

Nye verktøy for kontroll med listeria i laks og lakseprodukter

Vurdering og uttesting av metoder for å redusere listeria-nivået i råvarer og produkter

Even Heir, Askild Holck og 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 Johnsgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

	ISBN: 978-82-8296-313-8 (trykt) ISBN: 978-82-8296-314-5 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Nye verktøy for kontroll med listeria i laks og lakseprodukter: Vurdering og uttesting av metoder for å redusere listeria-nivået i råvarer og produkter. Forprosjekt	<i>Rapportnr.:</i> 30/2015
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Even Heir (prosjektleder), Askild Holck og Solveig Langsrud	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Avdeling:</i> Trygg og holdbar mat	<i>Dato:</i> 24. juni 2015
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 19 sider + 1 vedlegg
<i>Stikkord:</i> Laks, listeria, trygg mat, dekontaminering, kontroll	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> 901056
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Listeria er en stor utfordring for laksenæringen. Optimal produksjonshygiene er vesentlig for kontroll, men kan ikke sikre fravær av listeria i laks og lakseprodukter. Det er derfor behov for metoder som kan eliminere eller redusere nivået av listeria på laks. Formålet med dette forprosjektet har vært å gi en oversikt og vurdere effekt og egnethet av ulike teknologier og konsepter for reduksjon av listeria på laks og lakseprodukter. En oversikt over relevante metoder og teknologier ble gitt. Oversikten gir informasjon om kjemiske, fysiske og biologiske metoder for behandling av laks. Dette ga grunnlag for valg av metoder for videre uttesting. Metoder hvor dokumentasjon på listeria-effekt ikke var tilgjengelig eller mangelfull ble prioritert i uttesting. Ved uttesting ble laks tilsatt listeria og behandlinger gjennomført på rå filet, sløyd laks og kaldrøkt laks i tråd med anbefalinger fra leverandører. Det ble oppnådd 70-90 % drap av listeria ved bruk av metoder som reduserte listeria. Vi oppnådde begrenset effekt av midler som skulle hindre vekst av listeria i laks ved lagring. Resultater fra litteraturstudium og praktisk uttesting gir bransjen økt grunnlag for å vurdere metoder som kan være egnet for behandling av laks. Videre studier vil kunne bidra til kostnadseffektive strategier for kontroll med listeria i laks og lakseprodukter.	<i>Prosjektnr.:</i> 11154
<i>English summary/recommendation:</i> In this project, a review of methods and technologies with potential to be used for listeria reduction on salmon and salmon products was prepared. Selected methods were further tested and evaluated for listeria reduction or growth inhibition on fresh and smoked salmon. Methods for listeria reduction provided 70-90 % reduction in listeria levels. Obtained listeria growth reductions during storage were limited in our studies. However, we can not exclude that these methods can be optimized and inhibit listeria growth under other experimental conditions. A continuation of this pre-project could provide the industry with cost-effective strategies for control of listeria in salmon and salmon products.	

Innhold

1	Sammendrag	1
1.1	Norsk.....	1
1.2	Engelsk.....	1
2	Innledning	3
3	Problemstilling og formål	4
4	Prosjektgjennomføring	5
4.1	Oversikt over arbeidspakkene	5
4.2	Gjennomføring av forsøk i arbeidspakke 2 (AP2).....	5
5	Resultater, diskusjon og konklusjon	7
5.1	Bakgrunn for valg av metoder for uttesting i AP2.....	7
5.2	Belysning med UVC og pulsUV	8
5.3	Behandling med lauryl arginat (etyl lauryl arginat; LAE)	10
5.4	Behandling med løsninger basert på organiske syrer/salter.....	12
5.5	Behandling av laks med Freebac-Mucosol®	13
5.6	Oppsummering og konklusjon.....	16
5.7	Arbeidspakke 3: Kunnskapsbehov som grunnlag for videre arbeid.....	17
6	Leveranser	19

Vedlegg: Forsøksoppsett AP2

1 Sammendrag

1.1 Norsk

Kontroll med listeria er en stor utfordring for laksenæringen. Optimal produksjonshygiene er vesentlig for kontroll, men slike tiltak kan likevel ikke sikre fravær av listeria i laks og lakseprodukter. Det er derfor behov for metoder som kan eliminere eller redusere nivået av listeria på laks. Formålet med dette forprosjektet har vært å gi en oversikt og vurdere effekt og egnethet av ulike teknologier og konsepter for reduksjon av listeria på laks og lakseprodukter.

En oversikt over metoder og teknologier for behandling av laks, basert på litteraturgjennomgang og informasjon fra leverandører, ble gitt. Oversikten gir informasjon om kjemiske, fysiske og biologiske metoder for behandling av laks og tar for seg prinsipp, anvendelsesområder, effekt mot listeria, sensoriske effekter, kjennskap om legalisering i ulike markeder og nye kunnskapsbehov. Oversikten ga grunnlag for valg av metoder for videre uttesting. Metoder vurdert å ha potensiale for anvendelse, men hvor dokumentasjon på listeria-effekt ikke var tilgjengelig eller mangelfull, ble prioritert i uttesting.

Uttestingen hadde som hovedmål å avdekke om metodene drepte/fjernet listeria eller hemmet vekst av listeria på laks. Forsøkene ble gjort under betingelser som var relevante for å avdekke effekt av behandlingene på laks. Metoder som ble testet var ultraviolet lys (UV-C og pulsUV), slimfjerning ved bruk av H₂O₂-basert middel, behandling med tensidbaserte middel (lauryl arginat) og behandling med midler basert på salter av organiske syrer (Verdad N4 og Opti.Form PPA Plus). Det ble gjennomført behandlinger på rå filet, sløyd laks og kaldrøkt laks i tråd med anbefalinger fra leverandører. Listeria-analyser ble gjennomført for å avdekke drap samt vekst under kjølelagring.

Det ble oppnådd ca 70-90 % drap av listeria ved bruk av ultraviolet lys og lauryl arginat. Middel for avsliming og organiske salter viste svært begrenset effekt i våre forsøk. Resultater fra litteraturstudium og praktisk uttesting gir bransjen økt grunnlag for å vurdere metoder som kan være egnet for behandling av laks.

En videreføring av forprosjektet vil kunne bidra til kostnadseffektive strategier for kontroll med listeria i laks og lakseprodukter.

1.2 Engelsk

Listeria is among the most serious microbial challenges for the salmon industry. Hygienic processing is essential for listeria control but can not ensure absence of listeria in salmon and salmon products. Therefore, the salmon industry requests methods that can eliminate or reduce the levels of listeria on salmon. The aim of this work has been to provide an overview and evaluate methods and technologies with potential to be used for listeria reduction on salmon and salmon products.

A review of available methods and technologies based on surveys of scientific literature, Google search and information obtained from manufacturers was provided. The review includes methods and technologies of chemical, physical or biological origin for treatment of salmon. The obtained information was used to select methods for further testing and evaluation. Methods with potential to

be used for improved listeria control on salmon, but where documentation was inadequate or absent, were given priority in the practical testing.

The aim of the testing was to determine the effect of the methods for reduction of listeria on salmon and salmon products. Methods providing both listeria kill and growth inhibiting effects were tested. Tested methods included exposure to ultraviolet light (continuous UVC exposure and pulsed UV), desliming using H₂O₂ based compound (Freebac-Mucosol®), treatment with tenside based compound (lauryl arginate) and treatments using compounds based on organic acid salts (Verdad N4 and Opti.Form PPA Plus). Treatments were performed under relevant conditions on fresh and/or cold-smoked salmon. Analyses determined listeria reductions and growth inhibition after treatment and refrigerated storage.

Approximately 70-90 % reduction in listeria was obtained after treatments with UVC, pulsed UV or lauric arginate. Compound for desliming showed limited effect. The organic acid salts showed limited effects in our studies, but optimization for improved effects seems possible. The literature review and the testing, though of limited extent, give the salmon processing industry valuable information for evaluation of methods that can be suitable for treatment of salmon.

A continuation of this pre-project could provide cost-effective strategies for control of listeria in salmon and salmon products.

