





## **Forord**

Denne oppgaven ble utført ved instituttet for matematiske realfag og teknologi (IMT) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), i samarbeid med Bremnes Seashore AS. Oppgaven utgjør 30 poeng og er den avsluttende delen av en master i matvitenskap, retning produksjon og utvikling av næringsmidler.

Først og fremst vil jeg takke veilederne mine førsteamanuensis Odd Ivar Lekang ved IMT og Svein Olav Fjæra ved Bremnes Seashore AS. Tusen takk for hjelp til å utføre forsøk, konstruktiv kritikk, raske tilbakemeldinger og ikke minst engasjement for oppgaven. En spesiell takk til Svein Olav Fjæra for at jeg fikk komme på besøk til slakteriet på Bømlø, det var en spennende og lærerik tur for en Oslojente.

Takk til avdelingsingeniør Bjørn Reidar Hansen for hjelp til å finne utstyr, støtte under utføring av forsøk og for kaffe og Kong Haakon på fiskelaben.

Takk til professor Solve Sæbø for gjennomgang av R og tolkning av de statistiske resultatene. Og til slutt en takk til familie og venner for støtte dette halvåret.

## Sammendrag

Atlantisk laks (*Salmo salar*) kan fileteres enten pre eller post rigor. Pre rigor prosessering vil gi et ferskere produkt med kvalitetsmessige fordeler som fastere tekstur, mindre filetspalting og bedre sensoriske egenskaper. Ved å optimalisere slaktemetoden kan man utsette inntreden av rigor, som vil være ønskelig ved pre rigor filetering av oppdrettslaks ettersom det vil gi slakteriet mer tid til å prosessere laksen. Levendekjøling, kjøling av fisken før slakt, senker stressnivået i fisken og vil gi en betydelig lengre pre rigor tid. Lagringstemperatur etter slakt er også en viktig faktor som påvirker rigorutviklingen og vil kunne ha en effekt både på pre rigor tiden og styrken til rigor i fisken. Denne temperaturavhengigheten har vist seg å variere mellom ulike fiskearter, og lite forskning har blitt gjort med lagringstemperaturer på under 0°C. I denne oppgaven ble det derfor undersøkt hvordan temperaturer på under 0°C etter slakt påvirker rigorutviklingen, sammenliknet med nedkjøling ved 0°C.

Oppgaven er delt inn i flere delforsøk, hvor den første delen av forsøkene (forsøk 1-6) ble utført på fiskeanlegget ved NMBU. Forsøkene her ble utført på arktisk røye (*Salvelinus alpinus*). For å oppnå temperaturer på under 0°C ble kuldebad bestående av vann, salt og knust is benyttet. I det første forsøket ble det observert at ved lagring av nysløyd fisk ved 0°C, -4°C og gradvis fra 0 til -4°C viste målt rigor score til fiskene en indikasjon på at utviklingen av rigor varierer etter nedkjølingsmetode. Fisk plassert direkte i det kaldeste badet fryste raskt, som betyr at -4°C er for lav temperatur til å benyttes ved kjøling av fersk fisk. Det var ikke mulig å holde temperaturen til badene stabile og det ble observert en temperaturøkning i alle badene under forsøket. Dette betyr at resultatene fra dette forsøket ikke kan presentere temperaturavhengigheten til rigor ved de ønskede temperaturene. De neste forsøkene ble derfor brukt til å utvikle betingelser for kuldebadene slik at de kan holde riktig og stabil temperatur. Det ble observert at plassering av luftpumper i badene førte til sirkulasjon av vannet og gav en jevn temperatur i hele badet. Badet som skulle holde lavest temperatur kunne bli plassert i en fryser for å hindre varmeoverføring fra omgivelsene til badet. Et nytt forsøk med fisk ble utført: tre sløyde røyer ble kjølt ned ved bruk av tre forskjellige metoder; en fisk ble plassert i et bad på mellom 0.2 og -0.4°C, en fisk ble plassert i et bad på mellom -0.5 og -1.5°C og en fisk ble først plassert i det varmeste badet i en time og deretter overført til det kaldeste badet. Rigor ble målt etter 2, 4 og 6 timer ved å beregne rigor-indeks til fisken. Resultatene viste at fisken som ble plassert i det kaldeste badet hadde lavest rigor-indeks, samt en uventet nedgang i rigor-indeks etter 6 timer ved alle nedkjølingsmetodene. Fra resultatene ble det konkludert at flere fisk burde blitt kjølt ned ved bruk av hver metode for å

