

Produksjonshygiene og holdbarhet av islagret pre-rigor laksefilet

Sluttrapport – FHF-prosjekt 900938

Solveig Langsrud





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

Nofima har om lag 350 ansatte.

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

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsen gate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

	ISBN: 978-82-8296-***-* (trykt) ISBN: 978-82-8296-***-* (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Produksjonshygiene og holdbarhet av islagret pre-rigor laksefilet Sluttrapport – FHF-prosjekt 900938	<i>Rapportnr.:</i> 24/2015 <i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Solveig Langsrud	<i>Dato:</i> 1. juni 2015
<i>Avdeling:</i> Trygg og holdbar mat	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 66
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> 900938
<i>Stikkord:</i>	<i>Prosjektnr.:</i> 10667
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i>	
<p>Målet med prosjektet var å bygge opp et kunnskapsgrunnlag for å oppnå lenger og mer stabil holdbarhet på islagret laks. Mikrobiologisk vekst, sensoriske endringer og forbrukeropfatning av laksefilet som var tilsatt ulike kvalitetsreducerende bakterier og deretter lagret på is ble undersøkt. <i>Pseudomonas</i>, <i>Photobacterium</i> og <i>Shewanella</i> vokste opp og kunne redusere kvaliteten til islagret filet. For kokt laks fant man ikke signifikante negative utslag for liking hos forbrukere selv ved høye bakterietall (opp til 10⁹ kolonidannende enheter (kde) per gram). Dette til tross for at sensoriske analyser viste en rekke endringer i lukt og smak man anser som negative. De sensoriske endringene over tid var større for rå laks. God hygienisk kvalitet ga ikke økt vekst av <i>Listeria monocytogenes</i> på islagret filet. Videre ble det tatt renholdsprøver i to fileteringsbedrifter for å finne smittekilder for kvalitetsødeleggende bakterier. Undersøkelsene viste at smitte med <i>Pseudomonas</i> og muligens også <i>Shewanella</i> kan være knyttet til utilstrekkelig renhold eller for sjelden bytte av vann i tanker, mens <i>Photobacterium</i> kommer primært fra råvaren.</p> <p>Laksefilet kunne maksimalt ha en holdbarhetstid på 18 dager på is, selv ved lave starttall for totalchim (<100 kde/gram) og <i>Listeria monocytogenes</i> (8 kde/gram) og ved optimale lagringsforhold. Det er viktig å merke seg at ved tilgang til oksygen eller økning i temperatur vil bakterieveksten øke signifikant og dermed redusere holdbarheten. I og med at viktige kvalitetsreducerende bakterier og <i>Listeria monocytogenes</i> kan smitte fra produksjonsmiljøet vil en god hygiene kunne bidra til å opprettholde eller øke holdbarheten til norsk laks. Prosjektet har gitt informasjon næringsaktørene kan bruke til å fastsette riktig holdbarhetstid på sine produkter og arbeide for å øke denne. Dette kan bidra til produkter med bedre kvalitet til forbruker, øke inntjeningen og redusere tap i form av svinn.</p>	

English summary/recommendation:

The aim of the project was to increase the knowledge needed to obtain more stable quality of norwegian ice-stored salmon fillet. Microbiological growth, sensory changes and consumers' acceptance of salmon fillet added different potential spoilage bacteria was investigated. *Pseudomonas*, *Photobacterium* and *Shewanella* were identified as the most important spoilers. For heat treated salmon, no significant reduction in consumers' acceptance were found during storage even at high bacterial numbers, (up to 10^9 cfu/gram). However, results from sensory descriptive analysis showed increased intensity of negative odor/flavor attributes in corresponding fillet. Changes in sensory attributes were more dominating for raw salmon fillet than for heat treated. A higher hygienic quality did not lead to higher growth of *Listeria monocytogenes* on ice-stored salmon. It is important to point out the fact that the bacterial numbers in fillet with the same treatment showed variation. This will also influence the relationship between microbiological growth, sensory changes and consumer acceptance.

Two salmon production plants were visited and samples were taken after cleaning to find sources for spoilage bacteria in the production environment. The results showed that *Pseudomonas*, and partly *Shewanella* may survive the cleaning process and contaminate the raw materials. *Photobacterium* was primarily isolated from the raw material.

The maximum shelf life of ice-stored salmon fillet was 18 days even at low bacterial numbers (<100 cfu/gram) and *Listeria monocytogenes* (8 kde/gram) at the start of the storage period and optimal storage conditions. Increased oxygen availability or temperature increased the bacterial growth and reduced the shelf life. Since important spoilage bacteria and *Listeria monocytogenes* in the production environment may contaminate the raw materials better hygiene will lead to a more stable and for some producers, longer shelf life.

The knowledge obtained in the project make it easier for producers to predict shelf life of their own products and to improve the microbial quality of salmon.

Innhold

1	Innledning.....	1
2	Problemstilling og formål	2
3	Resultater, diskusjon og konklusjon.....	3
3.1	Mål 1: Bestemme hva som er potensialet for å øke holdbarhet	3
3.2	Mål 2: Finne ut sammenhengen mellom ferskhet slik forbrukeren oppfatter det (lukt og smak), lagringstid og oppvekst av forringelsesbakterier.....	4
3.3	Mål 3: Finne ut hvor i produksjonsprosessen man vil ha størst effekt av å sette inn tiltak for å hindre smitte med problembakterier	4
4	Nytteverdi og mulig videre anvendelse av resultater	6

Vedlegg 1 - Delrapport 1

Vedlegg 2 - Delrapport 2

1 Innledning

Pre-rigor filetert laks har et godt utgangspunkt med hensyn til ferskhet. Likevel vil vekst av mikroorganismer, som er en hovedårsak til kvalitetstap av fersk fisk, påvirke produktets holdbarhet. Målet med dette prosjektet var å skaffe mer kunnskap om sammenhengen mellom bakterienivå og -sammensetning, sensoriske endringer og forbrukeroppfatning av laksefilet. Videre skulle det undersøkes hvor i prosessen laksefilet blir smittet med uønskede bakterier.

Totalrammen for prosjektet var 4.015 mill NOK og ble ledet av Solveig Langsrud ved Nofima. En tverrfaglig gruppe av forskere (Trond Møretrø (ansvar AP5), Even Heir (ansvar AP3), Mats Carlehøg (ansvar sensorisk panel), Anlaug Ådland Hansen (ansvar AP1 og2), Birgitte Moen (ansvar bakteriesamfunnsanalyser), Margrethe Hersleth (ansvar forbrukerstudier) og Per Lea (ansvar statistikk) og laboratoriepersonale (Signe Drømtorp, Janina Berg, Merete Rusås Jensen, Elin Røssvoll, Tove Maugesten, Marius Normann, Ida Kasbo og Anette W. Aasli) var involvert i prosjektet. Videre bidro to laksebedrifter med råvarer og ved prøvetaking i produksjonsmiljø. Styringsgruppen besto av Hanne Tobiassen (Salmar), Rudi Jakobsen (Lerøy) og Kurt Olav Oppedal (Marine Harvest). Kristian Prytz var observatør fra FHF.

2 Problemstilling og formål

Prosjektet skulle gi filetprodusentene et bedre kunnskapsgrunnlag for å beregne holdbarheten til sine produkter og forbedre produksjonshygiene. Dette for å oppnå mer stabil spisekvalitet, økt holdbarhetstid og økt lønnsomhet.

Hovedmål: Kunnskapsgrunnlag for å oppnå lenger og mer stabil holdbarhet til islagret laks

1. Bestemme hva som er potensialet for å øke holdbarhet

- Hvor lang holdbarhetstid er det mulig å oppnå for islagret laksefilet ved optimal hygienisk behandling? Hvilket bakterienivå er akseptabelt ved produksjonsdagen for å oppnå en viss holdbarhetstid?
- Begrenses holdbarhet ved ekstremt god hygiene av forringelsesbakterier eller *Listeria monocytogenes*?

2. Finne ut sammenhengen mellom ferskhet slik forbrukeren oppfatter det (lukt og smak), lagringstid og oppvekst av forringelsesbakterier

- Hvilke bakterier påvirker i størst grad spisekvalitet?
- Hvilke endringer i smak og lukt forårsakes av kvalitetsforringende bakterier?
- Ved hvilket bakterienivå vil forbrukere flest reagere på endret smak/lukt?

3. Finne ut hvor i produksjonsprosessen man vil ha størst effekt av å sette inn tiltak for å hindre smitte med problembakterier

- Hva er de viktigste smittetilstandene for ulike kvalitetsreduserende bakterier? Råvarene eller produksjonsmiljøet
- I hvilke nisjer i produksjonsutstyret finnes mest forringelsesbakterier?
- Hvilken mikrobiologisk metode bør brukes for overvåking av produksjonsmiljøet? Totalkim eller spesifikke forringere?

3 Resultater, diskusjon og konklusjon

Detaljer om gjennomføring og resultater kan finnes i Vedlegg 1 og 2.

3.1 Mål 1: Bestemme hva som er potensialet for å øke holdbarhet

Spørsmål: *Hvor lang holdbarhetstid er det mulig å oppnå for islagret laksefilet ved optimal hygienisk behandling? Hvilket bakterienivå er akseptabelt ved produksjonsdagen for å oppnå en viss holdbarhetstid?*

Selv ved en meget god hygiene og god temperaturkontroll vil skinnfri laksefilet som er svøpt i plast og lagret på is maksimalt kunne ha en holdbarhetstid på opptil 18 dager. Dette forutsetter et lavt startnivå av forringelsesbakterier (< 100 kde/gram). Det er lagt til grunn i analysen at forbrukere ikke skal reagere negativt på dårlig kvalitet på råvaren (<10⁸ kde/gram eller lagringstid under 20 dager) ved holdbarhetstidens utløp.

Dersom man legger til et krav om at nivået av *Listeria monocytogenes* skal være under grenseverdien for ferdigmat (100 kde/gram) kan man ha en holdbarhetstid på opptil 18 dager dersom man har et utgangspunkt på mindre enn 8 kde/gram *Listeria monocytogenes*.

Betingelsene for holdbarhetstiden som angis her er en god temperaturkontroll og at filetene ikke eksponeres direkte for luft. Ved økt temperatur (>0°C) og tilgang på luft vil man få en rask økning i bakterievekst. Dette kan f.eks. være tilfelle i kjøledisk eller hos forbruker.

Spørsmål: *Begrenses holdbarhet ved ekstremt god hygiene av forringelsesbakterier eller Listeria monocytogenes?*

Å forbedre produksjonshygiene slik at man får et lavere nivå av forringere vil ikke føre til økt vekst av *Listeria monocytogenes* på islagret laksefilet. Bedre produksjonshygiene vil altså ikke redusere *Listeria*-holdbarheten. Derimot kan man oppnå lavere startnivåer av forringelsesbakterier og samtidig redusere faren for *Listeria*-smitte. Dette vil gi en lenger holdbarhetstid, både med tanke på sensoriske egenskaper og mattrygghet.

Listeria monocytogenes kan vokse på islagret laksefilet og ved høy smitte (>10 kde/gram) kan *Listeria*-nivået nå grenseverdien på 100 kde/gram før forbrukere oppfatter laksen som sensorisk uakseptabel. Det kan ikke utelukkes at man under visse betingelser som ikke er undersøkt her kan oppnå hemming av *Listeria*-vekst gjennom bakgrunnsfloraen, men dette er ikke et argument for å opprettholde en dårlig hygiene og et sensorisk akseptabelt produkt er ikke nødvendigvis trygt. Ubrutt kjølekjede som holder seg nær 0 °C og å unngå eksponering for luft er helt vesentlig for å unngå rask vekst av *L. monocytogenes* i rå laksefilet. Det må understrekes at *Listeria*-forsøkene ble gjort med en blanding av flere ulike stammer og at forsøkene på noen vis er «worst case scenario».

3.2 Mål 2: Finne ut sammenhengen mellom ferskhet slik forbrukeren oppfatter det (lukt og smak), lagringstid og oppvekst av forringelsesbakterier

Spørsmål: Hvilke bakterier påvirker i størst grad spisekvalitet? Hvilke endringer i smak og lukt forårsakes av kvalitetsforringende bakterier?

Tre typer bakterier som ofte forekommer på islagret laksefilet og som kan gi merkbare endringer i lukt er:

<i>Photobacterium</i>	ved ca 107 kde/gram:	Fermentert, Ammoniakk, Emmen
<i>Pseudomonas</i>	ved ca 109 kde/gram:	Kjemikalie, Gjær, Stikkende
<i>Shewanella</i>	ved ca 108 kde/gram:	Harsk, brygge
	ved ca 109 kde/gram:	Fermentert, Ammoniakk, Emmen

Ingen av disse bakteriene er sykdomsfremkallende for mennesker.

Spørsmål: Ved hvilket bakterienivå vil forbrukere flest reagere på endret smak/lukt?

Det er ikke noe entydig svar på ved hvilket bakterienivå forbrukere vil reagere negativt på kvalitet av laksefilet. Bakterienivåer opp til 10^9 kde/gram fører ikke til signifikante negative utslag for liking eller kjøpsvillighet til kokt laks. For lukt av rå laks kan forbrukerne reagere negativt på bakterienivåer på 10^7 kde/gram. Det er viktig å presisere at det var stor variasjon i bakterieinnhold i laksefileter med samme behandling noe som påvirker resulater for sammenhengen mellom bakterietall, sensoriske egenskaper og forbrukeres bedømmelse. I denne undersøkelsen hadde man i spørsmålsstillingen til forbrukere som utgangspunkt at rå laks var tiltenkt spist varmebehandlet. Smak og lukt av rå laks, f eks for bruk til sushi ble ikke undersøkt.

3.3 Mål 3: Finne ut hvor i produksjonsprosessen man vil ha størst effekt av å sette inn tiltak for å hindre smitte med problembakterier

Spørsmål: Hva er de viktigste smittekildene for ulike kvalitetsreducerende bakterier, råvarene eller produksjonsmiljøet?

- ***Photobacterium phosphoreum*** er en marin bakterie som finnes på levende laks og i noen grad sjøvann. *Photobacterium* overlever ikke renhold og etablerer seg ikke i produksjonsmiljøet. Viktigste smittekilde for denne bakterien på laksefilet er altså råvaren.
- ***Pseudomonas*** er en miljøbakterie som man også kan finne på levende laks og vann, men i lave antall. *Pseudomonas* overlever renhold og finnes på de fleste kontaktflater på maskiner/utstyr, noen ganger i meget høye antall. Viktigste smittekilde for denne bakterien på laksefilet er altså kontaktflater i produksjonsmiljøet som ikke er tilstrekkelig rengjort.
- ***Shewanella*** er en marin bakterie som finnes på levende laks. *Shewanella* forekommer relativt hyppig i utblødnings/lagringstanker og på kontaktflater i produksjonsmiljøet etter renhold, særlig i slakteavdelingen. Lagringstanker for oppbevaring av laks etter sløyning kan

være en mulig smittekilde, men om råvaren eller produksjonsmiljøet er viktigste smittekilde er usikkert.

Spørsmål: I hvilke nisjer i produksjonsutstyret finnes mest forringelsesbakterier?

Det var høyere nivåer kvalitetsreduserende bakterier i slakteriet enn i filetavdelingen. Dette kan skyldes et våtere miljø og mer smuss, noe som fører til høyere krav til renholdet for å komme ned i et akseptabelt bakterienivå. Det ble funnet relativt høye bakterietall i utblødningstank og lagringstanker med laks. Overvåking og oftere vannbytte anbefales. Transportører, filetmaskin og prismer fra sløyemaskin var problemområder med høye bakterietall (> 300 kde/cm²). Gulvrelaterte prøver har også høyt bakterienivå, men her er smitte til produkt mindre sannsynlig.

- **Pseudomonas** dominerte på produksjonsutstyr og finnes i de fleste renholdsprøver med høye totaltall.
- **Shewanella** fantes først og fremst på problempunkter i slakteavdelingen samt i utblødnings/lagringstanker. Det er usikkert om det er stor overføring av *Shewanella* fra laks til utstyr eller om *Shewanella* overlever spesielt godt på dette utstyret.
- **Photobacterium** overlever ikke et normalt renhold

Spørsmål: Hvilken mikrobiologisk metode bør brukes for overvåking av produksjonsmiljøet? Totalkim eller spesifikke forringere?

Det er mangel på gode og enkle metoder for å påvise spesifikke forringere, men totalkim for psykrotrofe bakterier vil i de fleste tilfeller gi et godt svar på nivået av forringelsesbakterier i produksjonsmiljøet.

4 Nytteverdi og mulig videre anvendelse av resultater

Prosjektet vil gi filetprodusentene et bedre kunnskapsgrunnlag for å beregne holdbarheten til sine produkter og evt øke holdbarheten gjennom bedre produksjonshygiene. Dette kan gi mer stabil spisekvalitet, økt holdbarhetstid og økt lønnsomhet. En stabil og sikker kjølekjede med lav temperatur er en forutsetning for at funnene i dette prosjektet skal kunne oppnås i praksis.

Det har vært et problem at filetprodusenter ikke har kjent til sammenhengen mellom de interne mikrobiologiske grenseverdier og forbrukernes forventninger til spisekvalitet. Dette gjorde det vanskelig å fastslå om dagens mikrobiologiske og sensoriske grenseverdier er riktige. Prosjektet har gitt informasjon om hvordan ulike bakterier forringer laksen og ved hvilke bakterienivåer forbrukere vil reagere på lukt og smak av produkt. Videre har man fått anslag på holdbarhetstid ved gitte startnivåer av bakterier, både kvalitetsforringende bakterier og *Listeria monocytogenes*. Brukt riktig vil disse dataene kunne bidra til riktigere holdbarhetsfastsettelse for laksefilet lagret på is. Dette vil gjøre at kundene får tryggere produkter med bedre spisekvalitet og det kan gi mindre svinn.

Videre har man i prosjektet sett på potensialet for å øke holdbarhetstiden til islagret filet utover det som er dagens nivå hos en del produsenter. Resultatene indikerer at ved å oppgradere renholdet, særlig i slakteavdeling og på punkter som er vanskelig å holde rene (transportører, sløyemaskiner, filetmaskin) og ved oftere bytte av vann i tanker, kan man redusere mikrobiologisk nivå i produkt og dermed forlenge holdbarheten. *Photobacterium phosphoreum*, som er en kjent forringer både av laks som er pakket ved modifisert atmosfære, og islagret laks, ser ikke ut til å overleve ordinært renhold. For å redusere denne på filet må man finne produksjonsmetoder der man unngår all kontakt mellom skinn/tarm og fiskekjøtt. Dette kan danne utgangspunkt for videre arbeid innen hygienisk design.

Et estimat gjort ved oppstarten av prosjektet indikerte at man ved å øke holdbarhetstiden med tre dager kan føre til en besparelse på 415 mill/per år for innenlandsmarkedet alene gjennom redusert svinn. Kan norske laksebedrifter øke holdbarhetstiden fra 15 til 18 dager som indikert av prosjektresultatene kan man altså forvente signifikante besparelser.

Produksjonshygiene og holdbarhet av islagret pre-rigor laksefilet

Solveig Langsrud

Medforfattere: Mats Carlehøg, Anlaug Ådland Hansen, Even Heir, Margrethe Hersleth, Per Lea, Birgitte Moen

Forord

Denne rapporten omhandler resultater fra deler av prosjektet «Produksjonshygiene og holdbarhet av pre-rigor laksefilet» finansiert av FHF. Arbeidet ble gjennomført i perioden 2013-2014 ved Nofima. Prosjektet ble ledet av Solveig Langsrud. En rekke forskere (*Even Heir, Anlaug Ådland Hansen, Margrethe Hersleth, Mats Carlehøg, Per Lea, Birgitte Moen*) samt en styringsgruppe med representanter fra laksenæringen og FHF (*Kurt Olav Oppedal, Hanne Tobiassen, Rudi Jakobsen, Kristian Prytz*) var involvert i planlegging og vurderinger av resultater.

Sammendrag

Målet med arbeidet var å bygge opp et kunnskapsgrunnlag for å oppnå lenger og mer stabil holdbarhet på islagret laks. Resultatene viste at bakterier på laks med størst forringelsespotensiale var *Pseudomonas*, *Photobacterium* og *Shewanella*. I konkurranse med hverandre hadde de to førstnevnte bakteriene størst betydning for kvalitet.

Ved lave starttall på totalkim (<100 kde/gram) og kontroll på temperatur (<0.5°C) kunne laksefilet ha en sensorisk holdbarhetstid på opp imot 18 dager. For kokt laks førte ikke bakterienivåer opp til 10⁹ kolonidannende enheter (kde) per gram til negative utslag for liking eller kjøpsvillighet hos forbrukere. Dette til tross for at sensoriske analyser viste en rekke endringer i lukt og smak man anser som negative (luft: fermentert/emmen/ammoniakk/kjemikalie; smak: fermentert/emmen). De sensoriske endringene over tid var større for rå laks enn kokt laks. Emmen og fermentert lukt slo ut allerede ved bakterietall på 10⁷ kde/gram og ammoniakk/stikkende/gjør/kjemikalielukt ved 10⁸ kde/gram. Forbrukerne vurderte derfor kvaliteten til samme laksefilet som lavere før koking enn etter: Kvaliteten ble vurdert som redusert ved bakterietall på 10⁸ kde/gram eller ved en lagringstid på 20 dager.

Undersøkelser viste videre at en god hygienisk kvalitet ikke førte til økt vekst av *Listeria monocytogenes* på fileten. Ved *Listeria*-tall under 8 kde/gram ved produksjon vil svøpt islagret fileten tilfredsstillende tilfredsstillende kravene til *Listeria*-holdbarhet til ferdigmat (< 100 kde/gram) i opptil 18 dager. Det er imidlertid viktig å merke seg at ved tilgang til oksygen eller økning i temperatur vil veksthastigheten til *Listeria* øke signifikant.

En god hygienisk kvalitet kan gi lenger holdbarhetstid, både med tanke på smak/luft og trygghet.

1. Mål

Målet med prosjektet var å bygge opp et kunnskapsgrunnlag for å oppnå lenger og mer stabil holdbarhet til islagret laks.

2. Hva er sammenhengen mellom ferskhet slik forbrukeren oppfatter det (lukt og smak), lagringstid og oppvekst av forringelsesbakterier

- Hvilke bakterier påvirker i størst grad spisekvalitet og hvilke endringer i smak og lukt forårsaker de?
- Ved hvilket bakterienivå vil forbrukere flest reagere på endret smak/lukt?

3. Hva er potensialet for å øke holdbarhet til islagret filet?

- Vil en økt hygiene gi fare for økt oppvekst av *Listeria monocytogenes*?
- Hvor lang holdbarhetstid er det mulig å oppnå for islagret laksefilet ved optimal hygienisk behandling?
- Hvilket bakterienivå er akseptabelt ved produksjonsdagen for å oppnå en viss holdbarhetstid?

2. Gjennomføring

For detaljer, se vedlegg 1.

«*Optimalhygiene*». Refererer til håndsløyd laks som var filetert for hånd ved Nofima under høye hygieniske betingelser.

«*Tilsatt forringere*». Refererer til laksefilet tilsatt 10^4 cfu/gram av en blanding av forringelsesbakterier før lagring.

«*Industrielt produsert filet*» Referer til laksefilet filetert og skippet i en produksjonsbedrift

Arbeidspakke 1: Identifisering og karakterisering av bakterieflora fra islagret pre-rigor laksefilet

Identifisering av bakteriestammer: Et utvalg av bakterier fra laksefilet etter 10 dagers lagring på is (innsamlet i forprosjekt) ble identifisert ved sekvensering av 16S rDNA og søk i sekvensdatabaser. Det ble valgt 12 bakterieisolater (tilhørende 6 slekter) for måling av forringelsepotensiale.

Kartlegging av forringelsepotensiale: De ulike bakteriene ble påført laks filetert ved høy hygiene (håndfiletert ved Nofima) til en konsentrasjon på 10^4 kde/gram (kolonidannende enheter per gram). Filetene ble svøpt i blåplast og lagret på is (og på 0°C kjølerom). Det ble tatt ut prøver til mikrobiologisk og sensorisk analyse etter ulike lagringstider. Det ble valgt ut prøver som hadde ca 10^7 , 10^8 og 10^9 kde/gram (dersom de vokste opp til denne konsentrasjonen) i tillegg til filet som ikke var tilsatt bakterier.

Effekt av fryseprosess på sensoriske parametere. Filet (små biter for rask fryse- og tineprosess) ble oppbevart i 12 dager vakuumpakket, fryst og tint igjen (halvparten av filetene) samme dag og analysert sensorisk (lukt). Det ble også gjort samme test med fileter påført bakterier.

Arbeidspakke 2: Holdbarhetsbegrensing ved forringelse

Fem isolater (3 slekter) valgt ut etter analysene i AP1 ble tilsatt enkeltvis i en konsentrasjon på 10^4 kde/gram til optimalhygiene laksefilet. Noen prøver ble tilsatt en blanding av bakteriene. Filetene ble svøpt i plast og lagret på is. Bakterieveksten målt i en tre ukersperiode. Ved hvert uttak ble også

fileter vakuumpakket og fryst ned til sensorisk analyse. Det ble gjennomført en objektiv, sensorisk analyse ved Nofimas sensoriske panel på Ås av rå, islagret laksefilet etter lagringstidspunkter som ga 10^7 (kun *Photobacterium*), 10^8 og 10^9 kde/gram. 14 sensoriske egenskaper (lukt) ble bedømt av 8 trente sensoriske dommere.

