og 328 (W) (figur 6), og plassert på hver sin absorbent. To av prøvegruppene ble deretter inokulert med hver sin bakteriekultur (isolat nr. 406 eller 328) ved å pipettere 0,3 ml på overflaten til hver enkelt fiskebit (30 gram) (figur 3.6). Ved hjelp av sterile utstryksspatler i plast ble inokulumet jevnt fordelt på den synlige overflaten av fiskebiten og lufttørket i ca. 20 min. Alle ikke-inokulerte- (kontroll) og inokulerte fiskebiter ble så pakket i hver sin vakuumpose (merket K for kontroll, L for 406 og W for 328) og vakuumert (figur 3.7) i en vakuummaskin (Webomatic, Tyskland). Prøvene ble inkubert ved $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ i totalt 21 dager.



Figur 3.7 Foto fra inokuleringsforsøk av pre-rigor laks, fra øverst til venstre til nederst mot høyre, pre-rigor laks (dag 0), oppdelte fiskebiter (à 30 gram) før inokulering, kultur til inokulering (Weissella), vakuuerte fiskeprøver til inkubering og homogenisert fiskeprøve (10^{-1}) fra uttak til kvantifisering.

Kulturer (nr. 406 og 328) til inokulering av laksebitene ble dyrket opp anaerobt på MRS Agar ved $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 72 timer, deretter ble ca. 1 koloni overført til hvert sitt sterile Sarstedt rør tilsatt MRS-buljong (15 ml). Det var ønskelig å bruke kuldeadapterte kulturer for inokulering av fiskeprøvene og rørene ble derfor inkubert ved $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ca. 2 døgn). Etter inkubering ble OD_{600} målt og bakteriekulturene fortynnet med MRS-buljong ned til $\text{OD}_{600} = 0,1$, som er tilsvarende en celledensitet på ca. 8×10^7 celler/ml (Labtools, u.å.). De to kulturene ble videre fortynnet 1:1000 i rør, og 0,3 ml av kulturen ble tilsatt fiskebitene (à 30 g) for å oppnå ønsket konsentrasjon i inokulerte biter på ca. 8×10^3 CFU/g (figur 3.6).

Det ble foretatt 9 prøveuttak til mikrobiell kvantifisering i en periode på totalt 21 dager, med 2-3 dager mellom hvert uttak og første uttak på dag 1. Til dette ble 3 prøver fra hver prøvegruppe tatt ut. 10 gram fra hver fiskebit (à 30 gram) ble aseptisk skåret av, med sterilisert skalpell, og overført til stomacherpose, som illustrert i figur 3.7 og 3.8. Ved åpning av vakuumposer, ble det gjort en egen vurdering/observasjon av lukt og utseende for alle prøvene. Resterende 20 gram fra hver prøve ble fryst ned til kjemisk analyse. 90 gram peptonvann ble deretter fylt i stomacherposen, til en 1:10 fortynning. Prøvene ble homogenisert i 1 minutt (IUL Masticator, Spania) og 10 ml overført til sterile Sarstedt fortynnings rør (10^{-1}), for fortynninger i serier og videre platespredning.



Figur 3.8 Prosedyre ved uttak av prøver til kvantifisering. Prøver ble aseptisk delt og 10 gram fra hver prøve homogenisert, fortynnet og ved platespredningsteknikk overført til sine respektive medier for inkubering. Resterende 20 gram av hver prøve ble fryst ned til pH-analyser.

For kvantifisering av melkesyrebakterier (isolat nr. 406 og 328) og total psykrofil flora ble 0,1 ml strøket utover på henholdsvis MRS Agar (NMKL nr. 140, 2007) og Long & Hammer Agar (NMKL nr. 184, 2006) (figur 3.8). For totalt kimtall og H_2S -produserende bakterier ble 1,0 ml innstøpt på Lyngby's Jernagar (Oxoid CM0964), og inkubert omvendt ved 25 °C i 72 ± 6 timer (NMKL nr. 184, 2006). Jernagar ble tilsatt 10 ml/L sterilfiltrert (filter 0,2 µm) L-cystein oppløsning (4 g/100 ml) (Sigma-Aldrich W326305) før innstøping av prøvemateriale.

Long & Hammer Agar ble tilsatt 2,5 ml/L sterilfiltrert (filter 0,2 µm) Fe (III) NH₄ citrat oppløsning (10 g/100 ml) før støping av agarskåler, og inkubert ved 15 °C i 5-7 døgn. For Jernagar ble svarte- (H₂S-produserende bakterier) og hvite kolonier (aerobt kimtall) telt.

3.9.1 Måling av pH i lakseprøver

Analyse av pH ble gjort av inokulerte og ikke-inokulerte prøver av vakuumpakket fisk under lagring. Til dette ble det valgt å ta med prøver fra dag 1, 7, 14 og 21 lagret ved 4°C. 10 gram fiskeprøve fra hver parallell ble overført til hvert sitt Sarstedt rør (50 ml) og fylt med 20 ml 0,17 M KCl-løsning (Merck 104933), til et 2:1 forhold mellom volum og vekt (Lorentzen *et al.*, 2012). Prøvematerialet ble mikset ved hjelp av en blender (IKA T25 Digital Ultra Turrax) i ca. 50 sekunder til blandingen hadde fått en slurry-aktig og homogen konsistens. Alle prøver (3 paralleller) ble deretter målt med standard pH-meter med elektrode (MeterLab PHM210, København).

3.9.2 Sensorisk vurdering av lukt og utseende

På dag 8 og dag 15 i lagringsforsøket ble det gjennomført en enkel sensorisk vurdering av både utseende og lukt for de ulike prøvene (figur 3.9). Vurderingene ble gjennomført av ansatte ved institutt for bioteknologi og matvitenskap ved NTNU, med ulik grad av erfaring fra sensoriske analyser. 9 ansatte ble invitert til sensorisk vurdering. Alle 9 møtte opp på første vurdering, mens 8 møtte på andre vurdering. Deltakerne hadde ikke fått informasjon om prøvene på forhånd, og prøvene ble servert i tilfeldig rekkefølge, merket med hvert sitt tresifret nummer. Numrene og rekkefølgen på prøvene var ulikt for de to dagene.

Før servering ble prøvene (à 30 gram) romtemperert i ca. 1 time i sine vakuumposer, deretter ble posene åpnet og lakseprøvene plassert i hver sin skål (figur 3.9). For å bevare mest mulig av flyktige luktstoffer, ble prøvene også dekket til. Hver bås i det sensoriske analyserommet fikk 1 brett med 3 prøver hver, sammen med et forklarende svarskjema. Deltakerne fikk

informasjon om å beskrive hver enkelt prøvene fra venstre mot høyre med så mange ord (maks 6) som de klarte for både lukt og utseende.



Figur 3.9 Fra venstre mot høyre henholdsvis serveringsbrett med fiskeprøver (406, 328 og kontroll) og nærbilde av fiskeprøver til sensorisk vurdering av lukt og utseende dag 15.

3.10 Databehandling og statistiske analyser

For inhiberingsassayet ble effekten av inhiberingen (co-kultur) kvantifisert ved å sammenligne kimtall av målorganisme fra co-kultur med kimtall fra monokultur av målorganisme. For å kunne tolke resultatene, ble følgende grenseverdier for inhiberingseffekten valgt:

- < 1,0 log reduksjon = ingen hemmende effekt
- 1,0-3,0 log-reduksjon = noe hemmende effekt
- > 3,0 Log reduksjon = god hemmende effekt

Statistiske analyser ble utført i Statistical Package for the Social Science (SPSS, versjon 25) på log-transformerte kimtall-verdier (CFU/ml). For å finne statistiske forskjeller ble One-way ANOVA (enveis variansanalyse) gjennomført ved Tukey Test ($P < 0,05$). Tosidig uparet t-test ble utført for signifikante forskjeller mellom grupper med like forutsetninger og Pearson's korrelasjons koeffisient (r) for å finne lineære korrelasjoner mellom to variabler. ComBase med applikasjonen DMFit ble benyttet for å estimere parametere for bakterievekst: nølefasens varighet, maksimum veksthastighet per time (μ_{\max}), maksimum log CFU/ml ved stasjonærfase (Y_{\max}) etter Baranyi and Roberts vekstmodell (Baranyi og Roberts, 1994; ComBase, 2020).

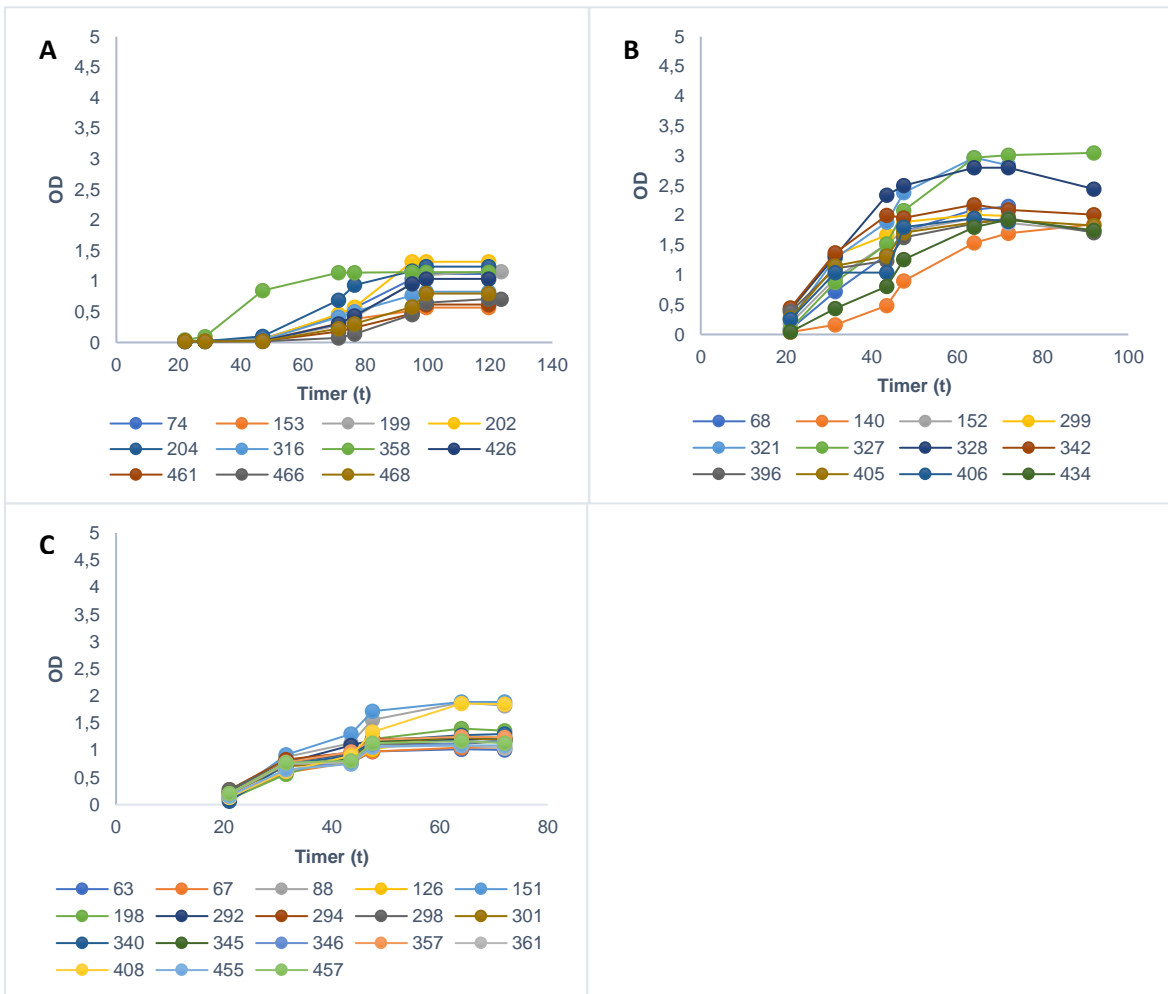
4 Resultat

4.1 Melkesyrebakterienes vekstegenskaper ved 15°C

I dette forsøket skulle vekstegenskaper ved 15°C undersøkes for 100 melkesyrebakterieisolater, der målet var å vurdere deres egnethet mot biokonservering. Temperaturen på 15 °C ble valgt på bakgrunn av ønsket om å undersøke hvordan isolatene vokste ved en temperatur lavere enn optimal veksttemperatur. Åtte isolater ble ekskludert i starten grunnet dårlig eller ingen vekst ved 15 °C, og én (nr. 75) på grunnlag av mistanke om kontaminert isolat (nr. 45, 189 og 194 fra røykelaks, 75, 245, 344 og 452 fra sushi og 248 fra gravlaks). Resterende isolater hadde vekst ved 15 °C. Vekstegenskapene ble derfor undersøkt for totalt 92 bakterieisolater, hvorav 40 var isolert fra sushi (figur 4.1), 30 fra røykelaks (figur 4.2) og 21 fra gravlaks (figur 4.3).

4.1.1 Melkesyrebakterier isolert fra sushi

11 melkesyrebakterier fra sushi hadde lengre lagfase, hvor 9 av de nådde eksponentiell fase etter 47 timer og én (nr. 466) etter rundt 71 timer (figur 4.1 A). De samme 11 isolatene kom i stasjonær fase etter rundt 100 timer, med OD₆₀₀ ved slutt som varierte fra 0,57 (nr. 153) til 1,16 (nr. 199) (figur 4.1 A). Resterende isolater fra samme produkt, foruten tre isolater (nr. 358, 140 og 434) med noe mer nølende start, var i eksponentiell fase allerede etter ca. 21 timer (figur 4.1 A, B og C). De fleste isolater med lengre lagfase (figur 4.1 A) hadde lengre eksponentiell vekstfase med slakere vekstkurve, enn de med kort lagfase. 7 av 12 isolater i figur 4.1 B hadde en slakere vekstkurve etter ca. 48 timer, resterende isolater (nr. 68, 140, 321, 327 og 434) ser ut til å fortsatt være i eksponentiell fase (Figur 4.1 B). Veksten for de 12 isolatene stagnerte mellom 64 og 92 timer, og OD₆₀₀ ved siste måling varierte fra 1,71 (nr. 396) til 3,05 (nr. 327) (figur 4.1 B). Frem til tredje måling var det mindre spredning i OD-verdi mellom de 18 isolater i figur 4.1 C. Etter rundt 48 timer hadde alle, bortsett fra to isolater (nr. 88 og 408) liten eller ingen stigning i OD-verdi. Etter 64 timer var alle 18 isolater i stasjonær fase, og OD₆₀₀ varierte fra 1,01 (nr. 63) til 1,89 (nr. 151) ved siste måling (figur 4.1 C).

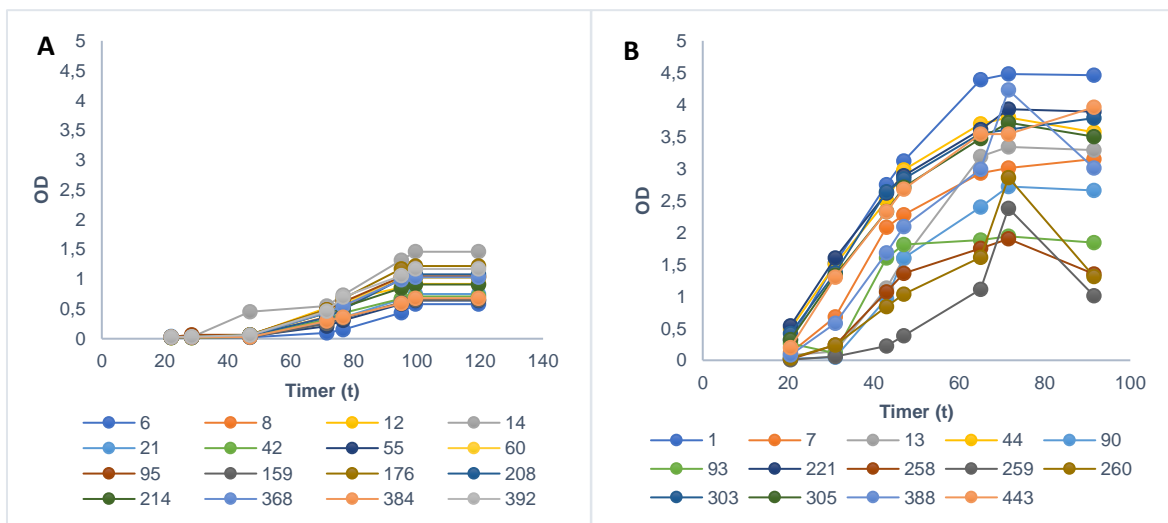


Figur 4.1 Vekstegenskaper ved 15 °C for 41 melkesyre bakterier isolert fra sushi, kvantifisert ved OD_{600} over en periode på totalt 5 døgn frem til stagning av vekst. Isolatene ble dyrket opp i MRS-buljong. Graf A (11 isolater), B (12 isolater) og C (18 isolater).

4.1.2 Melkesyre bakterier isolert fra røykelaks

15 av de 16 melkesyre bakterier isolert fra røykelaks i figur 4.2 A, hadde en lagfase som varte i 47 timer før veksten økte. Disse hadde forholdsvis lik vekstkurve frem til stagning etter 100 timer, med OD-verdi som varierte fra 0,58 (isolat nr. 6) til 1,22 (nr. 176). Isolat nr. 14 hadde en lagfase i underkant av 29 timer, før veksten gikk inn i eksponentiell fase, og endte med den høyeste OD-verdien på 1,46 etter 100 timer (figur 4.2 A).