2 Innledning

Bakterier av typen *Listeria monocytogenes* (heretter kalt listeria) er en stor utfordring for norsk laksenæring. Bakterien kan gi svært alvorlig sykdom, og både regelverk og kunder setter derfor strenge krav til maksimalt tillatte listeria-nivåer i potensielle risikoprodukter. Listeria på norsk laks kan derfor få store konsekvenser både for enkeltprodusenter og for en samlet norsk laksenæring.

For å hindre at laks smittes med listeria, er kontroll med listeria i produksjonsmiljø, maskiner og utstyr vesentlig. Fullstendig fravær av listeria i potensielle risikoprodukter fra laksenæringen kan likevel ikke forventes da det ikke er kritiske styringspunkter som eliminerer bakterien. Det er derfor behov for å undersøke om ytterligere tiltak, inkludert metoder som kan eliminere eller redusere listeria på laks (råvarer, ferdig produkt) kan bidra til økt listeria-kontroll.

Det finnes et økende antall kommersielt tilgjengelige metoder og forbindelser som har til hensikt å drepe, fjerne eller hemme vekst av listeria i råvarer og produkter av laks. Det varierer i hvilken grad disse er dokumentert med hensyn til både effekt mot listeria, praktisk anvendelse, kvalitetspåvirkning og kost-nytte verdi.

I dette forprosjektet har vi kartlagt kommersielt tilgjengelige behandlingsmetoder av laks og lakseprodukter med hensikt å drepe eller hemme vekst av listeria på laks. Dette ble gjort ved litteratursøk og utarbeiding av rapport med oversikt over fysiske, kjemiske og biologiske metoder/teknologier som kan benyttes for å eliminere eller hindre vekst av listeria på laks. Det ble videre valgt metoder for praktisk uttesting. Hovedmålet i uttestingen var å dokumentere i hvilken grad de valgte metodene hadde potensiale til å redusere listeria-nivået på laks.

Prosjektet er relatert til de tidligere FHF-finansierte prosjektene «Kartlegging av bedriftspraksis (produkt, prosess og organisering) som hemmer og fremmer forekomst av listeria i norske lakseprodukter» og «Tiltak for økt kontroll med listeria i laksenæringen». Prosjektet er i samsvar med FHF sin strategiske satsing på kvalitet som prioritert FoU aktivitet innen området Havbruk.

Prosjektet har hatt en styringsgruppe bestående av Randi Haldorsen (Marine Harvest, leder styringsgruppe), Odd Medhus (Marine Harvest) og Kristian Prytz (FHF). Ivar Hellesnes (Mattilsynet) har vært observatør. Prosjektleder har vært Even Heir (Nofima) og blitt gjennomført i samarbeid med forskerne Solveig Langsrud og Askild Holck samt ingeniørene Anette W. Åsli, Tove Maugesten, Janina Berg og Signe Drømtoptorp.

Vi ønsker å takke alle involverte, inkludert leverandører av fersk og røkt laks, for et godt samarbeid i gjennomføringen av forprosjektet.

3 Problemstilling og formål

Bakterien *Listeria monocytogenes* regnes som en av de største utfordringene for norsk laksenæring. Det er derfor behov for å vurdere nye tiltak for å oppnå økt kontroll med listeria på laks. Et økende antall teknologier og midler for behandling av laks er tilgjengelig, men oversikt over aktuelle metoder og dokumentert effekt mot listeria har til dels manglet.

Forprosjektet har hatt følgende mål:

1. Å etablere oversikt og vurdere ulike teknologier/metoder/konsepter for reduksjon av listeria på laks.
2. Å teste utvalgte metoder på relevante produkter for avklaring om metodene har potensiale eller ikke for reduksjon av listeria.

På grunnlag av dette skulle det utarbeides forslag til videre arbeid. Resultatene fra forprosjektet gir næringen bedre grunnlag for å vurdere metoder, slik at de i større grad kan rette innsatsen mot metoder som har dokumentert effekt, og samtidig forkaste teknologier og metoder som i liten grad bidrar til økt listeria-kontroll i laks eller som av andre årsaker ikke er aktuelle. Ytterligere undersøkelser kan være nødvendig før implementering i anlegg, som oppskalering, kost-nytttevurderinger, og begrensninger knyttet til for eksempel regelverk og forbrukerholdninger.

4 Prosjektgjennomføring

4.1 Oversikt over arbeidspakkene

Forprosjektet har inkludert tre arbeidspakker (AP1-3):

AP1. Oversikt og vurdering over aktuelle behandlingsmetoder: Arbeidspakken ble gjennomført som et litteraturstudium for å utarbeide en oversikt over metoder anvendt på laks med potensiale for å drepe eller hemme vekst av *L. monocytogenes*. Biologiske, kjemiske og fysiske metoder for behandling av laks ble undersøkt. Det ble utarbeidet en oversikt hvor tilgjengelig informasjon om prinsippet bak metoden, anvendelsesområder, effekt mot listeria, sensoriske effekter, kjennskap om legalisering i ulike markeder og nye kunnskapsbehov ble oppsummert. Oversikten ga grunnlag for valg av metoder for videre uttesting i AP2.

AP2. Uttesting av metoder/teknologier for å vurdere effekt mot listeria ved behandling av laks og lakseprodukter: I AP2 ble det valgt å fokusere på metoder som kan ha potensiale for praktisk anvendelse i laksenæringen, men hvor tilgjengelig dokumentasjon på effekt mot listeria ikke var dokumentert eller tilgjengelig i AP1. Endelig valg av metoder for uttesting ble bestemt i møter i styringsgruppen.

AP3: Formulere et hovedprosjekt for utdyping og videre uttesting: På bakgrunn av prosjektresultatene ble det påvist områder som er aktuelle for videre studier og uttesting ved en mulig videreføring av forprosjektet i et hovedprosjekt.

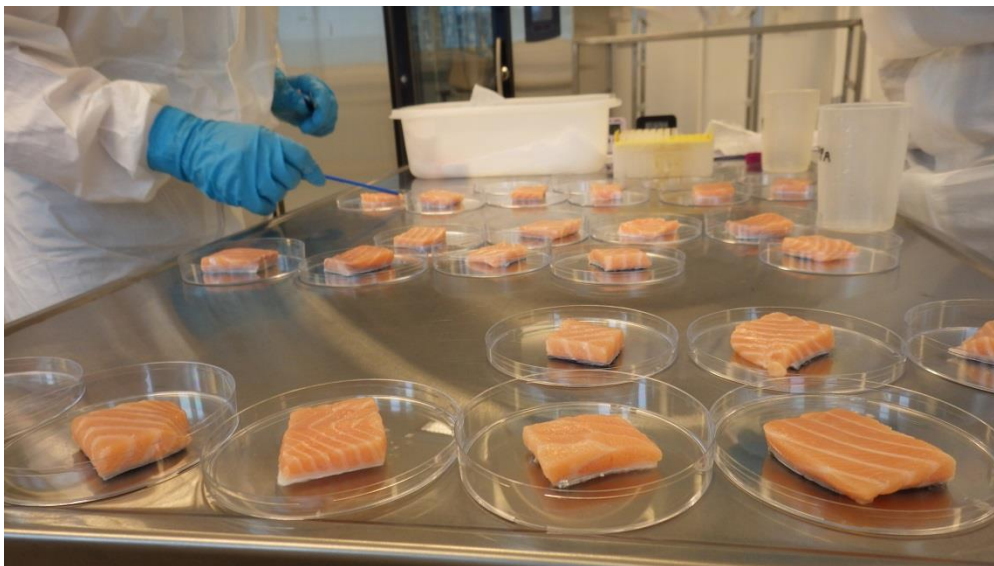
4.2 Gjennomføring av forsøk i arbeidspakke 2 (AP2).

Detaljer i forsøksoppsett er gitt i vedlegg. Hovedaktivitetene i oppsettet inkluderte:

- Valg av teknologi og metoder for videre uttesting (se Tabell 1).
- Anskaffelse av informasjon og komponenter/teknologi for behandling av laks.
- Forsendelse av laks fra produsenter til Nofima.
- Preparering av laksen og påføring av listeria i patogen prosesshall ved Nofima.
- Behandling av laks med ulike typer teknologier og metoder. Prøvetaking og pakking av laks for kjølelagring. Lagringsforsøk ble gjennomført for å avdekke effekt av behandlingen på drap og vekst av listeria i produktene.
- Prøveuttak og analyser for kvantifisering av listeria i laksen etter ulike lagringstider (11 og 21 dager for fersk laks, 32 dager for røkt laks).
- Gjentak/nye forsøk ble gjennomført basert på resultater fra første oppsett.