Arbeidspakke 3: *Listeria*-holdbarhet ved økt produksjonshygiene

Evne til vekst og veksthastighet av *L. monocytogenes* i laksefilet med ulik hygienisk kvalitet ble undersøkt ved bruk av belastningsforsøk. Det ble benyttet metodikk i henhold til anbefalinger gitt av referanse- laboratoriet for *L. monocytogenes* i EU (The EU Community Reference Laboratory (CRL) for *L. monocytogenes*). Ti stammer av *L. monocytogenes* ble valgt ut, hvorav seks isolert fra laksenæringen. Laks som var filetert ved optimal hygiene og industrielt produsert laks ble tilsatt ca 100 cfu/g *L. monocytogenes*. Parallelt ble laksefilet påført en blanding av forringelsesbakterier (10^4 cfu/g) og 100 cfu/g *L. monocytogenes*. Kontrollfileter var filet med optimalhygiene og industrielt filetert laks som ikke var tilsatt bakterier. Filetene ble lagret på is (noe prøver etterfulgt av lagring ved 8 °C) og bakterieveksten (totaltall og *L. monocytogenes*) målt ved bruk av referansemetodikk (ISO 11290-1).

Arbeidspakke 4. Forbrukervurdering av holdbarhet

Laksefileter (optimalhygiene + tilsatt forringere) ble svøpt i blåplast og lagret på is i isoporkasser. Det ble fryst ned fileter ved flere lagringstidspunkter (7, 11, 13 og 18 dager lagring på is for laks tilsatt bakterier og 11,18, 20, 22, 25, 27 og 32 dager lagring på is for optimalhygienelaks). Prøver som ga bakterienivåer på ca 10^7 , 10^8 og 10^9 cfu/g ble valgt ut for bakteriesamfunnsanalyser, sensorisk analyse og forbrukertest. Som en kontroll med lave bakterietall ble det benyttet laksefilet lagret i 10 dager, hvor bakterietallet var kommet opp i 10^4 kde/gram.

- *Sensorisk analyse*: En beskrivende test, QDA (ISO 13299:2003 General Guidance for establishing a sensory profile) ble benyttet. Sensoriske egenskaper (lukt på rå laks, smak og lukt på kokt laks) ble bedømt av 9 trente sensoriske dommere. Egenskapene ble bedømt på en skala fra 1 til 9 hvor 1 er ingen intensitet og 9 er høy intensitet. Variansanalyser (ANOVA) og multivariate analyser ble benyttet for analyser.
- *Forbrukertest*: For å kunne få et mål på holdbarheten til pre-rigor filetert laks tilsatt ulike forringelsesbakterier, ble det gjort en forbrukertest (80 forbrukere) hvor forbrukerne var spurt om aksept og kjøps/bruksvillighet. Rå (lukt) og varmebehandlet (lukt og smak) laksefilet ble bedømt etter ulik lagringstid.

3. Resultater og diskusjon

3.1 Hvilke bakterier påvirker i størst grad spisekvalitet og hvilke sensorisk endringer forårsaker de?

Konklusjon

Tre typer bakterier som ofte forekommer på islagret laksefilet og som kan gi merkbare endringer i lukt er:

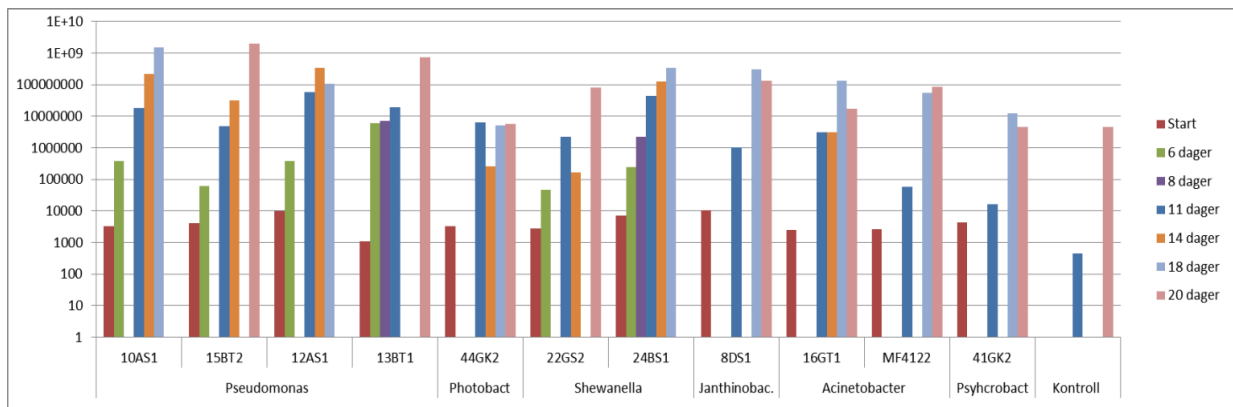
<i>Photobacterium</i>	ved ca 10^7 kde/gram:	Fermentert, Ammoniakk, Emmen
<i>Pseudomonas</i>	ved ca 10^9 kde/gram:	Kjemikalie, Gjær, Stikkende
<i>Shewanella</i>	ved ca 10^8 kde/gram:	Harsk, brygge
	ved ca 10^9 kde/gram:	Fermentert, Ammoniakk, Emmen

Det ble innledningsvis undersøkt forringelsespotensialet til 11 ulike bakterier som var funnet på islagret laks i en tidligere undersøkelse. Bakteriestammene ble tilsatt laksefilet enkeltvis og veksten fulgt gjennom lagring på is (Figur 1). Det var store forskjeller mellom bakteriene: Noen vokste relativt fort opp til høye bakterietall (f eks *Pseudomonas*) mens andre vokste langsommere og kom ikke opp til høye tall (f. eks *Psychrobacter*).

Videre ble utvalgte prøver undersøkt sensorisk (15 egenskaper på lukt, se vedlegg 1.1). Ved å sammenlikne luktprofil opp mot bakterietall var det mulig å finne hvilke bakterier som i størst grad reduserte kvaliteten. Plott som illustrerer hvilke sensoriske endringer som var relatert til hvilke bakterier er vist i vedlegg 1.2.

I sensoriske undersøkelser og forbrukertest ble det av praktiske årsaker benyttet fryst filet som var tint over natt på kjølerom. Effekten av fryseprosess på sensoriske parametere ble undersøkt på råstoff etter 12 dagers islagring. 19 sensoriske egenskaper som beskrev lukt, farge, utseende og tekstur ble undersøkt og resultatet viste at fryseprosessen ikke hadde en betydelig påvirkning på sensorisk kvalitet.





Figur 1 Bakterievekst på laksefilet tilsatt ulike bakterier og lagret på is. Figuren viser antall bakterier per gram filet.

Forsøket ble gjentatt med et utvalg av stammer og ga liknende resultater. Figur 2 viser vekstforløp og tidspunkt for sensoriske endringer for tre ulike bakterier (*Pseudomonas*, *Shewanella* og *Photobacterium*). Det var variasjoner mellom ulike stammer innenfor samme bakterietype og de mest kvalitetsødeleggende isolatene er vist.

Fra resultatene sett under ett (Vedlegg 1.2, Figur 1 og 2) ble det konkludert med at *Pseudomonas*, *Photobacterium* og *Shewanella* er de bakteriene som har størst potensiale for å gi en negativ lukt på islagret filet:

Pseudomonas Tre av *Pseudomonas*-stammene nådde opp til en meget høy sluttkonsentrasjon (10^9 kde/g). I det første forsøket ga noen *Pseudomonas*-stammer en syrlig lukt (10^7 kde/g) og en stamme gjær/kjemikalie/stikkende lukt (10^9 /g).

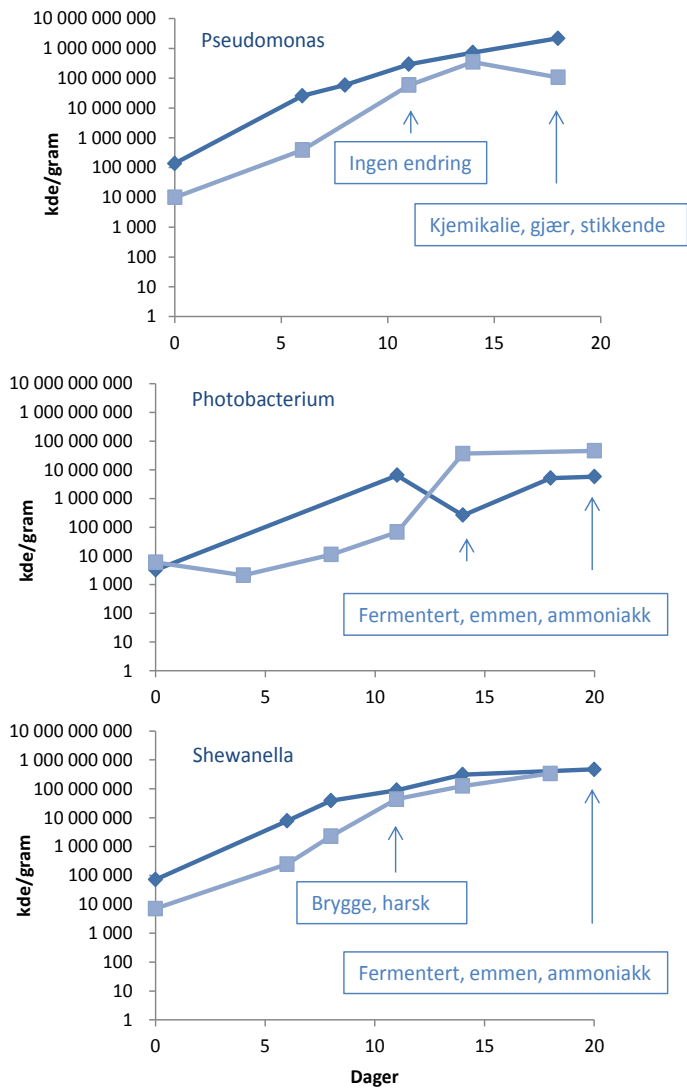
Photobacterium Bakterien vokste raskt, men veksten stoppet når den nådde et nivå på om lag 10^7 kde/g. *Photobacterium* ga en kraftig sensorisk endring (fermentert lukt, emmen lukt, ammoniakk lukt) selv ved relativt lave bakterietall (underkant av 10^7 kde/g).

Shewanella vokste noe saktere enn *Pseudomonas* og ga en bryggelukt og harsklukt ved et celletall på 10^8 kde/gram.

Acinetobacter er i slekt med *Pseudomonas*, men ikke ofte assosiert med forringelse av mat. Sensorisk ga den samme syrlige lukt som en del som *Pseudomonas*-stammer ved et celletall på 10^8 kde/gram, men siden den vokste saktere kom dette utslaget flere dager senere.

Psychrobacter* og *Janthinobacterium: Prøvene tilsatt disse bakteriene liknet kontrollprøven.

Psychrobacter vokste tilsynelatende ikke opp på laksefilet, mens *Janthinobacterium* vokste, men ga ikke sensoriske endringer.



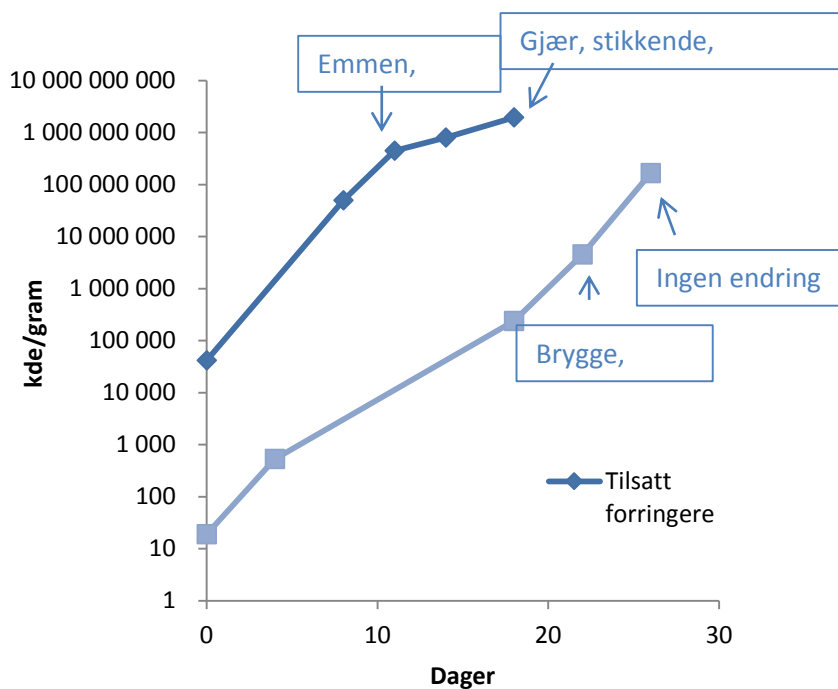
Figur 2 Vekst av tre ulike bakteriestammer på islagret laksefilet. Det er angitt tidspunkt der man fant sensoriske endringer på fileter som var tilsatt bakterier. Resultat av to uavhengige gjentak er vist.

Det ble også undersøkt hvordan en blanding av bakteriene ga sensoriske endringer (Figur 3). Etter 18 dagers lagring var bakterietallet kommet opp i 10^9 kde/g og sensorisk analyse viste en luktprofil typisk for *Pseudomonas*. Bakteriesamfunnsanalyse bekreftet at det var *Pseudomonas* som dominerte på fileten. For fileten som var behandlet ved optimal hygiene fant man få sensoriske endringer, selv etter 24 dagers lagring på is og et bakterietall på om lag 10^9 kde/gram. En analyse av bakteriesammensetningen viste at *Pseudomonas* dominerte i fileten.

Pseudomonas forringer mange typer mat. Den er kjent for å være nøysom, vokse ved lave temperaturer og danne biofilm på produksjonsutstyr. *Pseudomonas* vokser best i nærvær av luft, men noen stammer kan også vokse under vakuum.

Photobacterium phosphoreum er en selvlysende marin bakterie som lever i havvann og ofte i symbiose med marine organismer. Bakterien vokser ved kjøletemperaturer, krever salt for å vokse, er CO_2 -tolerant og tåler ikke frysing. Den er en kjent forringer av sjømat, særlig ved lagring uten luft.

Shewanella putrefaciens/baltica er en marin bakterie som er regnet som den viktigste forringelsesbakterien på islagret hvit fisk. Bakterien vokser ved



Figur 3 Bakterievekst på filet som er behandlet ved optimal hygiene (håndfiletert) og fileter tilsatt en blanding forringende bakterier. Viktige luktendringer sammenliknet med kontrollfilet (10 dager, ikke tilsatt bakterier) er angitt.

En begrensning ved denne studien er antall stammer som ble undersøkt. Det kan ikke utelukkes at resultatene ville være noe annerledes om stammevalget hadde vært et annet. For eksempel viste senere forsøk at når det ble benyttet pakkemetodikk nærmere industriell pakking av laks der lufttilgangen var dårligere (fileter lå tett mot hverandre), vokste *Pseudomonas* dårligere og *Photobacterium* bedre. Resultatene er i overensstemmelse med det man har funnet for andre typer fisk og for rund laks, og det ble konkludert med at *Photobacterium*, *Pseudomonas* og *Shewanella* er de bakteriene som har størst potensiale for å forringe islagret laksefilet.

3.2 Ved hvilket bakterienivå vil forbrukere flest reagere på smak/lukt?

Konklusjon

Det er ikke noe entydig svar på ved hvilket bakterienivå forbrukere vil reagere negativt på kvalitet av laksefilet. Bakterienivåer opp til 10^9 kde/gram fører ikke til signifikante negative utslag i aksept av kokt laks. For lukt av rå laks kan forbrukerne reagere negativt på laksefilet med bakterienivåer på 10^7 kde/gram.

Ut fra resultatene fra sammenlikning av ulike bakterier og deres rolle for endringer i lukt av laksefilet under lagring ble det valgt tre isolater som skulle benyttes i videre undersøkelser. Det ble laget opp nye prøver (Optimalhygienefilet og filet tilsatt en blanding av forringelsesbakterier) til forbrukerundersøkelser, men bakterieveksten stoppet denne gangen ved et nivå på 10^7 kde/gram for begge typer filet. Det ble gjort en del arbeid for å kunne velge lagringsforhold som var mer reproducerbare og samtidig relevante. Dette er omtalt i sidefelt.

I det endelige oppsettet for sensorikk og forbrukeranalyser ble filetene var pakket to og to i høyden (buk mot buk), svøpt i blåplast og lagt på poser med is i EPS-kasser. Kassene ble oppbevart på kjølerom ved 1°C. Temperaturen i kassene lå mellom 0 og 0.5°C. Figur 4 viser bakterievekst i optimalhygienefilet samt filet som var tilsatt forringelsesbakterier. De grønne pilene angir fileter som ble analysert sensorisk og benyttet i forbrukeranalyser.

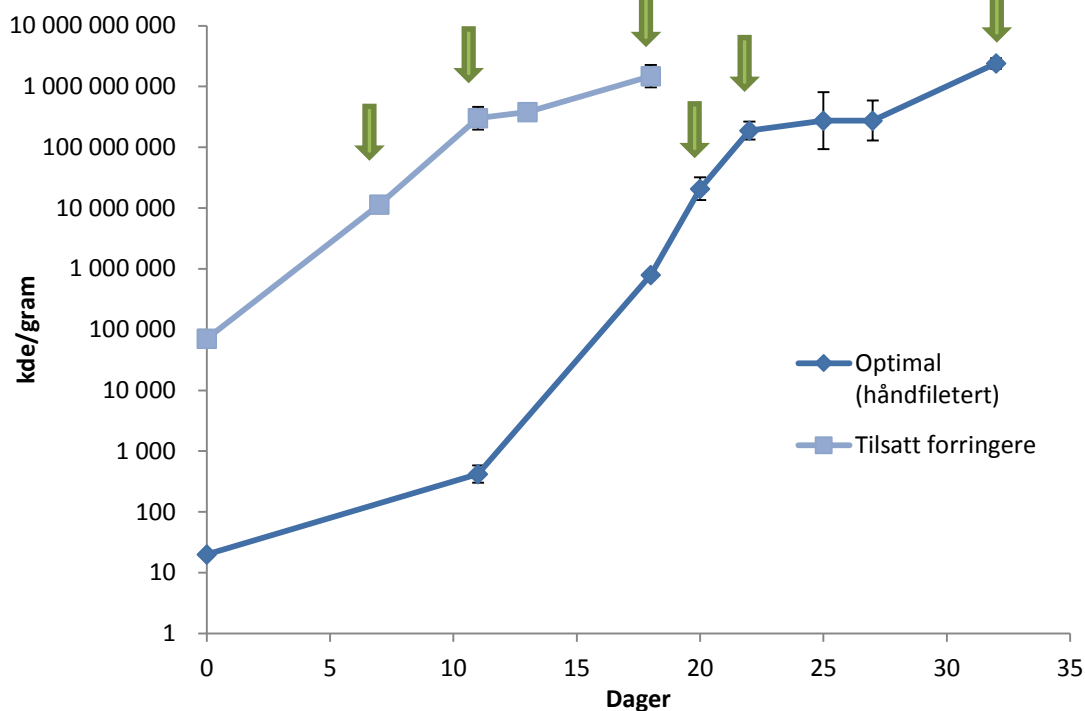
Bakteriefloraen ble bestemt for alle prøver til forbrukeranalyser og sensorikk (Se Tabell 1 og Vedlegg 1.3). For optimalhygienefileter var bakteriefloraen dominert av *Photobacterium* (>90%) etter 20 dagers lagring (totalkim på 10^7 kde/gram). Under videre lagring ble *Pseudomonas* mer og mer dominerende opp til 50 % ved 32 dagers lagring (totalkim på 10^9 kde/gram) (Tabell 1).

Fileter tilsatt bakterier var i likhet med optimalhygiene fileter dominert av *Photobacterium* (ca 90 %) i tidligste uttak (totalkim på 10^7 kde/gram). Her endret også floraen seg etter hvert, men med en større dominans av *Pseudomonas* i slutten av lagringstiden (18 dager, totalkim på 10^9 kde/gram). *Shewanella*, som er regnet som en viktig forringer av islagret fisk kom ikke opp i høye tall. (Tabell 1)

*Emballering var avgjørende for bakterievekst, bakterieflora og sensoriske endringer. I de innledende rundene ble filet svøpt buk mot buk i blå plastfolie og lagt i plastesker (HDPE) plassert på is. I disse forsøkene var bakteriefloraen dominert av *Pseudomonas*. Ved oppskalering ble filetene også pakket buk mot buk i blåplast og lagt i flere lag i isoporkasser med isoser over og under. Resultatet var at *Pseudomonas* ikke vokste opp, sannsynligvis pga lav oksygentilgang. *Photobacterium* dominerte og veksten stoppet ved 10^7 kde/gram. Videre undersøkelser viste store variasjoner mellom bakterietall for buk, skinnside og fileter som lå øverst og nederst i en plasteske.*

*Laksefileter til forbrukerundersøkelsene beskrevet her er pakket to i høyden (buk mot buk) og ligger på is i isoporkasser. Det ble tatt prøver på tvers av filetene for å få med både buk- og skinnside. Både *Pseudomonas* og *Photobacterium* vokste opp.*

Det er viktig å være klar over at konkurransen mellom ulike bakterier på filet er en hårfin balanse, der temperatur, fuktighet og oksygentilgang spiller en avgjørende rolle. Forringelsespotensialet kan også variere mellom bakterier av samme art. Man kan derfor forvente en stor variasjon mellom fileter, til og med de fra samme batch og samme kasse.



Figur 4 Oppvekst av bakterier (kde/gram) på filet produsert under optimal hygiene eller tilsatt forringelsesbakterier. Prøver til forbrukertest og sensorisk analyse er angitt med grønne piler. Optimal 32 dager ble kun brukt til sensorisk analyse og ikke i forbrukertesten. En kontroll (11 dager) inngikk i sensoriske analyser og forbrukerundersøkelse i tillegg (ikke vist).

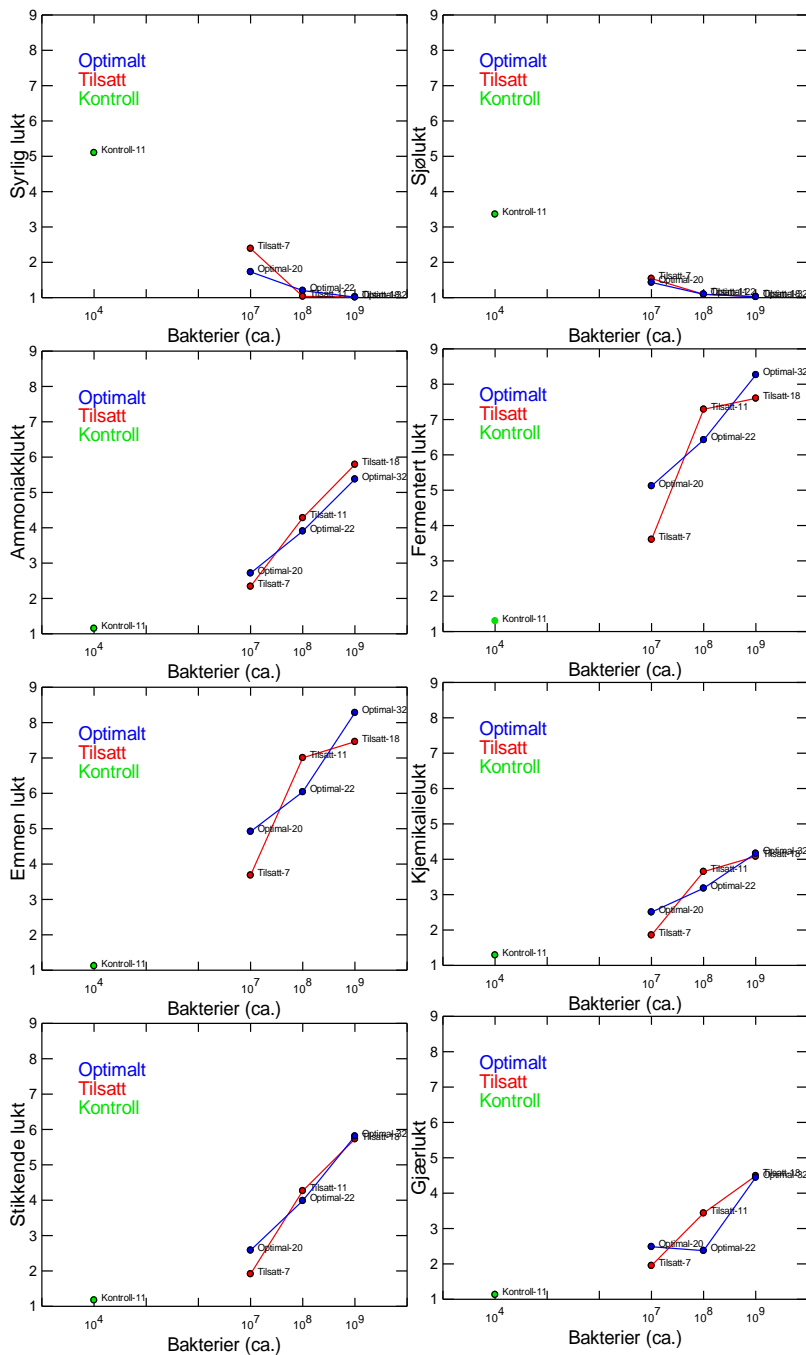
Tabell 1 Bakteriesammensetning i ulike fileter til sensorikk- og forbrukerundersøkelser. «Forringere» er fileter tilsatt forringelsesbakterier, og «Optimal» er fileter som er filetert under høye hygieniske betingelser.