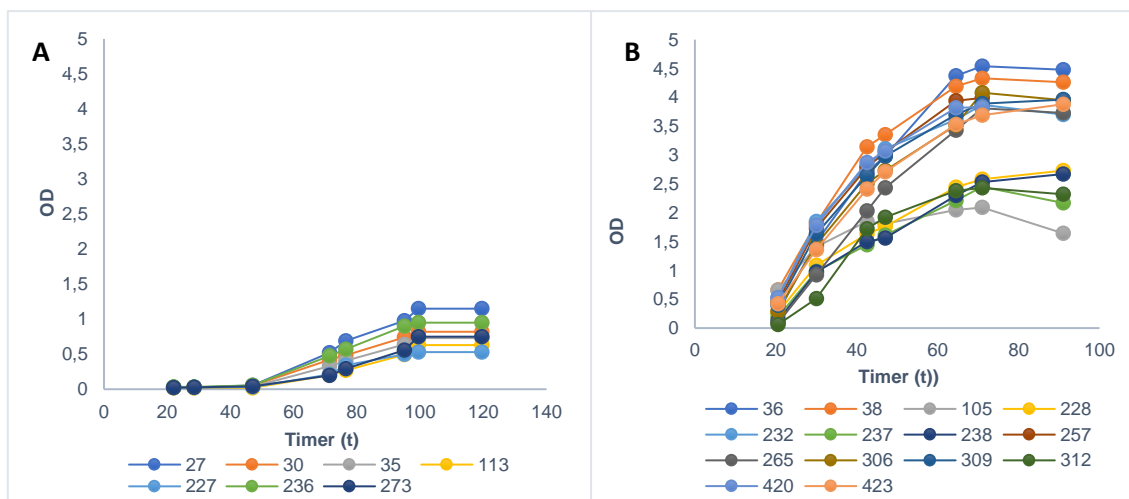
Det var større variasjon i veksten mellom isolatene i figur 4.2 B. En gruppe av isolater (nr. 1, 44, 221, 303, 305 og 443) var allerede i eksponentiell vekstfase etter ca. 20 timer. De samme isolatene hadde en forholdsvis bratt stigningskurve frem til stasjonær fase. Resterende isolater hadde mer nølende vekst i starten, og for isolat nr. 259 varte lagfasen i 43 timer. Alle isolater inntraff stasjonær fase mellom 70 og 90 timer, med unntak av isolat nr. 93 som hadde en avtagende vekst allerede etter 43 timer. OD₆₀₀ ved siste måling varierte fra 1,01 (nr. 259) til 4,46 (nr. 1) (figur 4.2 B)



Figur 4.2 Vekstegenskaper ved 15 °C for 30 melkesyre bakterier isolert fra røykelaks, OD₆₀₀ mot timer, over en periode på 5 døgn frem til stagnert vekst. Isolatene ble dyrket opp i MRS-buljong. Graf A (16 isolater) og B (14 isolater).

4.1.3 Melkesyrebakterier isolert fra gravlaks

Alle 7 isolater fra gravlaks i figur 4.3 A, var i lagfase frem til tredje måling (47 timer), og hadde en jevn og forholdsvis lik vekstkurve frem til veksten stagnerte etter 100 timer. Ved siste måling hadde isolatene OD₆₀₀ fra 0,53 (nr. 227) til 1,15 (nr. 27) (figur 4.3 A). Resterende 14 isolatene fra samme produkt var i eksponentiell fase allerede etter første måling (20 timer) (figur 4.3 B). En gruppe (nr. 36, 38, 232, 257, 265, 306, 420 og 423) hadde bratte vekstkurver, hvor høyeste OD-verdi etter 91 timer var 4,48 (isolat nr. 36). Den andre gruppen (nr. 105, 228, 237, 238 og 312) hadde slakere vekstkurver etter andre måling og frem til veksten stagnerte, med OD₆₀₀ fra 1,65 (nr. 105) til 2,73 (nr. 228) ved siste måling (figur 4.3 B).



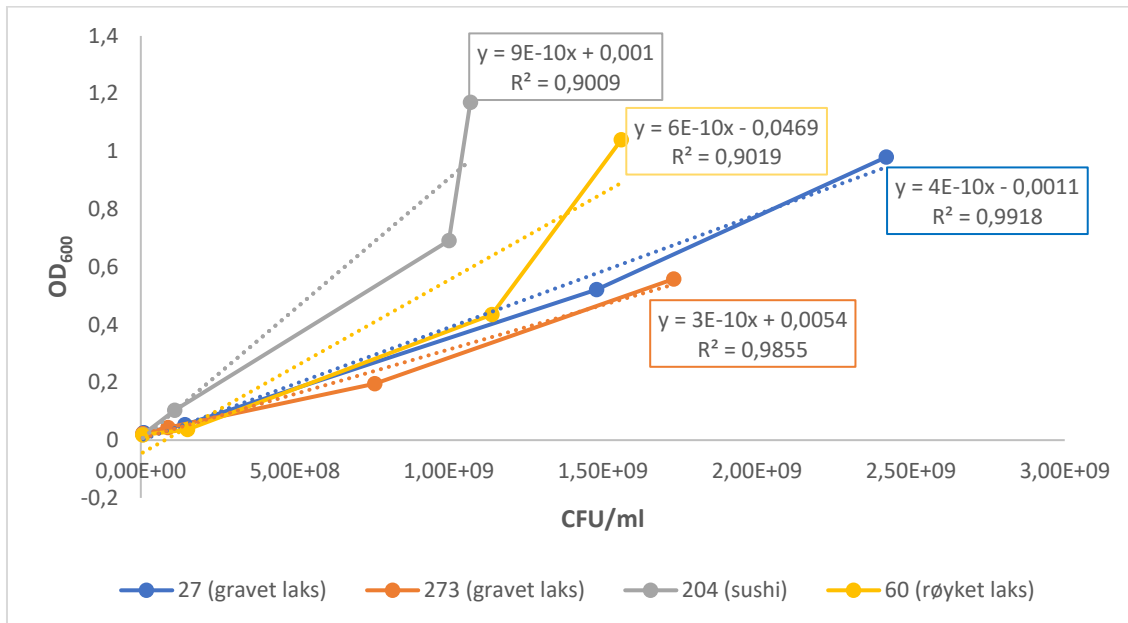
Figur 4.3 Vekstegenskaper ved 15 °C for 21 melkesyre bakterier isolert fra gravlaks, OD₆₀₀ mot timer, over en periode på 5 døgn frem til stagnert vekst. Isolatene ble dyrket opp i MRS-buljong. Graf A (7 isolater) og B (14 isolater).

4.2 Standardisering av OD mot kimtall for utvalgte isolater ved kvantifisering av vekst

Vekstegenskapene ved 15 °C til et utvalg på fire isolater, nr. 27 og 273 (gravlaks), 204 (sushi) og 60 (røykelaks), ble standardisert gjennom kvantifisering av kimtall (CFU/ml) og måling av OD₆₀₀ i en periode på 112 timer. Dette gav to variabler som ble plottet opp mot hverandre i et punktdiagram med linjer, figur 4.4. Vekstkurver for de samme isolatene, hvor OD₆₀₀ er plottet mot tid er fremstilt i vedlegg 2.

Vekstkurvene (OD₆₀₀ mot timer) for de fire utvalgte isolatene var relativt lik, med nølende vekstfase frem til rundt 40 timer, før de gikk inn i eksponentiell fase (vedlegg 2). Isolatene inntraff stasjonær fase et sted mellom 88-92,5 timer, hvor isolat nr. 273 hadde den laveste OD-verdien ved stagnering på 0,75 og isolat nr. 204 hadde den høyeste på 1,24. Standardkurver OD₆₀₀ mot kimtall (CFU/ml) for de utvalgte isolatene (27, 273, 204 og 60) mellom dag 1 og dag 4 inkubert ved 15°C vises i figur 4.4. Samtlige isolater hadde en startkonsentrasjon på mellom 5,36-8,51 x 10⁶ CFU/ml og ved dag 4 varierte kimtallet fra 1,07x 10⁹ (isolat nr. 204) til 2,42x 10⁹ CFU/ml (isolat nr. 27). Gjennomsnittlig OD for de utvalgte isolatene ble beregnet ved å løse ligningen ($Y = Ax + B$) for trendlinjer med $X=5,0 \times 10^8$ (figur 4.4). Dette ga følgende OD-verdier: 0,20, 0,16, 0,45 og 0,25 for henholdsvis

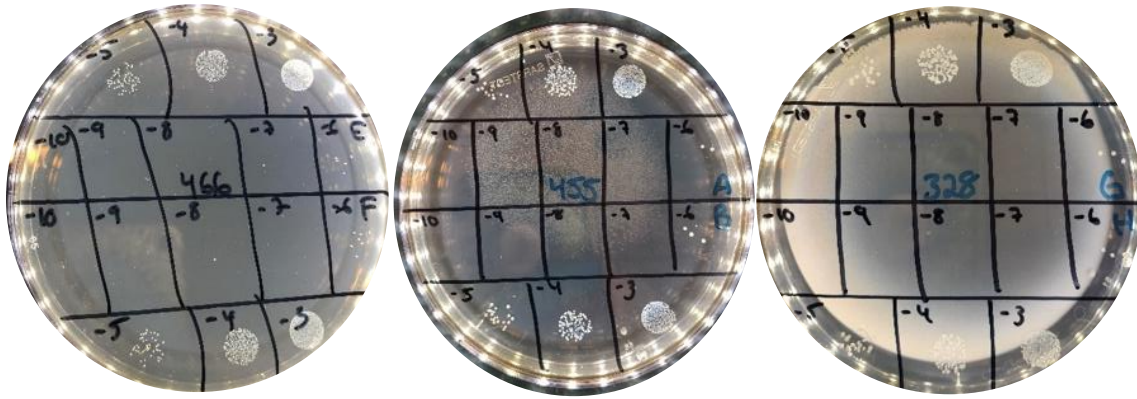
stamme nr. 27, 273, 204 og 60. Gjennomsnittet av disse ga en OD-verdi på $0,26 \pm 0,03$ (10 % valgt avvik).



Figur 4.4 Vekstegenskaper for fire utvalgte melkesyrebakterier (27, 273, 204, 60) ved 15 °C, OD₆₀₀ mot kimtall (CFU/ml) kvantifisert på MRS Agar. Trendlinje og tilhørende ligning for vekst er inkludert for de fire bakteriene.

4.3 Test av selektive medier for melkesyrebakterier og målorganismer

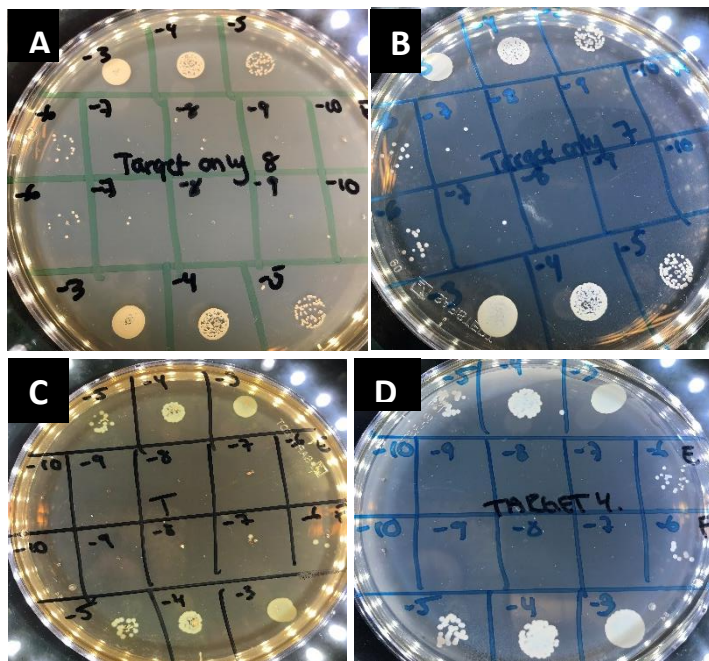
Alle 35 melkesyrebakterieisolater benyttet under screening ble testet på målorganismens selektive medier. Ingen av melkesyrebakteriene vokste på de selektive mediene (SAA og STAA). De selektive mediene anses derfor som egnet for kvantifisering av målorganismen. De fleste melkesyrebakteriene ga tellbare mikrokolonier på MRS Agar etter anaerob inkubasjon ved 25°C i 72 timer (figur 4.5). Noen av isolatene hadde derimot litt svake og små kolonier, og ble derfor inkubert lengre, opptil 120 timer.



Figur 4.5 Melkesyrebakterier ved plate-spotting etter anaerob inkubering ved 25°C i 72-120 timer. Fra venstre mot høyre, isolat nr. 466, 455 og 328 (Foto: eget)

Begge målorganismene, *B. thermosphacta* og *A. salmonicida*, vokste på sine respektive medier ved anbefalte inkuberingsbetingelser for den aktuelle målorganismen (Oxoid, 2016; NMKL nr. 150, 2004). Ved test av «plate-spotting» for *A. salmonicida*, ble det observert forholdsvis store kolonier, som ikke var like avgrenset. Av den grunn, for å sikre tellbare resultater videre under screeningen, ble det valgt å inkubere *A. salmonicida* ved 30°C fremfor 37°C.

Underveis i inhiberingseksperimentet med målorganismen *B. thermosphacta* ble det observert to ulike kolonytyper (noen små noen større av litt ulik farge) ved kvantifisering av både co-kultur og målorganismen i monokultur, noe som ga mistanke om at kulturen var kontaminert. I samme tidsrom ble det observert at organismen ikke vokste like godt ved 20°C i 48 timer. For å forsøke å rendyrke kulturen ble målorganismen isolert, gjennom Gramfarging og katalasetest for verifisering, der katalase- og Gram positive ble tatt med videre og dyrket opp på nye skåler. Etter denne prosessen ble målorganismen vurdert som ren. Inkubering ved 25 °C ble utprøvd under denne perioden, noe som viste seg å gi tydeligere og mer avgrensede kolonier, og dermed mer nøyaktig telling og kvantifisering av målorganismen. Figur 4.6 A-B (*B. thermosphacta*) og C-D (*A. salmonicida*), illustrerer at metoden plate-spotting fungerte godt for begge målorganismene, med avgrensede spotter og tellbare mikrokolonier innenfor hver enkelt spott, etter at inkubasjonstemperatur ble endret.



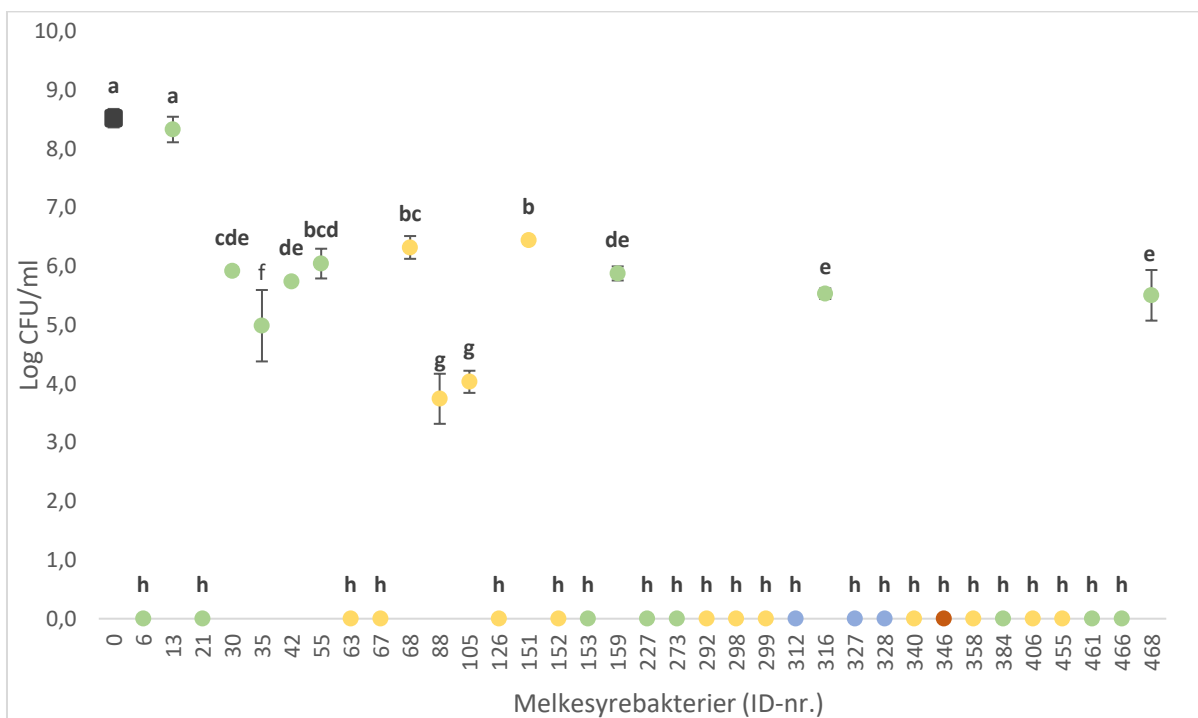
Figur 4.6 Plate-spotting av målorganismer etter inkubering, A og B, *B. thermosphacta* (25°C) på henholdsvis STAA og BHIA, C og D, *A. salmonicida* (30°C) på henholdsvis SAA og BHIA (Foto: eget)

4.4 Screening av melkesyrebakterier etter inhiberende egenskaper mot utvalgte målorganismer

35 melkesyrebakterier ble valgt ut for videre screening etter inhiberende egenskaper mot målorganismene *A. salmonicida* og *B. thermosphacta*, som beskrevet i kapittel 3.5. Utvalget bestod av 16 isolater identifisert som *Carnobacterium* (7 fra røykelaks, 5 fra sushi og 4 fra gravlaks), 15 isolater fra *Leuconostoc* (14 fra sushi og 1 fra gravlaks) og 3 fra *Weissella* (2 fra sushi og 1 fra gravlaks), i tillegg til ett uidentifisert isolat 346 (fra sushi). Punktene i diagrammet representerer hvert enkelt melkesyrebakterieisolat og fargekodene, grønn, gul og blå, henholdsvis isolater identifisert som *Carnobacterium*, *Leuconostoc* og *Weissella*, mens rødt punkt er ikke-identifisert isolat (346) (figur 4.7 og 4.8). Sort firkant representerer målorganismen dyrket alene (monokultur). Signifikans er indikert ved bokstavene (a-h) ($\alpha=0,05$), som vil si at isolater med like bokstav-koder er innenfor samme gruppe og er ikke signifikant forskjellige.