Felles for forsøkene:

- Alle forsøk ble gjennomført med hensikt å avdekke om teknologien/metodikken hadde effekt på listeria eller ikke. I hovedsak er derfor forsøkene gjennomført i liten skala og med et begrenset antall betingelser testet for hver metodikk.
- Metoden ble testet under realistiske betingelser med hensyn til produkttype (filet, skinn og gjeller på rå laks, filet av kaldrøkt laks) og lagringsforhold (islagring av rå laks, vakuumpakking og kjølelagring av røkt laks). Det ble brukt blanding av ulike *L. monocytogenes* stammer, de fleste isolert fra laksenæringen.
- Betingelser for uttesting var i henhold til anbefalinger gitt av leverandører og/eller innenfor akseptable grenser med hensyn til gjeldende lovverk. Forsøk og analyser ble gjort under betingelser som skulle kunne påvise effekt av metodene mot listeria dersom denne var tilstede.
- Alle forsøk ble gjennomført i patogen prosesshall ved Nofima.



Bilde 1 Påføring av *L. monocytogenes* til laks

5 Resultater, diskusjon og konklusjon

Hovedvekt i denne rapporten er lagt på resultater fra Arbeidspakke 2. For oversikt over metoder som kan benyttes for økt kontroll med listeria på laks (Arbeidspakke 1), kan denne fås ved henvendelse til prosjektleder.

5.1 Bakgrunn for valg av metoder for uttesting i AP2

Tabell 1 gir en oversikt over behandlingsmetodene som ble valgt for testing i dette prosjektet.

Vi prioriterte metoder som ut fra litteraturstudium ble vurdert å kunne gi redusert nivå av listeria på laks, men hvor dokumentasjon om effekt var mangelfull. Det ble valgt metoder som kan benyttes i ulike ledd av produksjonen (på råvarer, i prosess, på sluttprodukt). Dette inkluderte metoder som kan brukes som en barriere mot å få introdusert listeria inn i anlegg med råvarer (hel laks), som kan benyttes for behandling av laks i prosessen (filet) eller sluttprodukt (røkt laks). Metodene inkluderte både behandlinger som dreper listeria og metoder som hemmer vekst av listeria. Under følger kort informasjon om metodene som ble testet ut i praktiske forsøk:

- **UVC:** Laksen eksponeres for UV-lys i UVC-området (220-290 nm). Lys i dette bølgelengdeområdet har bakteriedrepende effekt. Lyskilden kan monteres på produksjonslinje, men en viss eksponeringstid er nødvendig for bakteriedrepende effekt. Bakteriedrepende effekt er avhengig av at lyset treffer bakteriene under eksponering, og det kan være en utfordring at lyset ikke når frem til bakterier som befinner seg under fiskekjell eller fuktighet. Metoden kan brukes på råvarer, filet eller røkt laks.
- **PulsUV:** Laksen eksponeres for korte pulser (<1 ms) med hvitt lys (200-1100 nm). Om lag 30-50 % av energien er i UV-området og gir bakteriedrepende effekt. Lyskilden kan monteres på produksjonslinjen, og krever kort eksponeringstid. Effekt er på samme måte som UVC avhengig av at lyset treffer bakteriene. Metoden kan brukes på råvarer, filet eller røkt laks.
- **Lauryl arginat (LAE):** Laksen påføres et LAE, et overflateaktivt stoff som dreper ulike mikroorganismer ved å skade cellemembranen. Bruk av LAE er tillatt brukt på laks i USA og i flere andre land (maks dose 200 ppm), men ikke i EU. LAE kan brukes f.eks. sent i prosessen ved påføring ved slicing og pakking av røkt laks.
- **Verdad N4:** Laksen påføres Verdad, en bufret løsning med naturlige aromakomponenter, eddik og andre organiske syrer som hemmer bakterievekst. Produktet er ifølge produsent «label friendly» og kan deklarerer som naturlig aroma. Verdad N4 anbefales tilsatt rå laks før røyking. Produsenten anbefaler også bruk av Opti.Form PPA Plus som er en blanding av kaliumacetat og kaliumlaktat i væskeform. Tilsetning krever E-nummermerking.
- **Mucosol (Freebac Mucosol®):** Laksen bades i Mucosol, en løsning med hydrogenperoksid som virkestoff. Middelet skal fjerne slim (avsliming) og dermed også bakterier fra overflaten. Kan potensielt benyttes på rund og sløyd laks.

Tabell 1 Oversikt over behandlingsmetoder som ble testet for å vurdere effekt av behandling mot *L. monocytogenes* på laks

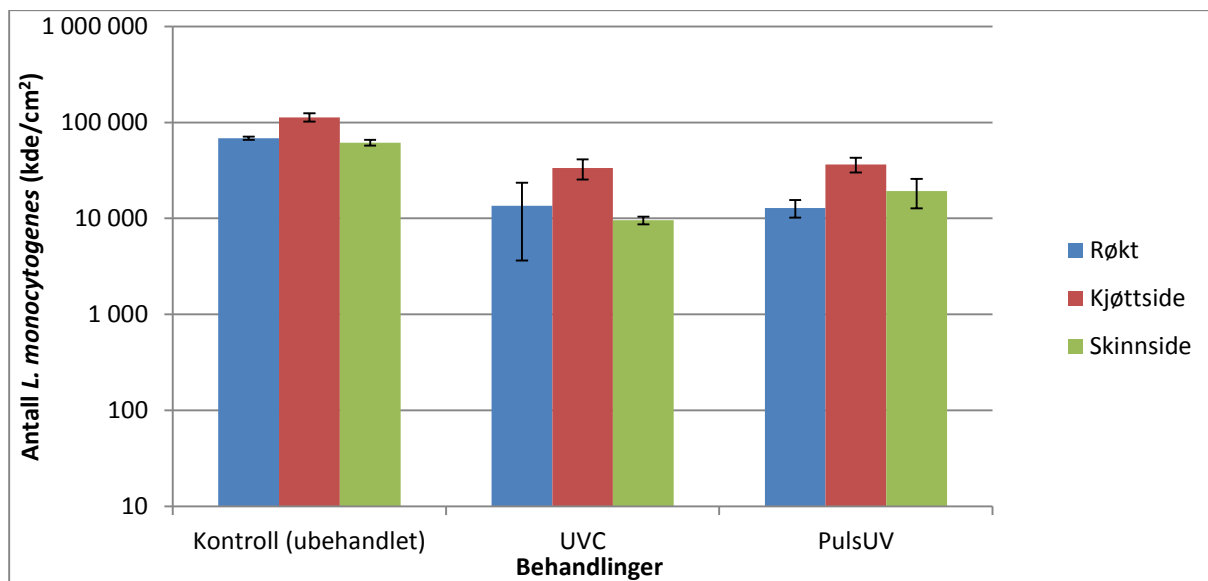
Metode	Forventet mekanisme	Testet på		Leverandør Utstyr/kjemi
		Kaldrøkt laks	Rå laks	
UVC (254 nm)	Drap	kjøttside	kjøttside + skinn	
PulsUV	Drap	kjøttside	kjøttside + skinn	SteriBeam
Lauryl arginat	Drap	kjøttside		Vedeqsa, Lamirsa Group
Verdad N4	Veksthemming		kjøttside + skinn	Corbion Purac
Freebac-Mucosol®	Fjerning av slim og listeria		skinn + gjeller	Corbion Purac