	10 ⁷ kde/gram		10 ⁸ kde/gram		10 ⁹ kde/gram	
	Forringere (7 dager)	Optimal (20 dager)	Forringere (11 dager)	Optimal (22 dager)	Forringere (18 dager)	Optimal (32 dager)
<i>Pseudomonas</i>	7-13 %	0.1-4%	22-70%	16-57%	46-87%	11-46 %
<i>Photobacterium</i>	85-92%	95-99 %	28-77%	42-70%	12-53%	31-48 %
<i>Shewanella</i>	< 0.1%	< 0.1%	< 0.1%	< 0.1%	0.1-0.4%	< 0.1%

Sensorisk analyse

Sensorisk analyse ble gjennomført både for rå laks (egenskaper lukt) og varmebehandlet laks (egenskaper lukt og smak). Prøver som ble bedømt var optimal hygiene (20, 22 og 32 dager), prøver med tilsatte bakterier (7, 11 og 18 dager) (se figur 4) og en kontrollprøve på 11 dager (industrielt filetert).

Sensoriske analyser av rå lakseprøver viste at flere egenskaper man regner som negative for liking av laks. Kjemikalielukt, fermentertlukt, emmenlukt, gjærlukt, stikkendelukt og ammoniakklukt økte signifikant med økende bakterietall (Figur 5). Egenskaper assosiert med meget fersk fisk, som syrlig lukt og sjøluft, sank.



Figur 5 Viktigste sensoriske endringer (lukt) for rå laks ved ulike lagringstider og bakterienivåer

Det var relativt små endringer i smak av kokt laks under lagringsforløpet. For laks med 10⁸ kde/gram eller mer fikk man et signifikant utslag av fermentert og emmen smak (optimalhåndtert laks etter 22 dager og laks tilsatt bakterier etter 11 og 18 dager).

I Figur 6 vises resultater for endring i utvalgte luktegenskaper for kokte lakseprøver. Negative egenskaper som kjemikalielukt, fermentertlukt, emmenlukt og ammoniakklukt økte med høyere bakterietall mens positive egenskaper som syrlig lukt og sjølukkt sank.

Rå laks, lukt

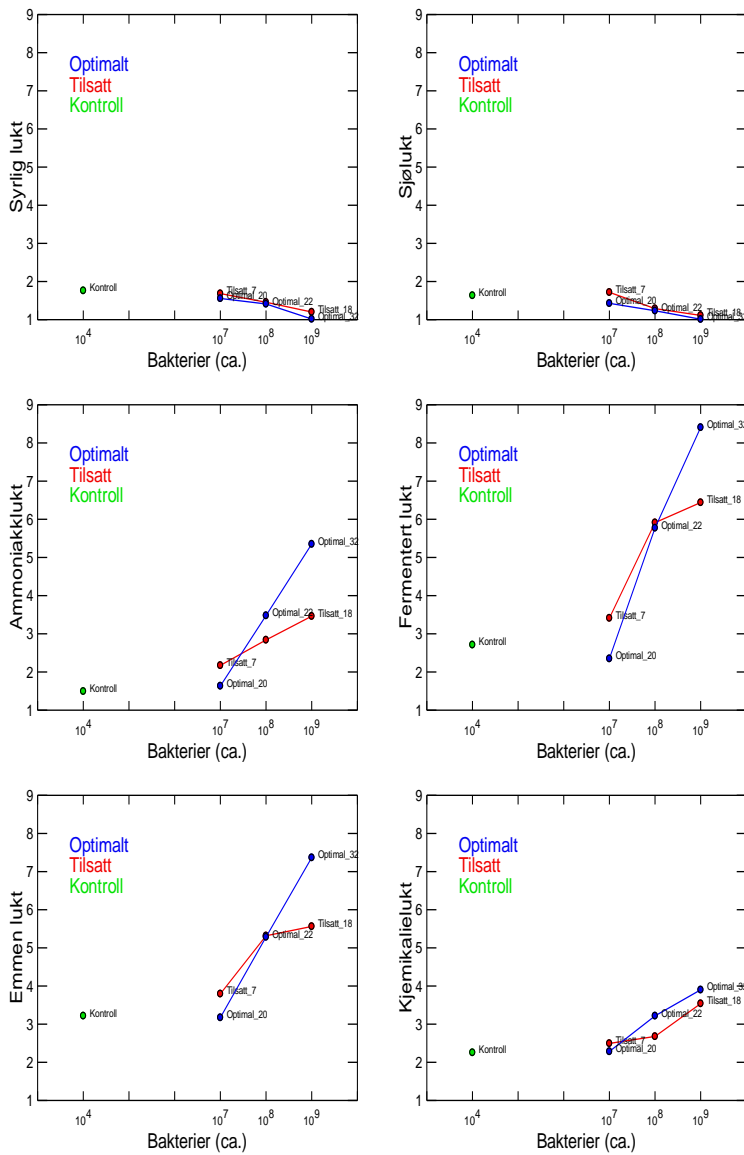
De fleste negative luktutslag som ble målt sensorisk økte i intensitet under lagringen.

Emmen lukt slo ut allerede ved et bakterietall på 10⁷ kde/gram.

Fermentert lukt slo ut ved 10⁷ kde/gram for optimalhygieneilet (etter 20 dager), men først ved 10⁸ kde/gram for filet som tilsatt forringere (11 dagers lagring).

Ved bakterietall på 10⁸ kde/gram og oppover var det i tillegg signifikant økning i Ammoniakk-, Stikkende-, Gjær-, og Kjemikalielukt,

Positive egenskaper (syrlig, sjø, agurk) sank under lagring.



Figur 6 Viktigste sensoriske endringer (lukt) for kokt laks ved ulike lagringstider og bakterienivåer.

Kokt laks, lukt

De lukteegenskapene som endret seg mest for kokt laks under lagring var fermentert, emmen, ammoniakk, kjemikalie og harsk hvor sistnevnte sank i intensitet under lagring og resterende økte.

Fermentert lukt og ammoniakklukt slo ut ved en bakteriekonsentrasjon på 10^8 kde/gram

Ved et bakterietall på 10^9 kde/gram slo emmen- og kjemikalieukt ut

Det var en tendens til at fileten ved optimal hygiene hadde høyere intensitet av negative lukteegenskaper enn tilsvarende fileter tilsatt bakterier ved 10^8 og 10^9 kde/gram. Dette kan skyldes lengre lagringstid på fileten med optimal hygiene.

Lukt som er assosiert med meget fersk laks (syrlig, sjø) sank utover i lagringstiden



Forbrukertester

Forbrukertester ble gjennomført på samme type prøver som ble testet sensorisk (diskutert ovenfor). Forbrukerne svarte på følgende spørsmål ved hhv smaking og visuell vurdering (lukting) på prøver:

Smaking (køkt laks):

- a) Tenk deg en situasjon hvor du spiser laks til middag. Hvor godt synes du denne prøven med laks smaker? Skala 1-9 (liker ikke i det hele tatt – liker veldig godt)
- b) Ville du kjøpt denne laksen igjen? Svar: ja eller nei

Vurdering (lukte og se, rå laks):

- a) Tenk deg en situasjon hvor du skal lage middag og åpner en pakke laks hjemme. Se på prøven og lukt på den. Hva synes du om kvaliteten til denne lakse-prøven?

Skala 1-9 (veldig dårlig - veldig god)

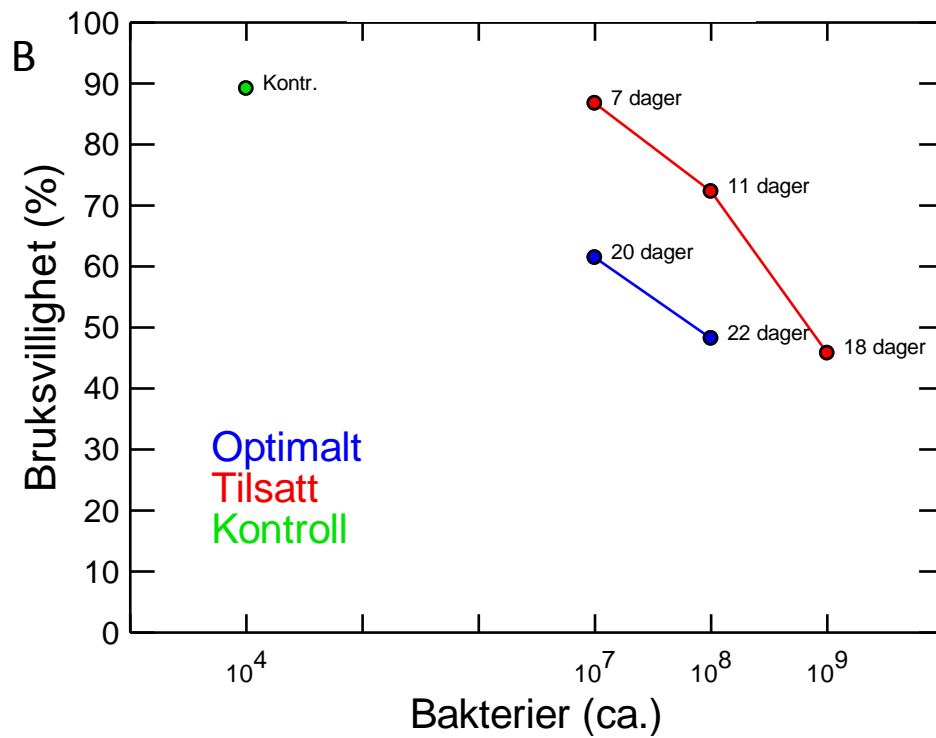
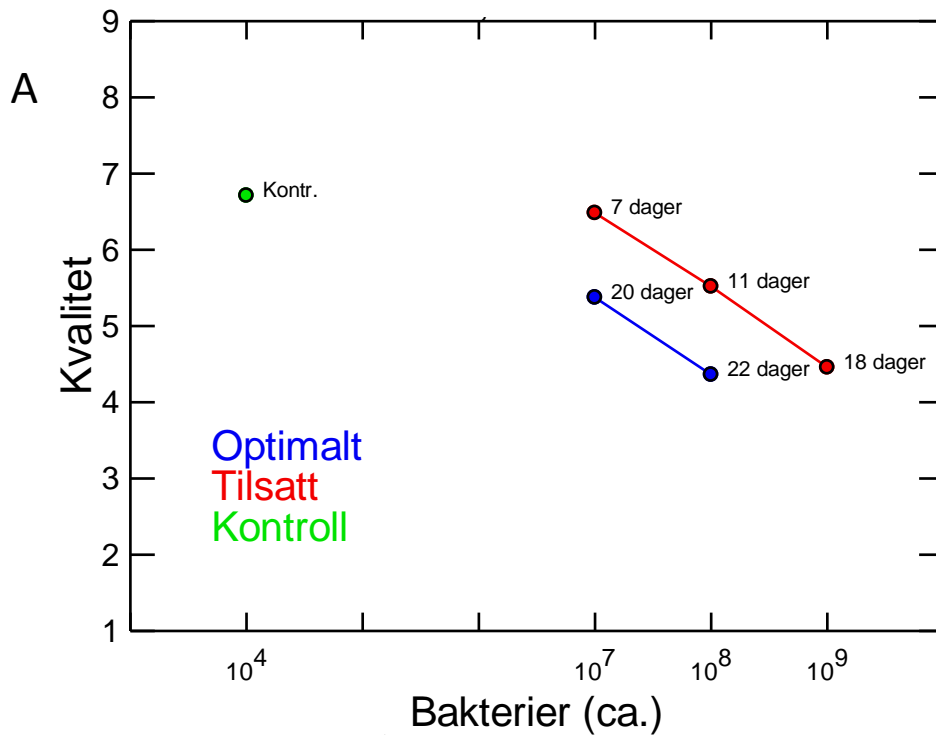
- b) Tenk deg en situasjon hvor du skal lage middag og åpner en pakke laks hjemme. Se på prøven og lukt på den. Ville du brukt denne prøven til dagens middag? Svar: Ja eller nei

Rå laks

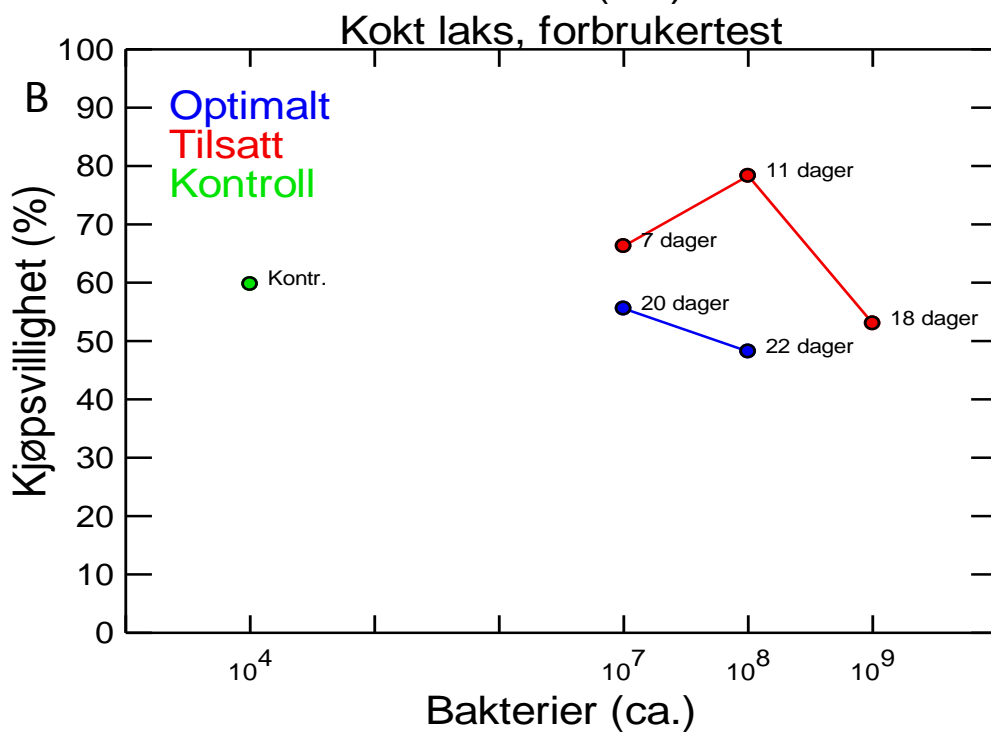
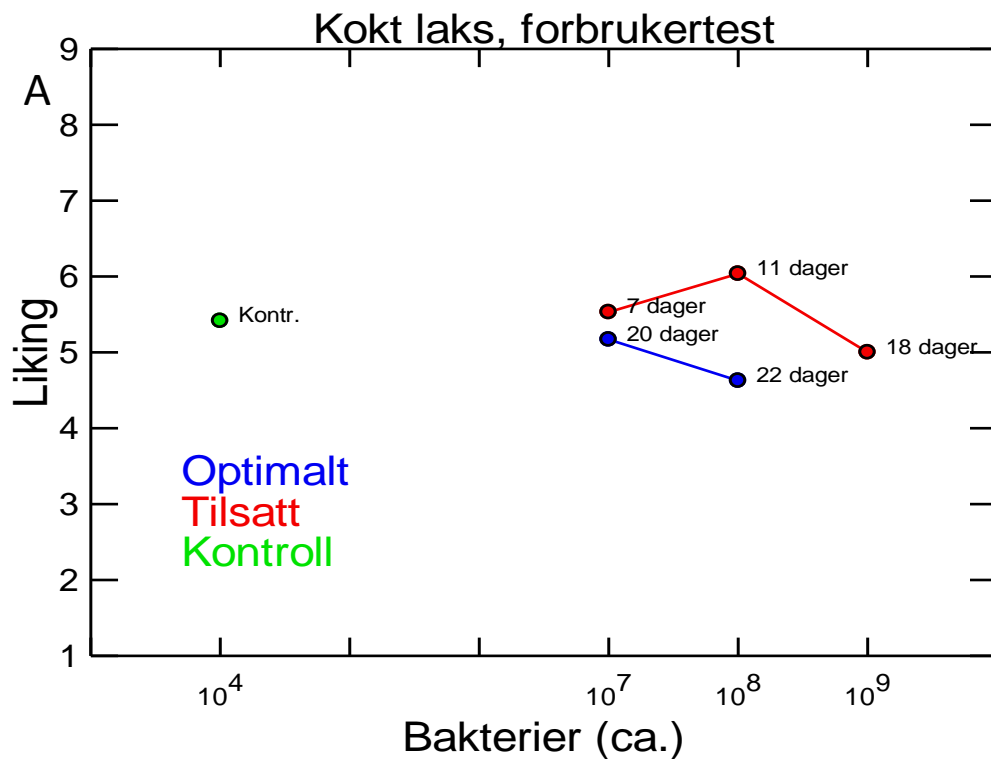
Resultater fra rå laks vises i Figur 7 A (kvalitet) og Figur B (brukervillighet). Figurene inkluderer også informasjon om bakterietall og lagringstid. Ikke uventet, var det en god sammenheng mellom hvilken kvalitet forbrukerne mente filetene hadde, ut fra lukt og utseende (Figur 7 A), og om de ville brukt laksen til middag (Figur 7B). Figur A viser at 90% av forbrukerne ville ha brukt kontrollprøven (10 dagers lagring, 10^4 kde/gram) til middag. Tilsvarende resultat ble funnet for fileter tilsatt forringelsesbakterier og lagret i 7 dager (10^7 kde/gram). Fileter som var lagret 20 dager eller mer eller som inneholdt mer enn 10^7 kde/gram bakterier fikk signifikant lavere poeng for kvalitet (Figur 7a og Vedlegg 1.5) og brukervilligheten sank også. Laveste brukervillighet fikk filet lagret i 18 dager og med et bakterienivå på 10^9 kde/gram da kun 45% mente fileten hadde god nok kvalitet til at de ville ha brukt den til middag.

Køkt laks

Resultatene fra varmebehandlet laks vises i figur 8A (liking) og B (kjøpsvillighet). Figurene inkluderer også informasjon om bakterietall og lagringstid. Det var mindre forskjell på fileter som ble likt dårligst og best for kokte prøver enn rå. Ikke uventet var det en god sammenheng mellom hvor godt forbrukerne likte filetene, ut fra smak (Figur 8 A), og om de ville ha kjøpt laksen igjen (Figur 8B). Statistisk sett påvirket hverken bakterietall eller lagringstid hvor godt forbrukerne likte de ulike filetene og om de ønsket å kjøpe dem igjen (Se Vedlegg 1.5). Med andre ord vil en laks som er lagret i 18 dager og som har et bakterietall på 10^9 kde/gram av mange forbrukere oppfattes som like akseptabel enn en filet lagret i kortere tid og med lave bakterietall. Figur 8B viser en kjøps sannsynlighet for kontrollprøven på 60% (10 dagers lagring, 10^4 kde/gram). Dette kan anses som et lavt nivå tatt i betraktning at dette var filet med et lavt mikrobiologisk nivå og begrenset lagringstid. Årsaken til en relativt lav kjøps sannsynlighet er sannsynligvis at forbrukere brukte smak på varmebehandlet laks som de vanligvis får servert som referanse. Prøvene vi serverte var ikke tilsatt hverken salt eller fett og de ble dessuten servert ved romtemperatur. Dette kan ha redusert opplevd kvalitet på prøvene.



Figur 7 Vurdering av kvalitet og bruksevillighet etter vurdering av rå filet med ulike lagringstider og bakterienivåer. Figuren viser gjennomsnittsverdier for 80 forbrukere.



Figur 8 Forbrukerlikning og kjøpsvillighet etter smaking av kokt filet med ulike lagringstider og bakterienivåer. Figuren viser gjennomsnittsverdier for 80 forbrukere.

Sammenheng mellom bruksvillighet, liking, bakterietall og sensoriske endringer

Rå laks

Hvis man sammenlikner liking av fileter med samme bakterietall, men med ulikt utgangspunkt (tilsatt forringelsesbakterier og optimale prøver) ser man at bakterietallet alene ikke forklarer liking. Generelt sett kan man si at ved samme bakterienivå skåret fileter tilsatt forringelsesbakterier høyere på liking enn fileter håndtert optimalt. De sensoriske analysene tydet også på høyere nivåer av negative lukteegenskaper ved ca samme bakterietall for fileter håndtert optimalt. En forklaring på dette kan være at fileter med optimalhygiene inneholdt noe mer *Photobacterium*, som gir endringer lukt ved lavere bakterietall enn *Pseudomonas*.

For å se mer på sammenhengene mellom liking og sensoriske endringer ble det laget såkalte preferanseplott, Vedlegg 1.4. Det var tydelig at det sensoriske forløpet til laksefileter tilsatt forringere og laksefileter behandlet optimalt går i samme retning under lagring. Tidlig i lagringen og ved lavere bakterietall dominerer egenskaper man assosierer med positive egenskaper (agurklukt, sjøluft og syrlig lukt, røde punkter med C viser forbrukere og tettheten er størst rundt disse egenskapene). Videre lagring og ved økning i bakterietall dominerer egenskaper man regner som negative (gjær/stikkende/ammoniakk/emmen). For prøver tilsatt forringere og optimalt behandlede prøver sett hver for seg er det altså en klar korrelasjon mellom lagringstid/bakterietall og økning av negative sensoriske egenskaper og påfølgende reduksjon i liking. Ser man alle prøvene under ett er sammenhengen ikke like klar. For eksempel liker forbrukerne bedre en filet lagret i 11 dager enn en filet lagret i 22 dager selv om førstnevnte skårer høyere for en rekke negative lukteegenskaper (Figur 8 og vedlegg 4). Dette kan tyde på at for laks som er lagret over 20 dager spiller andre egenskaper enn lukt en viktig rolle. Dette kan for eksempel være endringer i farge eller konsistens.

Oppsummert ser bruksvilligheten for rå laks ut til å synke ved bakterietall over 10^7 kde/gram eller lagringstid over 18 dager. For fileter under 20 dager kan dette forklares alene ved bakterieveksten som gir gjær/ stikkende/ammoniakk/emmen lukt av

Kokt laks

Sensoriske endringer var relativt like for kokte laksefileter med samme bakterietall og det var klare sammenhenger mellom bakterienivå/sammensetning og negative smaks og lukt-egenskaper man forventet ved oppvekst av forringelsesbakterier (ammoniakk/emmen/kjemikalie/fermentert). Man fant en jevnere fordeling av forbrukere i preferanseplottet (Vedlegg 1.4) sammenliknet med rå laks og dette betyr at det var noen forbrukere som foretrakk prøver som var lagret i kort tid og hadde lave bakterietall, men det var også noen som foretrakk laks etter lang lagringstid (18-20 dager) og høyere bakterietall. Noen forbrukere foretrekker altså kokt laks med høyere intensitet i lukt- og smaksegenskaper, også egenskaper som man normalt regner som å være negative.

Oppsummert fant man at selv om det sensoriske panelet finner negative endringer i lukt og smak til kokt filet virker det ikke som forbrukere reagerer negativt på smaken til kokt laks, selv ved høye bakterietall og lang lagringstid. Laks med bakterietall 10^8 kde/gram vil ikke oppfattes som å ha redusert kvalitet dersom lagringstiden ikke overstiger 20 dager.

3.3 Vil en økt hygiene og lavere totalmikroorganismetall på filet gi fare for økt oppvekst av *Listeria monocytogenes*?

Konklusjon

Å forbedre produksjonshygiene slik at man får et lavere nivå av forringere vil ikke føre til økt vekst av *Listeria monocytogenes* på islagret laksefilet. Bedre produksjonshygiene vil altså ikke redusere *Listeria*-holdbarheten. Derimot kan man oppnå lavere startnivåer av forringelsesbakterier og redusere faren for *Listeria-smitte*. Dette vil gi en lenger holdbarhetstid, både med tanke på sensoriske egenskaper og mattrygghet.

Listeria monocytogenes kan vokse på islagret laksefilet og ved høy smitte (>10 kde/gram) kan *Listeria*-nivået nå grenseverdien på 100 kde/gram før forbrukere oppfatter laksen som sensorisk uakseptabel. Ubrutt kjølekjede som holder seg nær 0 °C og å unngå eksponering for luft er helt vesentlig for å unngå rask vekst av *L. monocytogenes* i rå laksefilet.

Det er viktig å vite om forbedret produksjonshygiene og økt lagringstid av laksefilet kan gi økte vekst av *L. monocytogenes*. Laks som er beregnet for å konsumeres rå, må betraktes som et spiseklart produkt. Regelverket setter en grense ved 100 kolonidannende enheter (kde) per gram produkt på siste holdbarhetsdag eller ikke påvist ved utsendelse på denne type produkter. For produkter som skal varmebehandles rett før konsum vil ikke *Listeria monocytogenes* utgjøre noen helseisiko. I dette prosjektet var det tatt utgangspunkt i laks som skal varmebehandles, men det kan ikke utelukkes at filetene spises rå. Det er derfor ønskelig å vite om *Listeria*-nivået vil overstige grenseverdien i regelverket i løpet av lagringstiden. Ved å gjennomføre belastningsforsøk, kan man få kjennskap til hvordan *L. monocytogenes* vokser i produktet under aktuelle lagringsforhold og dermed vurdere *Listeria*-holdbarheten til denne type produkter.