4.4.1 *Aeromonas Salmonicida*

A. salmonicida ble dyrket alene (monokultur) og spottet på selektivt medium (SAA) og BHIA, som en kontroll ved kvantifisering av eventuell inhiberingseffekt av målorganismen i co-kulturen. Oppnådd gjennomsnittlig kimtall av *A. salmonicida* var 8,52 (figur 4.7), og 8,57 log CFU/ml på henholdsvis SAA og BHIA. Resultatene demonstrerer at det ikke var signifikante forskjeller mellom dyrkningsmetodene ($p = 0,21$, tosidig uparet t-test). Alle melkesyrebakterier dyrket i monokultur i fiskejuice ved samme betingelser ga vekst på MRS Agar. Kvantifisering av melkesyrebakteriene ga kimtall fra 7,22 (nr. 312) til 9,99 (nr. 68) log CFU/ml.



Figur 4.7 Inhiberingssassay med 35 utvalgte melkesyrebakterier mot *A. salmonicida* inkubert ved 15°C i 96 timer, kvantifisert SAA. Alle verdier er GJ. Snitt ($n=4$ melkesyrebakterier, $n=8$ målorganisme) av log-transformerte kimtall \pm standardavvik (vertikale stolper). Sort firkant (0) markerer vekst av målorganismen alene på SAA, resterende punkter de enkelte melkesyrebakterier i co-kultur med målorganismen. Isolater identifisert som *Carnobacterium* (grønn), *Leuconostoc* (gul), *Weissella* (blå) og uidentifisert isolat (rød). Bokstavmarkering indikerer signifikante forskjeller eller ikke mellom de ulike isolatene ($\alpha=0,05$).

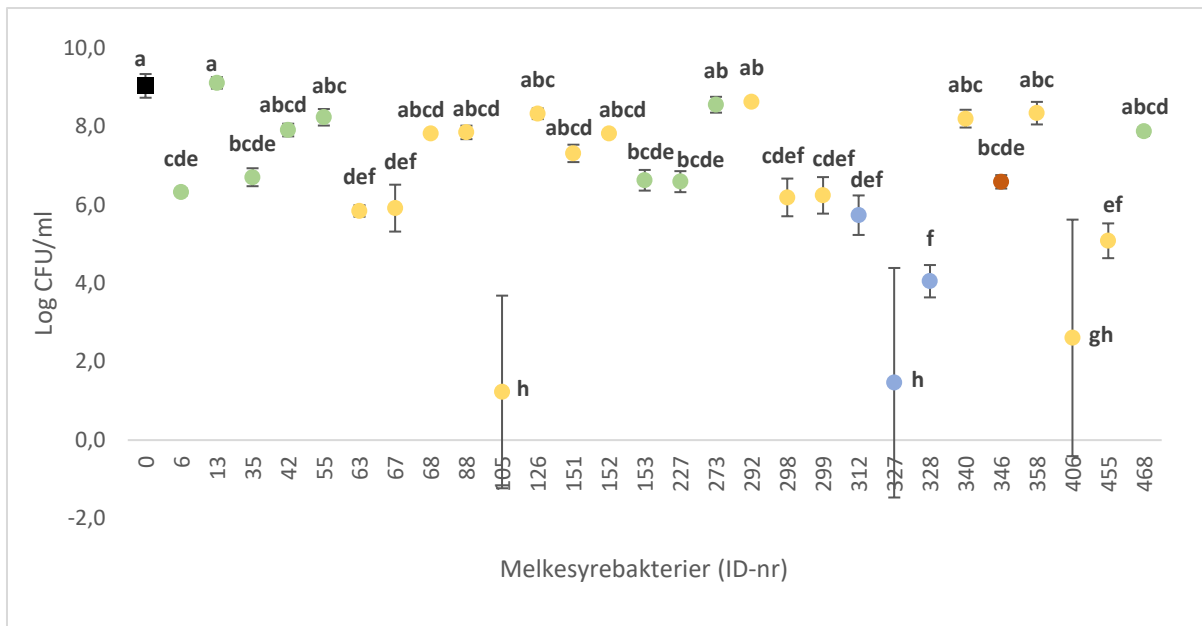
Resultatene fra inhiberingssassayet figur 4.7, illustrerer inhiberingseffekten fra hver enkelt melkesyrebakterie, dyrket i co-kultur med *A. salmonicida* og målorganismen i monokultur (0 = sort firkant) inkubert ved 15°C i 96 timer og kvantifisert på SAA. 23 (merket **h**) av 35

melkesyrebakterier (65,7 %), ga fullstendig hemming av *A. salmonicida*, og er ikke signifikant forskjellig fra hverandre ($p > 0,05$). Av de var 8 isolater fra *Carnobacterium*, 11 fra *Leuconostoc* og 3 fra *Weissella*, i tillegg til uidentifisert isolat nr. 346. Isolat nr. 88 og 105 (*Leuconostoc*) og nr. 35, og 468 (*Carnobacterium*) hadde også god hemmende effekt mot målorganismen, med log-reduksjon på over 3,00 log CFU/ml. Fem isolater (nr. 30, 42, 55, 159 og 316) fra slekten *Carnobacterium* og to (nr. 68 og 151) fra *Leuconostoc* hadde noe hemming, mens isolat nr. 13 ikke var signifikant forskjellig fra kontrollen ($p > 0,05$).

4.4.2 *Brochothrix thermosphacta*

Resultatet fra *B. thermosphacta* dyrket i monokultur og kvantifisert på selektivt- og generelt medium, ga gjennomsnittsverdier på 9,03 og 9,05 log CFU/ml for henholdsvis STAA og BHIA. Resultatene demonstrerer også her at dyrkningsmetodene ikke var signifikant forskjellig fra hverandre ($p = 0,82$, tosidig uparet t-test). Alle melkesyrebakterier benyttet i screening mot *B. thermosphacta*, dyrket i monokultur i fiskejuice ved samme betingelser, hadde vekst på MRS Agar. Kvantifiseringen ga kimtall fra 7,47 (nr. 227) til 9,89 (nr. 105) log CFU/ml for melkesyrebakterier.

28 melkesyrebakterier ble analysert for Inhiberingseffekt mot *B. thermosphacta* (figur 4.8). Av 28 var det 2 isolater nr. 105 (*Leuconostoc*) og 327 (*Weissella*) som utmerket seg ved inhibering av *B. thermosphacta*, med log-reduksjon på over 7,50 log CFU/ml (84-86 %), og er ikke signifikant forskjellige ($p > 0,05$). 6 andre isolater hadde også over 3 log reduksjon mot målorganismen, hvor av to (nr. 328 og 312) var fra slekten *Weissella* og resterende tre (nr. 63, 67, 406 og 455) fra *Leuconostoc*. Av de resterende melkesyrebakterier screenet mot målorganismen, hadde 13 isolater mellom 1,0-3,0 log reduksjon og 7 isolater ingen eller lavere enn 1,0 log reduksjon.



Figur 4.8 Inhiberingssesay med 35 utvalgte melkesyrebakterier mot *B. thermosphacta* inkubert ved 15°C i 96 timer, kvantifisert STAA. Alle verdier er GJ. Snitt ($n=4$ melkesyrebakterier, $n=8$ målorganisme) av log-transformerte kimtall \pm standardavvik (vertikale stolper). Sort firkant markerer vekst av målorganismen alene på STAA (0=kontroll), resterende punkter de enkelte melkesyrebakterier i co-kultur med målorganismen. Isolater identifisert som *Carnobacterium* (grønn), *Leuconostoc* (gul), *Weissella* (blå) og uidentifisert isolat (rød). Bokstavmarkering indikerer signifikante forskjeller eller ikke mellom de ulike isolatene ($\alpha=0,05$).

4.4.3 Melkesyrebakterienes samlet inhiberingseffekt mot målorganismene

Oversikt over samlet melkesyrebakterienes inhiberingseffekt mot målorganismene *A. salmonicida* og *B. thermosphacta* er oppstilt i tabell 4.1. Hensikten var å se om det var forskjeller i inhiberingsgrad mot gram-negative (*A. salmonicida*) eller gram-positive (*B. thermosphacta*) og mellom slektene for de ulike melkesyrebakterier. Vekstreduksjonen (log-transformerte kimtall) for de ulike målorganismene er fargekodet etter grad av inhibering, hvor rød farge indikerer ingen inhibering (<1,0 log reduksjon), gul noe inhiberende effekt (1,0-3,0 log reduksjon) og grønn god inhiberende effekt (>3,0 log reduksjon).

Totalt hadde 27 av 35 melkesyrebakterier (77%) god inhiberende effekt (> 3,0 log reduksjon) mot gram-negative (*A. salmonicida*) og 8 mot gram-positive (*B. thermosphacta*), med en log reduksjon på mellom 3,11-8,52 log CFU/ml. De 8 isolatene med god hemmende effekt mot *B. thermosphacta* hadde også god inhiberingseffekt mot *A. salmonicida*, dermed hadde disse en hemmende effekt mot både gram-positive og gram-negative. Alle slektene (*Carnobacterium*, *Leuconostoc* og *Weissella*) var representert blant de som viste god inhiberingseffekt (> 3,0 log reduksjon). To isolater fra slekten *Weissella* (nr. 327 og 328) og to fra *Leuconostoc* (nr. 105 og

406) hadde minimum 4,49 log CFU/ml reduksjon for begge målorganismene, og er ut fra aktuelle resultater lovende kandidater for biokonservering av fisk- og sjømat.

Tabell 4.1 Log reduksjon av målorganismene *A. salmonicida* og *B. thermosphacta* fra screening av 35 utvalgte melkesyrebakterier fra slektene *Carnobacterium*, *Leuconostoc* og *Weissella*. Verdiene er log-transformerte kimtall (CFU/ml) og er gjennomsnitt av leddene n=8 (målorganisme alene) og n=4 for kvantifisert co-kultur fra samme brønnplate. Fargene representerer valgte grenseverdier og indikerer: god hemmende effekt (grønn), noe hemmende effekt (gul) og < 1,0 = ingen hemmende effekt (rød).

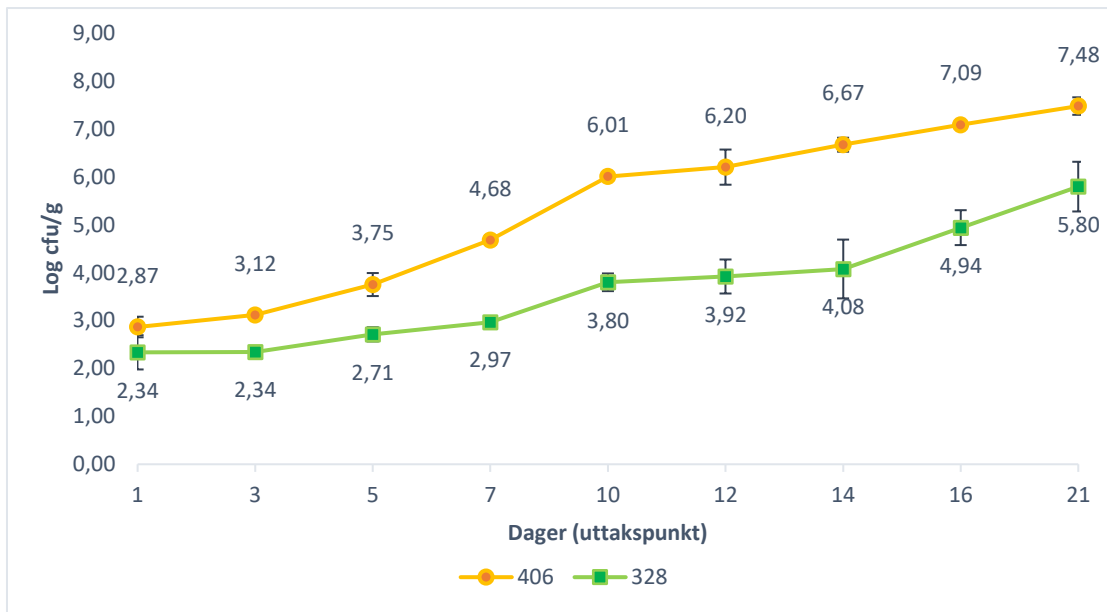
ID-nr.	Bakterieslekt		Log reduksjon (CFU/ml)	
			<i>A. salmonicida</i>	<i>B. thermosphacta</i>
13	<i>Carnobacterium</i>	<i>maltaromaticum</i>	< 1,0	< 1,0
63	<i>Leuconostoc</i> sp	<i>lactis</i>	8,52	3,19
67	<i>Leuconostoc</i> sp	<i>lactis</i>	8,52	3,11
68	<i>Leuconostoc</i> sp	<i>mesenteroides</i>	2,20	1,22
88	<i>Leuconostoc</i> sp.	<i>gelidum</i>	5,71	1,18
105	<i>Leuconostoc</i> sp	<i>citreum</i>	4,49	7,80
126	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>	8,52	< 1,0
151	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	2,08	1,72
152	<i>Leuconostoc</i>	<i>gelidum</i>	8,52	1,22
292	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactis</i>	8,52	< 1,0
298	<i>Leuconostoc</i>	<i>laktis</i>	8,52	2,84
299	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	8,52	2,79
327	<i>Weissella</i>	<i>viridenscens</i>	8,52	7,57
328	<i>Weissella</i>	<i>viridenscens</i>	8,52	4,98
340	<i>Leuconostoc</i>	<i>citreum</i>	8,52	< 1,0
346	-	-	8,52	2,45
358	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>	8,52	< 1,0
406	<i>Leuconostoc</i>	<i>gelidum</i>	8,52	6,42
455	<i>Leuconostoc</i>	<i>lactis</i>	8,52	3,95
6	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>gallinarum</i>	8,52	2,70
153	<i>Carnobacterium</i> sp.	-	8,52	2,41
55	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>gallinarum</i>	2,62	< 1,0
42	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>maltaromaticum</i>	2,79	1,13
35	<i>Carnobacterium</i>	<i>maltaromaticum</i>	3,73	2,33
312	<i>Weissella</i>	<i>hellenica</i>	8,52	3,30
273	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>divergens</i>	8,52	< 1,0
227	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>gallinarum</i>	8,52	2,44
468	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>divergens</i>	3,27	1,16
21	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>divergens</i>	8,52	
30	<i>Carnobacterium</i>	<i>maltaromaticum</i>	2,63	
159	<i>Carnobacterium</i> sp.	<i>gallinarum</i>	2,66	
316	<i>Carnobacterium</i>	<i>maltaromaticum</i>	2,97	
384	<i>Carnobacterium</i> sp.	-	8,52	
461	<i>Carnobacterium</i>	<i>gallinarum</i>	8,52	
466	<i>Carnobacterium</i> sp.	-	8,52	

4.5 Inokuleringsforsøk av pre-rigor laks med utvalgte melkesyrebakterier

Isolat nr. 406 fra slekten *Leuconostoc* og nr. 328 fra slekten *Weissella* ble valgt ut til inokuleringsforsøk av pre-rigor laks, basert på grad av inhibering (log vekstreduksjon) mot de aktuelle målorganismene (tabell 4.1 kap. 4.4.3). Et kriterium var også at to slekter ble representert. Forsøksoppsettet bestod av vakuumpakket pre-rigor laks, hvorav én gruppe ikke-inokulerte prøver og to grupper, inokulert med hver sin stamme 406 eller 328. Alle prøver ble inkubert ved lav temperatur (4°C) og analysert for mikrobiell vekst ved 9 uttak i en periode på 21 dager.

4.5.1 Kvantifisering av melkesyrebakterier i laks

Resultatene fra kvantifisering av melkesyrebakterier demonstrerte at både *Leuconostoc* (isolat nr. 406) og *Weissella* (isolat nr. 328) var i stand til å vokse på overflaten av pre-rigor laks inkubert ved 4 °C ± 1 (figur 4.9). Melkesyrebakterier ble ikke detektert i løpet av lagringsperioden for ikke-inokulerte prøver, bortsett fra ved siste uttak, hvor det ble registrert vekst i to paralleller (1,59 log CFU/g), og er derfor ikke illustrert i figur 4.9. Konsentrasjonen ved start (dag 1) ble detektert til 2,87 ± 0,22 log CFU/g og 2,34 ± 0,36 log CFU/g for henholdsvis prøver inokulert med *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328). Antall melkesyrebakterier var høyere for prøver inokulert med *Leuconostoc* enn de med *Weissella* gjennom hele lagringsperioden. Begge gruppene har en eksponentiell vekst med forholdsvis slak vekstkurve som etter 21 dager ved 4 °C hadde kimtall på 7,48 ± 0,18 og 5,80 ± 0,52 log CFU/g for henholdsvis prøver inokulert med *Leuconostoc* og *Weissella*.



Figur 4.9 Vekst av melkesyrebakterier kvantifisert på MRS Agar fra inokuleringsforsøk av pre-rigor laks med *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328), vakuumpakket og lagret ved 4°C i 21 dager. Verdiene er presentert som log CFU/g ± standardfeil (usikkerhetsstolper) og er gjennomsnitt av n=3.