5.2 Belysning med UVC og pulsUV

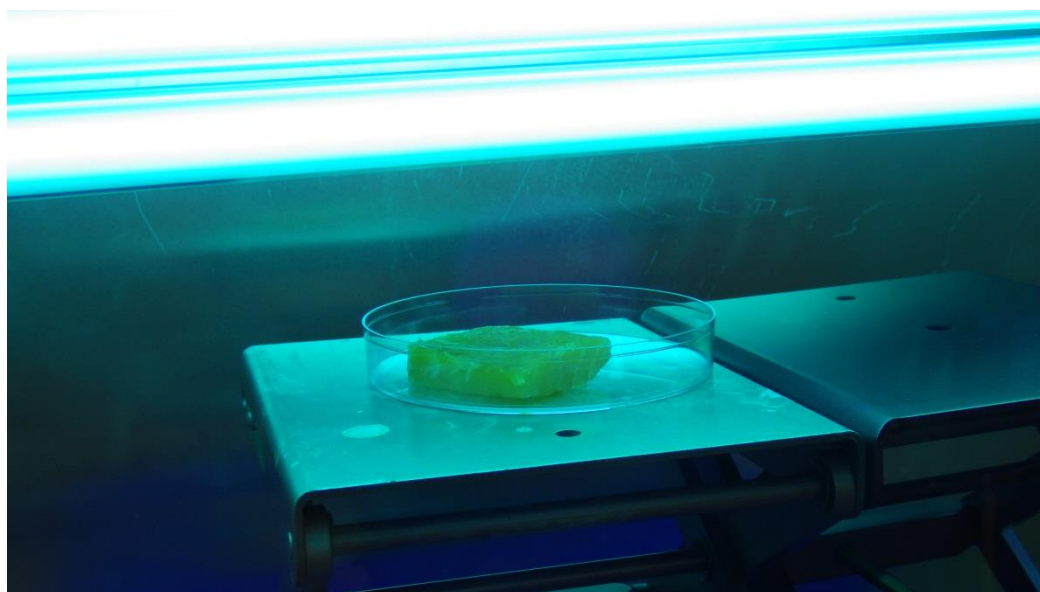
Figur 1 viser nivåer av *L. monocytogenes* på laks før eller etter belysning med UVC (254 nm, 9,8 mW/cm² dose benyttet) og pulsUV (3 pulser a 8,2 V benyttet). Resultatene viste 70-80 % drap av *L. monocytogenes* etter behandling. Det var små forskjeller i effekt mellom ulike typer overflater på fisken (filet, skinnside, røkt filet) som ble belyst. Om lag samme drapseffekt ble oppnådd ved bruk av UVC og pulsUV. Statistisk signifikante forskjeller ($P > 0,05$) mellom ubehandlede kontroller og behandlet laks ble funnet med unntak av UVC-behandlet røkt laks og pulsUV-behandlet skinn på rå laks.

Diskusjon og konklusjon:

- Belysning med UVC og pulsUV gir drap av listeria, men man kan ikke forvente mer enn ca 90 % reduksjon selv ved høye stråledoser
- Drapseffekt er avhengig av at lyset treffer bakteriene. På plane overflater uten struktur, f.eks. på en agarskål, oppnås 99,999% drap. Laks har struktur, skjell og slim som gjør at bakteriene delvis kan beskyttes mot belysning (også kalt skyggeeffekt). Dette kan gi redusert drapseffekt og eller variasjon i effekt mellom parallelle prøver. Resultatene viste noe variasjon på røkt laks(UVC) og ikke signifikant effekt på skinn (pulsUV) og indikerer trolig dette (se Figur 1).
- Behandling av laks med UVC eller pulsUV har trolig størst potensiale for anvendelse sent i prosessen, dvs ved pakking. Da får man redusert nivået i et sent prosesstrinn der senere kryssmitte er lite sannsynlig. Muligheter for å optimalisere behandlingen bør undersøkes. Drap av bakterier med UVC eller pulsUV kan også tenkes brukt som hygienisk tiltak på overflater av maskiner og utstyr i anlegget.
- Effekt på kvalitet og sensorikk på UV-behandlet, lagret laks bør undersøkes nærmere.



Figur 1 Drapeseffekt av UVC og pulsUV på *L. monocytogenes*. Verdiene er gjennomsnitt av 3 parallelle prøver for behandlede prøver og 6 parallelle prøver for ubehandlede kontroller. Standard feil er angitt.



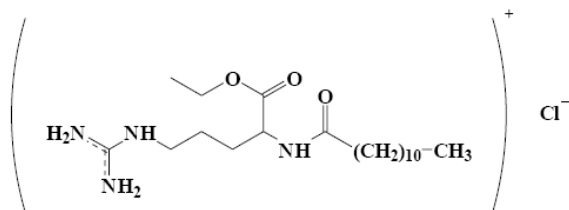
Bilde 2 Belysning av laksefilet med UVC

5.3 Behandling med lauryl arginat (etyl lauryl arginat; LAE)

Figur 2 viser effekt av LAE på drap av *L. monocytogenes* på kaldrøkt laks.

I forsøk 1 ble LAE med produktnavn Mirenat-SY benyttet. I forsøk 2 ble forsøket utvidet til også å teste Mirenat-TT, en annen variant av LAE. Primært ble Mirenat-SY valgt i uttesting da produktet ifølge produsenten (Vedeqsa, Spania) har best effekt på fettholdige produkter som laks fordi den inneholder en detergent, polysorbat-20 (E-1520). Behandling med LAE ga 80-90 % drap av *L. monocytogenes*.

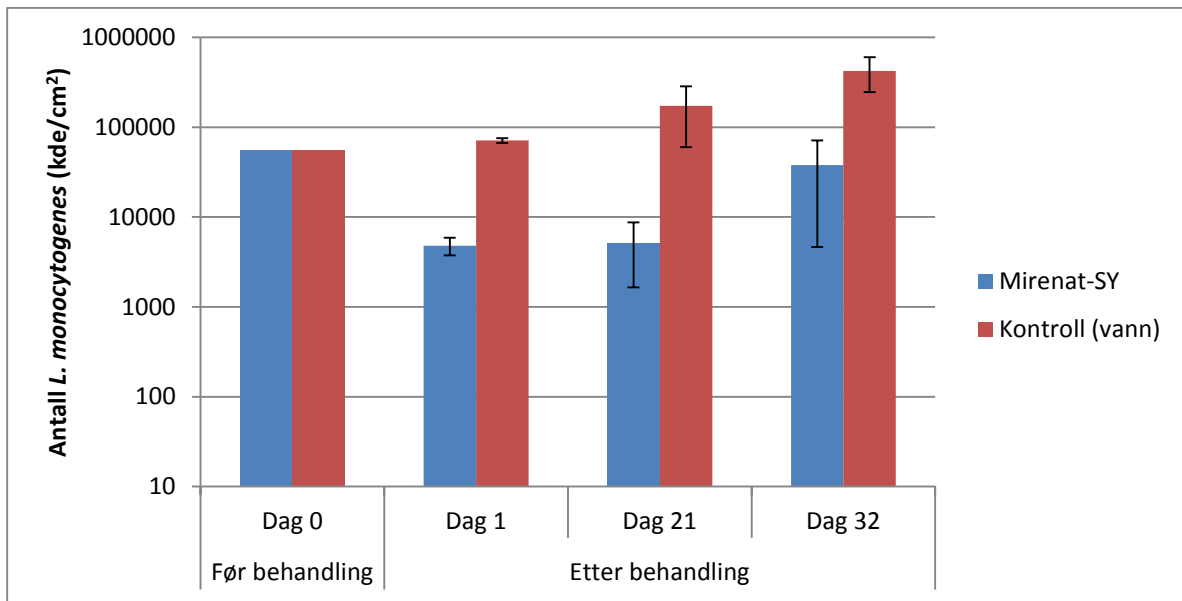
Kjemisk formel på virkestoff i Mirenat-SY og Mirenat TT:



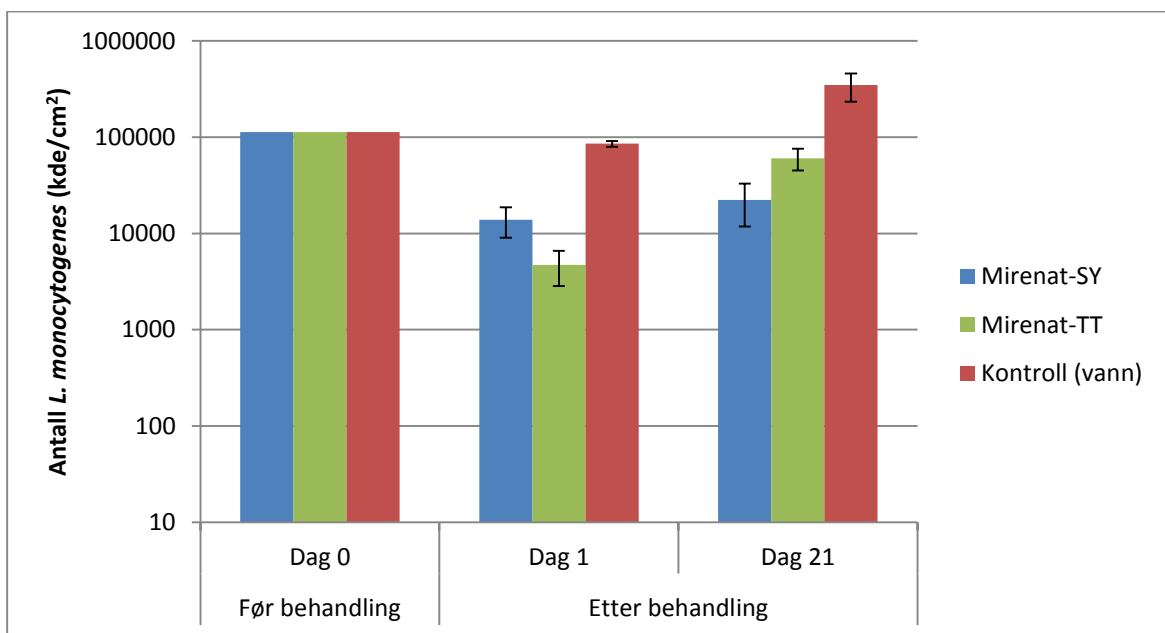
Diskusjon og konklusjon:

- LAE er oppgitt å ha bred antimikrobiell effekt som kan bidra til økt mattrygghet, holdbarhet og matkvalitet. De kommersielt tilgjengelige produktene kan sprayes på produktene, f.eks. under slicing av røkt laks.
- LAE gir ifølge tidligere undersøkelser ikke maksimalt bakteriedrap umiddelbart, men virker over tid. I våre forsøk ble derfor drap målt første gang 1 dag etter behandling.
- Listeria som overlever behandlingen får ikke redusert vekst.
- LAE tilsatt mat må deklarerer med E-nummer (E-243).

A)



B)



Figur 2 A) Effekt av Mirenat-SY på drap av *L. monocytogenes* på laks (Forsøk 1). B) Effekt av Mirenat-SY og Mirenat-TT på drap av *L. monocytogenes* på laks (Forsøk 2). Prøvene ble tatt før behandling og etter 1, 21 og 32 dagers kjølelagring av behandlet laks. Verdiene er gjennomsnitt av 3 parallelle prøver for behandlede laks og 6 parallelle prøver for ubehandlede kontroll (unntak Dag 32 hvor 3 paralleller for kontroll ble analysert). Standard feil er angitt.

5.4 Behandling med løsninger basert på organiske syrer/salter

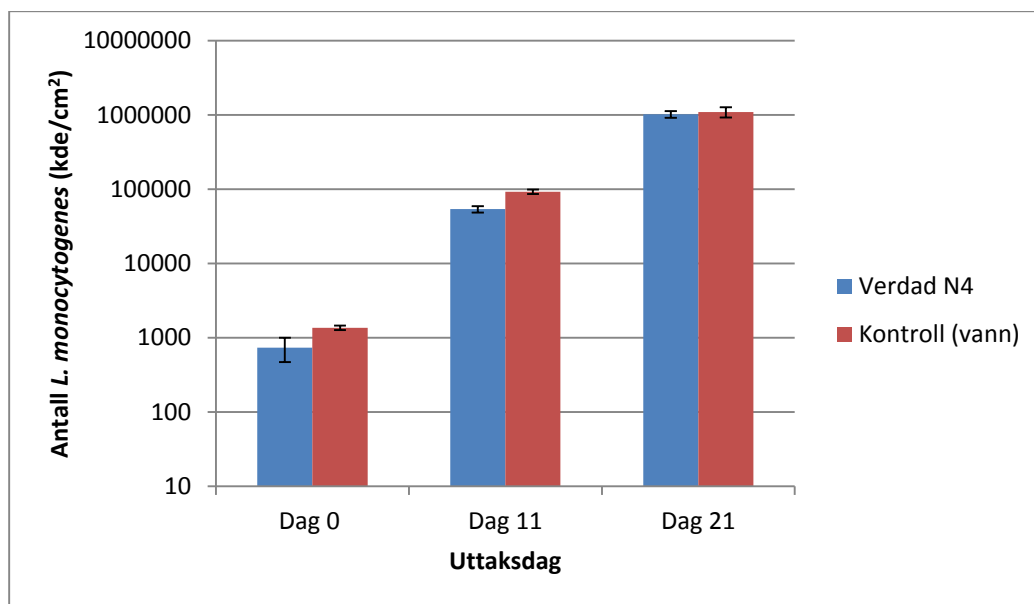
Figur 3 viser nivået av *L. monocytogenes* i laks behandlet med Verdad N4 og Opti.Form PPA Plus (Opti.Form) samt i kontroller rett etter behandling (Dag 0) og etter kjølelagring i 11-22 dager.

Behandling av rå laks med Verdad N4 ga ingen hemming av vekst på behandlet fersk laksefilet ved påfølgende lagring. Ved gjentak av forsøket ble det etter 22 dagers kjølelagring påvist noe lavere listeria-nivåer i laks behandlet med Verdad N4 enn i kontroll behandlet med vann. Verdad N4 og Opti.Form viste ingen listeria-hemmende effekt på laksefilet de første 11 dagene under lagring.

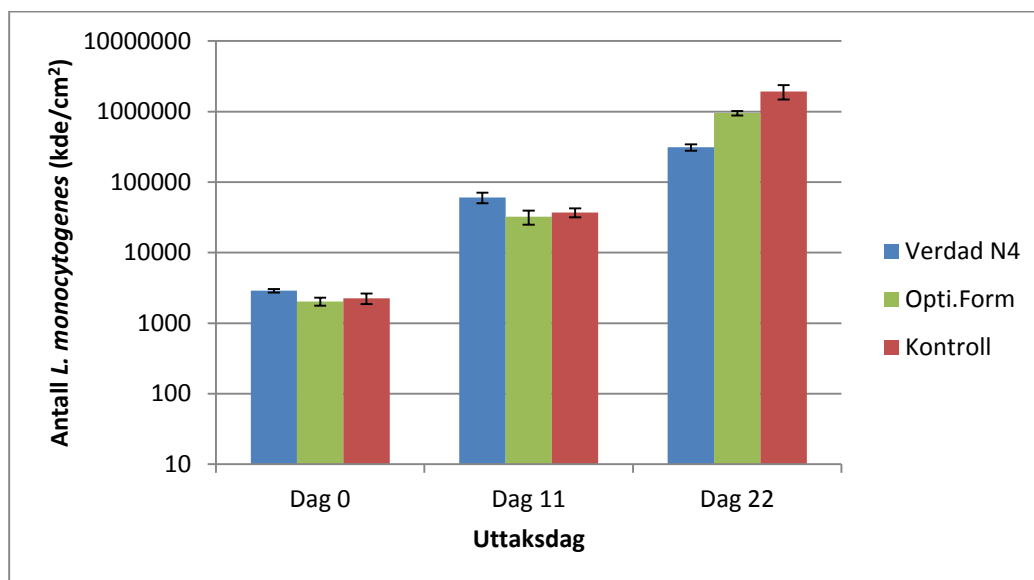
Diskusjon og konklusjon:

- Verdad N4 er et tilsetningsstoff som inneholder uspesifiserte aromakomponenter og salter av organiske syrer inkludert acetat. Produktet blir fremstilt ved fermentering av sukker. I tillegg til å gi økt smak og redusert behov for tilsetning av salt, kan Verdad N4 også bidra til økt mikrobiologisk holdbarhet og trygghet ved å hemme vekst av mikroorganismer. Verdad N4 er såkalt «label friendly», og behandlede produkter trengs ikke å merkes med E-nummer. Opti.Form PPA Plus er en blanding av kalium laktat og kalium acetat. Tilsetningsstoffet krever merking med E- nummer og har dokumentert antibakteriell effekt.
- Verdad N4 og Opti.Form kan injiseres eller påføres laksen i bad før røyking. Påføring etter røyking er ikke anbefalt av produsenten. Vi hadde ikke muligheter for å røyke listeria-smittet laks i dette prosjektet. Effekten ble derfor testet på rå laks uten røyking. Verdad N4 og Opti.Form ble påført ved dypping av laks i bad. Dette kan ha gitt lavere konsentrasjoner enn nødvendig for å oppnå veksthemming.
- Verdad N4 og Opti.Form ga hverken signifikant hemming av vekst eller drap av *L. monocytogenes*. Det kan ikke utelukkes at produktet har effekt om det benyttes mer optimale påføringsmetoder (injisering) og kombineres med røyking. Flere studier har rapportert veksthemmende effekt på *L. monocytogenes* av Opti.Form på røkt laks.