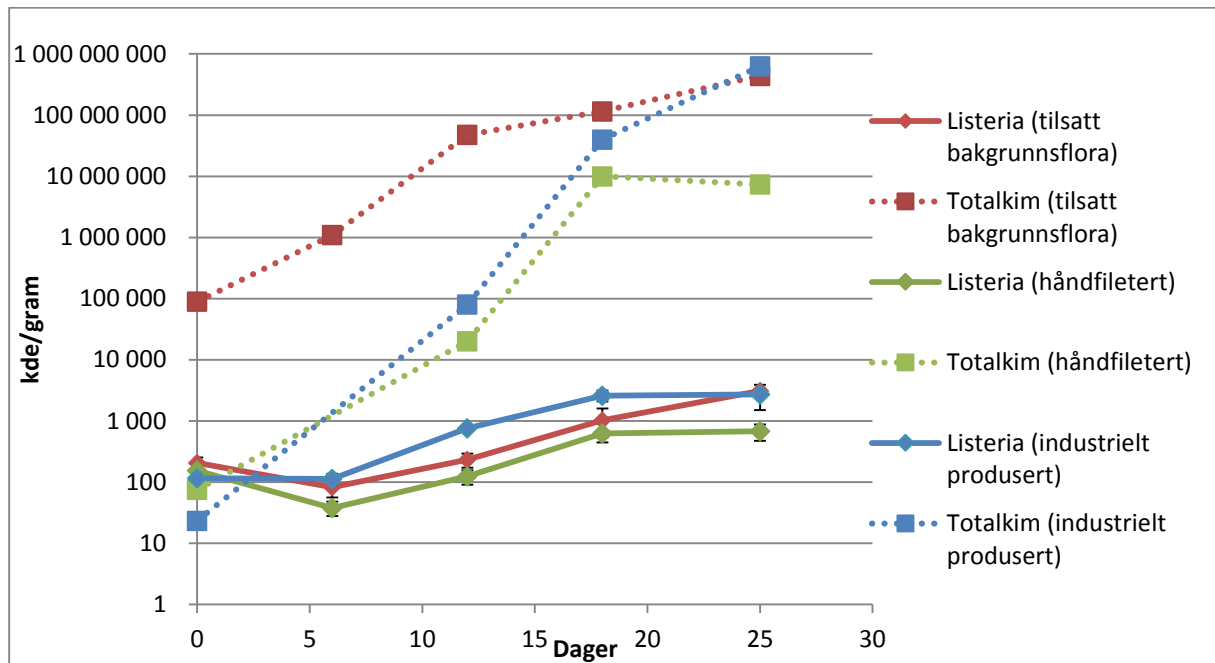
Laksefilet lagret svøpt i plast på is i EPS-kasser

Vekst av *Listeria monocytogenes* på laksefilet med tre ulike utgangspunkt ble undersøkt: 1) Håndsløyd/håndfiletert (optimalhygiene), 2) industrielt filetert og 3) tilsatt forringelsesbakterier. *Listeria* ble tilsatt med et startnivå på ca 100 kde/gram. Både filet produsert i industriskala og håndfiletert filet hadde svært lave totalmikroorganismetall i utgangspunktet (< 100 kde/g). Etter tilsetning av bakterier hadde filetene et startnivå på 10⁵ kde/g. Det ble påvist *L. monocytogenes* i håndfiletert filet i lave tall (< 2 kde/g) ved dag 0. Det ble ikke påvist *Listeria* i håndfileterte eller maskinfileterte kontrollfileter etter endt lagring (25 dager). Evt bakgrunnsflora av *Listeria* vil derfor sannsynligvis ikke påvirke resultatet.

Listeria-tallet holdt seg konstant eller gikk noe ned i de første 6 dagene av lagringsperioden for alle tre typer fileter før man så en svak vekst (Figur 9). I løpet av hele lagringsperioden økte nivået av *L. monocytogenes* med en faktor på 4 til 25 med lavest vekst for håndfiletert laks, altså den med lavest bakgrunnsflora av bakterier. Etter dag 18 stoppet veksten av *L. monocytogenes* på industrielt produsert filet samt på håndfiletert laks, mens veksten på filet tilsatt en høy bakgrunnsflora fremdeles økte. *Photobacterium* dominerte (>60 % av totalfloraen) på laksefilet etter 12-18 dagers lagring, etterfulgt av *Pseudomonas* (inntil 30 % av totalfloraen). Forskjellene man så i bakterievekst

på ulike typer råstoff kan skyldes ulikheter i bakteriesammensetning (Se vedlegg 3) selv om denne ut fra analysene så ut til å være liten.

Man vet at en god produksjonshygiene kan redusere forekomst av *Listeria monocytogenes* på laksefilet. Disse resultatene tyder på at en god produksjonshygiene kombinert med god temperaturkontroll i kan øke *Listeria*-holdbarheten til laksefilet som er svøpt og lagret på is.

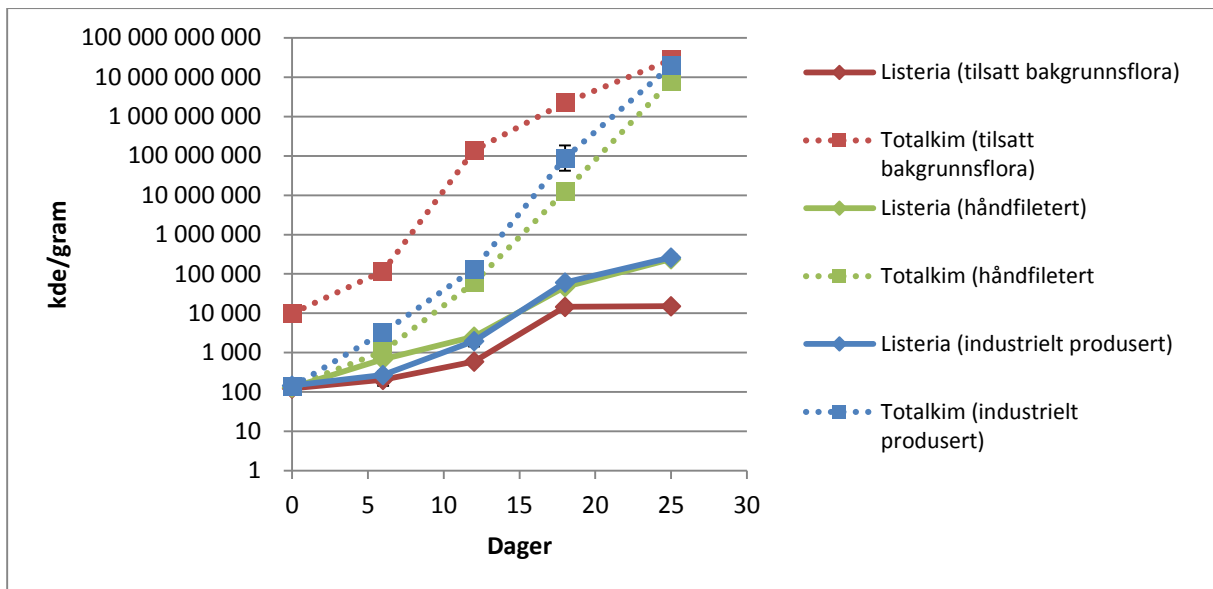


Figur 9 Vekst av *L. monocytogenes* på håndfiletert laks, industrielt produsert filet og laksefilet tilsatt en bakgrunnsflora av forringelsesbakterier. Filetene ble lagret i EPS-kasser på is ved 0°C. Figuren angir snittverdi og standardfeil for tre prøver

Laksefilet lagret på is og eksponert for luft og temperaturøkning

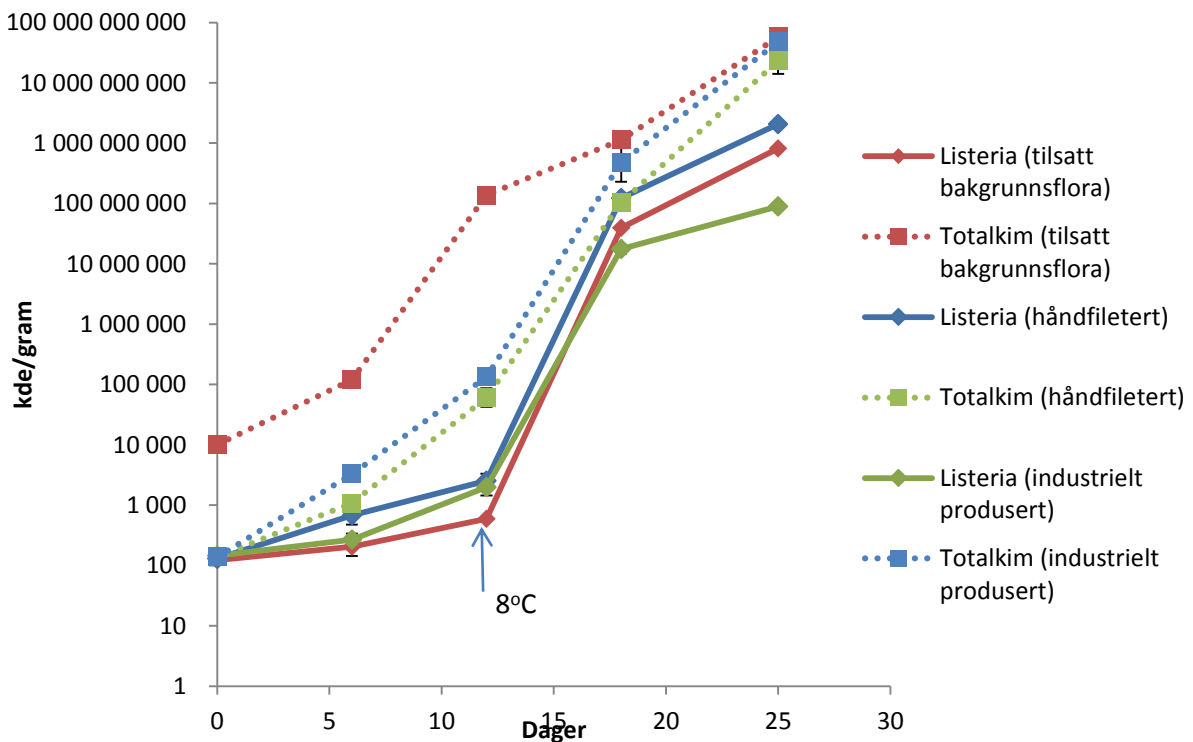
Det kan ikke utelukkes at laksefilet i perioder eksponeres for stor luft-tilgang (for eksempel i kjøledisker) eller temperaturøkninger (for eksempel i kjøleskap hos konsument). Effekten av denne type eksponering ble undersøkt ved å måle vekst av *Listeria* på islagrede laksebiter plassert i petriskåler. Etter en lagringsperiode på 12 dager ble noen skåler flyttet over til 8°C.

Ved eksponering for luft fikk man en liten, men statistisk signifikant vekst av *L. monocytogenes* allerede i de første 6 lagringsdagene på is (om lag dobling av nivå i løpet av seks dager, $p < 0.05$). Det var ikke signifikante forskjeller i vekst av *L. monocytogenes* i maskinfiletert laks og i håndfiletert laks (optimal hygiene). Høye nivåer (10^4 - 10^5 kde/g) av tilsatt bakgrunnsflora på filetene ga ikke veksthemming av *L. monocytogenes* de første seks dagene av lagringstiden (Figur 10). Etter 12 dager så man at veksten av *L. monocytogenes* var lavere i fileter som var tilsatt forringelsesbakterier ($p < 0.05$) sammenlignet med håndfiletert og industrielt produsert filet. Forskjellen mellom fileter økte utover lagringen og etter 18-25 dager fant man 10-100x så høye *Listeria*-tall i håndfiletert eller industrielt produsert filet (funnet i to uavhengige forsøk, kun det ene vist i Figur 10.). På dette tidspunktet hadde man en bakgrunnsflora av forringelsesbakterier på 10^{10} kde/g.



Figur 10 Vekst av *L. monocytogenes* på håndfiletert laks, industrielt produsert filet og laksefilet tilsatt en bakgrunnsflora av forringelsesbakterier. Filetene ble lagret i petriskåler på is ved 0°C. Figuren angir snittverdi av tre prøver.

Ved et skifte i temperatur fra 0°C til 8°C ble det en eksplosiv vekst både av *L. monocytogenes* og andre bakterier (Figur 11)



Figur 6 Vekst av *L. monocytogenes* på håndfiletert laks, industrielt produsert filet og laksefilet tilsatt en bakgrunnsflora av forringelsesbakterier. Filetene ble lagret i petriskåler på is ved 0°C og deretter (etter 12 dager) ved 8°C. Figuren angir snittverdi og standardavvik for tre prøver.

3.4. Hvor lang holdbarhetstid er mulig å oppnå med optimal hygiene? Hvilket bakterienivå er akseptabelt ved produksjonsdagen for å oppnå en viss holdbarhetstid?

Konklusjon

Ved en meget god hygiene og god temperaturkontroll vil laksefilet som er svøpt i plast og lagret på is kunne ha en holdbarhetstid på opptil 18 dager. Dette forutsetter et lavt startnivå av forringelsesbakterier (< 100 kde/gram). Det er lagt til grunn i analysen at forbrukere ikke skal reagere negativt på dårlig kvalitet på råvaren (<10⁸ kde/gram eller lagringstid under 20 dager) ved holdbarhetstidens utløp.

Dersom man legger til et krav om at nivået av *Listeria monocytogenes* være under grenseverdien for ferdigmat (100 kde/gram) kan man ha en holdbarhetstid på opptil 18 dager dersom man har et utgangspunkt på mindre enn 8 kde/gram *Listeria monocytogenes*.

Ved økt tilgang til luft og ved høyere temperaturer vil holdbarhetstiden være kortere.

Hvor lang *Listeria*-holdbarhet har islagret laksefilet?

Dersom laksefilet skal betraktes som et produkt som skal spises rå, er øvre grenseverdi for *L. monocytogenes* 100 kde/g ved siste forbruksdag. Veksthastighet og smittenivå har betydning for hvor lang tid det tar før denne grenseverdi er nådd. Våre forsøk viser at *L. monocytogenes* vokser svært langsomt i islagret laks. De første seks døgnene var det ikke vekst ved islagring (plastsvøp i EPS-kasser). I laksebiter eksponert for mer luft, økte *Listeria*-nivået noe. Etter smitte av laksen vil *L. monocytogenes* bruke noe tid på å tilpasse seg før vekst starter. Denne nølefasen (lagfasen) vil være avhengig av tilstanden til bakteriene før smitte. Med bruk av mange *L. monocytogenes*-stammer og oppdyrking av disse under forhold som sikrer god vekst forut for smitte av laksen, antas våre forsøksbetingelser å representere forhold som gir en kort nølefase. Under tilsvarende kjølelagring i lakseproduksjonskjeden (produsent, distribusjon, butikk) vil man derfor forvente en lengre nølefase og dermed i praksis langsommere nivåøkning av *L. monocytogenes* under lagring. Tabell 2 viser hvilket smittenivå av *L. monocytogenes* ved dag 0 som gir 100 kde/g ved noen valgte lagringstider av laksefilet lagret i EPS-kasse med is. Beregningene er basert på data fra Figur 9 som viser at det er en økning av *L. monocytogenes* fra 100 kde/g til 2600 kde/g i løpet av 18 dagers islagring av maskinfilet laks i EPS-kasser. Dette tilsvarer en generasjonstid på om lag 5 dager. De første 6 dagene er det imidlertid ingen vekst av *L. monocytogenes* i laksen. Dette betyr at når lagret og distribuert ved 0 °C vil *Listeria*-nivået ikke øke de første 6 dagene etter produksjon. Rask nedkjøling etter produksjon og ubrutt kjølekjede er imidlertid helt vesentlig for å unngå vekst.

Tabell 2 Beregnede verdier for maks smittetilvåer av *L. monocytogenes* i islagret laksefilet ved produksjonsdag (dag 0) som gir maksimum 100 kde/g *L. monocytogenes* etter 10, 14 og 18 dagers lagring.

	Lagringstid		
	10 dager	14 dager	18 dager
Grense for nivå <i>L. monocytogenes</i> ved dag 0	25 kde/g	14 kde/g	8 kde/g

Tabell 2 viser at dersom man ønsker 18 dagers holdbarhet for islagret laksefilet og *Listeria*-nivået i fileten ikke skal overstige 100 kde/g i løpet av lagringstiden, må fileten ikke inneholde mer enn 8 kde/g på produksjonsdato.

Ved andre lagringsbetingelser enn i EPS-kasser (jfr lagringforsøk av biter) vil selv optimal islagring gi betydelig raskere vekst av *L. monocytogenes*. Disse resultatene tilsier at for fersk laksefilet beregnet for rå konsum må *Listeria*-nivået være <1 kde/g på produksjonsdag dersom man ikke skal overstige grenseverdien på 100 kde/g ved konsum etter ca 15 dagers lagring på is (0°C). Ved kortere lagringstid, f.eks 6 dager, kan man ha et nivå inntil 10 kde/g på produksjonsdag uten at man overstiger grenseverdien på 100 kde/g.

Veterinærinstituttet har nylig foreslått grenseverdier for *Listeria* i laks ved produksjonsdato med utgangspunkt i de mikrobiologiske kriteriene for spiseklar mat. Dette gjelder for laks beregnet for å konsumeres i rå tilstand. For islagret laks er denne verdien foreslått satt til 10-50 kde/g ved produksjonsdag (Norsk Fiskeoppdrett #8, 2013). I forsøkene ble det benyttet laks smittet naturlig med *L. monocytogenes*. Laksen ble imidlertid fryst før lagringforsøk ved ulike temperaturer ble igangsatt. Forsøksbetingelsene er derfor ikke de samme som i våre forsøk og resultatene kan derfor ikke sammenlignes direkte. Ved våre forsøksbetingelser vil en smittedose på 10 kde/g fileten på produksjonsdagen føre til at man når grenseverdien på 100 kde/g etter ca 16 dager ved islagring i EPS-kasser. Beregningene er basert på resultater fra forsøk under betingelser som er relevante mht pakkemetode og lagringsforhold. Andre lagringsforhold, selv ved god islagring, vil kunne ha betydelig effekt på *Listeria*-veksten.

Hvor lang sensorisk holdbarhet har en islagret laksefilet?

Dette prosjektet har først og fremst tatt sikte på å undersøke forbrukeraksept av fileten til laks som skal varmebehandles. Det er altså ikke undersøkt forbrukernes aksept av smak og lukt av fileten med tanke på at den skal spises rå, for eksempel til sushi. Resultatene viser at for kokt laks vil forbrukere ikke nødvendigvis reagere negativt på endringer i smak relatert til bakterieveksten, selv ved høye bakterietall (10^9 kde/gram). Ved en ekstremt god hygiene og god temperaturkontroll vil bakterietallet ikke komme opp i dette før 32 dager. Likevel vises en antydning om redusert liking og kjøpsvillighet ved økt lagringstid for optimal hygienisk håndtert fileten (målt ved 10^7 og 10^8 kde/gram, hhv 20 og 22 dagers lagring).

Etter oppfordring om å lukte og vurdere rå filet for middag var toleransen derimot mindre. Ved bakterietall over 10^7 kde/gram eller lagringstid over 18 dager sank aksept. Ved en bakteriekonsentrasjon på 10^8 kde/gram reagerte sannsynligvis forbrukerne på lukt grunnet bakterienivå og som oppfattes som dårlig, som fermentert, emmen og ammoniakklukt. Hva som gjorde at forbrukerne ikke aksepterte filet som var lagret i 20 dager og med et lavere bakterienivå er vanskelig å si, men det kan ha vært en kombinasjon av lukt og andre egenskaper som ikke ble målt i denne undersøkelsen, som utseende og tekstur (ferskhetspreg).

Vi fant at ved en ekstrem hygiene med et startantall på mellom 10 og 100 kde/gram ville bakterietallet ligge under 10^7 kde/gram ved 18 dagers lagring (Figur 3 og 4). Bakterieveksten var meget rask (2-3 dager for tidobling) når den nærmet seg 10^7 kde/gram. For fileter tilsatt forringelsesbakterier hadde man en tidobling av bakterietall for hver fjerde lagringsdag (Figur 3 og 4). Tabell 3 viser estimerte startnivåer for å oppnå en viss holdbarhetstid på filet.

Tabell 3 Beregnede verdier for maks smittenivåer av forringelsesbakterier i islagret laksefilet ved produksjonsdag (dag 0) som gir 10^7 kde/g etter 12, 15 og 18 dagers lagring.

	Lagringstid		
	12 dager	15 dager	18 dager
Grense for nivå forringere ved dag 0	10^4 kde/g	10^3 kde/g	$<10^2$ kde/g

Vedlegg 1.1: Metoder

Arbeidspakke 1: Identifisering og karakterisering av bakterieflora fra islagret pre-rigor laksefilet

Identifisering av bakterier

Et utvalg av bakterier fra laksefilet innsamlet i forprosjekt (4-6 fileter pr anlegg) etter 10 dagers lagring på is ble identifisert ved sekvensering av 16S rDNA og søk i sekvensdatabaser. Det ble valgt 12 bakterieisolater for testing av effekt på forringelse av laksefilet ut fra følgende kriterier: 1) Vanlig forekommende på islagret laks etter ti dagers lagring og/eller 2) Publisert som mulig forringer av islagret sjømat

Isolater fra 4 ulike bedrifter ble tatt med (A,B,D og G, i tillegg til en Acinetobacter fra Nofimas stammesamling (MF4122). Isolater ble plukket både tidlig og seint under produksjon og fra kontroll filet.

Type	Isolatnavn
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10AS1 + 15BT2
<i>Pseudomonas fragi/psychrophila</i>	12AS1 + 13BT1
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	30BK1 + 44GK2
<i>Shewanella sp.</i>	22GS2 +24BS1
<i>Janthinobacterium</i>	8DS1
<i>Acinetobacter</i>	16GT1 +MF4122
<i>Psychrobacter</i>	41GK2

En av bakteriestammene viste seg i ettertid (30BK1) å være forurenset og resultatene er derfor ikke rapportert for denne.

Filetering og pakking

1. Laks ble filetert under streng hygiene. Laksen ble skylt under rennende vann, skrapet med kniv, filetert og skinnert. 10*20 cm² av den tykkeste delen av fileten ble skåret ut. Filetene ble påført bakteriesuspensjon (se under)
2. Filetene ble svøpt i blå plast og lagt i en 5 L boks som ble plassert i en gildekasse med is. Det ble fylt is på toppen. Kassene ble oppbevart på kjøll og det ble etterfylt med is på hvert uttak.

Inokulering av filet

Til undersøkelse av vekst og sensoriske endringer:

1. Bakteriene (12 ulike stammer) ble dyrket i laksebuljong ved 15°C. Kulturene ble fortynnet til 10⁶ cfu/ml i 10 ml fysiologisk saltvann
2. Fortynningen ble sådd ut på Long&Hammer agar for bestemmelse av inokulum. Skålene ble inkubert ved 15°C
3. Fem fileter ble inokulert for hver bakterietype. 2 ml per filetbit (ca 200 cm²) I tillegg ble det pakket fem fileter som var «inokulert» med samme volum fysiologisk saltvann.

Til test av effekt av frysing

1. *Pseudomonas* 12AS1, *Shewanella* 22GS2 og *Photobacterium* 30BK1 ble inokulert til 10^4 cfu/cm² på hele laksefileter (dvs 1 ml til 100 cm²)
2. De tre filetene + en kontrollfilet (påført sterilt fysiologisk saltvann istedenfor bakteriesuspensjon) ble pakket som beskrevet over.

Uttak

1. Bakterietall ble tatt for Dag-0, fileter.
2. Ved hvert uttak (se tabell)
 - a. Det ble skåret ut en bit på 3*3 cm for mikrobiell analyse.
 - b. 1 ml av fortynningsvann ble fryst ned for evt senere sekvensering
 - c. Resterende filet ble vakuumpakket og fryst ned for evt sensorikk.

Dag nr	<i>Pseudomonas/Shewanella</i>	Andre stammer	Kontrollfilet
0	X	X	X
6	X		
11	X	X	X
14	X	X	X
18	X	X	X
22		X	X

Mikrobiologisk analyse

Laksekjøttet ble stomachet, fortynnet i peptonvann og sådd ut på Long&Hammer agar.

Bakterieskålene ble oppbevart ved 15°C i 3-7 dager før avlesning av antall kolonier.

Enkeltbakteriekolonier ble identifisert ved 16S rDNA-analyse. Et utvalg av nedfrosne isolater ble tatt opp og sådd ut på Long&Hammer agar. Bakterieskålene ble oppbevart ved 15°C i 5-6 dager før koloniene ble lysert vha koking for å få frigitt DNA. Et variabelt område på 16S rDNA (V3-V4) ble kopiert opp vha PCR og deretter sekvensert (klassisk Sanger sekvensering).

Bakterieflora ble analysert ved hjelp av dybdeseqvensering (MiSeq, Illumina). DNA ble rensert direkte fra stomacherløsning (samme som ble brukt til utplating), et variabelt område av 16S rDNA (V4) ble kopiert opp vha PCR og indeksmerkede primere (en unik indeks per prøve). Prøvene ble slått sammen til en og sekvensert vha MiSeq (Illumina). Etter sekvensering ble prøvene multiplekset basert på indeksene og analysert i QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). Resultatene ble framstilt som relative prosentandeler av de ulike bakteriegruppene per prøve.

Sensorisk analyse

Se beskrivelse for arbeidspakke 4.