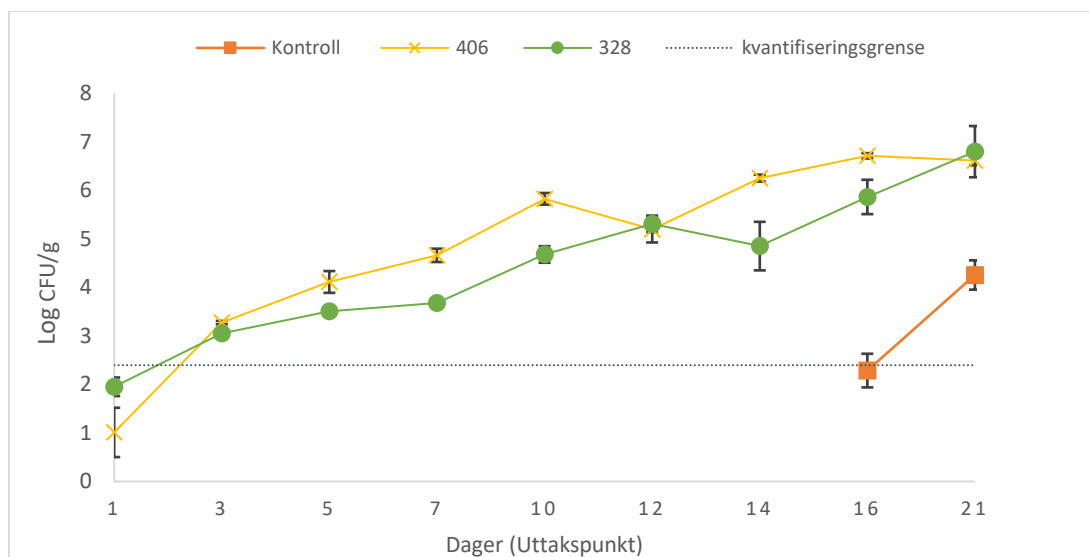
Vekstkinetikk for *Leuconostoc* og *Weissella* i vakuumpakket laks ved 4 °C, ble estimert etter primær modell av Baranyi og Roberts (1994) (tabell 4.2). Estimert viste at *Leuconostoc* hadde kortere lagfase på rundt 2 ± 1,1 dager mot nesten 4 dager ± 1,3 for *Weissella*, og at maksimum veksthastighet for *Leuconostoc* var nesten 1,8x høyere enn for *Weissella* i vakuumpakket laks ved 4 °C. R² (0,98) indikerer at dataene passer godt til modellen.

Tabell 4.2 Vekstkinetikk-parametere for melkesyrebakterier inokulert i pre-rigor laks ved 4°C estimert fra primær modell av Baranyi and Roberts. Maks veksthastighet (μ_{max} 1/dag), varighet av lagfase (dag), maksvekst (Y_{max} log cfu/ml). R² er basert på modellens tilpasning og SE standardfeil av R². NA=ingen asymptote

Pakking	Temp (°C)	Prøve	μ_{max} (1/dag)	Lag phase (dag)	Y_{max} (log CFU/g)	R ²	SE
Vakuum	4	406	0,362 ± 0,04	2,09 ± 1,1	7,34 ± 0,21	0,98	0,24
		328	0,203 ± 0,02	3,71 ± 1,3	NA	0,98	0,18

4.5.2 Kvantifisering av kimtall og hydrogensulfidproduserende bakterier i laks

Vekstkurvene for totalt aerobe bakterier (totalkim) kvantifisert på Jernagar er illustrert i figur 4.10. I kontrollprøver ble totalkim kun detektert over kvantifiseringsgrense (2.40 log CFU/g) etter dag 16, noe som tilsier at råstoffet (*pre-rigor* laks) var av høy mikrobiell kvalitet, uten særlig bakgrunnsflora. For inokulerte lakseprøver ble totalkim detektert under kvantifiseringsgrensen på dag 1. Frem til dag 10 var det en gradvis eksponentiell kimtallsøkning, og på dag 12 hadde inokulerte prøver tilnærmet lik konsentrasjon på rundt 5 log CFU/g. Ved siste uttak (dag 21) var kimtallsverdier på $4,26 \pm 0,30$ log CFU/g for kontrollprøven og $6,62 \pm 0,10$ og $6,80 \pm 0,53$ log CFU/g for henholdsvis prøver inokulert med *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328).

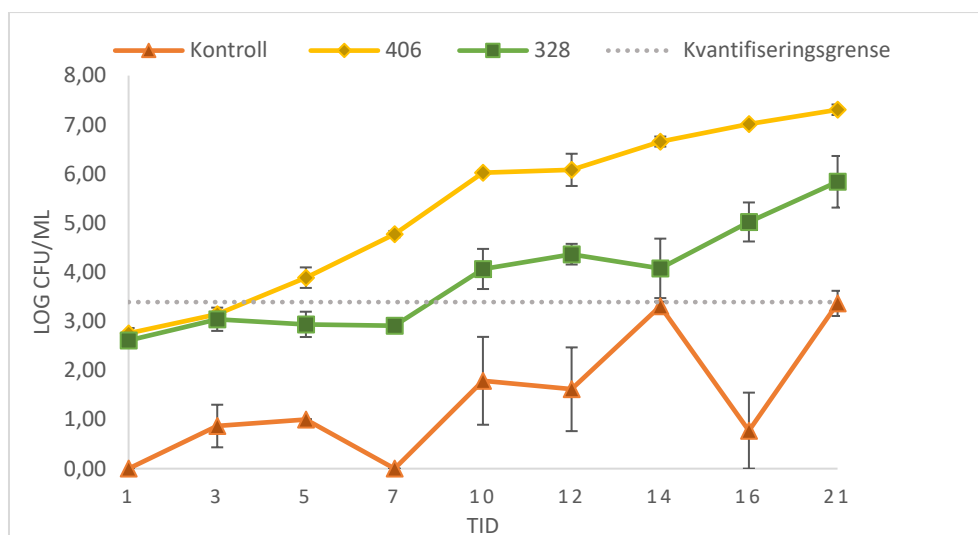


Figur 4.10 Totalt aerobe bakterier (svarte og hvite kolonier på Jernagar) i ikke-inokulerte prøver (kontroll) og inokulerte prøver (*Leuconostoc* nr. 406 og *Weissella* nr. 328) av laks lagret ved 4°C i 21 dager. Data er log-transformerte kimtall (CFU/g) av gjennomsnitt $n=3 \pm$ standardfeil. Horisontal stiplede linje indikerer kvantifiseringsgrensen (2,40 log CFU/g).

H₂S-produserende bakterier ble kvantifisert ved svarte kolonier på Jernagar. Deteksjonen av H₂S-produserende bakterier var sporadiske gjennom lagringsforsøket for de ulike prøvegruppene, der det ofte kun ble observert vekst på én av tre paralleller, og var under kvantifiseringsgrensen for kontrollprøver og inokulerte prøver gjennom hele lagringsperioden, unntatt ved dag 21 hvor inokulerte prøver hadde 2,67 og 3,11 log CFU/g for henholdsvis *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328).

4.5.3 Kvantifisering av aerobe kimtall og psykrofil flora i laks

Startkonsentrasjonen for psykrofilt aerobt kimtall var $2,75 \pm 0,11$ log CFU/g for *Leuconostoc* (nr. 406) og $2,61 \pm 0,12$ log CFU/g for *Weissella* (nr. 328), og under kvantifiseringsgrensen (figur 4.11). I kontrollprøven ble det ikke detektert psykrotrofe bakterier ved første uttak (dag 1), og kimtallet holdt seg under kvantifiseringsgrensen gjennom hele lagringsperioden. Mellom dag 3 og 21 steg kimtallet i kontrollprøven til $3,36 \pm 0,26$ log CFU/g, men på dag 7 og 16 var registret kimtall på 0,77 log CFU/g eller lavere, som kan tyde på at de ulike lakseprøvene hadde noe ulik kvalitet. For de inokulerte lakseprøvene ble sluttkonsentrasjonen detektert til $7,31 \pm 0,11$ log CFU/g og $5,84 \pm 0,53$ log CFU/g for henholdsvis *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328)



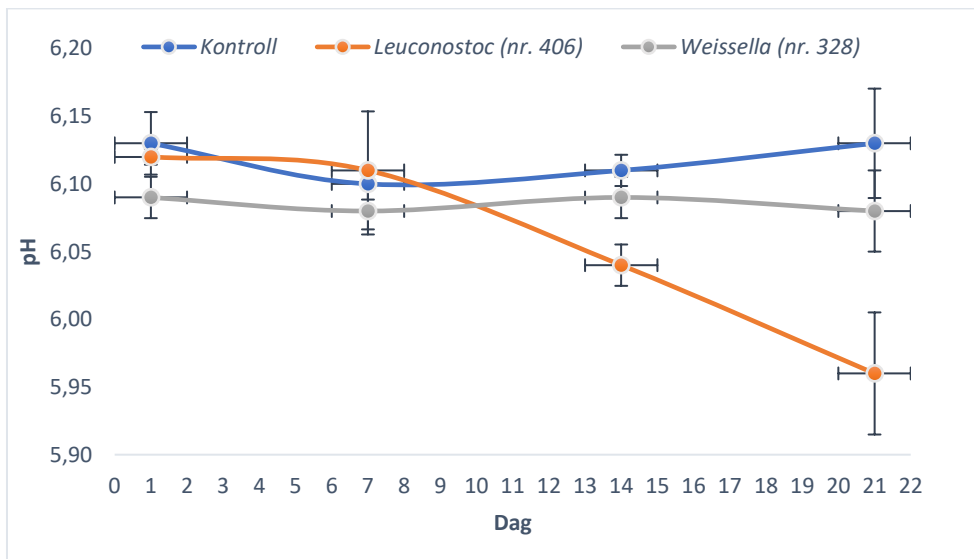
Figur 4.11 Psykrofilt aerobt kimtall (Long & Hammer) i ikke-inokulerte prøver (kontroll) og inokulerte prøver (*Leuconostoc* nr. 406 og *Weissella* nr. 328) av laks lagret ved 4°C i 21 dager. Data er log-transformerte kimtall (CFU/g) av gjennomsnitt $n=3 \pm$ standardfeil. Horisontal stiplet linje indikerer kvantifiseringsgrensen (3,40 log CFU/g).

4.5.4 Korrelasjon mellom kimtall på Jernagar og melkesyrebakterier på MRS Agar

Det totale kimtallet (hvite og svarte kolonier) kvantifisert på jernagar ble plottet opp mot melkesyrebakterier kvantifisert på MRS Agar for de inokulerte prøver *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328) for å se om det var korrelasjon mellom variablene (vedlegg 3). R-kvadrert verdi (R^2) indikerte at det var liten variasjon mellom datasettene, og beregnet Pearson's korrelasjon koeffisient gav r-verdi på 0,93 for *Leuconostoc* (nr. 406) og 0,96 for *Weissella* (nr. 328), som antyder en god korrelasjon mellom variablene.

4.5.5 Utvikling av pH i ikke-inokulerte og inokulerte lakseprøver

Utvikling av pH i de ulike prøvegruppene, kontroll, *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328) ble målt ved dag 1, 7, 14 og 21 (figur 4.12). Den initielle pH (dag 1) ble målt til pH $6,13 \pm 0,02$ for kontrollprøven og pH $6,12 \pm 0,01$ og $6,09 \pm 0,02$ for henholdsvis *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328). For *Leuconostoc* (nr. 406) ble det registrert et fall fra pH $6,11 \pm 0,04$ til pH $6,04 \pm 0,02$ på dag 14, og ved siste måling (dag 21) var det et ytterligere fall i pH på nesten 0,1 pH-enheter. Både kontrollprøven og inokulert prøve (328) hadde forholdsvis stabil pH mellom dag 1 og dag 21. Samtlige prøvegrupper hadde størst standardavvik ved siste måling ($\pm 0,03-0,05$).



Figur 4.12 pH i ikke-inokulerte (kontroll) og inokulerte prøver (*Leuconostoc* nr. 406 og *Weissella* nr. 328) av pre-rigor laks ved 4°C i 21 dager. Verdiene er gjennom av $n=3$ for hver prøvegruppe \pm standardavvik. Merk kuttet pH-skala på y-aksen.

4.5.6 Sensorisk vurdering av lakseprøver på dag 8 og 15 i inokuleringsforsøket

En enkel sensorisk vurdering av lakseprøvene ble gjennomført ved dag 8 og 15, av en gruppe på total 9 personer med tilknytning til NTNU. Hver enkelt prøve ble beskrevet med ord for både lukt og utseende. Ordene som beskrev lukt, er presentert i enkeltstående ordskyer for hver prøvegruppe for dag 8 og dag 15, og er illustrert i figur 4.13. Ordskylene fremhever de mest gjentakende ordene som størst og skalerer størrelsen ned jo mindre gjentakende de er.

De mest gjentakende ordene for prøvegruppene på dag 8, som de hadde til felles, var ordene «laks» og «svak lukt», figur 4.13. Kontrollprøven ble i tillegg beskrevet som «nøytral» og «frisk», der «nøytral» også ble brukt for å beskrive prøve 406. Et gjentakende ord for de inokulerte prøvene var ordet «fersk», i tillegg var ordet «sjø» et gjentakende ord for prøve 328. Gjentakende ord for beskrivelse av utseende var: rosa, oransje, glansfull, tørr overflate, god struktur og mørk muskel. Etter hver vurdering ble det lagt opp til en felles diskusjon med deltakerne om de ulike prøvene. Her kom det frem at det var liten forskjell mellom prøvene på dag 8, spesielt for lukt.

På dag 15 ble ordene, «lite lukt», «laks» og «agurk» fremhevet for samtlige prøvegrupper, figur 4.13. I tillegg var «nøytral» en gjentakende beskrivelse for kontrollprøve og 406. Flere beskrev også kontrollprøven som «harsk» og prøve 328 som «sur». Prøve 328 ble i tillegg beskrevet med ordene «sjø» og «syrlig» og prøve 406 med ordet «friskt». Beskrivende ord for utseende for de ulike prøvene ved dag 15 var: matt, tørr, blass, glansfull, fin/jevn marmorering, rosa og oransje. Også på dag 15 kom det frem i felles diskusjon etter vurdering, at det var vanskelig å kjenne store forskjeller mellom prøvene både for lukt og utseende.



Figur 4.13 Ordskyer med beskrivende ord fra sensorisk vurdering av lukt ved dag 8 og 15 for ikke-inokulerte- (kontroll) og inokulerte prøver med *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328) av pre-rigor laks lagret ved 4°C. Jo større ord, jo mer gjentakende ord for prøven.

5 Diskusjon

Fisk- og sjømat er spesielt utsatt når det kommer til bakteriell ødeleggelse og regnes som svært lettbederelig med forholdsvis kort holdbarhet (Dalgaard, 2000; Gram og Huss, 1996). *Aeromonas sp.* og *Brochothrix thermosphacta* i spiseklar fisk er blitt rapportert (Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2017; González-Rodríguez *et al.*, 2002), og beskrives som forringelsesbakterier som lett kan oppstå i blant annet lett prosesserte og/eller vakuumpakkede fiskeprodukter (Gram og Huss, 1996; Gram og Dalgaard, 2002; Wiernasz *et al.*, 2020; Françoise, 2010; Abel, Rotabakk og Lerfall, 2019; Mamlouk *et al.*, 2012). I denne studien er det blitt sett på hvordan bruk av melkesyrebakterier kan påvirke veksten til Gram-positive og Gram-negative forringelsesbakterier i et forsøksoppsett med fiskejuice som substrat ved 15 °C, og hvordan melkesyrebakterier vokser under ulike betingelser som temperatur og vakuum, som et ledd i å vurdere isolatenes potensiale innenfor biokonservering (Leroi *et al.*, 2015).

5.1 Metodeutvikling for bruk av melkesyrebakterier som biokonserverende kultur i fisk

For å kunne vurdere melkesyrebakterienes potensial og egnethet som biokonserverende kultur i kjølelagrede fiskeprodukter var det avgjørende at de kunne vokse og tilpasse seg miljø ved temperaturer lavere enn det som regnes som optimal veksttemperatur for disse bakteriene (Leroi *et al.*, 2015). Melkesyrebakterienes vekst ved 15 °C ble målt Spektrofotometrisk ved OD₆₀₀, som er en god metode for generering av mikrobielle vekstkurver, og vil kunne gi nyttig informasjon om bakterienes oppførsel og hvilke vekstbetingelser som vil være optimale (Yang *et al.*, 2018; Dalgaard og Koutsoumanis, 2001). Undersøkelse av vekstegenskaper ved 15 °C viste at 92 av totalt 100 isolater vokste ved denne temperaturen (figur 4.1-4.3), noe som ga et godt utgangspunkt for videre implementering i screeningforsøket mot forringelsesbakteriene *A. salmonicida* og *B. thermosphacta*. Matamoros *et al.* (2009) så også på vekst ved 15°C for 52 isolater av melkesyrebakterier fra ulike sjømatprodukter, og fant at alle vokste ved denne temperaturen. De 92 melkesyrebakteriene benyttet i denne studien er isolert fra spiseklare produkter som sushi (40 stk.), røykelaks (30 stk.) og gravlaks (21 stk.), og underbygger derfor teorien om at

melkesyrebakterier isolert fra fisk- og sjømat ofte vil være tilpasningsdyktige miljø ved lave temperaturer (Ghanbari *et al.*, 2013; Jeppesen og Huss, 1993).