A)



B)



Figur 3 A) Nivå av *L. monocytogenes* på laksebiter behandlet med Verdad N4 og kontrollbiter behandlet med vann i løpet av lagringstiden. B) Resultater fra gjentak av forsøket i Figur 3A hvor behandling med Opti.Form ble inkludert for sammenligning mot Verdad N4. Verdiene er gjennomsnitt av 3 parallelle prøver. Standard feil er angitt.

5.5 Behandling av laks med Freebac-Mucosol®

Nivåer av *L. monocytogenes* i laks og på gjeller av laks behandlet med Freebac-Mucosol® (Mucosol) er gitt i henholdsvis figur 4 og 5.

Det ble skilt ut et grå-/brunaktig slimlag som fløt til overflaten av karet hvor laks ble behandlet med 1% Mucosol i 15 min. Visuelle fargeforandringer på skinn eller fiskekjøtt ble ikke observert. Behandling

med Mucosol viste en reduksjon i listerianivå på laks på 70-80 %. Kontroller behandlet tilsvarende i vann ga imidlertid en reduksjon på 50 % i forhold til ubehandlet laks. Det er ikke avklart om reduksjonen skyldes fjerning eller drap av listeria. Mucosol-behandling hadde ikke effekt på listerianivået på gjeller. Effekt av Mucosol på den totale mikrofloraen på laksen ble undersøkt i Forsøk 2. Etter 11 dagers islagring var det små forskjeller og totalt bakterienivå på både Mucosolbehandlet og ubehandlet kontroll var på 10^6 - 10^7 kde/g.

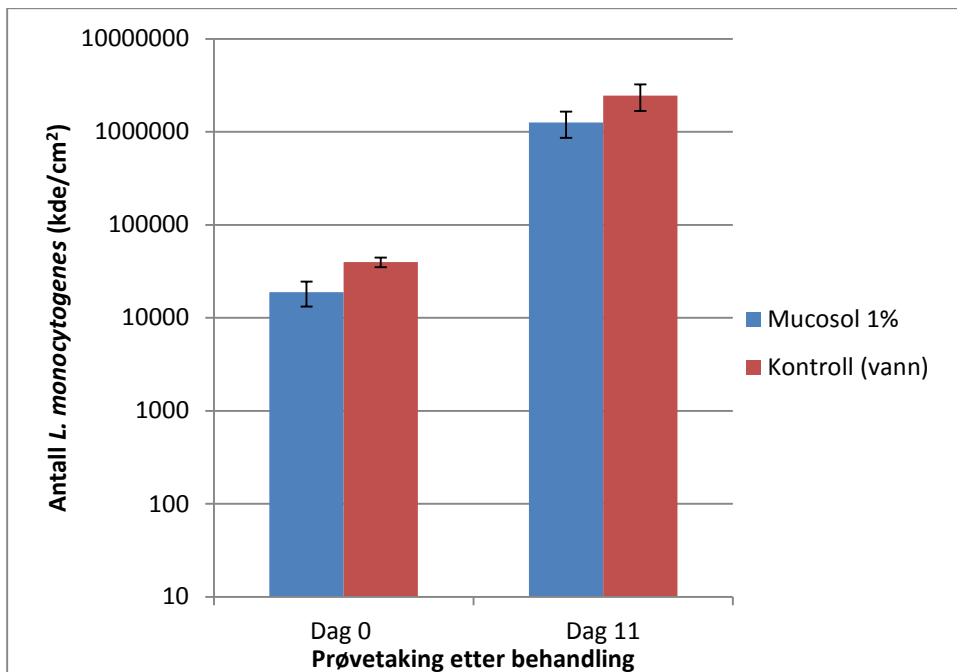
Diskusjon og konklusjon:

- Mucosol er beregnet for å fjerne slim på rund eller sløyd fisk. Behandling med Mucosol fjerner også noe bakterier på fisken.
- Små forskjeller i effekt mellom laks behandlet i vann (kontroller) og laks behandlet med Mucosol viser at selve skylleprosessen bidrar til å fjerne listeria på laksen.
- Produsentens anbefalinger om bruk av Mucosol kan være krevende ved industriell bruk pga vannforbruk og behandlingstid i kar. En mulighet kan være bruk i kjøletank etter sløyting og filetering. Effekt på kvalitet og sensorikk etter lagring er ikke avklart.
- Listeria sitter ofte på gjellene til laksen. Dersom Mucosol skal ha potensial for reduksjon av listeria på rund laks, bør derfor middelet ha effekt på listeria som sitter på gjeller. Ingen effekt på gjeller ble påvist i våre forsøk til tross for at gjellene ble optimalt eksponert for Mucosol under behandlingen.

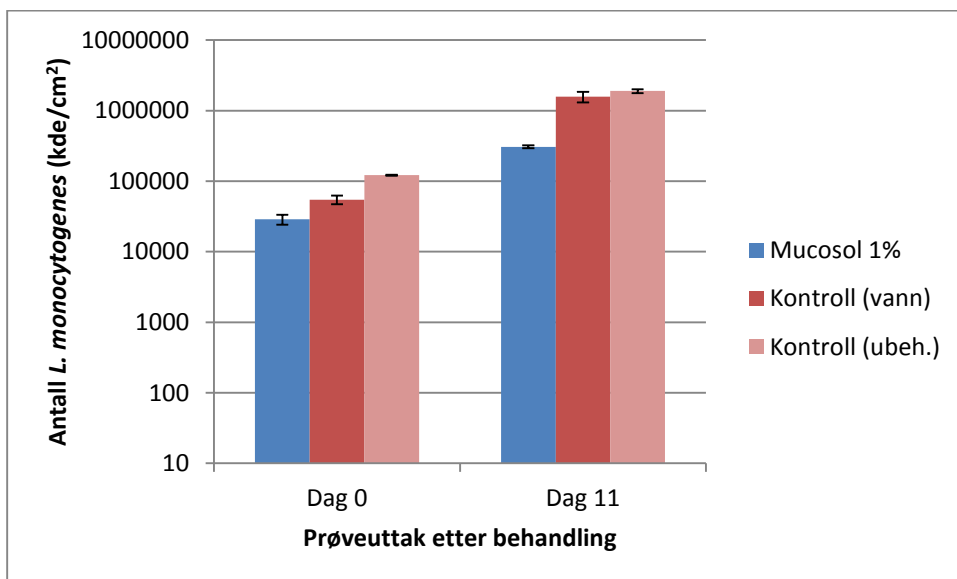


Bilde 3 Mucosol-behandling av sløyd laks. Bilde tatt etter 15 min behandling i 1 % Freebac-Mucosol® (til høyre). Kontroll-laks i vannbad til venstre