Arbeidspakke 2: Holdbarhetsbegrensing ved forringelse

Filetering og pakking

1. Laks ble filetert under streng hygiene. Laksen ble skrappt med en kniv under rennende vann, filetert og skinnert. Det ble skåret ut biter på 10*20 cm². Filetene ble påført bakteriesuspensjon (se under)

- Filetene ble svøpt i blå plast og lagt i en 5 L boks som ble plassert i en gildekasse med is. Det ble fylt is på toppen. Kassene ble oppbevart på kjølerom innstilt på 1°C og det ble etterfylt med is på hvert uttak.

<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10AS1
<i>Pseudomonas fragi</i>	12AS1
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	44GK2
<i>Shewanella</i> sp.	24BS1

Inokulering av filet

- *Pseudomonas* (10AS1 og 12AS1), *Photobacterium* (44GK2) og *Shewanella* (24BS1) ble dyrket i laksebuljong ved 15°C. Kulturene ble fortynnet til 10⁶ cfu/ml i 10 ml fysiologisk saltvann
- Det ble i tillegg laget en sammensatt bakterieflora av alle bakteriene med totalkons på 10⁴ cfu/cm²
- Fem fileter ble inokulert for hver bakterietype. 2 ml per filetbit (ca 200 cm²)

Uttak

- Bakterietall ble tatt for Dag-0, fileter.
- Ved hvert uttak (se tabell)
 - Det ble skåret ut en bit på 3*3 cm for mikrobiell analyse.
 - 1 ml av fortynningsvann fryses ned for evt senere sekvensering
 - Resterende filet ble vakuumpakket og fryst ned for evt sensorikk.

Dag nr	<i>Pseudomonas</i>	<i>Photobacterium</i>	<i>Shewanella</i>	Kontrollfilet	MIX
-7				X	
0	X	X	X		X
4		X		X – 11 dager	
6	X	X	X		X
8)	X	X	X	X – 15 dager	X
11	X	X (kun 44GK2)	X		X
14	X	X	X	X – 22 dager	X
18	X			X – 26 dager	X

Mikrobiologisk analyse

Laksekjøttet ble stomachet, fortynnet i peptonvann og sådd ut på Long&Hammer agar. Bakterieskålene ble oppbevart ved 15°C i 3-7 dager før avlesning av antall kolonier.

Sensorisk analyse

Det ble analysert for lukt av rå filet – se arbeidspakke 4

Arbeidspakke 3 *Listeria*-holdbarhet ved økt produksjonshygiene

Forsøket ble gjennomført som belastningsforsøk i hht anbefalt metodikk og oppsett (AFSSA Technical Guidance Document On shelf life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods). Det ble benyttet laks med ulik mikrobiologisk kvalitet for å vurdere hvordan ulike nivåer av bakgrunnsflora påvirket vekst av *L. monocytogenes*.

Råvarer

Fersk, islagret laks ble mottatt fra lakseslakteri. To typer laksefilet ble benyttet:

- Håndsløyd, islagret laks ble håndfiletert ved Nofima under optimale hygieniske forhold for å representere laks med optimal mikrobiologisk kvalitet (betegnet HF).
- Fersk, maskinfiletert islagret laks for å representere laks prosessert og filetert i anlegg (betegnet MF).

Laksen var sløyd/maskinfiletert 2 dager før påføring av bakterier.

L. monocytogenes og isolater fra bakgrunnsflora laks

10 isolater av *L. monocytogenes* ble benyttet:

- 6 isolater fra laks/prosessering av laks
- 1 isolat fra utbrudd (kjøttpålegg)
- 3 referansestammer

Isolatene omfattet serotypene 1/2a, 1/2b og 4b. Stammene ble tilsatt som en blanding til laksefileten etter separat oppdyrking av hver stamme i laksebuljong (12°C i 48 timer).

For å simulere laks produsert ved dårlig hygiene ble noen prøver tilsatt en blanding av isolater som representerer dominerende bakterier på laks ved lagring på is. Bakteriestammene (*Pseudomonas* (12AS1), *Photobacterium* (44GK2) og *Shewanella* (24BS1)) ble dyrket separat i laksebuljong ved 15°C og deretter blandet og tilsatt i like antall. Bakterieløsningene ble oppbevart på is før poding til laksen samme dag.

Tilsetning av bakterier til laksefilet

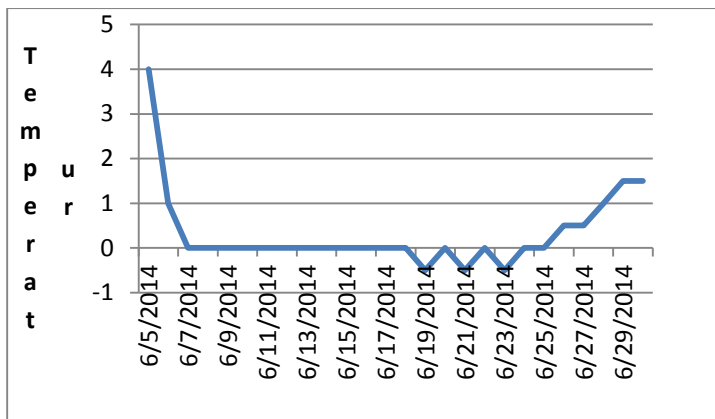
Følgende laksefileter ble preparert:

- **HF laks:** Håndfiletert laks tilsatt blanding av *L. monocytogenes*
- **MF laks:** Maskinfiletert laks tilsatt blanding av *L. monocytogenes*
- **HFFlora:** Håndfiletert laks tilsatt blanding av *L. monocytogenes* og blandingskultur (blanding av dominerende bakterieflora på laks)
- **Kontrollfileter:** HF og MF laks som ikke ble tilsatt bakterier

L. monocytogenes ble spredt jevnt utover laksefileten til ca 100 bakterier/cm². Til laks hvor bakgrunnsflora av bakterier skulle tilsettes, ble det benyttet en blanding av *L. monocytogenes* og blandingskultur til hhv 100 bakterier/cm² og 10 000 bakterier/cm². Laksefileten ble oppbevart på is inntil poding.

Lagring svøpt i blåplast i EPS-kasser

L. monocytogenes og blandingskultur ble spredt jevnt utover begge sider av laksefileten (200 cm² fileter). Filetene ble lagt buk mot i EPS-kasser med is og med plastomslag rundt filetene og lagret i klimarom ved 0-1°C. Is ble erstattet i lagringsperioden ved smelting. Temperatur i kassene med laks ble logget i hele lagringsperioden.



Temperatur i EPS kasse under islagring fra forsøksstart 05062014 til forsøksslutt 30062014

Lagring i petriskåler

Etter poding ble biter på 3x3x1 cm av podet laksefilet overført til petriskåler m/lokk, pakket i poser og deretter plassert i kasser med is. Is ble erstattet i lagringsperioden ved smelting. Ved dag 12 etter start lagring ble halvparten av prøvene overført til klimarom ved 8°C.

Analyser

Bakterienivåer av *L. monocytogenes* og totalkim ble bestemt i podet laksefilet etter 0, 6, 12, 18 og 25/26 dager. For hver type laksefilet ble det tatt ut tre parallelle prøver. Ved forsøksstart (dag 0 og forsøksslutt (dag 25/26) ble det tatt uttak (3x25g) av kontrollfileter av HF laks og MF laks for å kontrollere om *Listeria* var tilstede i uinokulert filet. Det ble tatt prøver til både kvantitative og kvalitative analyser. Det ble gjennomført analyser for å bestemme bakteriesammensetningen i prøver etter 12 og 18 dagers lagring. Analysene ble utført ved isolering av bakterie-DNA fra prøvene etterfulgt av delvis 16S-sekvensering ved bruk av MiSeq.

Arbeidspakke 4 Forbrukervurdering av laksefilet

Laks tilsatt forringelsesbakterier: Påføring av bakterier

70 fileter på is ble mottatt Nofima. Feteste del av buklist og halebit ble skåret vekk.

En blanding av *Pseudomonas*, *Photobacterium* og *Shewanella* ble påført begge sider av filetene til en sluttkonsentrasjon på om lag 10 000 bakterier/cm². Bakteriene var dyrket i laksebuljong ved 15°C og fortynnet i fysiologisk saltvann.

Filetene ble svøpt i blå plast og lagt bukside mot bukside i isoporkasser. Det lå to tynne poser med is i bunn. Det ble plassert en kasse med kun is på toppen. Kassene ble oppbevart på kjøll ved 0-1°C. Det ble plassert temperaturloggere i lokket til hver kasse.

Laks med optimalhygiene: Filetering og skinning

70 sløyde laks ble mottatt og filetert under streng hygiene to dager etter slakting. Laksen ble skylt, skrapet, filetert og skinnnet. Feteste del av buklist ble skåret av. Kniver og fjøler ble spritet mellom hver fisk.



Lagring og uttak

Filetene ble svøpt i blå plast og lagt bukside mot bukside i isoporkasser. Det lå to tynne poser med is i bunn. Det ble plassert en kasse med kun is på toppen. Kassene ble oppbevart på kjøll ved 0-1°C. Det ble plassert temperaturloggere i lokket til hver kasse. Uttak, nedfrysing og analyser

Ved hvert uttak (se tabell)

- a. Det ble skåret ut bit på om lag 10 gram tvers gjennom fileten for mikrobiell analyse fra fire ulike fileter. Prøvene ble tatt ut fra ulike kasser. Prøvene ble sådd ut på Long&Hammer medium, inkubert ved 15°C og telt etter 3-7 dager. Enkeltbakteriekolonier ble identifisert ved 16S rDNA-analyse og totalflora ved Miseq som beskrevet for arbeidspakke 1.
- b. 1 ml av fortynningsvann ble fryst ned for bakteriesamfunnsanalyse

Resterende filet (15 stk per uttak med unntak dag 0) ble vakuumpakket og fryst ned for evt sensorikk og forbrukertester.



Uttak, nedfrysing og analyser

Ved hvert uttak :

- Det ble skåret ut bit på ca 10 gram tvers gjennom fileten for mikrobiell analyse fra fire ulike fileter. Prøvene ble tatt ut fra ulike kasser. Prøvene ble sådd ut på Long&Hammer medium, inkubert ved 15°C og telt etter 3-7 dager.
- 1 ml av fortynningsvann ble fryst ned for bakteriesamfunnsanalyse
- Resterende filet (15 stk per uttak med unntak dag 0) ble vakuumpakket og fryst ned for evt sensorikk og forbrukertester.

Sensorisk analyse

Sensoriske analyser i prosjektet er utført på følgende vis:

Analyselokaler

Analysene ble utført i et sensorisk laboratorium som er bygget og innredet i samsvar med krav i ISO 8589:1988 *General guidance for the design of test rooms*. Laboratoriet har individuelle bedømmelsesbåser, standard belysning og eget ventilasjonssystem.

Analysemetode

Det ble utført en beskrivende test ved en Quality Descriptive Analysis ISO 13299:2003 av et sensorisk panel bestående av trente dommere. Dommerne er valgt ut på grunnlag av sine lukt- og smaksevner som tilfredsstillende krav i ISO 8586-1:1993. Det sensoriske panelet blir trent, testet og kontrollert regelmessig.

GJENNOMFØRING

Kokte prøver:

Forforsøk

Før hovedforsøket startet ble det sensoriske panelet kalibrert gjennom et forforsøk, hvor de ble trent i bruk av de valgte egenskapene og intensiteten av disse. I kalibreringen av det sensoriske

panelet brukes normalt de to prøver som er mest ulik hverandre. Resultatene ble gjennomgått ved hjelp av Profile plot i PanelCheck.

Hovedforsøk

Fileter av fisk ble tint over natt i isoporeske på kjølerom. Halvtinte fileter ble så bearbeidet der brun muskel ble fjernet, snitt ble laget 3 cm på hver side om midtlinjen og biter om 1 cm tykkelse ble laget. Disse ble lagt ut på steikebrett (uten noe olje på bunn) der videre tining foregikk. Alle prøver ble bearbeidet før bedømmelse startet.

Prøvene ble varmebehandlet i kombidamper på 100 % damp i 5 minutter på + 80 °C til kjernetemperaturen var + 72 °C. Prøvene ble satt på kjølerom for rask nedkjøling og ble dekt av en plastfolie.

Prøver ble tatt ut cirke 30 minutter før bedømmelse og ble servert romtemperert til dommerne + 18 °C. Prøver ble servert i hvit plastikkbeger med lokk. Hver dommer har fått servert prøve fra samme del av fileten gjennom forsøket. Prøver ble servert i randomisert rekkefølge.

Forforsøk

Før hovedforsøket startet ble det sensoriske panelet kalibrert gjennom et forforsøk, hvor de ble trent i bruk av de valgte egenskapene og intensiteten av disse. I kalibreringen av det sensoriske panelet brukes normalt de to prøver som er mest ulik hverandre. Resultatene ble gjennomgått ved hjelp av Profile plot i PanelCheck.

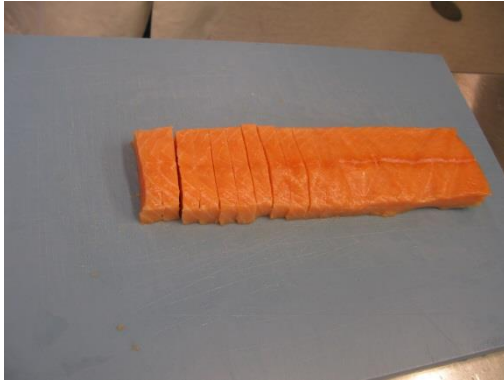
Hovedforsøk

Fileter av fisk ble tint opp over natt i isoporeske på kjølerom (mikrobiologi). Halvtinte fileter ble så bearbeidet der brun muskel ble fjernet, snitt ble laget 3 cm på hver side om midtlinjen og biter om 1 cm tykkelse ble laget. Disse ble lagt i plastikkfolie for videre tining i romtemperatur.

Prøvene ble tatt ut cirke 1 time før bedømmelse til temperering og ble servert romtemperert til dommerne + 18 °C. Prøver ble servert i hvit plastikkbeger med lokk. Prøver ble servert i randomisert rekkefølge.

Dataregistrering

Sensorisk laboratorium bruker EyeQuestion Software (Logic8 BV, Nederland) for å registrere data fra beskrivende tester. Hver dommer har egen PC og registrerer sine bedømmelser fortløpende. Venstre side av skalaen tilsvarer ingen intensitet av egenskapen, og høyre side tilsvarer tydelig intensitet av egenskapen.



Forklaring av egenskaper på lukt brukt på rå laks.

Syrlig lukt

Relateres til en frisk, balansert lukt som skyldes organiske Syrer
Ingen intensitet = ingen syrlig lukt
Tydelig intensitet = tydelig syrlig lukt

Fermentert lukt

En fermentert sur lukt, skjemt (kompost, silo), oppvaskklut
Ingen intensitet = ingen sur lukt
Tydelig intensitet = tydelig sur lukt

Sjølukt

Relateres til lukt av frisk, salt sjø
Ingen intensitet = ingen sjølukt
Tydelig intensitet = tydelig sjølukt

Agurklukt

Lukten av frisk slangeagurk
Ingen intensitet = ingen agurklukt
Tydelig intensitet = tydelig agurklukt

Fiskeoljelukt

Relateres til alle typer fiskeoljelukter (tran)
Ingen intensitet = ingen fiskeoljelukt
Tydelig intensitet = tydelig fiskeoljelukt

Kjemikalieklukt	Lukt av kjemikalie, klor, acetone, etanol (sprit), diesel Ingen intensitet = ingen kjemikalieklukt Tydelig intensitet = tydelig kjemikalieklukt
Emmen lukt	En ufrisk / flau / lite aromatisk / kvalmende lukt Ingen intensitet = ingen emmen lukt Tydelig intensitet = tydelig emmen lukt
Stikkende lukt	En skarp, stikkenede lukt som river i nesen Ingen intensitet = ingen stikkende lukt Tydelig intensitet = tydelig stikkende lukt
Svovellukt	Lukt av svovel, kål, løk, kokte egg Ingen intensitet = ingen svovellukt Tydelig intensitet = tydelig svovellukt
Gjærklukt	Lukt av gjær i prøven Ingen intensitet = ingen gjærklukt Tydelig intensitet = tydelig gjærklukt
Ammoniakkklukt	Lukt av ammoniakk Ingen intensitet = ingen ammoniakkklukt Tydelig intensitet = tydelig ammoniakkklukt
Harsklukt	Relateres til lukt av oksiderte fettstoff (gress, høy, stearin, maling) Ingen intensitet = ingen harsklukt Tydelig intensitet = tydelig harsklukt

Forklaring av egenskaper på lukt brukt på kokt laks.

LUKT

Syrligklukt	Relateres til en frisk, balansert lukt som skyldes organiske syrer Ingen intensitet = ingen syrligklukt Tydelig intensitet = tydelig syrligklukt
Sjøklukt	Relateres til lukt av frisk, salt sjø Ingen intensitet = ingen sjøklukt Tydelig intensitet = tydelig sjøklukt
Metallklukt	Lukt av metall (ferrosulfat) Ingen intensitet = ingen metallklukt Tydelig intensitet = tydelig metallklukt

Fermentert lukt	En fermentert surlukt, skjemt (lukt av oppvaskklut) Ingen intensitet = ingen fermentert lukt Tydelig intensitet = tydelig fermentert lukt
Bryggelukt	Brygge, råtne ,gamle fiskekasser Ingen intensitet = ingen bryggelukt Tydelig intensitet = tydelig bryggelukt
Kjemikalielukt	Relateres til lukter som klor, acetone, etanol (sprit) Ingen intensitet = ingen kjemikalielukt Tydelig intensitet = tydelig kjemikalielukt
Emmenlukt	En ufrisk / flau / lite aromatisk lukt Ingen intensitet = ingen emmen lukt Tydelig intensitet = tydelig emmen lukt
Svovellukt	Lukt av svovel Ingen intensitet = ingen svovellukt Tydelig intensitet = tydelig svovellukt
Ammoniakkluft	Lukt av ammoniakk, stikkende, skarp Ingen intensitet = ingen ammoniakkluft Tydelig intensitet = tydelig ammoniakkluft
Harsklukt	Styrken av alle harske lukter (gress, høy, stearin, maling) Ingen intensitet = ingen harsk lukt Tydelig intensitet = tydelig harsk lukt
SMAK	
Syrligsmak	Relateres til en frisk, balansert smak som skyldes organiske syrer Ingen intensitet = ingen syrligsmak Tydelig intensitet = tydelig syrligsmak
Bittersmak	Relateres til grunnsmaken bitter (koffein) Ingen intensitet = ingen bitter smak Tydelig intensitet = tydelig bitter smak
Sjøsmak	Relateres til smak av frisk, salt sjø Ingen intensitet = ingen sjøsmak Tydelig intensitet = tydelig sjøsmak
Metallsmak	Smak av metall Ingen intensitet = ingen metallsmak Tydelig intensitet = tydelig metallsmak
Fermentert smak	En fermentert sursmak, skjemt Ingen intensitet = ingen fermentert smak

Tydelig intensitet = tydelig fermentert smak

Bryggesmak

Brygge, råtne , gamle fiskekasser
Ingen intensitet = ingen bryggesmak
Tydelig intensitet = tydelig bryggesmak

Kjemikaliesmak

Relateres til smaker som klor, acetone, etanol (sprit)
Ingen intensitet = ingen kjemikaliesmak
Tydelig intensitet = tydelig kjemikaliesmak

Emmensmak

En ufrisk / flau / lite aromatisk / kvalmende smak
Ingen intensitet = ingen emmen smak
Tydelig intensitet = tydelig emmen smak

Svovelsmak

Smak av svovel
Ingen intensitet = ingen svovelsmak
Tydelig intensitet = tydelig svovelsmak

Ammoniakksmak

Smak av ammoniakk, stikkende, skarp
Ingen intensitet = ingen ammoniakksmak
Tydelig intensitet = tydelig ammoniakksmak

Harsksmak

Styrken av alle harske smaker (gress, høy, stearin, maling)
Ingen intensitet = ingen harsk smak
Tydelig intensitet = tydelig harsk smak

TEKSTUR

Hardhet

Mekanisk teksturegenskap relatert til kraft som må til for å bite gjennom prøven. Bedømmes med jekslene ved 1. bitt
Ingen intensitet = ingen hardhet, myk (kremost)
Tydelig intensitet = tydelig hardhet

Saftighet

Overflateteksturell egenskap som beskriver væske absorbert eller avgitt fra et produkt. Væske avgitt fra prøven , bedømt etter 4-5 tygg.

Ingen intensitet = Ingen saftighet, ingen væske avgitt fra prøven
Tydelig intensitet = Tydelig saftighet, tydelig mengde væske avgitt fra prøven

Forbrukerundersøkelse

I denne delen av prosjektet ble det gjennomført forbrukertester på rå laks og varmebehandlet laks. Det ble valgt prøver ved tre lagringstider (20, 22 og 32 dager) for optimal hygiene og prøver ved tre lagringstider (7, 11 og 18 dager) for tilsatte bakterier. Lagringstidene representerte bakterietall der man forventet merkbare sensoriske utslag. Alle prøvene ble testet sensorisk uken før

forbrukertesten. Prøven som var lagret 32 dager ble avvist av dommerne og ble derfor erstattet med en kontrollprøve med lagring 10 dager.

Det ble rekruttert 80 forbrukere som spiser laks minimum 1 gang pr uke. Testen ble gjennomført 19. og 20. november i Nofima's lokaler i Ås og besto av to sesjoner: 1) Smaking på 6 prøver varmebehandlet laks (kjernetemperatur på 72 grader, servert romtemperert), 2) Vurdering av (lukte og se) på 6 prøver rå laks. Alle prøver ble servert i balansert rekkefølge. Forbrukere svarte på følgende spørsmål:

Smaking:

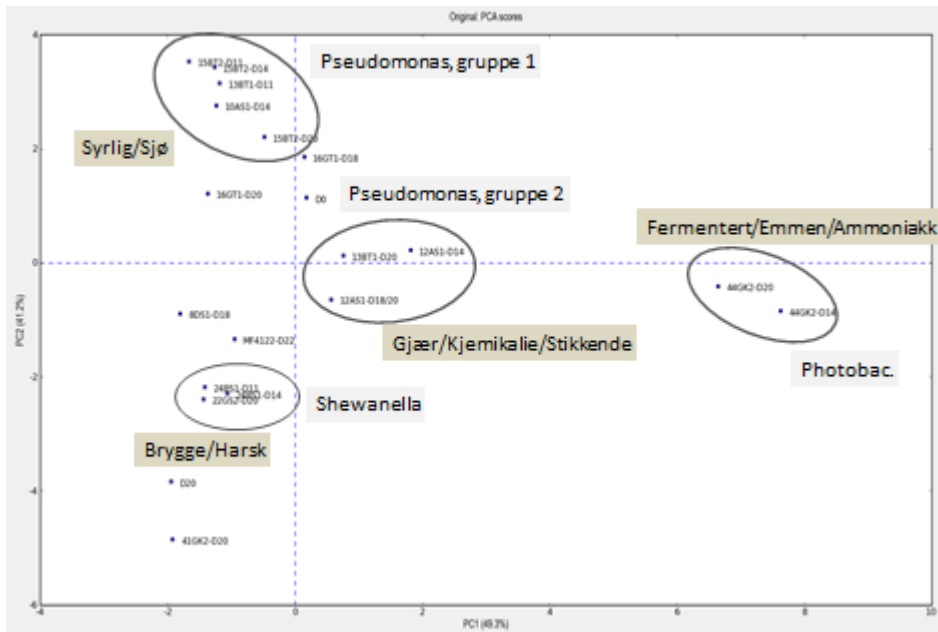
- c) Tenk deg en situasjon hvor du spiser laks til middag. Hvor godt synes du denne prøven med laks smaker? Skala 1-9 (liker ikke i det hele tatt – liker veldig godt)
- d) Ville du kjøpt denne laksen igjen? Svar: ja eller nei

Vurdering (lukte og se):

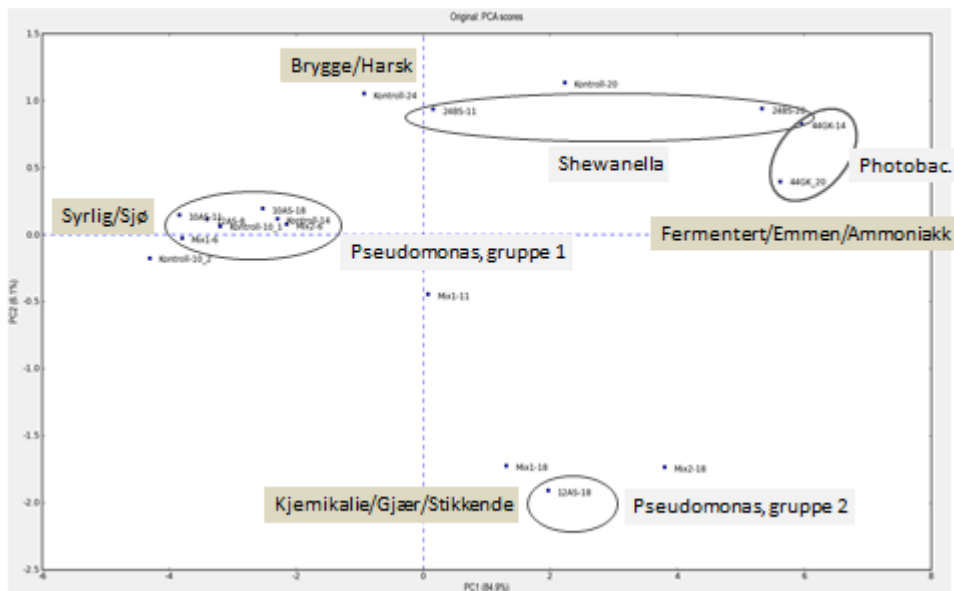
- c) Tenk deg en situasjon hvor du skal lage middag og åpner en pakke laks hjemme. Se på prøven og lukt på den. Hva synes du om kvaliteten til denne lakse-prøven?
Skala 1-9 (veldig dårlig - veldig god)
- d) Tenk deg en situasjon hvor du skal lage middag og åpner en pakke laks hjemme. Se på prøven og lukt på den. Ville du brukt denne prøven til dagens middag? Svar: Ja eller nei