De 92 melkesyrebakteriene kan deles inn i to grupper med tanke på lagfase, eksponentiell fase og stasjonærfase (figur 4.1-4.3). En gruppe, bestående av 43 isolater, hadde ingen lagfase basert på observasjon av vekstkurven, som vil si at en eventuell lagfase sannsynligvis var kortere enn 20 timer. Denne kunne blitt registrert ved ytterligere en-to målinger innen 20 timer. De fleste isolater innen samme gruppe inntraff også stasjonær fase raskere, etter ca. 47-72 timer mot 70-100 timer for den andre gruppen som bestod av 49 isolater. Den andre gruppen (49 isolater), hadde derimot forholdsvis lang lagfase som varte opp mot 47 timer. For flere av isolatene med lang lagfase ble det også observert små kolonier på plate, og behov for opptil 5 dager inkubasjon ved 25 °C. Lengden på lagfasen, som representerer tiden bakterien trenger for å tilpasse seg et nytt miljø før celledeling starter, vil kunne påvirkes av bakteriens tidligere vekstomgivelser og ulike stressfaktorer, som følge av eksempelvis skadede celler (frysing og temperatur forandringer) eller ved påvirkning av pH eller NaCl (Robinson *et al.*, 2001; Francois *et al.*, 2006). Cellestress og fysiologisk tilstand kan derfor være en forklaring på en lengre lagfase for over halvparten av melkesyrebakteriene. I tillegg forklarer Baranyi (1998) at sannsynligheten for å inkludere minst én celle med god fysiologisk bakgrunn, er teoretisk større med høy bakteriell celletetthet ved start, og at dette igjen vil føre til rask vekst og kortere lag-periode for tilpasning. Om dette er tilfelle, kan inokuleringsstørrelse fra plate til buljong også ha påvirket lagfasen. Begge gruppene bestod av både isolater fra sushi, røyket- og gravet laks, noe som tyder på at det ikke er noen direkte sammenheng mellom produktkategori og vekstegenskaper ved 15 °C.

Åtte isolater ble derimot ekskludert grunnet fravær av vekst ved 15 °C. Årsaken til dette er ukjent, men det kan vurderes om inkubasjonslengden kan ha vært for kort, da det i vekstforsøket ble observert at flere av de 92 isolatene som vokste ved 15 °C, hadde behov for inkubasjonstid i opptil 120 timer for å få målbar og senere kvantiserbar vekst. Ringø og Gatesoupe (1998), som mente at melkesyrebakterier fra kalde farvann er mer saktevoksende, påpekte viktigheten av en lengre inkubasjonstid, i tillegg til faktorer som næringsrikt medium

og inkubasjonstemperatur ved isolering av melkesyrebakterier. Det kunne vært aktuelt å testet andre dyrkningsmedium, eksempelvis M17-agar for isolater med ingen eller dårlig vekst ved 15 °C, som har viste seg å gi et bedre resultat for isolatene med dårlig vekst (Olsen, 2020). Et bedre grunnlag for vekstkinetikk kunne blitt estimert gjennom ComBase (ComBase, 2020; Baranyi og Roberts, 1994), for større forutsigbarhet ved utvelgelse av isolater blant de 92 benyttede melkesyrebakteriene. I tillegg kan det vurderes om dårlig cellevekst vil kunne ha videre betydning for en eventuell inhiberingseffekt av utvalgte målorganismer, da det er rapportert at produksjon av bakteriosiner gjerne er størst ved både pH og temperaturer under det som gir optimal vekst for melkesyrebakterier (Mataragas *et al.*, 2003).

Standardkurver (OD₆₀₀ mot CFU/ml) basert på veksten av 4 isolater (to fra gravlaks, en fra hver av produktene sushi og røykelaks), ble laget for å beregne gjennomsnittlig OD-verdi som tilsvarte ønsket konsentrasjon på $5,0 \times 10^8$ CFU/ml for melkesyrebakteriene i co-kultur under screening (figur 4.4). Hensikten var å få et reproducerbart forholdstall mellom organismene i alle forsøksoppsett. Standardisering for de fire isolatene ga verdier fra 0,16 (nr. 273) til 0,45 (204), og en gjennomsnittlig OD-verdi på $0,26 \pm 0,03$ (10 % avvik). De fire melkesyrebakteriene var i utgangspunktet plukket ut på grunn av forholdsvis lik observert vekst. Likevel er det forholdsvis store forskjeller mellom isolatene ved målt OD₆₀₀ mot kimtall (CFU/ml). For å oppnå sammenlignbare resultater med både upublisert og publisert materialet innenfor samme tema, ble det valgt å benytte OD₆₀₀ 0,22 som utgangspunkt for videre arbeid med screening av melkesyrebakteriene. Dette tilsvarer en OD 0,01 lavere enn det som ble beregnet (minus 10 % avvik), og ble vurdert til å være et like godt forholdstall mellom OD og kimtall med tanke på reproducerbarhet. For målorganismene ble det valgt å bruke empiriske formler for konvertering OD₆₀₀ til CFU/ml, som ga en konsentrasjon på $8,0 \times 10^7$ CFU/ml for OD₆₀₀ 0,1 (Labtools, u.å.).

Før vekstegenskapene ble målt ble det antatt at melkesyrebakteriene ville ha tilsynelatende lik vekst. Det bør poengteres at kunnskapen om isolatene på forhånd var svært liten og at det i tillegg ble tatt hensyn til oppgavens omfang og tidsbegrensninger. Tatt i betraktning resultatene fra OD-måling av de 92 isolatene, da spesielt med hensyn til isolatenes varierende lagfase, kan det derfor diskuteres om utvalget for standardiseringen var representativt nok,

og godt nok som føringspunkt for startkonsentrasjon. Med tanke på at co-kulturen i screeningfasen ble inkubert i 96 timer, kan det ha ført til at noen isolater med lang lagfase ikke fikk nok tid for fullstendig utvikling av vekst. Dette kunne ha blitt løst ved enten å inkubere brønnplaten lengre eller med en høyere startkonsentrasjon, for å gi isolatene et bedre utgangspunkt for vekst ved 15 °C. Til videre arbeid, anbefales det å få med et større utvalg i standardiseringen for bedre optimalisering av metoden. Eventuelt kunne man ha benyttet seg av en forenklet metode, med færre målepunkter over en lengre periode, slik Matamoros *et al.* (2009) gjorde for utvelgelse av melkesyrebakterieisolater.

High throughput screening (HTS) og in-vitro assays har ført til nye hel- eller halvautomatiske fremgangsmåter for blant annet kultivering og kvantifisering etter 96-mikrobrønnplateformatet (Siewerts *et al.*, 2008; Tornero og Dangl, 2001; Hamilton *et al.*, 2002; Wiernasz *et al.*, 2017). Felles for metodene er at de er mer tid- og konstandseffektive og utstyrsbesparende, spesielt i forhold til engangsutstyr i motsetning til tradisjonelle platespredningsteknikker (Siewerts *et al.*, 2008). Flere av metodene kan derimot være vanskelig å implementere for vanlige og enkle laboratorier, da det vil kreve kostbart spesialutstyr og utvikling av nye protokoller (Siewerts *et al.*, 2008). I denne studien ble metoden fra Wiernasz *et al.* (2017) med små modifikasjoner benyttet ved kultivering og spotting, med gode resultater både i forhold til kultivering og kvantifisering. Maks grensen på 50 kolonier per spott var en god grense for både målorganismer og melkesyrebakterier, men i etterkant kan det diskuteres om denne kunne vært noe høyere for melkesyrebakteriene, da størrelsen på koloniene for flere isolater var så små, at det kunne telles flere innenfor hver spott.

Selektive medier bør i utgangspunktet være så spesifikke at de kun fremmer vekst av den organismen som er av interesse og inhiberer vekst av andre mikroorganismer. Både SAA Agar og STAA var selektive nok til å hindre vekst av de 35 melkesyrebakteriene som ble testet, noe som var viktig ved kvantifisering for å finne inhiberingseffekten. MRS Agar er et rikt, naturlig og generelt vekstmedium som vanligvis brukes ved kvantifisering av melkesyrebakterier (Nero *et al.*, 2006; Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2018), Likevel ble det observert dårlig vekst for flere av melkesyrebakteriene. En mulig årsak kan være at kvantifisering av *Carnobacterium* på MRS

Agar kan gi underestimerte deteksjoner, da det er dokumentert at de ikke vokser ved tilstedeværelse av acetat (Collins *et al.*, 1987). Videre oppdaget Yost og Nattress (2000) at isolater av *Leuconostoc* mistet evnen til å subkultiveres på MRS Agar. For å forhindre dette kunne det vært aktuelt å teste et annet medium, eksempelvis M17-agar. Chessa *et al.* (2019) fant ingen signifikant forskjell mellom kvantifisering av kulturer med melkesyrebakterier på MRS Agar og M17, derimot ble det funnet at M17 favoriserte vekst av kokker og MRS Agar staver, noe som kanskje bør tas med i en vurdering av oppdyrking av melkesyrebakterier i senere forsøk.

For både *A. salmonicida* og *B. thermosphacta* ble det valgt å endre inkubasjonstemperaturen for å få tellbare kolonier ved spotting. Siden hver spott bestod av kun 5 µl og platene tilsatt medium på forhånd ble tørket, kan dette ha resultert i liten overflate for vekst av mikrokoloniene. Basert på egne observasjoner før og etter endring av temperatur var det ingen grunn til å tro at dette har påvirket resultatet. Tidligere forskning har også benyttet 30°C fremfor 37 °C ved kvantifisering av *Aeromonas* (Villari *et al.*, 1999). For *B. thermosphacta* ble temperaturen økt fra 20 °C til 25 °C med godt resultat. Siden flere har benyttet 25 °C som inkubasjonstemperatur ved kvantifisering av organismen (Mamlouk *et al.*, 2012; Stackebrandt og Jones, 2006; Illikoud *et al.*, 2019), er det ikke grunn til å tro at temperaturforandringen har påvirket resultatet nevneverdig ved kvantifisering av *B. thermosphacta*.

5.2 Screening av melkesyrebakterier etter inhiberende egenskaper mot utvalgte målorganismer

For screening etter inhiberende egenskaper ble et utvalg på 35 melkesyrebakterier testet mot målorganismene *A. salmonicida* og *B. thermosphacta* (figur 4.7 og 4.8). Utvalget bestod av 16 isolater identifisert som *Carnobacterium* (7 fra røykelaks, 5 fra sushi og 4 fra gravlaks), 15 isolater fra *Leuconostoc* (14 fra sushi og 1 fra gravlaks) og 3 fra *Weisella* (2 fra sushi og 1 fra gravlaks), i tillegg til ett uidentifisert isolat 346 (sushi) (Lillebjerka, 2019; Olsen, 2020). Grunnlaget for utvelgelsen er tidligere oppnådde resultater av publisert- (Lillebjerka, 2019) og upublisert materiale (Jelena Stupar) innenfor samme tema. Screeningen ble utført i 96-brønns mikroplater med beriket fiskejuice av laks som substrat for de ulike kulturene og inkubert ved

15°C i 96 timer. Den kvantitative metoden i mikroformat er utviklet av Wiernasz *et al.* (2017), og skal gi en rask og presis sammenligning av mange isolater.

Målorganismer dyrket i monokultur og kvantifisert på selektivt og generelt medium, viste at det var ingen signifikante forskjeller mellom dyrkningsmetodene ($p > 0,05$). Gjennomsnittlig kimtall for *A. salmonicida* kvantifisert på SAA var $8,52 \pm 0,2$ CFU/ml og for *B. thermosphacta* kvantifisert på STAA $9,03 \pm 0,3$ log CFU/ml, som bekrefter at begge målorganismene vokste godt i fiskejuice ved 15 °C (figur 4.7 og 4.8). Wiernasz *et al.* (2017) oppnådde kimtall fra $5,70 \pm 0,5$ til $9,70 \pm 0,1$ log CFU/ml for ulike målorganismer (forringelses- og patogene bakterier) dyrket som monokultur i fiskejuice med samme startkonsentrasjon. I samme studie hadde *B. thermosphacta* kimtall på 8,4 og $8,7 \pm 0,5$ i henholdsvis fiskejuice av laks og torsk, omtrent 1 log mindre enn det som ble detektert i denne studien. Det lave standardavviket for den enkelte målorganismen indikerer at det var liten variasjon i utvalget ($n=36$ og $n=32$) for henholdsvis *A. salmonicida* og *B. thermosphacta*. Fiskejuice som substrat er anbefalt for å dokumentere eksempelvis forringelsespotensiale hos bakterier (Gram og Huss, 1996), som samsvarer med disse resultatene i oppgaven.

Melkesyrebakteriene ble også dyrket i monokultur. I screening mot *A. salmonicida* oppnådde melkesyrebakteriene i monokultur kimtall fra 7,22 til 9,99 log CFU/ml og mot *B. thermosphacta* kimtall fra 7,47 til 9,89 log CFU/ml, som viser at alle 35 isolater klarte å vokse i fiskejuice ved 15 °C og at testsystemet også var velfungerende for melkesyrebakterier isolert fra sjømatprodukter. Dette samsvarer også med teorien om at melkesyrebakterier ofte kan nå høye verdier ($10^7 - 10^8$ CFU/ml) i fiskeprodukter (Gram og Huss, 1996). Det bør poengteres at dette kun tilsvarer rundt 1,5 log økning for isolatene som ble detektert med laveste kimtall, med tanke på at startkonsentrasjonen i brønnplaten var på 10^6 CFU/ml for melkesyrebakteriene. Resultatene underbygger likevel oppnådde inhiberingsresultater av målorganismene, da testsystemet viser at inhiberingseffekten ikke skyldtes fravær av verken målorganisme eller melkesyrebakterier.

Log-reduksjonen ble kalkulert ut fra oppnådde kimtall fra kvantifisert co-kultur og kontroll (målorganismen i monokultur). Inhiberingseffekten ble deretter estimert ved å vurdere reduksjonen mot valgte grenseverdier. Wiernasz *et al.* (2017) vurderte 4,0-4,5 log CFU/ml som sterk inhiberende effekt, som ga utgangspunktet for følgende grenser: en log reduksjon større enn 3,0 indikerte god hemmende effekt, 1,0-3,0 log-reduksjon noe hemmende effekt og log reduksjon mindre enn 1,0 ble vurdert som ingen hemmende effekt.

Resultatene fra screening mot målorganismen *A. salmonicida* (figur 4.7 og tabell 4.1), demonstrerte at 34 av 35 melkesyrebakterier hadde inhiberende effekt i ulik grad mot målorganismen. Det lave standardavviket på 0,30 eller mindre for 32 av 35 isolater, indikerer det er liten spredning i verdiene mellom parallellene. 23 av isolatene hadde evnen til å inhibere veksten til *A. salmonicida* fullstendig. Resultatene indikerer dermed at disse isolatene kan ha hatt en reduksjon på opptil 8,52 log CFU/ml (tabell 4.1) Fullstendig hemming av en målorganisme er etter min kunnskap sjeldent rapportert, spesielt når det kommer til Gram-negative bakterier, noe gjør disse funnene svært interessante. Dette betyr også at effekten bør valideres gjennom å sjekke de samme isolatene på nytt mot målorganismen. Funnene kan likevel tolkes som en sterk inhiberende effekt (Wiernasz *et al.*, 2017). Fem andre isolater ble også vurdert til å ha god hemmende effekt (> 3,0 log reduksjon), som vil si at totalt 28 av 35 isolater hadde god inhiberingseffekt mot *A. salmonicida*. 11 av disse 28 isolatene er identifisert som *Carnobacterium*, 13 fra *Leuconostoc* og 3 isolater fra *Weissella* i tillegg til uidentifisert isolat (nr. 346). Inhibering av Gram-negativ bakterier er uvanlig og mindre rapportert (Chahad *et al.*, 2012). Stevens, K. *et al.* (1991), har tidligere forklart at årsaken ligger i det ytre ugjennomtrengelig membranlaget til de Gram-negative bakteriene, som blokkerer bakteriosiner. Helander, von Wright og Mattila-Sandholm (1997), beskrev også i sin artikkel at bakteriosiner i utgangspunktet kun inhiberer nært beslektede arter eller Gram-positive bakterier. De mente likevel at det var blitt rapportert om nye innfallsvinkler, som ga økt potensiale gjennom synergieffekt av ulike antimikrobielle metabolitter. I senere tid har andre også sett på inhibering av *Aeromonas*, ved hjelp av isolater av melkesyrebakterier og/eller ved deres antimikrobielle metabolitter (organiske syrer eller bakteriosiner) (Luis Balcázar *et al.*, 2006; Chahad *et al.*, 2012; Ringø, 1999; Rengpipat, Rueangruklikhit og Piyatiratitivorakul, 2008; Vescovo *et al.*, 1997; Anacarso *et al.*, 2014). Anacarso *et al.* (2014) oppdaget at

inokulering av den bakteriosin-produserende stammen *Lactobacillus pentosus* i fersk laksefilet virket å kontrollere veksten av *Aeromonas hydrophila*. Effekten ved kun tilsetning av bakteriosinet var imidlertid mindre klar, noe som kan indikerer at biokonservering basert på kun én antimikrobiell metabolitt ikke vil gi tilstrekkelig effekt.

I screening etter inhiberende egenskaper mot *B. thermosphacta* hadde 21 av 28 isolater inhiberende effekt av ulik grad (figur 4.8 og tabell 4.1). 8 av disse viste god hemmende effekt (> 3,0 log reduksjon), og av disse var tre identifisert som *Weissella* og resterende fem som *Leuconostoc*. 2 isolater, nr. 105 fra *Leuconostoc* og nr. 327 fra *Weissella*, utmerket seg med over 7,5 log reduksjon, og var ikke signifikant forskjellige fra hverandre ($p > 0,05$). Også isolat nr. 406 fra *Leuconostoc* og nr. 328 fra *Weissella* viste seg å ha god inhiberingseffekt mot målorganismen. Både isolat nr. 105, 327 og 406 hadde derimot stort standardavvik, noe som viser til stor spredning kimtallsverdier. Dette skyldes at én eller to paralleller hadde lite eller ingen vekst, det er derfor noe usikkerhet knyttet til oppnådde resultater. Flere av isolatene hadde også noe inhiberende effekt, der flest var representert av *Leuconostoc*, men også noen fra *Carnobacterium*. I MAP eller vakuumpakket kjøttprodukter kan *B. thermosphacta* være den dominerende forringelsesorganismen, men på bekostning av andre slekter som *Carnobacterium*, *Lactobacillus* eller *Leuconostoc* (Borch og Molin, 1989; Ercolini *et al.*, 2006), noe som kan være en mulig årsak til at det ikke var like god hemming av *B. thermosphacta*. Likevel bør det nevnes at selv om et isolat eller en slekt av melkesyrebakterie ikke har så god hemmende effekt eller kun inhiberer én målorganisme, bør den likevel ikke utelukkes. Noe inhiberende effekt kan også være betydningsfullt, og en biokonserverende kultur kan bestå av flere ulike melkesyrebakterier, som dermed kan gi en synergieffekt.