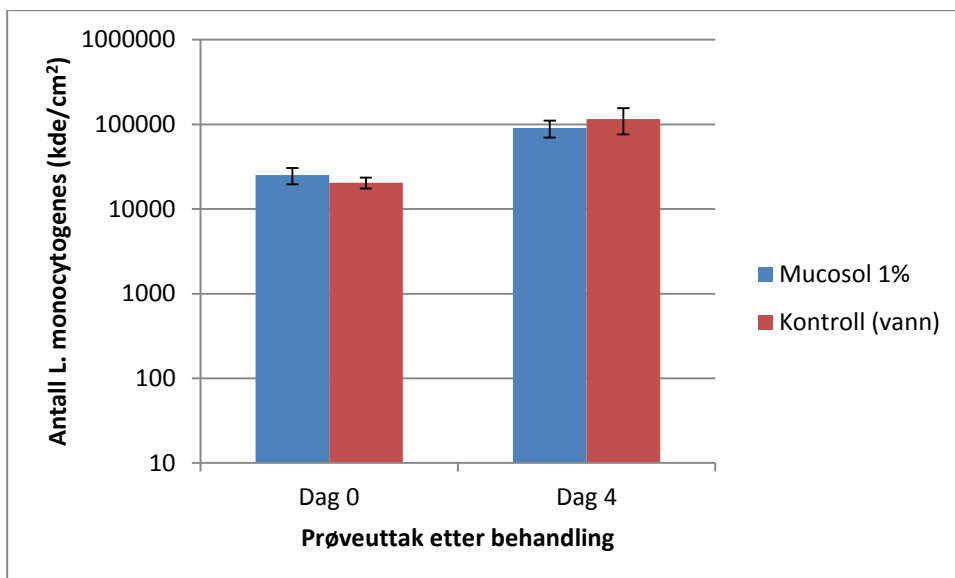
A)



B)



Figur 4 A) Forsøk 1: Nivå av *L. monocytogenes* etter behandling av laks i bad med Mucosol (1%). Verdiene er gjennomsnitt av 3 parallelle prøver for behandlede prøver og 6 parallelle prøver for ubehandlede. B) Forsøk 2: Gjentak av Forsøk 1, i tillegg ble det inkludert kontrollen som ikke ble behandlet. Verdiene er gjennomsnitt av 3 parallelle prøver. Standard feil er angitt.



Figur 5 Nivå av *L. monocytogenes* etter behandling av laksegjeller i bad med Mucosol (1 %). *Listeria*-nivåer bestemt etter behandling (Dag 0) og etter 4 dagers påfølgende kjølelagring. Verdiene er gjennomsnitt av 3 parallelle prøver. Standard feil er angitt.

5.6 Oppsummering og konklusjon

En oversikt over de ulike behandlingene og oppnådd reduksjon er gitt i Tabell 2.

Tabell 2 Oversikt over behandlingene testet på laks og oppnådd effekt på *L. monocytogenes*

Behandling	Laks behandlet	Kommersielt produkt testet	Effekt på <i>L. monocytogenes</i>
Ultraviolet lys (UVC)	Røkt filet Rå laks (skinnside og kjøttside)		70-80 % drap
PulsUV	Som for UVC		70-80 % drap
Lauryl arginat	Røkt laks	Mirenat-SY; Mirenat- TT	80-90 % drap
Organiske syrer/salter	Rå filet med skinn	Verdad N4; Opti.Form PPA Plus	Ikke drap eller vekstreduserende effekt ¹
Avsliming	Rå filet med skinn Gjeller Sløyd laks	Freebac-Mucosol®	0-80 % reduksjon ²

¹ Målt etter 11 dagers islagring av behandlet, rå filet (se kap. 5.4).

² Inntil 80 % reduksjon oppnådd ved behandling av rå filet med skinn; Ingen reduksjon oppnådd ved behandling av gjeller (se kap. 5.5).

Kommentarer:

- Resultatene oppnådd for de ulike behandlingene er gitt under hvert delkapittel 5.2-5.5. De testede metodene hadde begrenset effekt på reduksjon og/eller veksthemming av *Listeria* på laks. For metoder som dreper *Listeria* ble det gjennomgående påvist en reduksjon på 70-90 %.

- Praktisk uttesting av metoder og teknologier har blitt gjennomført under kontrollerte forhold og under betingelser egnet for å avdekke i hvilken grad metodene har effekt mot *L. monocytogenes* på laks. Forsøkene er blitt gjennomført under realistiske forhold inkludert bruk av listeria-stammer isolert fra laksenæringen. Med få unntak viste resultatene liten variasjon mellom paralleller og biologiske gjentak. Dette indikerte at forsøksoppsettet var robust og at resultatene er egnet til å vurdere hvilket potensiale de utvalgte metodene har for å redusere eller hemme vekst av *L. monocytogenes* på laks.
- Metodene som ble valgt for praktisk uttesting utgjør kun en liten del av metoder og teknologier som kan ha potensiale for redusere nivået av *L. monocytogenes* på råvarer eller produkter av laks. Resultatene fra dette forprosjektet kan derfor anses som et første trinn i arbeidet med å finne fram til robuste strategier med dokumentert effekt som kan være velegnet for å oppnå økt kontroll med listeria i laks og lakseprodukter.
- Behovet og forslag til videre arbeid rundt problemstillingen er gitt i kapittel 5.7

5.7 Arbeidspakke 3: Kunnskapsbehov som grunnlag for videre arbeid

Litteraturreportene i arbeidspakke 1 viste at en lang rekke metoder kan ha potensiale for å drepe eller redusere veksten av listeria på laks. Den praktiske uttestingen i dette prosjektet omfattet et begrenset antall metoder hvor det var mangelfull dokumentasjon på effekt mot listeria. Forprosjektet har avklart at enkelte av disse metodene i liten grad er egnet for å oppnå økt kontroll med listeria, mens andre bør vurderes for videre uttesting, optimalisering og evaluering.

Kunnskapsbehov som har blitt avdekket

Bedre data for å kunne sammenligne effekt av metoder er ønskelig: Det er ofte vanskelig å sammenligne resultater fra ulike studier og også å sammenligne effekt av ulike behandlinger da forsøksbetingelsene varierer. For å få bedre dokumentasjon samt muligheten til å sammenligne effekten av ulike teknologier og behandlinger, er det behov for å teste flere metoder og teknologier under kontrollerte og realistiske betingelser. Metoder med størst potensiale for anvendelse og effekt mot listeria bør velges. Dette kan inkludere bruk av metoder som dreper listeria, f.eks. bakteriofager (eks. produktene Listex og Listshield) og kortvarig varmebehandling (eks. Sonosteam) og metoder som hemmer vekst av listeria (eks. salter av organiske syrer). I våre forsøk var det også interessant å se at skylling av sløyd laks i vann reduserer listeria-nivået på laks (Figur 4B). Videre uttesting av dette bør vurderes.

Det er behov for å optimalisere metodene: I dette prosjektet ble forsøkene gjennomført under betingelser som skulle sikre en effektiv behandling. For noen av metodene er det flere alternative behandlingsmåter som kan påvirke sluttresultatet (f. eks. behandling med organiske salter ved injisering, behandling av laksen i bad eller ved tørrsalting). Andre metoder (UV-belysning) viser variasjon i effekt mellom paralleller. Optimalisering av enkeltmetoder kan bidra til en viss økt effekt mot *L. monocytogenes*. Det ble ikke forsøkt å optimalisere metodene i dette forprosjektet. Ved prosessering av laks, må man forvente at forholdene ved behandling kan variere. Dette kan bidra til uønsket variasjon i oppnådde effekter. Optimalisering for å oppnå effektive og robuste metoder under relevante forhold er derfor viktig. Vurdering av hvilke metoder som bør brukes hvor samt uttesting av metoder i anlegg inngår i dette.

Kan kombinasjoner av metoder gi økt effekt? I dette forprosjektet evaluerte vi effekt av metoder brukt enkeltvis. Metodene bidrar til drap/ fjerning av listeria, eller hemmer vekst av listeria på laks. Ved å kombinere metoder kan man både oppnå drap og hindre overlevende listeria i å vokse på produktet under lagring. Både synergi- og antagonistiske effekter kan forekomme ved å kombinere behandlinger. Det er derfor behov for flere undersøkelser for å kombinere ulike metoder/teknologier på en optimal måte. Optimaliserte emballerings- og lagringsmetoder kan inngå i dette.

Effekt på kvalitet og sensoriske egenskaper. Effekt av behandlinger på kvalitet (sensorikk og holdbarhet) er i liten grad blitt undersøkt. Det er vesentlig å undersøke hvordan aktuelle behandlingsmetoder av laks påvirker viktige sensoriske egenskaper ved produktet og om f.eks. behandling av råvarer påvirker kvaliteten til sluttprodukt. Varmebehandling vil kunne gi effektiv reduksjon av listeria, men samtidig påvirke farge og kvalitet på laks. Det vil i etterkant av dette forprosjektet bli gjennomført enkle tester på hvordan teknologien Sonosteam (kombinasjon av varme og ultralyd) påvirker sensoriske egenskaper til behandlet laks. Effekt av teknologien på listeria bør deretter vurderes.