Vedlegg 1.2: Sensoriske utslag (lukt) for ulike bakteriestammer

AP 1: Utvalg av bakteriestammer

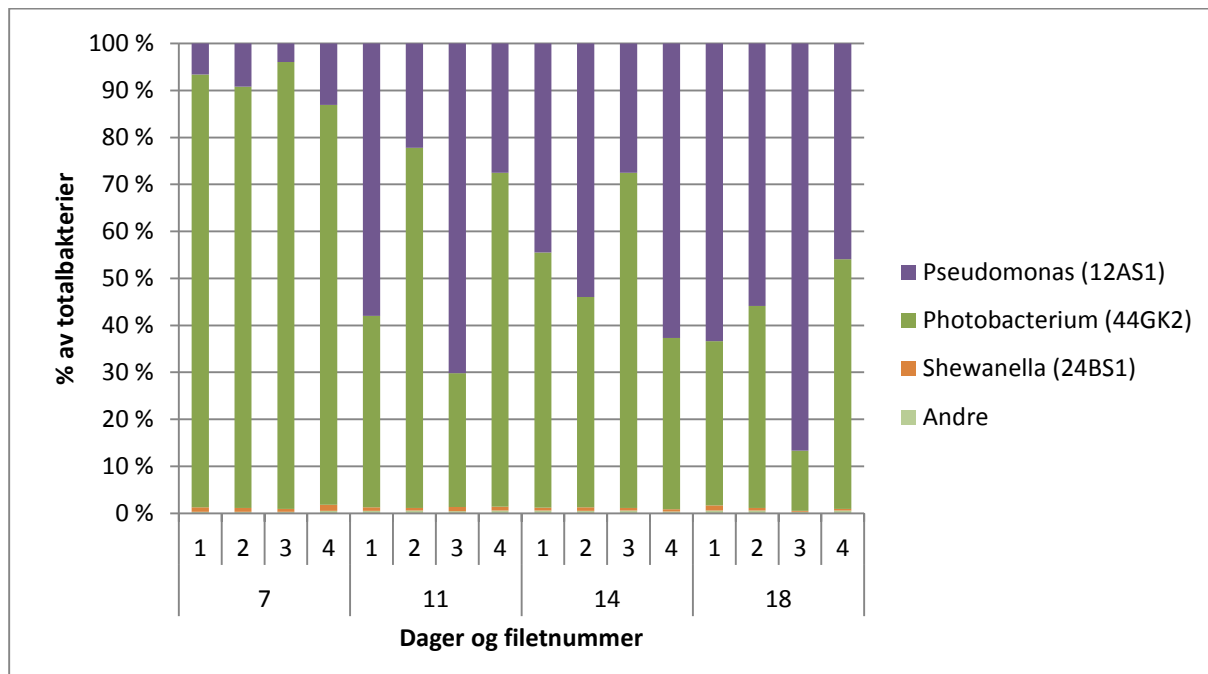


AP 2: Holdbarhetsbegrensning ved forringelse

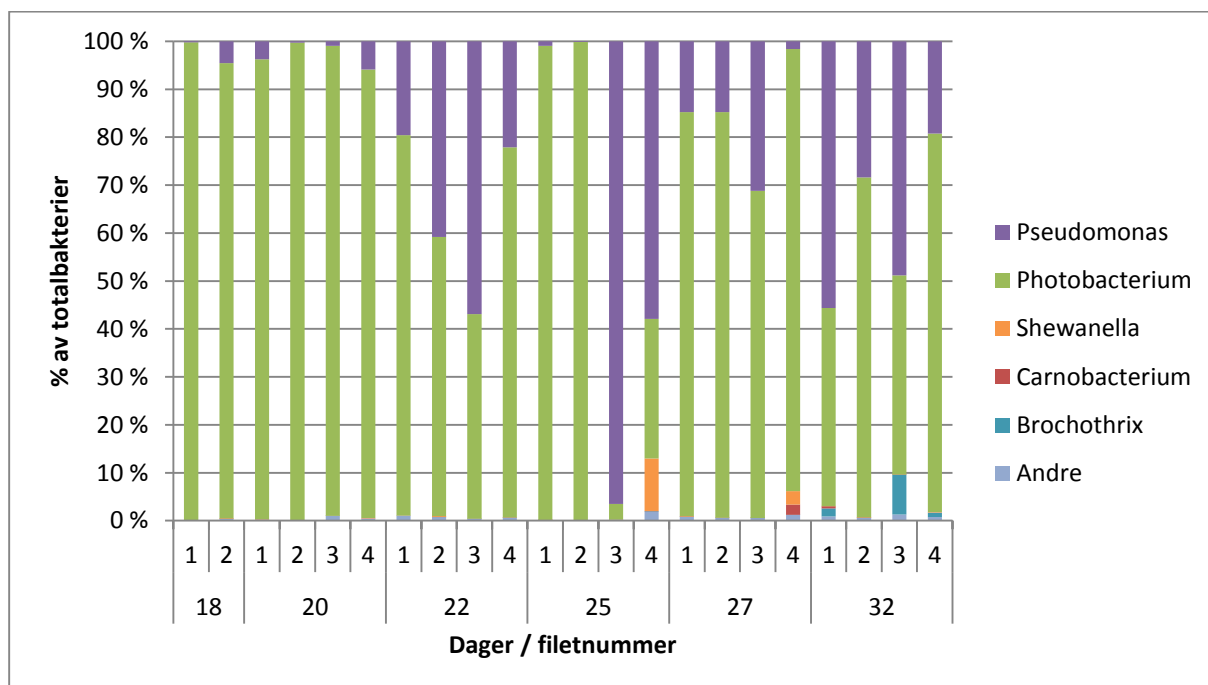


Vedlegg 1.3: Bakteriesamfunnsanalyser

Fileter til forbrukertester (Arbeidspakke 4)

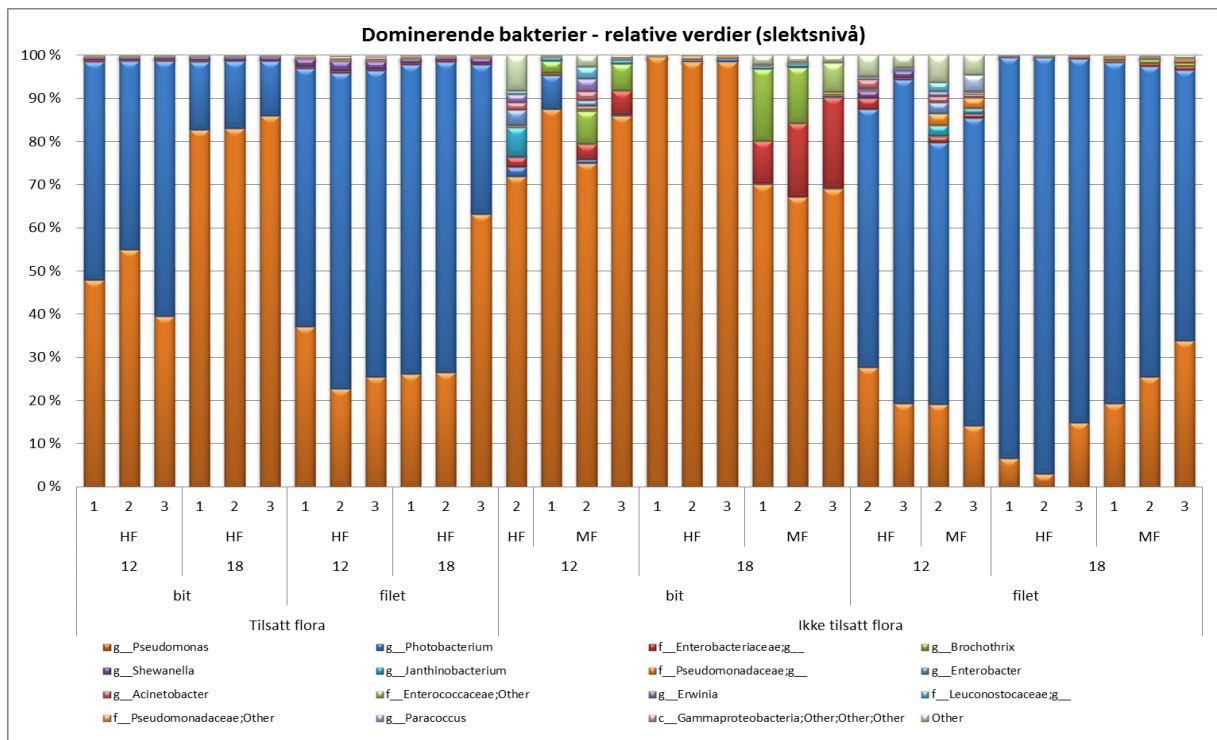


Figur Bakteriesamfunn for fileter (4 per lagringstid) tilsatt en blanding av Pseudomonas stamme 12AS1, Photobacterium stamme 44GK2 og Shewanella stamme 24BS1. Fileter lagret i 7, 11 og 18 dager ble benyttet i forbrukerundersøkelser...



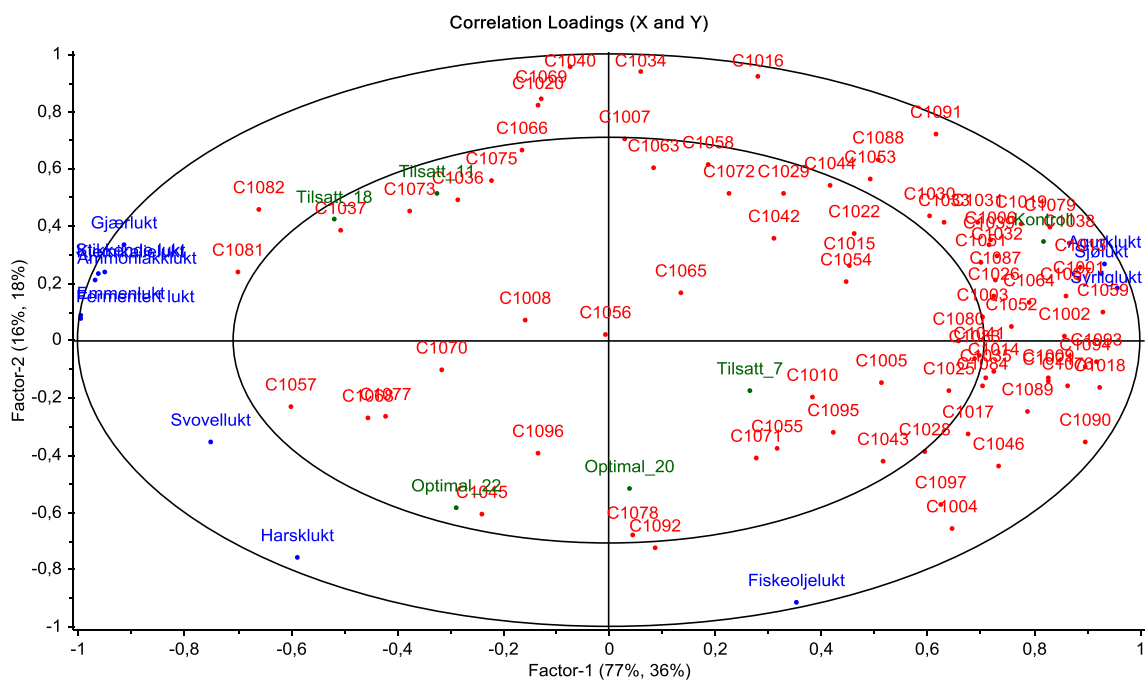
Figur Bakteriesamfunn for fileter (4 per lagringstid) håndtert med optimalhygiene. Fileter lagret i 20 og 22 dager ble benyttet i forbrukerundersøkelser.

Filet i forsøk med tilsatt Listeria (Arbeidspakke 3)

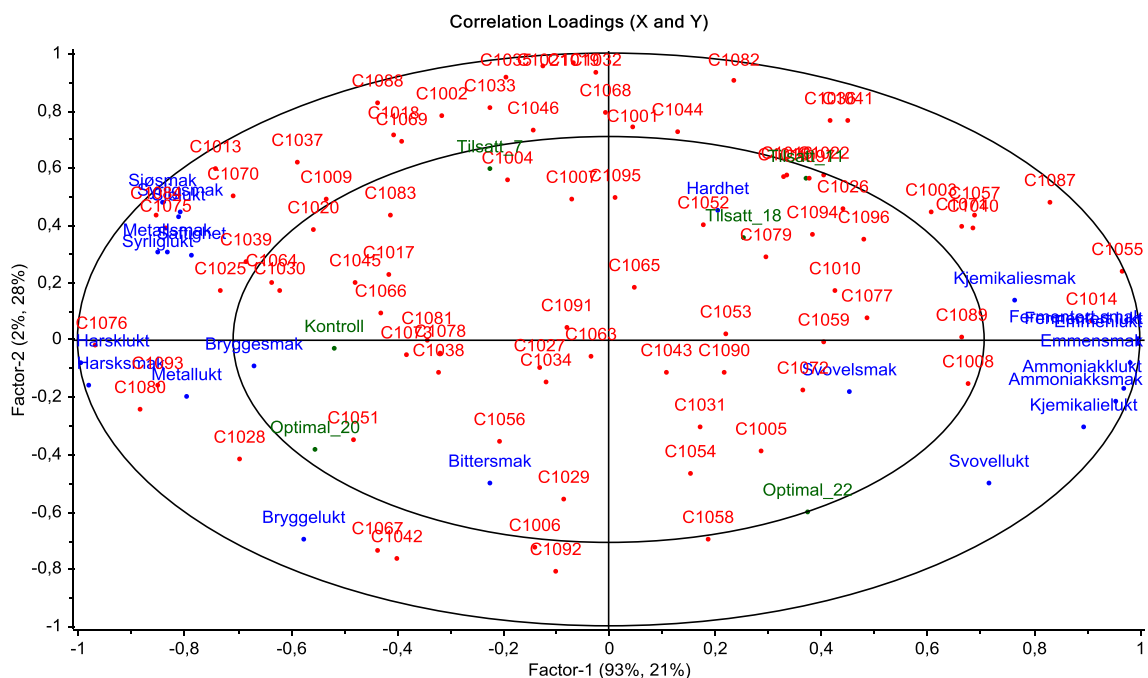


Figur : Bakteriesammensetning (% av totalmik) i laks lagret som biter i petriskåler (bit) og som filet i EPS-kasser med svøp (filet). Data er etter 12 og 18 dagers lagring på is for tre parallelle prøver er gitt (enkelte prøver dag 12 kun 1-2 paralleller grunnet lavt totalmik). HF: Håndfiletert filet; MF: Industrielt produsert filet.

Vedlegg 1.4: Preferanseplott



Figur Preferanseplott for rå laks



Figur Preferanseplott for kokt laks

Vedlegg 1.5: Variansanalyser forbrukerdata- Tukeys test

Tabell: Gjennomsnittsverdier for kvalitet og liking. Verdier i samme kolonne angitt med samme bokstav er ikke statistisk forskjellige.

Type	Lagringstid	Kvalitet (rå)	Liking (køkt)	Bakterie-tall
Kontroll	10 dager	6,7 ^a	5,4 ^{abc}	10 ⁴
Optimal	20 dager	5,4 ^c	5,2 ^{bc}	10 ⁷
Optimal	22 dag	4,4 ^d	4,6 ^c	10 ⁸
Tilsatt	7 dager	6,5 ^{ab}	5,5 ^{ab}	10 ⁷
Tilsatt	11 dager	5,5 ^{bc}	6,0 ^a	10 ⁸
Tilsatt	18 dager	4,5 ^d	5,0 ^{bc}	10 ⁹
p		<0,0005	<0,0005	

Smitteveier og smittekilder for bakterier som forringer islagret pre-rigor laksefilet

Trond Møretrø, Solveig Langsrud, Nofima

Forord

Denne rapporten omhandler resultater fra deler av prosjektet «Produksjonshygiene og holdbarhet av pre-rigor laksefilet» finansiert av FHF. Arbeidet ble gjennomført i perioden 2013-2014 ved Nofima. Arbeidet som er beskrevet her ble ledet av Trond Møretrø. Solveig Langsrud var prosjektleder. En styringsgruppe med representanter fra laksenæringen og FHF (*Kurt Olav Oppedal, Hanne Tobiassen, Rudi Jakobsen, Kristian Prytz*) var involvert i planlegging og vurderinger av resultater. Vi vil takke de to bedriftene som deltok for godt samarbeid. Rapporten er skrevet uten referanser for å gjøre den mer lesbar, referanser kan fås ved henvendelse til forfatterne.

Sammendrag

I en annen del av prosjektet «Produksjonshygiene og holdbarhet av islagret pre-rigor laksefilet» ble *Pseudomonas*, *Photobacterium* og *Shewanella* identifisert som viktige forringere av islagret laks. Det finnes svært lite informasjon om forekomst av disse bakteriene i produksjonsmiljøet. For å bestemme hvor man skal sette inn tiltak for å redusere forringelsesbakterier trenger man mer kunnskap om smitteveier og nisjer for disse bakteriene i produksjonsmiljøet.

Det ble foretatt prøveuttak hos to produksjonsanlegg (A og B) for pre-rigorfiletert laks, i henholdsvis mars og oktober 2014. Begge bedriftene hadde både slakte- og fileteringsavdeling. For bedrift A ble det også tatt et mindre prøveuttak i november 2014. Til sammen 97 renholdsprøver, 9 vannprøver og 10 samleprøver fra laks fra slakteri, samt fra 18 fileter lagret på is ble analysert for bakterienivå og de mest dominerende bakterietypene identifisert ved DNA-sekvensiering.

Bakterienivået i renholdsprøver var svært varierende. Generelt var bakterienivået høyere i slakteri enn i fileteringsavdeling. Noen transportører som var slitte eller vanskelig å vaske hadde høyt bakterienivå.

Photobacterium phosphoreum ble funnet på råvare men ikke på renholdsprøver. *Photobacterium* overlever ikke renhold og etablerer seg ikke i produksjonsmiljøet. Viktigste smittekilde for denne bakterien på laksefilet er altså råvaren. *Pseudomonas* dominerte i renholdsprøver fra begge bedrifter, men i mindre grad på råvare. *Pseudomonas* overlever renhold og finnes på de fleste kontaktflater på maskiner/utstyr, noen ganger i meget høye antall. Viktigste smittekilde for denne bakterien på laksefilet antas å være kontaktflater i produksjonsmiljøet som ikke er tilstrekkelig rengjort. *Shewanella* ble hyppig påvist fra laks i slakteri og forekommer også relativt hyppig i utblødnings/lagringstanker. *Shewanella* ble påvist på kontaktflater i produksjonsmiljøet etter renhold i slakteri. Lagringstanker for oppbevaring av laks etter sløying kan være en mulig smittekilde, men om råvaren eller produksjonsmiljøet er viktigste smittekilde er usikkert.

Det ble ikke funnet enkle spesifikke metoder for å identifisere kvalitetsforringende bakterier. Siden *Pseudomonas* dominerte i de fleste renholdsprøver vil kimtall (psykrotrofe bakterier, 15-20°C) være en brukbar parameter for nivået av kvalitetsforringende bakterier i produksjonsmiljøet. Flertallet av bakteriene som dannet svarte kolonier på jernagar var *Shewanella*, mens et mindretall var andre bakterier blant annet *Aeromonas*.

Levende laks er viktigste smittekilde for *Photobacterium* i islagret laks. For *Shewanella* antas levende laks å være en viktig kilde, men også vanntanker og utstyr kan være mulige smittekilder. *Pseudomonas* overlever renhold og dominerer i produksjonsmiljøet. *Pseudomonas* på utstyr er den viktigste smittekilden for islagret laks.

Bakgrunn

Bakterievekst på fersk laks er avhengig av en rekke forhold, som temperatur, oksygentilgang samt startnivå og sammensetning av bakterieflora. Vi har tidligere sammenliknet oppvekst av bakterier på islagret laksefilet fra ulike bedrifter. Det ble tatt ut fileter tidlig og sent på produksjonsdagen og bakterietall og -sammensetning undersøkt etter 10 dagers lagring. Ved ankomst av fileter (1 dag etter filetering) dominerte bakterien *Photobacterium phosphoreum* på filetene, mens senere dominerte *Pseudomonas*. For bedrifter som leverte fileter med høyeste bakterietall var bakterienivået på filetene produsert tidlig på produksjonsdagen høyest. Samme nivå tidlig og sent ble funnet for bedriftene med lave nivåer. Dette tydet på at forskjellene mellom bedrifter skyldtes ulik produksjonshygiene.

I en annen del av prosjektet «Produksjonshygiene og holdbarhet av islagret pre-rigor laksefilet» ble *Pseudomonas*, *Photobacterium* og *Shewanella* identifisert som viktige forringere av islagret laks. Dette samsvarer med det som er kjent fra litteratur om spesifikke forringere av sjømat. Det finnes svært lite informasjon om forekomst av disse bakteriene i produksjonsmiljøet. For å bestemme hvor man skal sette inn tiltak for å redusere forringelsesbakterier trenger man mer kunnskap om smitteveier og nisjer for disse bakteriene i produksjonsmiljøet.

Målet med arbeidet var å få svar på følgende spørsmål:

- Hva er de viktigste smittekildene for ulike kvalitetsreduserende bakterier? Råvarene eller produksjonsmiljøet?
- I hvilke nisjer i produksjonsutstyret finnes mest forringelsesbakterier?
- Hvilken mikrobiologisk metode bør brukes for overvåking av produksjonsmiljøet? Totalkim eller spesifikke forringelsesbakterier?

Gjennomføring

Det ble foretatt prøveuttak hos to produksjonsanlegg (A og B) for pre-rigorfiletert laks, i henholdsvis mars og oktober 2014. Begge bedriftene hadde både slakte- og fileteringsavdeling. Det var noen ulikheter i prosessen mellom anleggene:

- Bedrift A hadde deslimingsmaskin.
- Bedrift B hadde i tillegg til utblødningstank, to lagringstanker for oppbevaring av laks lengre nedstrøms i produksjonslinjen.

Bedrift A hadde daglig kloralkalibasert vask med alternering hver 14 dag mellom kvartære ammoniumsforbindelser og pereddiksyre for desinfeksjon. Det var installert CIP-vask av

sløyemaskiner. Utblødningstank ble vasket hver helg. Bånd ble vasket mens de gikk, med demontering i helger.

Bedrift B hadde daglig kloralkalibasert vask med desinfeksjon med pereddiksyre. Utblødningstank og andre lagringstanker ble rengjort to ganger pr uke. Bånd ble vasket mens de gikk, med periodisk demontering.

Prøveuttak

Det tatt renholdsprøver, vannprøver og prøver fra laks fra slakteri (Tabell 1). For bedrift B ble det også tatt ut filet fra ulike trinn i prosess, som ble lagret på is. (Dette ble også gjort for bedrift A, men disse prøvene ble dessverre analysert feil). For bedrift A ble det gjennomført et ekstra prøveuttak i november 2014. Det ble da tatt prøver av fileter fra 4 ulike trinn i prosess og deretter lagret på is samt 5 utstyrprøver og 3 prøver fra laks fra slakteri.

Tabell 1. Oversikt over prøvetakingspunkter

Prøvetype*	Bedrift A		Bedrift B	Totalt
	Uttak 1	Uttak 2	Uttak 1	
Utstyr (kontaktflater)	24	4	30	58
Transportører	15	1	15	31
Miljøprøver	5		3	8
Vannprøver	4		5	9
Laks i slakteri	3	3	4	10
Sum	51	8	57	116
Islagret filet		4	3	7

*Utstyr: alle maskiner utenom transportører; Miljøprøver: produksjonsmiljø utenom maskiner og utstyr; Vannprøver: sjøvann inn, vann i stunner/desliming, utblødningstank, lagringstanker; Laks i slakteri: samleprøver fra svaber av laks

Renholdsprøver

Det ble tatt overflateprøver for mikrobiologisk analyse (50 fra bedrift A og 48 for bedrift B) fra utstyr og maskiner fra hele produksjonslinja fra stuning til pakking av fileten. Uttaket ble gjort etter renhold, dvs før produksjonsstart. For bedrift A ble 5 av de samme punktene prøvetatt 8 måneder etter det første uttaket. Det ble tatt prøver fra sløyemaskin, skrapere, gradere, fileteringsmaskin, trimmemaskin, skinnfjernere og andre kontaktflater langs linjen. Det ble tatt prøver fra 15 transportører både fra bedrift A og B. Det ble tatt et mindre antall miljøprøver fra ulike kasser (Bedrift A), gulv (Bedrift A og B) og en gulvprøve (bedrift B).