Under forsøket oppstod det også gjentatte problemer ved kvantifisering av *B. thermosphacta*. En av årsakene til dette var observasjon av to ulike kolonytyper, som kan ha skyldtes enten kontaminert- eller stresset stamme. Etter rendyrking ble også inkubasjonstemperatur økt fra 20 °C til 25 °C, noe som ga et bedre kvantifiseringsgrunnlag med større og mer avgrensede kolonier. Det er likevel noe usikkerhet i forhold til om målorganismen ble helt rendyrket og resultatene bør derfor etterprøves, samtidig bør metoden i forhold til inkuberingstemperatur vurderes optimalisert. Flere andre studier har også sett på muligheten for inhibering av *B.*

thermosphacta ved bruk av isolater av melkesyrebakterier med ulikt resultat (Chahad *et al.*, 2012; Matamoros *et al.*, 2009; Fall *et al.*, 2010). Siden *B. thermosphacta* kan bidra til forringelse i lettprosessert fiskeprodukter, som eksempelvis røyket laks (Leroi, 2011), er funnene i denne studien likevel aktuelle og interessant for videre utprøving av melkesyrebakteriene mot denne forringelsesorganismen.

7 melkesyrebakterier (isolat nr. 21, 30, 159, 316, 384, 461 og 466) ble ekskludert i screening mot målorganismen *B. thermosphacta*, på bakgrunn av at isolatene plutselig hadde ingen eller svært dårlig vekst på MRS Agar og/eller i buljong. Det ble forsøkt å øke inkubasjonstiden og dyrke opp på nytt fra nedfryste rør, uten hell. Selv om isolater i nedfryste rør ble oppbevart i frysestativ ved overføring til plate, vil likevel temperaturen i rørene kunne endres noe, og med tanke på at isolatene ble benyttet av flere personer i samme tidsrom, kan dette ha ført til stressede celler. Yost og Nattress (2000) oppdaget også at isolater av *Leuconostoc* mistet evnen til å subkultiveres på MRS Agar. Her kan det tenkes at enkelte isolater under påvirkning av ulike stressfaktorer, kan gå i dvale, og dermed ikke vokse.

Resultatene i denne studien viser til at alle tre isolater fra slekten *Weissella* hadde god hemmende effekt både mot *B. thermosphacta* og *A. salmonicida*. Både *Leuconostoc*, *Weissella* og *Carnobacterium* er rapportert som bakteriosinproduserende stammer (Papathanasopoulos *et al.*, 1997; Calo-Mata *et al.*, 2008a). Woraprayote *et al.* (2018) brukte et nytt bakteriosin fra *Weissella* (BCC 7293) i coating av film som en pakkemetode for fiskefileter av pangasius (Haimalle), og fant at metoden inhiberte både Gram-positive *Listeria monocytogenes* og *Staphylococcus aureus*, og Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* og *Salmonella Typhimurium*. *Weissella* er derimot blitt omtalt som en potensiell sykdomsfremkallende bakterie (Kamboj, Vasquez og Balada-Llasat, 2015), og selv om den beskrives som aktuell i fermenteringsprosesser har den ikke fått GRAS-status eller godkjenning for bruk (Fessard og Remize, 2017). Også *Carnobacterium* og *Leuconostoc* var representert ved middels til god inhibering av *A. salmonicida* og *B. thermosphacta*, noe som tyder på at begge disse slektene har potensiale som biokonserverende kultur mot Gram-positive og Gram-negative forringelsesbakterier. Både

Olsen (2020) og Lillebjerka (2019) brukte de samme 35 isolatene under deres arbeid med screening mot forringelses- og patogene bakterier. Slekten *Leuconostoc* var størst representert, med god inhiberingseffekt, mot den Gram-negative forringelsesbakterien *Pseudomonas fluorescens*, mens *Carnobacterium* viste seg å være den slekten som hadde best inhiberingseffekt mot Gram-positive *Listeria innocua* og *Staphylococcus aureus* og Gram-negative *Escherichia coli* (Olsen, 2020; Lillebjerka, 2019). I de samme studiene ble spesielt ett isolat (nr. 461) trukket fram fra slekten *Carnobacterium* som viste middels til god inhiberingseffekt mot de nevnte målorganismene. Isolat nr. 461 viste også i denne studien potensiale, ved full inhibering av *A. salmonicida*, derimot var dette et av isolatene som ble ekskludert fra screeningforsøket mot *B. thermosphacta*. *Carnobacterium* har relativt nylig blitt reklassifisert, men er allerede omtalt som en melkesyrebakterie som kan ha en viktig rolle innenfor biokonservering av sjømat (Calo-Mata *et al.*, 2008a), og har vist seg som lovende mot både Gram-negative og Gram-positive bakterier i andre studier (Brillet *et al.*, 2005; Wiernasz *et al.*, 2017). I denne studien var det derimot ingen av isolatene fra slekten *Carnobacterium*, som hadde god inhiberende effekt (> 3 log reduksjon) mot *B. thermosphacta*. *Weissella* og *Leuconostoc* og *Carnobacterium* er alle psykrotrofe melkesyrebakterier som er tidligere blitt isolert fra fiskeprodukter (Calo-Mata *et al.*, 2008a; Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2017), og alle tre er også beskrevet som bakterier som kan bidra til forringelse i matprodukter (Leroi, 2010; Pilet og Leroi, 2011; Wiernasz *et al.*, 2020). Melkesyrebakterier er kjent for å kunne bidra med uønsket lukt og smak, slimdannelser, produksjon av Diacetyl (smørsmak) og et uakseptabelt høyt syrenivå (Leroi *et al.*, 1996; Jeppesen og Huss, 1993), noe som også bør vurderes ved eventuell videre bruk av disse melkesyrebakteriene som biokonserverende kultur.

Grad av inhiberende effekt, kan være et steg mot utvelgelse av potensielle isolater for biokonservering (Gómez-Sala *et al.*, 2016; Matamoros *et al.*, 2009; Leroi *et al.*, 2015). Ferske eller minimalt prosesserte fiskeprodukter er ofte utsatt når det kommer til forringelsesbakterier (Gram og Dalgaard, 2002), og for å kunne benytte melkesyrebakterier i biokonservering av fisk må isolatene derfor ha et ganske bredt biokonserverende spekter mot flere ulike forringelsesbakterier. Denne studien viser det er mulig for isolater av melkesyrebakterier å hemme vekst av både *A. salmonicida* og *B. thermosphacta*, to forringelsesorganismer kan oppstå i fisk, noe som gjør isolatene svært interessante med tanke

på konservering av fisk. Likevel er det et langt steg igjen for å kunne benytte seg av disse i kommersiell setting (Leroi *et al.*, 2015), og biokonservering av sjømatprodukter for å forlenge holdbarheten er fortsatt svært lite dokumentert (Wiernasz *et al.*, 2020). Wiernasz *et al.* (2017) oppdaget at type fiskejuice (laks eller torsk) i utgangspunktet hadde liten påvirkning på den antimikrobielle effekten, men ga generelt noe lavere effekt i torskejuice enn i laksejuice (Wiernasz *et al.*, 2017). Melkesyrebakterier dyrket i fiskejuice, har også vist seg å gi høyere produksjon av organiske syrer som melkesyre, eddiksyre og ravsyre enn ved dyrking i MRS-buljong (Özcelik, Kuley og Özogul, 2016), som vil si at fiskejuicen benyttet i dette forsøket kan ha hatt innvirkning på produksjon av antimikrobielle substanser, og muligens påvirket inhiberingseffekten i positiv grad. Organiske syrer produseres i ulike grad, som ofte er avhengig av blant annet type bakterie, miljø, ulike påkjenninger og konkurranse mellom bakterier (Leroi, 2010; Nuryana, Andriani og Lisdiyanti, 2019; Tomar, 2019). Borch og Molin (1989) som undersøkte forskjeller under aerobe og anaerobe forhold, fant at eddiksyre ble produsert i størst grad av *Carnobacterium* ved aerobe forhold, i motsetning til maursyre (metasyre) som kun ble produsert under anaerobe forhold. In *et al.* (2013) oppdaget derimot at eddiksyre hadde den svakeste antimikrobielle virkningen blant de organiske syrene som ble testet mot ulike arter av *Shigella*. Organiske syrer er ofte sluttprodukter under fermentering, noe som er et viktig punkt å ta hensyn til ved utvelgelse av stammer til biokonservering. Sjømatprodukter, som eksempelvis fersk laks, er ikke-fermenterte produkter, og den applikerte stammen må derfor ikke bidra til forandring av sensoriske- eller næringsmessige verdi (Leroi, 2010).

5.3 Inokuleringsforsøk av pre-rigor laks med utvalgte melkesyrebakterier

Leuconostoc (isolat-nr. 406) og *Weissella* (isolat-nr. 328) ble på bakgrunn av den samlede graden av inhibering (log vekstreduksjon) mot de aktuelle målorganismene valgt ut for inokulering av pre-rigor laks (tabell 4.1). Alle lakseprøver ble vakuumert og inkubert ved $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ i en periode på totalt 21 dager. For å kunne benytte melkesyrebakterier i ferske sjømatprodukter, er det helt essensielt og et kriterium at de kan vokse ned mot kjøleskapstemperaturer (Leroi *et al.*, 2015). På bakgrunn av de oppnådde resultatene fra vekstegenskapene ved 15°C , var det derfor håp om at de utvalgte isolatene også hadde evnen til å tilpasse seg en lavere temperatur ned mot 4°C .

Resultatene demonstrerte at begge isolatene klarte å vokse ved $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ i vakuumpakket laks (figur 4.9). Veksten i vakuumpakket laks ved 4°C , ble også estimert etter primær modell av Baranyi og Roberts (1994), som viste at *Leuconostoc* hadde kortere lagfase og kom raskere i gang med vekst enn *Weissella* (tabell 4.2). Dette samsvarer med resultatene hvor det ble detektert kimtallvekst allerede ved første uttak (dag 1) for begge isolatene, noe som også indikerer en forholdsvis kort tilpasning ved denne temperaturen. Før inokulering ble også kulturene kuldeadaptert ved 8°C (2 døgn), noe som sannsynligvis har bidratt til denne raske tilpasningen. Estimert veksthastighet for *Leuconostoc* var nesten 1,8x høyere enn for *Weissella*. En R^2 på (0,98) for begge estimatene indikerer at dataene passet godt til modellen. 4°C er en temperatur ofte forbundet med vanlig kjøleskaptemperatur, dermed også lagringstemperatur for blant annet fiskprodukter av forbrukere. Det at både *Leuconostoc* og *Weissella* viser såpass god vekst ned mot kjøleskaptemperaturer er et viktig steg i riktig retning med tanke på biokonservering av ferske fiskeprodukter (Leroi *et al.*, 2015). Melkesyrebakterier blir generelt beskrevet som mesofile organismer, med optimal vekst ved temperaturer rundt 30°C (Matamoros *et al.*, 2009). Tidligere studier har også trukket frem psykrotrofe melkesyrebakterier, som har evnen til å vokse ned mot 0°C (van de Guchte *et al.*, 2002). Lignende resultater ble oppdaget av Jeppesen og Huss (1993) i deres studie, hvor 61 melkesyrebakteriene, isolert fra lettprosesserte fiskeprodukter, vokste ved 10°C etter 4 dager, videre vokste 90 % av isolatene ved 5°C etter 3-9 dager og 33 % ved 2°C ved opptil 9 dager inkubasjon. *Leuconostoc* oppnådde i denne studien en konsentrasjon på $5,80 \pm 0,52$ log CFU/g og *Weissella* $7,48 \pm 0,18$ log CFU/g i vakuuerte lakseprøver etter 21 dager ved 4°C . Ved siste uttak ble det også registrert et lavt kimtall av melkesyrebakterier i kontrollgruppen, noe som i utgangspunktet kan være forventet med tanke på at melkesyrebakterier i fisk ofte er relatert til produksjonsmiljø (Gram og Huss, 1996). Derfor kan resultatet indikere god hygienisk råvarekvalitet og en generelt god håndtering ved prosessering. Den antimikrobielle effekten kan i noen tilfeller gi sterkere effekt og i andre tilfeller svakere effekt, når temperaturen senkes fra 25°C til 5°C , noe som kan påvirke både den konserverende kulturen og veksten av målorganismen som testes. Dette kan videre føre til interaksjoner som gjør at bakterienes vekst forandres (Jeppesen og Huss, 1993), som bør vurderes ved biokonservering av ferske fiskeprodukter, som krever lagring ved lav temperatur.

Lett prosesserte fiskeprodukter er ofte dominert av psykrotrofe Gram-negativ forringelsesbakterier, som *Photobacterium* spp., *Vibrio* spp., *Shewanella* spp. og *Enterobacteriaceae*, som gjerne kan nå 10^7 - 10^8 CFU/g gjennom lagring (Wiernasz *et al.*, 2020). I inokuleringsforsøket ble totalkim (svarte og hvite kolonier) detektert til over kvantifiseringsgrensen (2,40 log CFU/g) etter dag 3 i lagringsforsøket for inokulerte prøver, og ved siste uttak var nivået på mellom 6,6 og 6,80 log CFU/g for prøver inokulert med *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328) (figur 4.10). Kontrollprøven hadde derimot ikke kimtall over kvantifiseringsgrense før mellom dag 16 og 21 i forsøket. Resultatet indikerer et lavt nivå av forringelsesbakterier i kontrollprøven, men også for inokulerte prøver kan det se ut som om prøvene ikke var spesielt utsatt for forringelse av bakterier under lagring. Pearson's korrelasjons koeffisient (r) på 0,93 for *Leuconostoc* (nr. 406) og 0,96 for *Weissella* (nr. 328), viste at det var forholdsvis sterk lineær korrelasjon mellom variablene (vedlegg 3), noe som kan indikere at kimtallet kvantifisert på Jernagar var veksten av melkesyrebakteriene som ble inokulert i fiskeprøvene. Utvikling av H_2S -produserende bakterier påvirkes av laksefiletens fysiske og kjemiske forhold, i tillegg til lagringsbetingelser (Rosnes *et al.*, 2003). I lagringsforsøket ble H_2S -produserende bakterier (svarte kolonier), kun detektert over kvantifiseringsgrensen ved dag 21 for inokulerte prøver med *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328), noe som vil si at H_2S -produserende bakterier ikke hadde noen rask utvikling i inokulerte prøver. Resultatene viste også at kontrollprøven hadde et lavt innhold av psykrotrofe bakterier (kvantifisert på L&H Agar) gjennom hele lagringsforsøket, med aerobe kimtall under kvantifiseringsgrensen (figur 4.11). Dette tyder på at detekterte kimtallsverdier (L&H Agar) i inokulerte prøver også sannsynligvis var vekst av de to melkesyrebakteriene *Leuconostoc* og *Weissella*. Rosnes *et al.* (2003) oppdaget at de fleste prøvene av vakuumpakkede pre-rigor fileter lagret i 12 dager hadde et generelt lavere bakterieinnhold av H_2S -produserende bakterier og psykrotrofe bakterier enn prøver filetert post-rigor, noe som kan tyde på at det å benytte seg av pre-rigor laks i et slikt inokuleringsforsøk kan være gunstig for å finne ut hvordan inokulerte melkesyrebakterier påvirker lakseprøver under lagring.

Utvikling av pH i de ulike vakuumpakkede prøvegruppene lagret ved 4 °C ble målt ved dag 1, 7, 14 og 21 av tre paralleller (figur 4.12). Resultatene viste at både kontrollprøver og prøver

inokulert med *Weissella* hadde en forholdsvis stabil pH mellom dag 1 og dag 21. Kun inokulert prøve med *Leuconostoc* hadde et fall på 0,16 pH-enheter mellom dag 1 og dag 21, men her var standardavviket forholdsvis høyt for hvert uttak. Et høyt standardavvik ble også registrert for samtlige prøver ved siste uttak, noe som kan indikere at pH i kan ha vært noe høyere eller lavere ved dag 21 enn det som ble registrert.

5.4 Sensorisk vurdering

Gjennom en enkel sensorisk vurdering, utført av ansatte ved NTNU, ble lukt og utseende for vakuumpakket fiskeprøver beskrevet ved dag 8 og 15 i langringsforløpet (figur 4.13). Det må poengteres at hovedinteressen for den sensoriske vurderingen var å se om det var merkbare luktforskjeller mellom prøvene, om de inokulerte prøvene utmerket seg på noen måte og eventuelt kunne assosieres i forhold til syring eller forringelse. Vurdering av utseende ble valgt som et tillegg, og er derfor mindre vektlagt. Vurderingen kan ikke sammenlignes med en fullstendig sensorisk analyse, men er med på å gi en indikasjon på hva som kan forventes ved tilsetning av melkesyrebakterier i et ferskt lakseprodukt. For videre utredelser anbefales det derfor å gjøre en mer helhetlig sensorisk analyse etter eksisterende metoder, og inkludere parametere som smak.