Kost-nytte analyser. Listeria forekommer oftest i svært lave nivåer på laks og lakseprodukter. Selv metoder som gir begrenset reduksjon kan derfor ha stor nytteverdi ved å bidra til redusert forekomst av listeria på laks fra norsk laksenæring. Dette vil kunne bidra til redusert risiko for norske lakseprodukter som kilde til listeria-infeksjoner, redusere tilbakekallingen av norsk laks som følge av listeria og sikre et godt omdømme av norsk laks. Det er ulike kostnader knyttet til ulike metoder og teknologi. Vurderinger om i hvilken grad aktuelle metoder/teknologier bidrar til økt kontroll med listeria i forhold til kostnader i investeringer og bruk av metodene bør gjennomføres.

Oppskalering. I hvilken grad metodene og teknologiene er egnet for oppskalering for bruk i storskala prosessanlegg må vurderes.

Regelverk, forbrukerholdninger, samfunnsaksept. Det er ulike regelverk i ulike land når det gjelder metoder og tilsetningsstoffer (type, nivåer) som er tillatt brukt for behandling av laks. Det er også forskjeller i krav til deklareringsregler. Regelverket er ikke statisk, men i kontinuerlig endring. Bruk av metoder som i hht dagens regelverk ikke er tillatt brukt på laks til det norske markedet kan være relevante for behandling av norsk laks til andre markeder. Dette gir et behov for å avklare regelverk knyttet til aktuelle metoder.

6 Leveranser

Følgende leveranser er gitt/planlagt:

1. Oversikt over metoder for behandling av laks (arbeidspakke 1). Rapport sendt styringsgruppa 26. februar 2015. Det tas sikte på publisering av en vitenskapelig oversiktsartikkel i etterkant av prosjektet.
2. Hovedrapport med resultater fra arbeidspakke 2 (denne rapporten). Leveres i henhold til plan, 30. juni 2015.
3. Møter i styringsgruppa/prosjektgruppa. Møter i styringsgruppa har blitt avholdt 11. desember 2014, 3. mars 2015 og 16. juni 2015. Det er i tillegg blitt avholdt enkelte uformelle telefonmøter med Randi Haldorsen (leder av styringsgruppa) i løpet av prosjektperioden.
4. Presentasjon på fagsamling. Resultater fra forprosjektet vil bli presentert på en fagsamling for laksenæringen i oktober 2015.

Vedlegg: Forsøksoppsett AP2

Valg av metoder. Leverandører av ulike teknologi (Tabell 1) ble kontaktet og løsninger sendt fra leverandører til Nofima for uttesting. Info om anbefalt metodikk for behandling ble også mottatt. For behandling med UV-lys, ble eksisterende utstyr ved Nofima benyttet.

Råvarer. Laks ble mottatt fra Marine Harvest. Fersk laks ble oppbevart i kasser med is i kjølerom. Vakuumpakket røkt laks ble oppbevart på kjølerom ved 1 °C inntil bruk. Før tilsetning av listeria ble laksebiter á ca 3 x 3 x 1 cm tykkelse skjært til.

Oppdyrking av *Listeria monocytogenes*. Det ble benyttet en blanding av 10 ulike *L. monocytogenes* stammer. Stammene inkluderte tre referansestammer og sju stammer tidligere isolert fra laksenæringen. Stammene ble dyrket ved 37 °C i 24 t i Brain Heart Infusion buljong (BHI) etterfulgt av ny oppdyrking (1% inokulum) i laksebuljong (medium lagd av laks) ved 12 °C i 48 t. En miks av hver stamme (listeriamiks) i likt antall ble oppbevart på is inntil bruk.

Påføring av *L. monocytogenes* til laks. Biter av laks ble tilsatt *L. monocytogenes* vha pipettering av 20 µl listeriamiks til hver bit og spredning vha podeøse. Listeria ble absorbert til laksen i ca 20 min før behandling. Det ble tilsatt ulike mengder listeria avhengig av behandlingsmetode. Høye nivåer (ca 10⁶/bit) av listeriamiks ble tilsatt til biter som skulle behandles med antatt bakteriedrepende metoder (UV-C, pulsUV, Lauryl arginat, Mucosol). Lavere nivåer (ca 10⁴ /bit) av listeriamiks ble tilsatt biter som ble behandlet med metoder som ble antatt å ha listeria veksthemmende effekt (Verdad N4 og Opti.Form PPA Plus).

Behandling og lagring. Laksebiter tilsatt *L. monocytogenes* ble behandlet med ulike metoder:

- Bestråling med UV-C: Biter ble belyst med bølgelengde 254 nm i 60 s tilsvarende en dose på 9,8 mW/cm².
- Bestråling ved bruk av PulsUV: Biter ble eksponert for 3 pulser (< 1ms) á 8,2 V med hvitt lys.
- Behandling med tensid (Lauryl arginat): Biter av røkt laks ble påført 200 ppm Mirenat-SY. Dette tilsvarer høyeste tillatte dose i USA. Mengde tilsatt ble beregnet ut fra vekt på laksebit og en brukskons. av Mirenat-SY på 1,5 %. Ved gjentak av forsøk ble det i tillegg benyttet en annen type: Mirenat-TT. Kontroll ble påført tilsvarende volum destillert vann.
- Behandling med salter av organiske syrer (Verdad N4 og Opti.Form PPA Plus): Biter av filet med skinn ble lagt i løsning med Verdad N4 (3,1 % (w/w), 4°C) i 10 min. Kontrollbiter ble lagt i destillert vann i 10 min. Etter avrenning i 5 min ble biter tilsatt *L. monocytogenes* på både skinnside og kjøttside. Etter 20 min absorbering ble bitene pakket for lagring (se under). Ved gjentak ble biter også behandlet med Opti.Form PPA Plus. Laksebiter ble behandlet med 2,2 % (w/w) Opti.Form PPA Plus på samme måte som biter behandlet med Verdad N4. Nivåer av Verdad N4 og Opti.Form PPA Plus er ihht anbefalinger fra leverandør.
- Avsliming (Freebac-Mucosol®): Behandling med Mucosol ble utført på biter av laks og på gjeller. Biter av filet tilsatt *L. monocytogenes* (se over) ble lagt i løsning med Mucosol (1% (w/w), 4°C) i 15 min. Kontroller inkluderte biter lagt i destillert vann og ubehandlede biter av laks. Etter behandling ble prøvene lagret (se under). I forsøk 2 ble effekt av 5% Mucosol

undersøkt samt effekt av Mucosol på gjelder. Gjellebuer av fersk, sløyd laks ble skjært ut og tilsatt *L. monocytogenes* før behandling i 1 % Mucosol i 15 min, 4 °C. Kontroller var gjeller behandlet med destillert vann. Behandlede gjeller ble lagret på is inntil prøvetaking.

For hver behandling og uttakstid ble det benyttet 3 paralleller av behandlede prøver og 3-6 parallelle kontroller tilhørende hver behandling.

Lagring. Røkt laks behandlet med lauryl arginat ble vakuumpakket og lagret kjølig (ca 1 °C). Rå laks behandlet med Verdad N4, Opti.Form PPA Plus og Freebac-Mucosol® ble lagt i stomacherposer etter behandling og lagret kjølig (3-4 °C). Kontrollprøver tilhørende de ulike behandlingene ble lagret tilsvarende som behandlede prøver. Prøver bestrålt med UVC og pulsUV ble ikke lagret.

Prøvetaking og analyser. Prøvetaking ble gjort etter behandling (dag 0; dag 1 for lauryl arginat) og i løpet av lagringstiden (dag 11 og dag 21 for fersk laks behandlet med lauryl arginat, Verdad N4 og Opti.Form PPA Plus). For Mucosol-behandlet fisk ble det tatt prøver etter behandling (dag 0) og etter 4 dagers lagring på is.

Prøver ble sådd ut på Rapid L'mono agarskåler for påvisning av *L. monocytogenes*. Skålene ble inkubert ved 37 °C i 2 dager før telling av kolonier og beregning av drap, vekst og veksthemming av *L. monocytogenes*.