Det ble svabret et areal på 100-300 cm² med sterile kompresser (Mesoft, Mölnycke Health Care AB, Göteborg) om ikke annet er oppgitt. Kompressen lagt i et rør med 15 ml Dey Engley Neutralizing broth. Røret ble ristet og ved forventning om høye bakterietall ble det laget fortyninger i peptonvann. Prøvene ble platet ut på dobbelt sett med jernagarskåler. Den ene halvparten ble inkubert anaerobt og resten aerobt. For bedrift A ble det også platet ut på CFC (selektiv agar for *Pseudomonas*). Alle skåler ble inkubert på 15 °C i minst 5 dager før avlesing. For de fleste prøvene ble det også analysert for *Enterobacteriaceae* ved å tilsette 1 ml til petrifilm som ble inkubert ved 37 °C i 24 timer.

Vannprøver

Det ble tatt prøver av vann fra ulike prosesstrinn. Fra begge bedrifter ble det tatt vannprøve fra stunningsvann og utblødningstank. Bedrift A hadde deslimingsmasin og det ble tatt prøver fra denne før og under produksjon. Bedrift B hadde i tillegg to andre oppbevaringstanker med vann for sløyd laks som det også ble tatt prøver fra. Fra bedrift B ble det også tatt prøve fra sjøvann som ble pumpet inn sammen med laksen. 50 ml vann ble filtret (0.45 µm) og filteret ble deretter plassert på agarskåler. Skålene ble inkubert og avlest som beskrevet for renholdsprøver. Det ble også sådd ut 100 µl direkte fra vannprøver til agar. Det ble analysert for *Enterobacteriaceae* med petrifilm.

Prøver fra laks fra slakteri

For bedrift A ble det tatt prøver fra laks etter stunner og etter desliming samt rett etter sløyning. For bedrift B ble prøvene tatt fra laks etter stuning, før sløyemaskin, samt fra laks på bånd rett før og rett etter utblødningstank. Prøvene ble tatt som samleprøver ved å svabre tre laks (gjeller/skinn/buk). Svabre ble overført til rør med Dey-Engley Neutralizing broth og mikrobiologiske analyser gjort som beskrevet for renholdsprøver (se forrige avsnitt).

Filetprøver

Det ble tatt ut filet (3-4 stk for hvert uttak) rett etter filetmaskin, trimming og rett før pakking. Fra bedrift A ble det også tatt ut filet etter skinning. Filetene ble pakket i blåplast, lagt på is og sendt til Nofima for lagring og analyse. Ved ankomst neste dag ble filetene pakket ut. Det ble tatt ut prøver for mikrobiologisk analyse (utplating på jernagar, inkubering ved 15 °C før avlesning). Filetene ble svøpt i blåplast og lagt på is i isoporkasser. Filetene ble oppbevart i et kjølerom ved 1 °C og analysert etter 14 dager. Det ble analysert for *Enterobacteriaceae* med petrifilm.

Identifisering av bakterier

Plukking av bakteriekolonier

For å bestemme hvilke bakterier som dominerte i prøvene ble det plukket og identifisert opptil 20 tilfeldig valgte kolonier fra jernagar (inkubert anaerobt). For å se om sorte kolonier på jernagar var *Shewanella* og om man fant andre sulfidproduserende bakterier i produksjonsmiljøet ble det plukket og identifisert opptil 3 sorte/grå kolonier med ulik kolonimorfologi/farge på jernagar inkubert aerobt fra hver prøve. For å undersøke om CFC agar egnet seg for å påvise *Pseudomonas* ble det også plukket og identifisert kolonier med ulik morfologi fra CFC skåler.

Identifisering

En liten mengde celler fra koloni ble overført til en brønn i et mikrotiterbrett med 50 µl TE buffer. Brettet ble deretter varmebehandlet ved 99 °C i 10 min, og sentrifugert ved 4700 rpm i 3 min. 30 µl supernatant ble deretter overført til et nytt brett, og brettet ble fryst ned ved -20 °C inntil videre analyse. 16S rDNA ble amplifisert i PCR reaksjon med 1 µl supernatant som templat og Mangala F + R som primere. Sekvensieringen ble utført med Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems med Mangala F som primer. De resulterende sekvensene ble brukt i et databasesøk (<http://rdp.cme.msu.edu>) og identifisert til slektsnivå.

Resultater og diskusjon

Er råvarene eller produksjonsmiljøet viktigste smittekilde for kvalitetsreduserende bakterier?

Konklusjon

- ***Photobacterium phosphoreum*** er en marin bakterie som finnes på levende laks og i noen grad sjøvann. *Photobacterium* overlever ikke renhold og etablerer seg ikke i produksjonsmiljøet. Viktigste smittekilde for denne bakterien på laksefilet er altså råvaren.
- ***Pseudomonas*** er en miljøbakterie som man også kan finne på levende laks og vann, men i lave antall. *Pseudomonas* overlever renhold og finnes på de fleste kontaktflater på maskiner/utstyr, noen ganger i meget høye antall. Viktigste smittekilde for denne bakterien på laksefilet er altså kontaktflater i produksjonsmiljøet som ikke er tilstrekkelig rengjort.
- ***Shewanella*** er en marin bakterie som finnes på levende laks. *Shewanella* forekommer relativt hyppig i utblødnings/lagringstanker og på kontaktflater i produksjonsmiljøet etter renhold, særlig i slakteavdelingen. Lagringstanker for oppbevaring av laks etter sløyning kan være en mulig smittekilde, men om råvaren eller produksjonsmiljøet er viktigste smittekilde er usikkert.

Tabell 2 viser de mest dominerende bakterieslektene som ble funnet i bedriftene. Totalt ble det identifisert ca. 1500 bakterier fra de to laksebedriftene: Det ble totalt påvist 42 ulike bakterieslekter, hvorav 21 slekter ble påvist i begge bedriftene.

Pseudomonas

Pseudomonas er en nøysom og kuldetolerant bakterie som vokser på laksefilet under islagring. Noen *Pseudomonas*-bakterier kan gi en uønsket lukt på rå filet (kjemikalie, gjær, stikkende), men først når de når opp i høye antall (10^9 /gram).

Pseudomonas var den dominerende bakterieslekten i prøver fra begge bedrifter og ble påvist i henholdsvis 60 og 50% av totalt antall prøver fra hhv bedrift A og B (Tabell 2). *Pseudomonas* ble påvist i alle typer prøver, men i mindre grad på laks i slakteriet (Figur 1 og 2). Bakterien ble funnet på to av sju samleprøver fra laks i slakteri men vokste opp og dominerte på alle fileter etter 10 dager lagring på is (totalt 18 undersøkt, Tabell 3). Det ble bare identifisert 1 koloni som *Pseudomonas* fra råvare (laks rett etter stuning). Dette tydet på en smitte av filetene under prosessering, enten fra innvoller under sløyning eller fra maskiner/utstyr. *Pseudomonas* ble påvist i henholdsvis 91% og 72% av renholdsprøvene fra bedrift A og B som hadde bakterienivå over deteksjonsgrensen. Den høye forekomsten av *Pseudomonas* i renholdsprøver viser at denne bakterien overlever renhold.

Man vet at for noen bakterier, for eksempel *Listeria monocytogenes*, er det bare noen varianter som overlever i produksjonsmiljøet («husstammer»), mens andre fjernes av renholdet. Dette kan skyldes ulik evne til å overleve renhold. *Pseudomonas* omfatter en rekke ulike arter med ulike egenskaper og man kunne tenke seg at noen hadde bedre overlevelsessevner og ville dominere i miljøet. DNA-sekvensene (16S rDNA) til *Pseudomonas*-isolatene ble sammenliknet for å finne ut om ulike typer var

tilstede i produksjonsmiljøet og på råvarer, eller om renhold og andre betingelser førte til en seleksjon av visse typer. Det ble totalt påvist 53 ulike sekvenstyper av *Pseudomonas*. Noen av disse typene var svært vanlige i bedriftene, mens andre var svært sjeldne. To nært beslektede typer ble funnet i 6-11 renholdsprøver fra ulikt utstyr i begge bedrifter og ble også funnet på ferdig filet i begge bedrifter. Det er mulig at renholdet selekterer for disse typene *Pseudomonas* og at de har bedre overlevelsessevne i lokalene enn andre typer. En av typene *Pseudomonas* ble påvist på en sløyemaskin og akselerasjonstransportør (begge uttak) i bedrift A. Ved det andre uttaket ble den også påvist på fileten. For bedrift B ble de to sekvensprofilene funnet både i renholdsprøver og i fileten.

Lavere forekomst av *Pseudomonas* på råvarer enn i miljøet gjør at det ble konkludert med at produksjonsmiljøet er viktigste smittekilde.

Photobacterium phosphoreum

Photobacterium phosphoreum er en selvlysende marin bakterie som lever i havvann og ofte i symbiose med marine organismer. Den er kulde- og CO₂-tolerant og vokser derfor opp både på islagret laksefilet og modifisert-atmosfærepakket filet. *Photobacterium phosphoreum* gir fermentert, ammoniakk og emmen lukt ved relativt lave antall på laks, ca 10⁷/gram.

Photobacterium ble funnet på fire av sju samleprøver fra laks fra slakteri (Tabell 2). *Photobacterium* ble påvist på råvare (laks rett etter stuning) fra begge bedrifter (Figur 2). I bedrift A var *Photobacterium* dominerende på laks tatt ut tidlig i slakteprosessen, men den ikke ble funnet på laks etter sløyning. Det var også større forekomst av *Photobacterium* på laks før enn etter desliming. Bedrift B hadde ikke deslimingsmaskin, men også her ble *Photobacterium* påvist på laks før, men ikke etter sløyning. I bedrift B ble *Photobacterium* også funnet i vann som ble pumpet inn med laks og i vann/blod i utblødningstank (Figur 2). *Photobacterium* ble ikke påvist i noen renholdsprøver (Tabell 1, Figur 1), noe som tyder på at den ikke overlever renhold. *Photobacterium* ble ikke påvist på fileten lagret på is (totalt 18 undersøkt, Tabell 3). God vekst av på islagret filet er imidlertid observert i flere i andre lagringsforsøk i prosjektet (Rapport fra delprosjekt 1-4), og den hadde en stor betydning for holdbarhet selv om utgangsnivået på fileten ved produksjonsdagen er under deteksjonsgrensen for mikrobiologiske analyser.

Det ble konkludert med at levende laks (skinn) er viktigste smittekilde for *Photobacterium*, og at nivået synker utover i produksjonsprosessen til ikke målbare nivåer på fileten på produksjonsdagen. Rutiner for å hindre overføring fra skinn til fileten vil redusere forekomst av *Photobacterium* på fileten.

Shewanella og andre sulfidproduserende bakterier

Shewanella putrefaciens/baltica er en marin bakterie som er regnet som en viktig forringelsesbakterie på islagret hvit fisk. Bakterien er kuldeterolerant og kan vokse opp på islagret laks med mindre den blir utkonkurrert av *Pseudomonas* og *Photobacterium*. Bakterien kan forårsake bryggelukt og harsk lukt ved ca 10⁸/gram og fermentert, ammoniakk og emmen lukt ved ca 10⁹/gram. Selv om *Shewanella* er mest studert kan andre sulfidproduserende bakterier også ha betydning for forringelse av sjømat. *Aeromonas* er en bakterieslekt som kan danne sulfid, og som er rapportert som forringer av fisk. *Aeromonas* er vanlig forekommende på levende fisk og *Aeromonas salmonicida* kan forårsake furunkulose hos laks.

Shewanella ble påvist hyppigere på laks fra slakteri og fra vannprøver enn fra renholdsprøver (Tabell 2, Figur 2). Dette i motsetning til *Pseudomonas*, som var hyppigst forekommende i renholdsprøver.

Shewanella ble påvist på seks av sju samleprøver fra laks fra slakteri, men vokste ikke opp til høye antall på filet under lagring. Den ble funnet på tre av 18 fileter etter 10 dagers lagring på is (Tabell 3).

Som for *Pseudomonas* ble det også gjort analyser for å se om man hadde seleksjon av visse varianter under renhold. For *Shewanella* ble det totalt sekvensiert 104 isolater fra bedrift A fra uttak 1 og 2. Sekvensiering av 16SrDNA viste at det var flere ulike typer *Shewanella* til stede. 4 av 5 hovedtyper av *Shewanella* ble påvist i både mars og november. To av disse typene ble påvist både i vann og på utstyr, to typer ble funnet på vann, utstyr og laks fra slakteri, mens en type *Shewanella* kun ble påvist fra laks fra slakteri. Det kan spekuleres på om *Shewanella* av den sistnevnte typen har mindre evne enn andre typer til å etablere seg i anlegget. Den dominerende typen (46 av 104 isolater med identisk 16 S rDNA) ble påvist fra både renholdsprøver, vann og laks fra slakteri. Det var også stor diversitet blant 136 isolater av *Shewanella* identifisert fra bedrift B. Også i bedrift B ble hovedgruppene av *Shewanella* påvist i de fleste prøvetyper, mens en type bare ble påvist i renholdsprøver. Det ble påvist 6 ulike typer *Shewanella* fra renholdsprøve fra stunner og tre ulike typer fra blodvann i utblødningstank. Det ble konkludert med at råvaren er en viktig smittekilde for *Shewanella*, men at man ikke kan utelukke smitte under prosess, særlig fra utblødnings/lagringsanker.

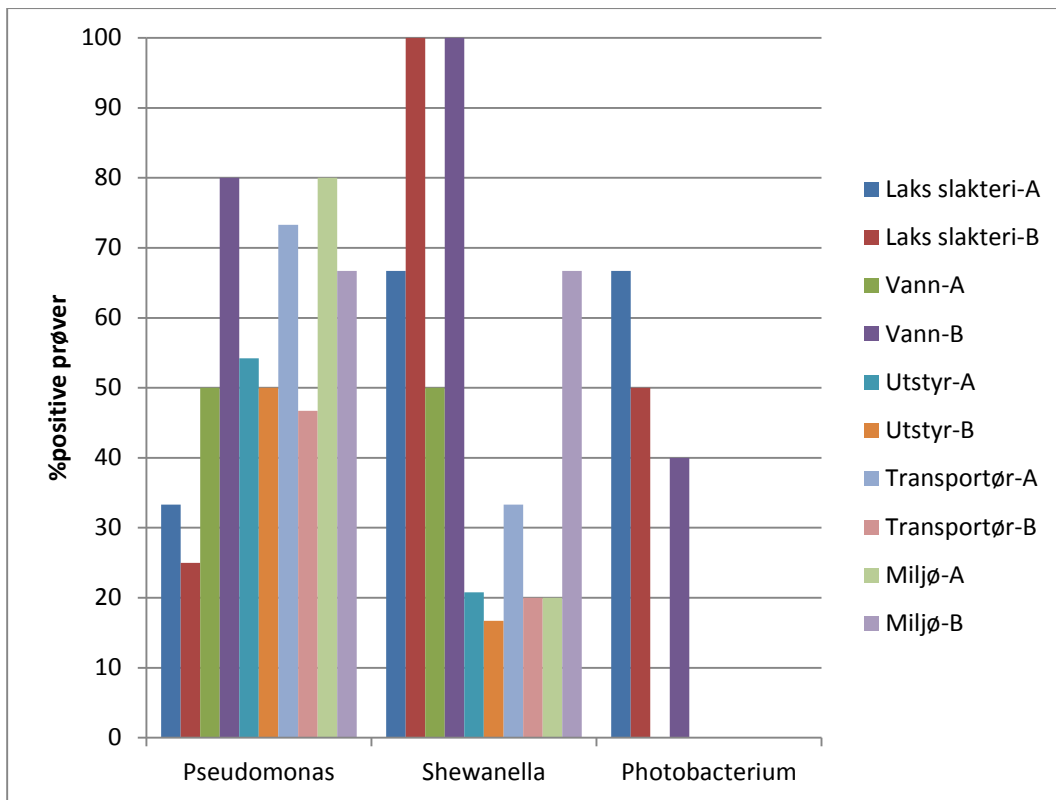
Aeromonas ble påvist på laks fra slakteri og på islagret filet fra begge bedrifter (Tabell 2). *Aeromonas* ble påvist på nesten halvparten av transportørene i bedrift A, men ble ikke påvist på noen transportører i bedrift B (Tabell 2). Det ser altså ut til at bakterien til en viss grad overlever renhold, men som for *Shewanella* at råvare også er en viktig kilde.

For bedrift A var 70% av *Aeromonas* isolatene identiske (samme 16S rDNA sekvens). Det vil si at det kan være samme stamme, men mer nøyaktige undersøkelser ville være nødvendig for å bekrefte dette. Denne sekvensprofilen ble påvist fra til sammen 12 renholdsprøver fra begge uttakene samt på fileter fra andre uttak. Den ble også påvist på laks fra slakteri og i vann fra deslimingsmaskin. Profilen ble ikke påvist i bedrift B. Det er mulig at bedrift A har en husstamme av *Aeromonas* som overlever renhold og kan smitte laks ved prosessering, men typingsstudier vil være nødvendig for å kunne konkludere sikkert om dette.

Andre bakterier

Andre marine bakterier som *Pseudoalteromonas*, *Vibrio* og *Psychromonas* ble, i likhet med *Photobacterium* funnet på råvare men ikke på renholdsprøver fra produksjonsutstyr, transportører, miljøprøver eller islagret filet. Ingen av disse bakteriene regnes for å ha betydning for forringelse av islagret laksefilet.

For bedrift A ble det gjort et ekstrauttak der *Pseudomonas* ble funnet i flertallet av renholdsprøvene, men ikke var så dominerende som ved første uttak. Ved uttak 2 ble det funnet en del Gram positive bakterier, mens det ved uttaket i mars var bare 1 av 650 identifiserte bakterier Gram positive. Gram positive bakterier tåler mer tørking enn Gram negative bakterier og isoleres ofte fra tørre prøvepunkter. Vi vet ikke årsaken til at det var mer Gram positive bakterier i november, dersom prøvepunktene var tørrere i november kan dette være en mulig forklaring. I tillegg ble det i uttak 2 funnet *Acinetobacter* både i renholdsprøver og på laksefilet lagret på is. *Acinetobacter* likner *Pseudomonas*, men er ikke en like viktig forringer. Disse forskjellene mellom uttakene illustrerer at bakteriefloraen på utstyr kan variere over tid.



Figur 1. Forekomst av kvalitetsforringende bakterier i ulike prøvetyper i bedrift A og B

Tabell 2. Oversikt over påvisning (prosent) av bakterieslekter i ulike prøvetyper

Bakterieslekt	Bedrift A (uttak 1)						Bedrift B					
	Laks slakteri (3*)	Vann (4)	Utstyr (24)	Transportører (15)	Miljø (5)	Totalt	Laks slakteri (4)	Vann (5)	Utstyr (30)	Transportører (15)	Miljø (3)	Totalt
<i>Pseudomonas</i>	33**	50	54	73	80	61	25	80	50	47	67	51
<i>Shewanella</i>	67	50	21	33	20	29	100	100	17	20	67	33
<i>Aeromonas</i>	33	50	8	47	20	28	25	0	0	0	100	7
<i>Acinetobacter</i>	33	25	13	33	0	18	0	0	10	13	0	9
<i>Chryseobacterium</i>	33	0	8	13	20	16	0	0	10	7	0	7
<i>Comamonas</i>	0	0	13	13	20	12	0	0	3	7	0	4
<i>Janthinobacterium</i>	0	25	13	13	0	12	0	0	13	7	0	9
<i>Psychrobacter</i>	33	25	4	20	0	12	75	60	20	7	33	25
<i>Flavobacterium</i>	67	25	4	7	0	10	25	40	3	7	0	9
<i>Morganella</i>	0	0	4	13	0	6	75	0	0	0	3	7
<i>Serratia</i>	0	0	4	13	0	6	0	0	17	7	0	11
<i>Yersinia</i>	0	25	4	7	0	6	0	0	3	7	0	4
<i>Photobacterium</i>	67	0	0	0	0	4	50	40	0	0	0	7
<i>Pseudoalteromonas</i>	33	25	0	0	0	4	75	60	0	0	33	12
<i>Vibrio</i>	0	0	0	0	0	0	100	40	0	0	0	11
<i>Psychromonas</i>	0	0	0	0	0	0	100	20	0	0	0	9
<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	7
<i>Kluyvera</i>	0	0	0	7	0	2	0	0	10	0	0	5

*Antall prøvepunkter

***Pseudomonas* ble påvist i 1 av 3 prøver (33%) fra laks fra slakteri

Basert på bakterier identifisert fra jernagar inkubert anaerobt og aerobt

Bakterieslekter funnet i mer enn 5% av prøvepunkter i minst en bedrift er vist

Antatte kvalitetsforringende bakterier er uthevet

Utstyr er kontaktflater med produkt, miljøprøver er overflater som ikke er i kontakt med produkt

Bare uttak 1 er vist for bedrift A.

Tabell 3. Bakterier på fersk og islagret filet

Prøve	Bedrift A (uttak 2)				Bedrift B		
	Dag 1 [¤]		Dag 14		Dag 1 [¤]	Dag 14	
	Totalkim/g*	Bakterier identifisert	Totalkim/g	Bakterier identifisert	Totalkim/g	Totalkim/g	Bakterier identifisert
Filet, etter filetering	120	<i>Microbacterium, Aeromonas, Flavobacterium, Acinetobacter, Rhodococcus, Chryseobacterium</i>	8 x 10 ⁵	<i>Pseudomonas</i> 16/16 <i>Aeromonas</i> (svart)***	<20	5 x 10 ⁶	<i>Pseudomonas</i> 15/17 <i>Shewanella</i> 2/17 <i>Aeromonas</i> (svart)&
Filet, etter trimming	<20		2 x 10 ⁶	<i>Pseudomonas</i> 10/11 <i>Acinetobacter</i> 1/11	20	4 x 10 ⁶	<i>Pseudomonas</i> 26/26
Filet, etter skinning	53	<i>Acinetobacter</i> (dominerende), <i>Comamonas, Pseudomonas</i>	3 x 10 ⁶	<i>Pseudomonas</i> 14/14 <i>Aeromonas</i> (svart)&			
Filet, ved pakking	27	<i>Acinetobacter Flavobacterium, Pseudomonas</i>	4 x 10 ⁶	<i>Pseudomonas</i> 11/12 <i>Carnobacterium</i> 1/12 <i>Shewanella, Aeromonas</i> (svart) ^{&}	<20	6 x 10 ⁶	<i>Pseudomonas</i> 21/22 <i>Carnobacterium</i> 1/22 <i>Shewanella</i> (svart) ^{&}

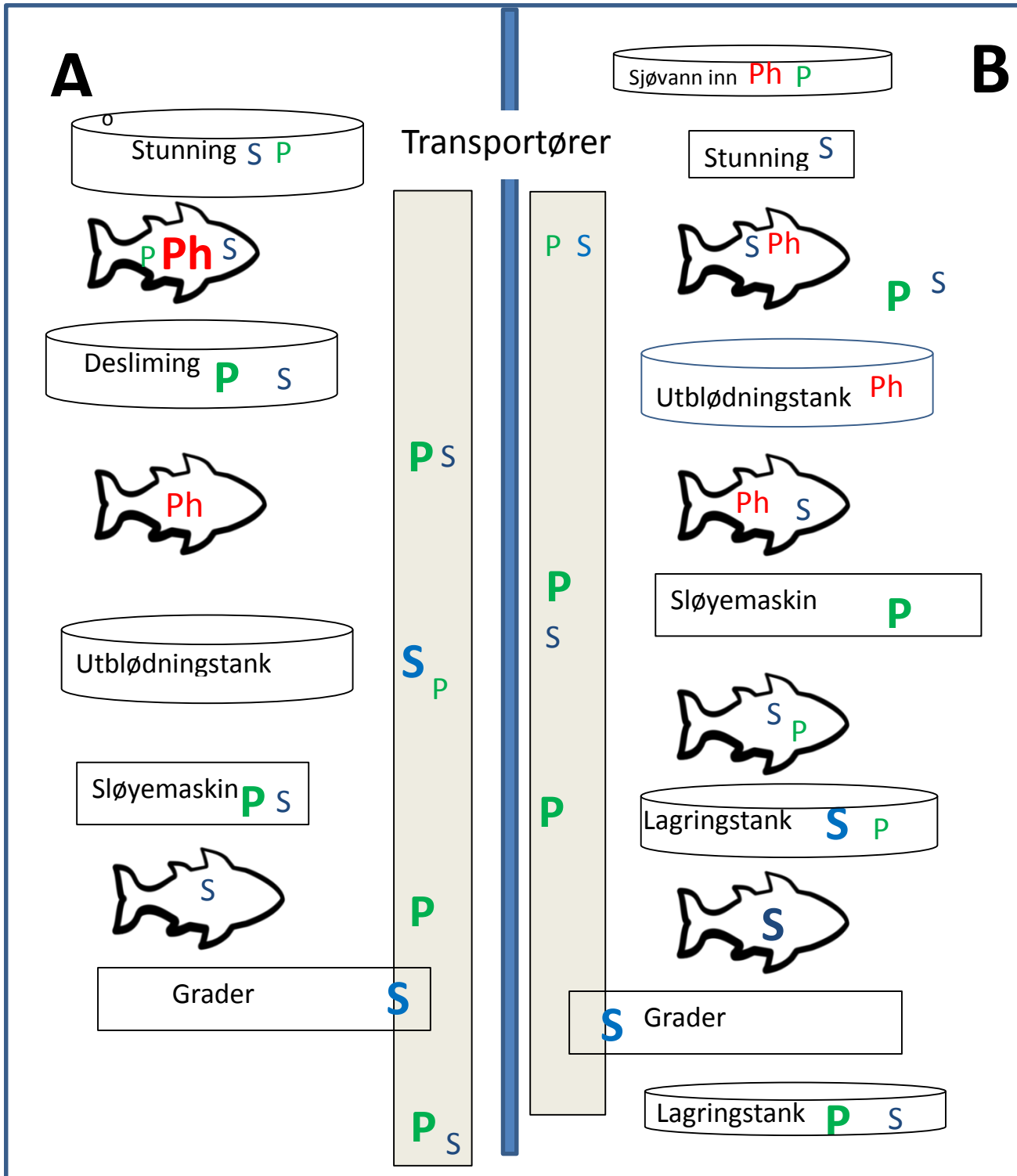
¤Uttak av fileter ved mottak dagen etter produksjonsdag.