Den sensoriske vurderingen indikerte at ingen av de vakuumpakkede lakseprøvene hadde noen merkbar sensorisk forandring gjennom langringsforløpet, da de mest gjentakende ordene (lite lukt, laks og agurk) ved dag 15, ikke er ord som typisk forbindes med uønsket- eller vond lukt. Generelt kan det tyde på at det ikke var særlig forskjell mellom inokulerte prøver og ikke-inokulerte prøver. Dette gir ikke et sikkert resultat på hvordan melkesyrebakteriene påvirket det vakuumpakkede lakseproduktet under lagring ved 4 °C, men er likevel et interessant resultat som gir en indikasjon på at isolatene *Leuconostoc* og *Weissella* ikke hadde merkbar sensorisk påvirkning på lakseprøvene. Med tanke på oppnådde resultater under screening og i inokuleringsforsøket er *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328) to isolater som definitivt bør utforskes videre.

6 Konklusjon

I denne studien ble melkesyrebakterier isolert fra sushi, røyket- og gravet laks analysert for deres egnethet som mulige kandidater i biokonservering av spiseklar fisk. I den forbindelse ble vekstegenskapene til 100 melkesyrebakterier ved 15 °C undersøkt, hvor av 92 hadde vekst ved denne temperaturen. Et utvalg på 35 av de 92 melkesyrebakteriene ble screenet for antimikrobiell effekt mot forringelsesbakteriene *A. salmonicida* og *B. thermosphacta*. Mot *A. salmonicida* hadde totalt 34 av 35 isolater inhiberende effekt. 27 isolater hadde en reduksjon på over 3,0 log CFU/ml mot målorganismen, hvorav 23 av de inhiberte veksten til *A. salmonicida* fullstendig. Mot *B. thermosphacta* hadde 21 melkesyrebakterier inhiberende effekt, hvorav 8 isolater god inhiberende effekt med en reduksjon på over 3,0 log CFU/ml. Screeningforsøket i 96-brønns mikroplater med beriket fiskejuice som substrat viste seg å være en optimal metode for å detektere vekst av både mono- og co-kultur etter 96 timer ved 15 °C, men kvantifisering- og inkubasjonsbetingelser for målorganismer bør muligens optimaliseres for en mer sikker kimtallsdeteksjon ved senere studier.

Resultatene fra inokuleringsforsøket indikerte en rask miljøtilpasning for *Leuconostoc* (nr. 406) og *Weissella* (nr. 328) i vakuumpakket pre-rigor laks ved 4°C, og estimert veksthastighet for *Leuconostoc* var nesten 1,8x høyere enn for *Weissella*. Ved dag 21 var kimtallet for inokulerte prøver på 7,48 og 5,80 log CFU/ml for henholdsvis *Leuconostoc* og *Weissella*. Sensorisk vurdering på dag 8 og 15 i lagringsforløpet tydet på at det var liten forskjell mellom de ulike prøvegruppene.

Alle slektene (*Carnobacterium*, *Leuconostoc* og *Weissella*) var representert blant de som viste god inhiberingseffekt (> 3,0 log reduksjon), og 8 av de vurderes som lovende kandidater med god antimikrobiell effekt mot både Gram-positive og Gram-negative organismer, deriblant to isolater fra slekten *Weissella* (nr. 327 og 328) og to fra *Leuconostoc* (nr. 105 og 406), som ansees som egnede kandidater for videre forskning mot biokonservering av spiseklar fisk.

7 Videre perspektiv

Veien til en eventuell kommersialisering er lang og det mange kriterier og tester som må bestås før implementering av melkesyrebakterier i et fiskeprodukt kan vurderes (Leroi *et al.*, 2015). Det ble gjort flere interessante funn som gjør melkesyrebakteriene benyttet i denne studien svært lovende for videre testing, og for fremtidig forskning er det mange muligheter og veier å gå for videre selektering av aktuelle isolater.

Av de 35 identifiserte melkesyrebakteriene var det mange som viste middels til god inhiberende effekt mot begge målorganismene *Aeromonas salmonicida* og *Brochothrix thermosphacta*, og det anbefales derfor i videre studier at et bredere utvalgt av disse testes i vakuumpakket laks ved 4 °C, da kun to isolater (*Weissella* og *Leuconostoc*) ble tatt med videre i dette inokuleringsforsøket av *pre-rigor* laks. Det kunne også vært interessant og undersøkt vekstegenskapene til flere av melkesyrebakteriene ved 4 °C, eller enda lavere, gjennom eksempelvis et rørforsøk i MRS-buljong eller fiskejuice, for å se om flere av isolatene hadde vekst ved temperaturer ned mot lagringstemperatur for fisk, og om det kunne endret bildet av vekstegenskapene. Et annet interessant perspektiv kunne vært og sett på hvordan isolatene hadde fungert i en flerkultur, eksempelvis med 2-5 melkesyrebakterier sammen, da dette kunne gi en synergisk effekt og en mer bredspektret biokonserverende kultur mot både Gram-positive og Gram-negative bakterier som kan dominere ved forringelse av fiskeprodukter. En flerkultur satt sammen av melkesyrebakterier med ulike vekstegenskaper, eksempelvis av både hurtigvoksende- og mer langsomt voksende isolater, kunne kanskje ført til at isolater med lengre vekstfase hadde «overtatt rollen» som biokonserverende, når hurtigvoksende isolater hadde nådd stasjonærfase. Implementering av en slik kultur kan være aktuelt med tanke på holdbarheten til fersk fisk (10 dager ved 0-4 °C for Salma), og kanskje kunne dette også bidratt til å øke holdbarheten for ferske eller lett prosesserte kjølelagrede fiskeprodukter. I tillegg vil en mer helhetlig sensorisk analyse av melkesyrebakterier inokulert i *pre-rigor* laks gi et bedre bilde på hvordan bakteriene vil kunne påvirke den sensoriske kvaliteten, og dermed et bedre selekteringsgrunnlag for biokonserverende melkesyrebakterier i fremtiden.

Referanser

- Abd-El-Malek, A. M. (2017) Incidence and virulence characteristics of *Aeromonas* spp. in fish, *Veterinary world*, 10(1), s. 34.
- Abel, N., Rotabakk, B. T. og Lerfall, J. (2019) Effect of heat treatment and packaging technology on the microbial load of lightly processed seafood, *LWT*, 101, s. 123-129.
- Anacarso, I. *et al.* (2014) A bacteriocin-like substance produced from *Lactobacillus pentosus* 39 is a natural antagonist for the control of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in fresh salmon fillets, *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), s. 604-611. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.012>.
- André, V. (2018) GOOD PRACTICE GUIDELINES (GPG) ON NATIONAL SEAFOOD TRACEABILITY SYSTEMS, *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*, (C1150), s. 1-24.
- Aryani, D. C. *et al.* (2015) Quantifying strain variability in modeling growth of *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Food Microbiology*, 208, s. 19-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.006>.
- Ashie, I. *et al.* (1996) Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish, *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 36(1-2), s. 87-121.
- Aung, M. M. og Chang, Y. S. (2014) Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives, *Food Control*, 39, s. 172-184. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.007>.
- Baranyi, J. og Roberts, T. A. (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food, *International Journal of Food Microbiology*, 23(3-4), s. 277-294.
- Baranyi, J. (1998) Comparison of stochastic and deterministic concepts of bacterial lag, *Journal of theoretical biology*, 192(3), s. 403-408.
- Borch, E. og Molin, G. (1989) The aerobic growth and product formation of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix*, and *Carnobacterium* in batch cultures, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30(1), s. 81-88.
- 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.
- Buchanan, R. L. og Bagi, L. K. (1997) Microbial competition: effect of culture conditions on the suppression of *Listeria monocytogenes* Scott A by *Carnobacterium piscicola*, *Journal of Food Protection*, 60(3), s. 254-261.
- Cahill, M. M. (1990) Bacterial flora of fishes: a review, *Microbial ecology*, 19(1), s. 21-41.
- Calo-Mata, P. *et al.* (2008a) *Current Applications and Future Trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the Biopreservation of Aquatic Food Products*. Finnes ved 43-63.
- Calo-Mata, P. *et al.* (2008b) 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.
- Castellano, P. og Vignolo, G. (2006) Inhibition of *Listeria innocua* and *Brochothrix thermosphacta* in vacuum-packaged meat by addition of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* CRL705 and its bacteriocins, *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), s. 194-199.
- Chahad, O. B. *et al.* (2012) Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products, *Research in Microbiology*, 163(1), s. 44-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.08.005>.
- Chessa, L. *et al.* (2019) Effect of growth media on natural starter culture composition and performance evaluated with a polyphasic approach, *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), s. 152-158.
- Collins, M. *et al.* (1987) Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus,

- Carnobacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), s. 310-316.
- ComBase (2020) DMFit - How to use it Tilgjengelig fra: https://browser.combase.cc/DMFit_Help.aspx (Hentet: 10.15.2020).
- Dalgaard, P. (2000) Fresh and lightly preserved seafood, *Shelf life evaluation of foods*, s. 110-139.
- Dalgaard, P. og Koutsoumanis, K. (2001) Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models, *Journal of Microbiological Methods*, 43(3), s. 183-196. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00219-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00219-0).
- Domingo, J. L. (2007) Omega-3 fatty acids and the benefits of fish consumption: Is all that glitters gold?, *Environment International*, 33(7), s. 993-998. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.05.001>.
- Don, S. *et al.* (2018) Identification of potential spoilage bacteria in farmed shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Application of Relative Rate of Spoilage models in shelf life-prediction, *LWT*, 97, s. 295-301.
- Dykes, G. A. (1995) Bacteriocins: ecological and evolutionary significance, *Trends in ecology & evolution*, 10(5), s. 186-189.
- Ercolini, D. *et al.* (2006) Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), s. 4663-4671.
- Fall, P. A. *et al.* (2010) Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031, *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), s. 357-361. doi: doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02801.x.
- FAO (2018) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals*. Rome. Tilgjengelig fra: <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540EN.pdf>.
- Fessard, A. og Remize, F. (2017) Why are *Weissella* spp. not used as commercial starter cultures for food fermentation?, *Fermentation*, 3(3), s. 38.
- Francois, K. *et al.* (2006) Effect of environmental parameters (temperature, pH and aw) on the individual cell lag phase and generation time of *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), s. 326-335.
- Françoise, L. (2010) Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products, *Food Microbiology*, 27(6), s. 698-709.
- Gálvez, A. *et al.* (2008) Application of Bacteriocins in the Control of Foodborne Pathogenic and Spoilage Bacteria, *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), s. 125-152. doi: 10.1080/07388550802107202.
- Gálvez, A. *et al.* (2014) *Biopreservation of Seafoods Food Biopreservation*. New York, NY: Springer New York, s. 75-89.
- Gambarin, P. *et al.* (2012) *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood and potential hazards for the consumers, *International journal of microbiology*, 2012.
- Ghanbari, M. *et al.* (2013) Seafood biopreservation by lactic acid bacteria—a review, *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), s. 315-324.
- Gómez-Sala, B. *et al.* (2016) Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin, *International Journal of Food Microbiology*, 223, s. 41-49. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.005>.
- 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.
- Gorris, L. G. og Tauscher, B. (1999) Quality and safety aspects of novel minimal processing technologies, *Processing foods. Quality optimization and process assessment*, s. 325-339.
- 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(1-2), s. 79-97.
- Granum, P. E. (2015) *Matforgiftning, Smitte Gjennom Mat Og Vann*. 4. utgave. utg. Cappelen Damm AS.
- Hamilton, C. *et al.* (2002) Multichannel plating unit for high-throughput plating of cell cultures, *Biotechniques*, 33(2), s. 420-423.
- Hanlin, M. B. *et al.* (1993) Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria in Combination Have Greater Antibacterial Activity, *Journal of Food Protection*, 56(3), s. 252-255. doi: 10.4315/0362-028x-56.3.252.
- Heir, E. og Langsrud, S. (2014) Tiltak for økt kontroll med listeria i laksenæringen. Sluttrapport+ vedlegg.
- Helander, I. M., von Wright, A. og Mattila-Sandholm, T. (1997) Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria, *Trends in Food Science & Technology*, 8(5), s. 146-150.
- Helsedirektoratet (2016) *Kostrådene og næringsstoffer, kap 2.3 Fett*. Tilgjengelig fra: <https://www.helsedirektoratet.no/faglige-rad/kostradene-og-naeringsstoffer/inntak-av-naeringsstoffer/fett> (Hentet: 05.04 2020).
- Hoel, S. *et al.* (2015) Assessment of Microbiological Quality of Retail Fresh Sushi from Selected Sources in Norway, *Journal of Food Protection*, 78(5), s. 977-982. doi: 10.4315/0362-028x.Jfp-14-480.
- Hoel, S., Vadstein, O. og Jakobsen, A. N. (2017) Species distribution and prevalence of putative virulence factors in mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from fresh retail sushi, *Frontiers in Microbiology*, 8, s. 931.
- Hoel, S., Vadstein, O. og Jakobsen, A. N. (2018) Growth of mesophilic *Aeromonas salmonicida* in an experimental model of nigiri sushi during cold storage, *International Journal of Food Microbiology*, 285, s. 1-6.
- Hoel, S., Vadstein, O. og Jakobsen, A. N. (2019) The significance of mesophilic *Aeromonas* spp. in minimally processed ready-to-eat seafood, *Microorganisms*, 7(3), s. 91.
- Holzappel, W. og Wood, B. J. (2012) *The genera of lactic acid bacteria*. Springer Science & Business Media.
- Huss, H. H. (1988) *Fresh fish--quality and quality changes: a training manual prepared for the FAO/DANIDA Training Programme on Fish Technology and Quality Control*. Food & Agriculture Org.
- Illikoud, N. *et al.* (2019) Genotypic and phenotypic characterization of the food spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*, *Food Microbiology*, 81, s. 22-31.
- In, Y. W. *et al.* (2013) Antimicrobial activities of acetic acid, citric acid and lactic acid against *S. higella* species, *Journal of Food Safety*, 33(1), s. 79-85.
- Isonhood, J. H. og Drake, M. (2002) *Aeromonas* species in foods, *Journal of Food Protection*, 65(3), s. 575-582.
- Jakobsen, A. N. *et al.* (2020) Growth and spoilage metabolites production of a mesophilic *Aeromonas salmonicida* strain in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during cold storage in modified atmosphere, *Journal of Applied Microbiology*.
- 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.
- Kamboj, K., Vasquez, A. og Balada-Llasat, J.-M. (2015) Identification and significance of *Weissella* species infections, *Frontiers in Microbiology*, 6, s. 1204.
- Kilcher, S., Loessner, M. J. og Klumpp, J. (2010) *Brochothrix thermosphacta* bacteriophages feature heterogeneous and highly mosaic genomes and utilize unique prophage insertion sites, *Journal of bacteriology*, 192(20), s. 5441-5453.

- König, H. og Fröhlich, J. (2017) Lactic acid bacteria *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, s. 3-41.
- Labtools (u.å.) *E. coli Cell Culture Concentration from OD600 Calculator*. Tilgjengelig fra: <http://www.labtools.us/bacterial-cell-number-od600/> (Hentet: 30.10. 2020).
- Laursen, B. G., Leisner, J. J. og Dalgaard, P. (2006) Carnobacterium Species: Effect of Metabolic Activity and Interaction with *Brochothrix thermosphacta* on Sensory Characteristics of Modified Atmosphere Packed Shrimp, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(10), s. 3604-3611. doi: 10.1021/jf053017f.
- 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.* (1996) Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked salmon, *International Journal of Food Science & Technology*, 31(6), s. 497-504.
- Leroi, F. (2010) Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products, *Food Microbiology*, 27(6), s. 698-709.
- Leroi, F. (2011) Biopreservation of lightly preserved seafood products, *INFOFISH international*, s. 41-46.
- Leroi, F. *et al.* (2015) Selection of bioprotective cultures for preventing cold-smoked salmon spoilage, *International Journal of Food Microbiology*, 213, s. 79-87.
- Li, Q., Montalban-Lopez, M. og Kuipers, O. P. (2018) Increasing Antimicrobial Activity of Nisin-based Lantibiotics Against Gram-negative Pathogens, *Applied and Environmental Microbiology*. doi: 10.1128/aem.00052-18.
- Lianou, A. og Koutsoumanis, K. P. (2013) Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: A review, *International Journal of Food Microbiology*, 167(3), s. 310-321. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.016>.
- Lillebjerka, A. (2019) *Biokonservering-Screening av melkesyrebakterier for inhibering av patogene bakterier i sjømat*, NTNU.
- Lorentzen, G. *et al.* (2012) Viability of *Listeria monocytogenes* in an experimental model of nigiri sushi of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and salmon (*Salmo salar*), *Food Control*, 25(1), s. 245-248.
- Luis Balcázar, J. *et al.* (2006) Growth inhibition of *Aeromonas* species by lactic acid bacteria isolated from salmonids, *Microbial ecology in health and disease*, 18(1), s. 61-63.
- Lücke, F.-K. (2000) Utilization of microbes to process and preserve meat, *Meat Science*, 56(2), s. 105-115. doi: [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00029-2).
- Mamlouk, K. *et al.* (2012) Quantification of viable *Brochothrix thermosphacta* in cooked shrimp and salmon by real-time PCR, *Food Microbiology*, 30(1), s. 173-179. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.09.012>.
- Matamoros, S. *et al.* (2009) Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria, *Food Microbiology*, 26(6), s. 638-644. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.011>.
- Mataragas, M. *et al.* (2003) Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442, *Meat Science*, 64(3), s. 265-271. doi: [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00188-2).
- McClure, P. *et al.* (1993) A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*, *International Journal of Food Microbiology*, 19(3), s. 161-178.
- Mukundan, M., Antony, P. og Nair, M. (1986) A review on autolysis in fish, *Fisheries Research*, 4(3-4), s. 259-269.
- Muscolino, D. *et al.* (2014) Hygienic-sanitary evaluation of sushi and sashimi sold in Messina and Catania, Italy, *Italian Journal of Food Safety*, 3(2), s. 134-136. doi: 10.4081/ijfs.2014.1701.

- Nero, L. A. *et al.* (2006) Comparison of Petrifilm aerobic count plates and de Man–Rogosa–Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria, *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 14(3), s. 249-257.
- Nestel, P. (1990) Effects of N-3 fatty acids on lipid metabolism, *Annual review of nutrition*, 10(1), s. 149-167.
- Neyts, K. *et al.* (2000) Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods, *Letters in Applied Microbiology*, 31(5), s. 359-363. doi: doi:10.1046/j.1472-765x.2000.00828.x.
- NMKL nr. 140 (2007) Melkesyre bakterier. Bestemmelse i næringsmidler i forbindelse med bederving. Nr. 140, 2. utg.: Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler (NMKL).
- NMKL nr. 150 (2004) *Aeromonas*, mesofile arter. Bestemmelse i næringsmidler og fôr. Nr. 150, 3. utg.: Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler (NMKL).
- NMKL nr. 184 (2006) Kimtall og spesifikke fordervelseskulturer i fisk og fiskevarer. Nr. 184: Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler (NMKL).
- Nuryana, I., Andriani, A. og Lisdiyanti, P. (2019) Analysis of organic acids produced by lactic acid bacteria, i *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, s. 012054.
- Næringsmiddelhygieneforskriften (2008) *Forskrift om næringsmiddelhygiene (næringsmiddelhygieneforskriften)*. Tilgjengelig fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1623> (Hentet: 01.04 2020).
- Olsen, K. (2020) *Biokonservering- Screening av melkesyrebakterier som mulig beskyttende kultur i spiseklar sjømat* NTNU.
- Oxoid (2016) Dehydrated Culture Media Code: CM0881 - A medium for the isolation of *Brochothrix thermosphacta* from food samples *Product Detail*. Thermo Fisher Scientific Inc.
- Papadimitriou, K. *et al.* (2016) Stress physiology of lactic acid bacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), s. 837-890.
- Papathanasopoulos, M. A. *et al.* (1997) Multiple Bacteriocin Production by *Leuconostoc mesenteroides* TA33a and Other *Leuconostoc/Weissella* Strains, *Current microbiology*, 35(6), s. 331-335.
- Pilet, M.-F. og Leroi, F. (2011) Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in fresh seafood and seafood products *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation*. Elsevier, s. 324-347.
- Pin, C., de Fernando, G. D. G. og Ordóñez, J. A. (2002) Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(9), s. 4441-4447.
- Pinto, A. D. *et al.* (2012) Detection of potentially pathogenic *Aeromonas* isolates from ready-to-eat seafood products by PCR analysis, *International Journal of Food Science & Technology*, 47(2), s. 269-273.
- Provincial, L. *et al.* (2013) Survival of *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas hydrophila* in sea bream (*Sparus aurata*) fillets packaged under enriched CO₂ modified atmospheres, *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), s. 141-147.
- Remenant, B. *et al.* (2015) Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties, *Food Microbiology*, 45, s. 45-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.009>.
- Rengpipat, S., Rueangruklikhit, T. og Piyatiratitivorakul, S. (2008) Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*, *Aquaculture Research*, 39(2), s. 134-143.
- Ringø, E. og Gatesoupe, F.-J. (1998) Lactic acid bacteria in fish: a review, *Aquaculture*, 160(3-4), s. 177-203.
- Ringø, E. (1999) Lactic acid bacteria in fish: antibacterial effect against fish pathogens, *Effects of antinutrients on the nutritional value of legume diets*, 8, s. 70-75.
- Ringø, E. og Holzapfe, W. (2000) Identification and characterization of carnobacteria associated with the gills of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Systematic and applied microbiology*, 23(4), s. 523-527.

- Ringø, E. *et al.* (2001) Identification and characterization of carnobacteria isolated from fish intestine, *Systematic and applied microbiology*, 24(2), s. 183-191.
- Robinson, T. P. *et al.* (2001) The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Food Microbiology*, 70(1-2), s. 163-173.
- Rosnes, J. T. *et al.* (2003) Effects of pre-, in-, and post-rigor filleted Atlantic salmon (*Salmo salar*) on microbial spoilage and quality characteristics during chilled storage, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 12(2), s. 17-31.
- Russo, F. *et al.* (2006) Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups, *Food Microbiology*, 23(8), s. 797-802.
- Ryder, J., Iddya, K. og Ababouch, L. (2014) Assessment and management of seafood safety and quality: current practices and emerging issues, *FAO fisheries and aquaculture technical paper*, (574), s. 1.
- Schleifer, K.-H. *et al.* (1995) Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 5(8), s. 1081-1094. doi: [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00047-X](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00047-X).
- Secci, G. og Parisi, G. (2016) From farm to fork: lipid oxidation in fish products. A review, *Italian Journal of Animal Science*, 15(1), s. 124-136. doi: 10.1080/1828051X.2015.1128687.
- Serio, A. *et al.* (2014) A survey on bacteria isolated as hydrogen sulfide-producers from marine fish, *Food Control*, 39, s. 111-118.
- Sieuwert, S. *et al.* (2008) A simple and fast method for determining colony forming units, *Letters in Applied Microbiology*, 47(4), s. 275-278.
- Silva, J. *et al.* (2002) Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria, *Letters in Applied Microbiology*, 34(2), s. 77-81.
- 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.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W. K. og Rosnes, J. T. (2002) A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products—significance of microbial growth, activities and safety, *International Journal of Food Science & Technology*, 37(2), s. 107-127.
- Sivertsvik, M., Rosnes, J. T. og 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), s. 1467-1472. doi: doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb09668.x.
- Stackebrandt, E. og Jones, D. (2006) The genus *Brochothrix*, *Prokaryotes*, 4, s. 477-491.
- Stevens, K. *et al.* (1991) Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), s. 3613-3615.
- Stevens, K. A. *et al.* (1991) Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), s. 3613-3615. Tilgjengelig fra: <https://aem.asm.org/content/aem/57/12/3613.full.pdf>.
- Stiles, M. E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 70(2), s. 331-345. doi: 10.1007/bf00395940.
- Stohr, V. *et al.* (2001) Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon, *Food Research International*, 34(9), s. 797-806.
- Tacon, A. G. (2020) Trends in global aquaculture and aquafeed production: 2000–2017, *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(1), s. 43-56.
- 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.
- Tomar, O. (2019) The effects of probiotic cultures on the organic acid content, texture profile and sensory attributes of Tulum cheese, *International Journal of Dairy Technology*, 72(2), s. 218-228.
- Tornero, P. og Dangl, J. L. (2001) A high-throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 28(4), s. 475-481.

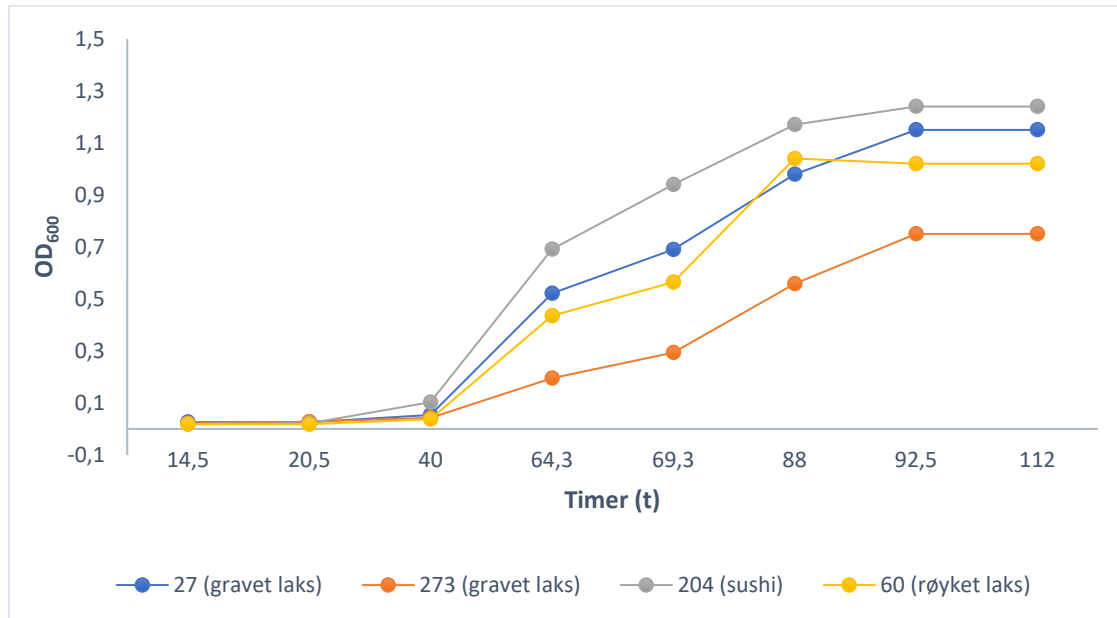
- Trondsen, T. *et al.* (2003) Perceived barriers to consumption of fish among Norwegian women, *Appetite*, 41(3), s. 301-314. doi: [https://doi.org/10.1016/S0195-6663\(03\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0195-6663(03)00108-9).
- van de Guchte, M. *et al.* (2002) Stress responses in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1), s. 187-216. doi: 10.1023/a:1020631532202.
- Vescovo, M. *et al.* (1997) Combined effects of *Lactobacillus casei* inoculum, modified atmosphere packaging and storage temperature in controlling *Aeromonas hydrophila* in ready-to-use vegetables, *International Journal of Food Science & Technology*, 32(5), s. 411-419.
- Villari, P. *et al.* (1999) A comparison of different culture media for the membrane filter quantification of *Aeromonas* in water, *Letters in Applied Microbiology*, 29(4), s. 253-257.
- Vuyst, L. D. og Vandamme, E. J. (1994) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetics and Applications*. Springer US : Imprint: Springer.
- 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.
- 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 volatilome composition, *Frontiers in Microbiology*, 10, s. 3103.
- Woraprayote, W. *et al.* (2018) Antimicrobial biodegradable food packaging impregnated with Bacteriocin 7293 for control of pathogenic bacteria in pangasius fish fillets, *LWT*, 89, s. 427-433.
- Yang, E. *et al.* (2018) Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria, *AMB express*, 8(1), s. 10.
- Yang, S.-C. *et al.* (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals, *Frontiers in Microbiology*, 5(241). doi: 10.3389/fmicb.2014.00241.
- Yost, C. og Nattress, F. (2000) The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage, *Letters in Applied Microbiology*, 31(2), s. 129-133.
- Zacharof, M. P. og Lovitt, R. W. (2012) Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article, *APCBEE Procedia*, 2, s. 50-56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>.
- Zhang, J. *et al.* (2010) Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat, *Food Control*, 21(2), s. 198-202. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.05.010>.
- Özcelik, S., Kuley, E. og Özogul, F. (2016) Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria, *LWT*, 73, s. 536-542.

Vedlegg

Oversikt over alle melkesyrebakterieisolater

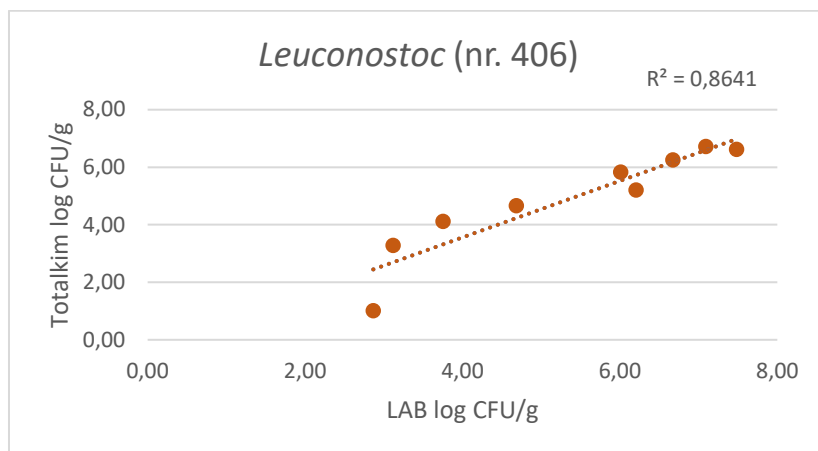
Stamme ID	Stav/kokk	Produkt	Produsent	Stamme ID	Stav/kokk	Produkt	Produsent
1	S	Røykelaks	E	214	K	Røykelaks	F
6	S	Røykelaks	E	221	S	Røykelaks	E
7	S	Røykelaks	E	227	S	Gravlaks	D
8	S	Røykelaks	H	228	S	Gravlaks	D
12	S	Røykelaks	H	232	S	Gravlaks	D
13	S	Røykelaks	H	236	S	Gravlaks	D
14	S	Røykelaks	H	237	S	Gravlaks	F
21	S	Røykelaks	H	238	S	Gravlaks	F
27	S	Gravlaks	E	245	S	Sushi	C
30	S	Gravlaks	E	246	S	Gravlaks	F
35	S	Gravlaks	E	248	S	Gravlaks	F
36	S	Gravlaks	E	257	S	Gravlaks	G
38	S	Gravlaks	E	258	S	Røykelaks	G
42	S	Røykelaks	D	259	K	Røykelaks	G
44	S	Røykelaks	D	260	S	Røykelaks	G
45	S	Røykelaks	D	265	S	Gravlaks	F
55	S	Røykelaks	D	273	S	Gravlaks	F
60	S	Røykelaks	E	292	S	Sushi	A
63	S	Sushi	A	294	S	Sushi	A
67	S	Sushi	A	298	S	Sushi	A
68	K	Sushi	A	299	K	Sushi	A
74	S	Sushi	B	301	S	Sushi	A
75	S	Sushi	B	303	S	Røykelaks	D
88	K	Sushi	B	305	S	Røykelaks	D
90	S	Røykelaks	F	306	S	Gravlaks	D
93	K	Røykelaks	F	309	S	Gravlaks	D
95	S	Røykelaks	F	312	S	Gravlaks	D
105	K	Gravlaks	D	316	S	Sushi	B
113	S	Gravlaks	D	321	S	Sushi	B
126	K	Sushi	A	327	S	Sushi	B
140	S	Sushi	B	328	S	Sushi	B
151	K	Sushi	A	340	S	Sushi	C
152	K	Sushi	A	342	K	Sushi	C
153	S	Sushi	A	344	S	Sushi	C
159	S	Røykelaks	F	345	S	Sushi	C
176	S	Røykelaks	E	346	S	Sushi	C
189	K	Røykelaks	F	357	S	Sushi	C
194	S	Røykelaks	F	358	S	Sushi	C
198	S	Sushi	A	361	S	Sushi	C
199	S	Sushi	A	368	S	Røykelaks	F
202	S	Sushi	A	384	S	Røykelaks	E
204	S	Sushi	A	388	S	Røykelaks	E
208	S	Røykelaks	E	392	S	Røykelaks	E

Stamme ID	Stav/kokk	Produkt	Produsent
396	S	Sushi	B
405	K	Sushi	B
406	K	Sushi	B
408	S	Sushi	B
420	S	Gravlaks	D
423	S	Gravlaks	D
426	S	Sushi	A
434	S	Sushi	A
443	S	Røykelaks	D
452	K	Sushi	C
455	S	Sushi	C
457	S	Sushi	C
461	S	Sushi	C
466	S	Sushi	A
468	S	Sushi	A

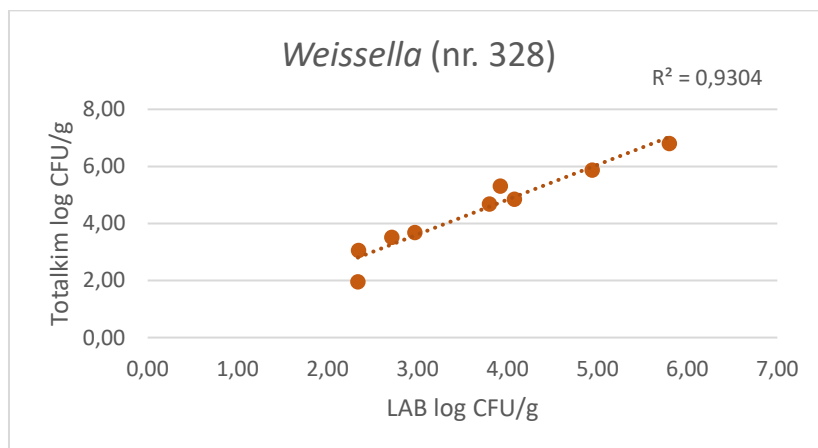
Vekstegenskaper til fire utvalgte isolater (OD₆₀₀ mot timer)

Vekstegenskaper ved 15 °C til fire utvalgte melkesyrebakterier (27, 273, 204, 60) målt ved OD₆₀₀ i en periode på 120 timer. Melkesyrebakteriene er isolert fra sushi, røyket-, og gravet laks.

Totalkim (hvite og svarte kolonier) kvantifisert på jernagar mot kimtall av melkesyre bakterier på MRS Agar



Korrelasjonen mellom variablene ($n=10$ prøvepunkt) kimtall på Jernagar og MRS Agar for inokulert prøve *Leuconostoc* (nr. 406) lagret ved 4°C i 21 dager. Lineær trendlinje og R-kvadrert verdi er lag til.



Korrelasjonen mellom variablene ($n= 10$ prøvepunkt) kimtall på Jernagar og MRS Agar for inokulert prøve *Weissella* (nr. 328) lagret ved 4°C i 21 dager. Lineær trendlinje og R-kvadrert verdi er lag til.