*Totaltall basert på utplating på jernagar inkubert aerobt ved 15 °C. Gjennomsnittsverdier for 2-3 fileter.

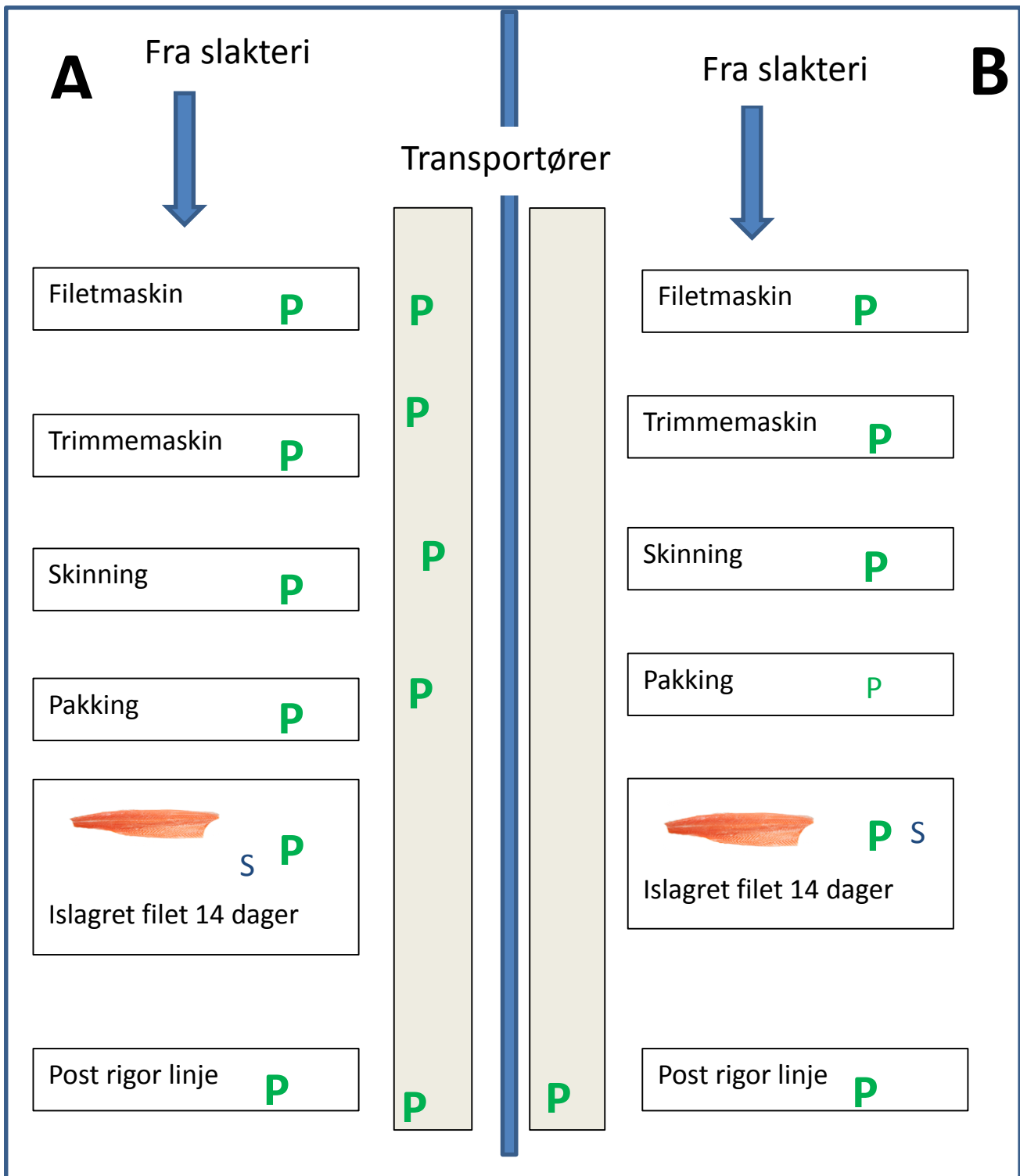
***Pseudomonas* identifisert for 15 av 17 kolonier tilfeldig plukket fra jernagar inkubert anaerobt/aerobt

***Svarte kolonier på jernagar inkubert aerobt identifisert som *Aeromonas*, ca 10⁴/g

&Svarte kolonier på jernagar inkubert aerobt identifisert som *Shewanella* og/eller *Aeromonas*, ca 10⁵/g



Figur 2. Oversikt over forekomst av *Pseudomonas* (P), *Shewanella* (S) og *Photobacterium* (Ph) i slakteridelen av bedrift A og B. Uthevete bokstaver indikerer at bakteriene dominerte på prøvepunktet. Sylinder indikerer vannprøve



Figur 3. Oversikt over forekomst av *Pseudomonas* (P) og *Shewanella* (S) fileteringsavdeling i bedrift A og B. Uthevete bokstaver indikerer at bakteriene dominerte på prøvepunktet. *Photobacterium* ble ikke påvist i noen prøver

Nisjer i produksjonsutstyret for forringelsesbakterier

Konklusjon

Det ble funnet mer kvalitetsreducerende bakterier i slakteriet enn i filetavdelingen. Dette kan skyldes et våtere miljø og mer smuss, noe som fører til høyere krav til renholdet for å komme ned i et akseptabelt bakterienivå. Det ble funnet relativt høye bakterietall i utblødningsstank og lagringstanker med laks. Overvåking og oftere vannbytte anbefales. Transportører, filetmaskin og prismer fra sløyemaskin var problemområder med høye bakterietall. Gulvrelaterte prøver har også høyt bakterienivå, men her er smitte til produkt mindre sannsynlig.

- ***Pseudomonas*** dominerte på produksjonsutstyr og finnes i de fleste renholdsprøver med høye totaltall.
- ***Shewanella*** fantes først og fremst på problempunkter i slakteavdelingen samt i utblødnings/lagringstanker. Det er usikkert det er stor overføring av *Shewanella* fra laks til utstyr eller om *Shewanella* overlever spesielt godt på dette utstyret.
- ***Photobacterium*** overlever ikke et normalt renhold

I Tabell 4 er det vist en oversikt over bakterienivået i ulike typer renholdsprøver, og punkter med høye bakterienivåer er vist. De samme problempunktene gikk igjen i begge bedrifter.

- Enkelte transportører hadde høye bakterietall og problemet var for flere av dem relatert til dårlig vaskbarhet, enten på grunn av slitasje eller på grunn av dårlig tilgjengelighet for vask. Bedrift A: En transportør med høyt bakterienivå var tydelig slitt. For denne transportøren ble det også funnet svært høye bakterietall i andre uttak. Bedrift B: Et av båndene med høyt bakterienivå var svært vanskelig å komme til for vask. Det var lavt bakterienivå (under deteksjonsgrensen) på de fleste transportører i prerigorlinje filetavdeling og *Pseudomonas* ble ikke påvist. Det motsatte var tilfelle for post-rigor linjen der *Pseudomonas* dominerte (Figur 3).
- Det ble funnet høyt bakterienivå for prismer i sløyemaskin, høyere enn andre prøver fra sløyemaskin. Det er usikkert om selve prismene var vanskelig å holde rene eller om det skyldtes tilbakeslag fra vakuumsystem.
- For filetmaskin (kontaktflater, kniv) ble det påvist høye bakterietall for begge bedrifter.
- Gulvrelaterte prøver og kasser hadde også høye bakterietall, men betydningen av dette er usikker fordi det ikke var direkte produktkontakt.

Pseudomonas

Pseudomonas ble stort sett funnet på alle problempunkter og også på overflater med lave bakterietall. Bakterien ser derfor ikke ut til å etablere seg i spesielle nisjer. *Pseudomonas* er også vanlig forekommende fra renholdsprøver i andre typer matproduksjon. Bakterien har en rekke egenskaper som gjør at den er tilpasset overlevelse og vekst i produksjonsmiljø for laks: Den vokser godt i fuktig miljø og ved lave temperaturer, den utkonkurrerer andre bakterier, den kan vokse selv i

perioder med lav næringstilgang, den har god evne til å danne biofilm og er relativt resistent mot desinfeksjonsmidler. En svakhet hos *Pseudomonas* er at den er ganske følsom for tørke. Hygienisk design av maskiner, lett tilgjengelighet for renhold, riktig bruk av VD-midler og opptørking er viktig for å bli kvitt *Pseudomonas*.

Shewanella

Shewanella overlevde til en viss grad renholdet og ble hyppigere påvist på renholdsprøver fra slakteriet enn fileteringsavdelingen (Figur 2 og 3). Dette kan skyldes at det er mer fuktig og mer smuss på slakteriet og dermed større bakteriebelastning, noe som setter høyere krav til renholdet. Det ble påvist høye bakterietall i utblødningstanker og i andre lagringstanker. *Shewanella* ble påvist i vann fra alle slike tanker i bedrift B. Utblødningstankene ble ikke rengjort daglig. Man må regne med at det avgis bakterier fra laks til vann med påfølgende risiko for smitte til annen laks i slike tanker. Det ble konkludert med at *Shewanella* kan overleve ordinært renhold dersom bakterienivået i utgangspunktet er høyt. I tillegg bør man være oppmerksom på utblødnings- og lagringstanker som mulig oppformeringssted og smittekilde til råvare. Her er renhold av RSW-system og vannbytte viktig.

Andre bakterier og problemområder

Det ble påvist en del *Enterobacteriaceae* i renholdsprøver og de utgjorde en betydelig del av bakteriefloraen. For begge uttak fra bedrift A ble *Yersinia* funnet i prøvepunkt fra prismen i en sløyemaskin mens *Morganella* ble funnet i et prøvepunkt i en filetmaskin. *Enterobacteriaceae* er ikke kjent som forringelsesbakterier for islagret laks, men påvisning ved begge disse uttakene kan indikere at prismen i sløyemaskin kan være vanskelig å rengjøre. Et annet alternativ er at *Yersinia* er etablert i vakuum/rørsystem på oversiden av prismene og frigjøres til sløyemaskin fra dette.

Det ble observert en del fileter som lå skinn mot kjøttside underveis i prosessen. Ved å unngå dette vil man kunne redusere smitte fra råvare til ferdig skinnnet filet.

Tabell 4. Bakterienivåer i renholdsprøver

Bedrift A						Bedrift B				
Problemutstyr	Neg.†	1-20*	21-300	>300		Neg.	1-20	21-300	>300	Problemutstyr
Transportører	2**	3	6	4		7	0	3	5	
Slitt bånd				x					x	Bånd lite tilgjengelig for vask
Blått helt bånd				x					x	Fire bånd post rigor linje
Bånd post rigor				x						
Utstyr	7	10	4	3		7	6	9	8	
Sløyemaskin prismer				x					x	Sløyemaskin prismer
Filetmaskin kniv				x					x	Filetmaskin
Skinnfjerner				x					x	Utblødningskar
Miljø	0	1	3	1		0	0	0	3	
Gulv			x						x	Gulv
Kasser				x					x	Gulvnal
Totalt	9	14	13	8		14	6	12	16	

*Bakterietall pr. cm²

**Antall prøvepunkt for hvert bakterienivå

†Ikke påvist bakterier, deteksjonsgrense 0.4-1.5 pr. cm²

Hvilke påvisningsmetoder for bør man bruke for kvalitetsreducerende bakterier?

Konklusjon

Totalkim vil i de fleste tilfeller gi et godt svar på nivået av forringelsesbakterier i produksjonsmiljøet. Det er mangel på gode og enkle metoder for å påvise spesifikke forringere.

Pseudomonas

Som nevnt over dominerte *Pseudomonas* i renholdsprøver fra produksjonsmiljøet i begge bedrifter og ble funnet i ca. 50-80% av utstyre-, transportør- og miljøprøver. *Pseudomonas* er en vanlig forringer av islagret laks, den var også den dominerende bakterien på islagret filet fra laks fra de to bedriftene når det ble testet. Bruk av selektivt CFC dyrkningsmedium for *Pseudomonas* på bakterier isolert fra bedrift A viste at en rekke andre bakterier, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Morganella*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Shewanella* og *Stenotrophomonas* også vokste på dette mediet. Disse bakteriene kunne ikke skilles fra *Pseudomonas* på kolonimorfologi eller farge. CFC egner seg derfor ikke til spesifikk påvisning av *Pseudomonas* i renholdsprøver.

Siden *Pseudomonas* dominerer i produksjonsmiljøet kan man som hovedregel si at nivået av totalkim også vil indikere mengde *Pseudomonas* i renholdsprøver. Et unntak fra dette var 3 prøvepunkter i slakteriet i bedrift B, der *Psychrobacter* var dominerende uten at *Pseudomonas* ble påvist. I tillegg ble *Shewanella* påvist på en Graader i bedrift A uten at *Pseudomonas* ble påvist.

Resultater fra prosjektet indikerer at noen *Pseudomonas* har mer negativ innvirkning på kvalitet av laks enn andre. Det er også mulig at noen *Pseudomonas* fra produksjonsmiljøet ikke kan vokse på islagret laks, men det er uansett ikke mulig å skille disse artene fra hverandre med enkle metoder.

Konklusjonen er at totalkim er den beste metoden for å overvåke *Pseudomonas* og da også forringelsesbakterier på utstyr og miljøprøver i produksjonsmiljøet. Det anbefales at skåler for totalkim inkuberes ved 15-20 °C i 3-5 dager. For islagret laks er bakterier som kan vokse aerobt mest interessant og agarskåler kan derfor inkuberes aerobt. For å få en oversikt over bakterier som overlever renhold anbefales det å ta prøvene etter renhold, før produksjon. *Pseudomonas* vil vokse på alle vanlige typer dyrkningsmedier for totalkim. Dersom man bruker jernagar vil man i tillegg til totalkim også få en oversikt over nivået av sulfidproduserende bakterier.

Photobacterium

Det var forventet at mange bakterier i produksjonsmiljøet er aerobe og derfor vokste dårlig i fravær av oksygen. Et unntak er koliforme, som kan vokse godt både aerobt og aneorobt. Forforsøk indikerte bedre vekst av *Photobacterium* under anaerobe enn aerobe forhold, mens det motsatte var tilfelle for *Shewanella* og *Pseudomonas*. Det ble derfor undersøkt om det å oppbevare skåler anaerobt kan gi en viss grad av seleksjon for *Photobacterium*.

Photobacterium ble påvist fra prøver fra laks fra jernagarskåler inkubert anaerobt. Imidlertid vokste det også opp mange andre typer bakterier, inkludert *Pseudomonas* og *Shewanella*. En årsak til dette

er at noen *Pseudomonas* vokser anaerobt. Det var nødvendig å ta ut skålene jevnlig for å sjekke om det var vokst opp bakterier og dette kan over tid ha gitt god nok oksygen til oppvekst av bakterier som i utgangspunktet trenger luft. Det var ikke mulig å skille *Photobacterium* fra andre typer bakterier utfra kolonimorfologi. Allikevel anbefales det at skålene inkuberes anaerobt dersom man ønsker å få en vis seleksjon for *Photobacterium*, siden den da konkurrerer bedre med andre bakterier.

Det antas at nivået av *Photobacterium* på laks som kommer inn fra ventemerde kan ha betydning for nivået av *Photobacterium* i ferdig produsert filet (før lagring). I bedrift A var *Photobacterium* den dominerende bakterien på laks før desliming ved begge uttak, og i slike tilfeller vil totalkim (anaerobt) fra råvare laks kunne indikere nivået av *Photobacterium*. I bedrift B var det andre bakterier enn *Photobacterium* som dominerte på laks tidligst i prosessen, og totalkim ga ikke et godt mål på nivået av *Photobacterium*.

Shewanella og andre sulfidproduserende bakterier

Shewanella er regnet som en viktig forringer av sjømat og ofte regnes sorte kolonier på jernagar som *Shewanella*. Resultatene viste at ulike bakterier dannet sorte kolonier på jernagar, og at det var noen forskjeller i farge og morfologi blant disse. 59% av sorte kolonier ble identifisert som *Shewanella*, mens 20% var *Aeromonas* og 6% var *Pseudomonas* (Tabell 5). Det var forskjeller mellom bedriftene. I bedrift A var 45% av bakteriene som dannet svarte kolonier *Shewanella*, mens i bedrift B var det tilsvarende tallet 80%. Hovedforskjellen var et det var flere sulfidproduserende *Aeromonas* i bedrift A enn i bedrift B. Noen isolater av *Shewanella* dannet en rødlig/oransje koloni rundt et sort senter, mens andre *Shewanella* ikke kunne skilles fra andre bakterier som dannet sorte kolonier. Utseende på kolonier var avhengig av inkuberingstid. Mange kolonier hadde kun en liten svart prikk i kjernen de første dagene, mens den svarte delen utvidet seg og dekket større deler av kolonien ved lenger inkubering. Bilder av noen av isolatene som ga svarte kolonier på jernagarskåler ved 15 °C er vist i Vedlegg 2.1.

Produksjon av sulfid i mat regnes som en forringelsesfaktor og sort farge på jernagar skyldes slik sulfidproduksjon. Man kan derfor i prinsippet tenke at sorte kolonier på jernagar er et mål på bakterier som danner sulfid og derfor forringer laks. Imidlertid vil forringelse også avhenge av hvor godt bakteriene vokser på laks under islagring og hvilke andre lukt/smakskomponenter de produserer. *Aeromonas* som dannet sorte kolonier på jernagar ble også funnet på islagret filet av laks, men i lavere konsentrasjon enn *Pseudomonas*. *Aeromonas* ble påvist på nesten halvparten av transportørene i bedrift A (uttak 1), mens den i bedrift B bare ble påvist i miljøprøver av renholdsprøvene. For de andre bakteriene med sorte kolonier er betydning for forringelse av laks usikkert. Sensoriske undersøkelser av laks podet med *Shewanella* viste at ammoniakk, emmen og fermentert var viktige sensoriske endringer så sulfidproduksjon alene er ikke nok til å si noe om forringelsespotensialet. Det kan derfor være ønskelig med en metode som påviser mer spesifikt *Shewanella*. Forekomsten av *Shewanella* i bedriften relativt til andre sulfidproduserende bakterier, vil avgjøre hvor godt svarte kolonier på jernagar er et mål for denne bakterien.

Tabell 5. Bakterier som med sorte kolonier på jernagar inkubert aerobt

Slekt/Genus	Svarte kolonier Bedrift A	Svarte kolonier Bedrift B	Svarte kolonier Totalt	Total %
<i>Aeromonas</i>	31	3	34	19,8
<i>Citrobacter</i>	4		4	2,3
<i>Hafnia</i>	4		4	2,3
<i>Janthinobacterium</i>	1		1	0,6
<i>Morganella</i>	2	3	5	2,9
<i>Pseudomonas</i>	11		11	6,4
<i>Psychrobacter</i>	4		4	2,3
<i>Shewanella</i>	46	55	101	58,7
<i>Pseudoalteromonas</i>		7	7	4,1
<i>Serratia</i>		1	1	0,6
Totalt	103	69	172	100

*totalt antall identifiserte kolonier fra jernagar inkubert aerobt fra alle type prøver

Vedlegg 2.1. Bilder av utvalgte isolater som ga svarte kolonier på jernagar

Skålene ble inkubert aerobt ved 15 °C.

Aeromonas (type 1)

Dag 2

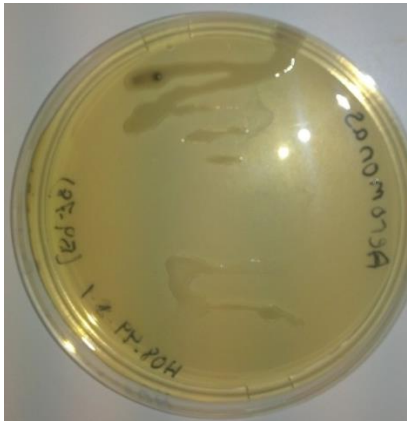


Dag 7



Aeromonas (Type 2)

Dag 2

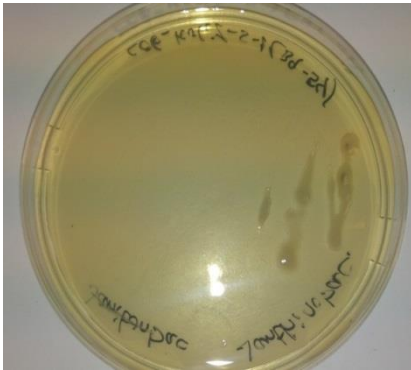


Dag 7

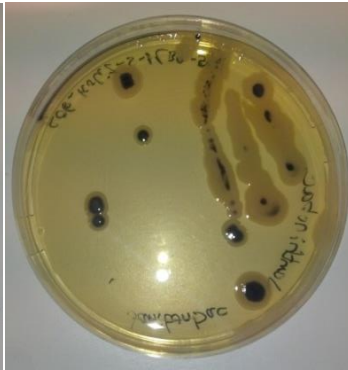


Janthinobacterium

Dag 2

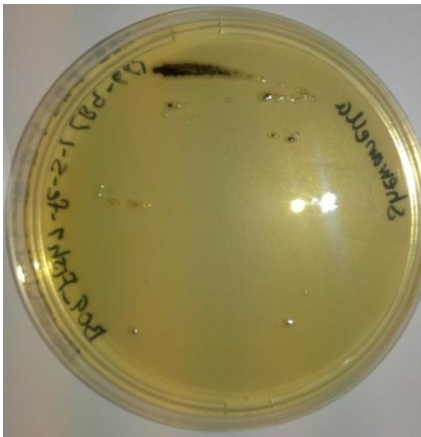


Dag 7



Shewanella (Type 1)

Dag 2

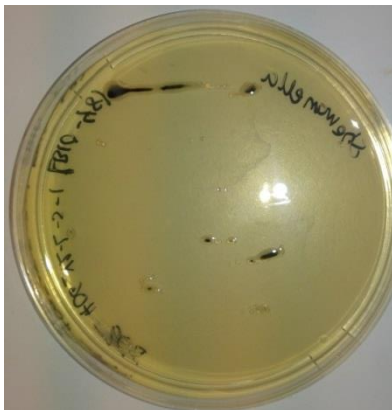


Dag 3



Shewanella (Type 2)

Dag 2



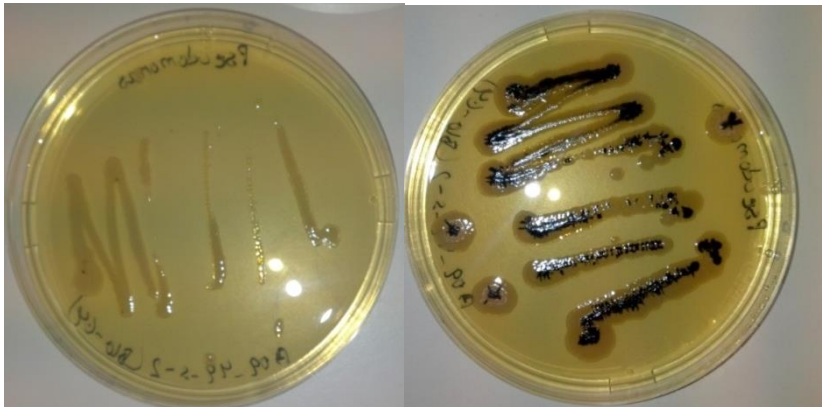
Dag 3



Pseudomonas

Dag 2

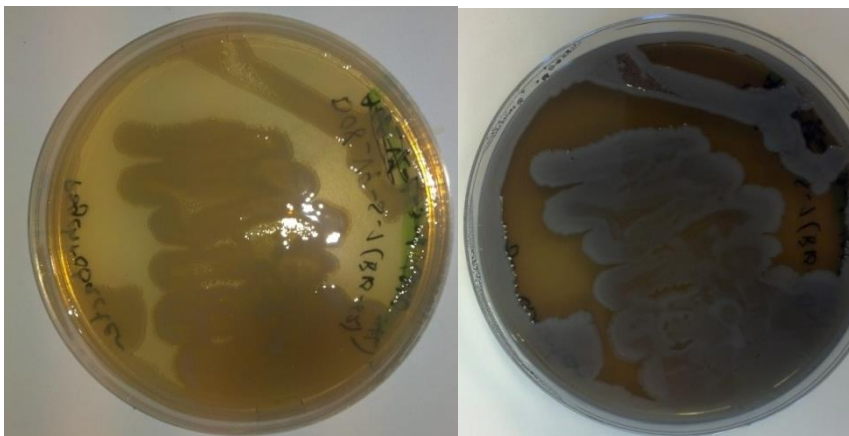
Dag 7



Psychrobacter

Dag 2

Dag 7





ISBN 978-82-8296-299-5 (trykt)
ISBN 978-82-8296-300-8 (pdf)
ISSN 1890-579X