få resultater som kan testes for statistisk signifikans og at forsøket må vare lengre, ettersom fiskene fortsatt hadde en lav rigor-indeks ved slutten av forsøket. For å finne lavest mulig nedkjølingstemperatur som kan benyttes til å kjøle ned fisken uten at den fryser ble røye lagt i kuldebad med ulike temperaturer i en halv time og deretter undersøkt ved å se på stivheten til fiskene. Denne temperaturen ble observert til å være  $-1.5^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0.6^{\circ}\text{C}$ ). For å ta hensyn til usikkerheten i temperaturmålingene og for å sikre at fisken ikke fryser ble laveste temperatur som kan benyttes på kuldebadene bestemt til å være  $-1.4^{\circ}\text{C}$ .

Forsøk 7 og 8 ble utført på Bremnes Seashore sitt slakteri på Bømlo. Her ble utvikling av rigor mortis til atlantisk laks overvåket de 24 første timene etter slakt. To kuldebad bestående av RSW (refrigerated sea water) og knust is ble benyttet i forsøket, et på  $0^{\circ}\text{C}$  og et på  $-1.4^{\circ}\text{C}$ . Tre fisk fra pumpe fra ventemerde og tre fisk fra levendekjølingsbasseng ble lagt i hver av badene. Grad av rigor ble målt i alle fiskene ved å beregne rigor-indeks. Fiskene som ble lagt i  $-1.4^{\circ}\text{C}$  badet hadde gjennomsnittlig høyest rigor-indeks gjennom hele forsøket, men det var ingen signifikant forskjell mellom nedkjølingsmetodene på grunn av stor variasjon mellom fiskene som ble kjølt ned ved bruk av samme metode. Det var ingen forskjell mellom fisk fra levendekjølingsbasseng og fisk fra ventemerde i noen av badene. Et siste forsøk ble utført for å undersøke om fiskene i  $-1.4^{\circ}\text{C}$  badet var stive fordi de var i rigor eller fordi de hadde fryst. Fisk ble plassert i et bad med  $-1.4^{\circ}\text{C}$  i tre timer og deretter overført til et bad med  $0^{\circ}\text{C}$ . Rigor score til fiskene viste at de ble stive i løpet av de tre første timene og deretter mykere igjen etter at de ble overført til det varmere badet. Dette indikerer at laks nedkjølt i  $-1.4^{\circ}\text{C}$  bad vil kunne fryse og dermed bli oppfattet som stivere enn laks nedkjølt i  $0^{\circ}\text{C}$  bad. Ettersom laksen som ble benyttet i forsøkene ikke var sløyd er det en mulighet at det var blodet i fiskene som fryste, ettersom blod har en frysepunkt nedsettelse på  $-0.7^{\circ}\text{C}$ .

## Abstract

Farmed Atlantic salmon (*Salmo Salar*) can be fileted either pre or post rigor. Processing pre rigor yields a product with longer shelf life and superior quality because of the firmer texture, less gaping and better sensorial properties. By optimizing the slaughter method it is possible to postpone the development of rigor, which is desirable during pre rigor fileting as this will give the slaughterhouse more time to process the fish. Live chilling, chilling before slaughter, will reduce the level of stress in the fish and leads to a longer pre rigor time period. The storage temperature after slaughter is also an important factor affecting the development of rigor mortis in the fish and it can influence both the pre rigor time and the maximum strength of rigor. The temperature dependency of rigor varies between different species of fish and there is little research available on the influence of sub-zero temperatures. The main aim with this thesis was therefore to investigate how storage temperatures under 0°C after slaughter affects the development of rigor in comparison to storage temperatures at 0°C

The experimental part of this thesis is divided into several experiments, where the first part (experiment 1-6) was completed in the fish laboratory at NMBU. These experiments were performed on Arctic char (*Salvelinus alpinus*). To achieve temperatures under 0°C cooling baths consisting of freshwater, salt and crushed ice were employed. From the first experiment it was observed that when storing newly gutted fish at 0°C, -4°C and gradually from 0°C to -4°C the measured rigor score indicated that the development of rigor could be affected by the cooling method. The fish put directly into the coldest bath froze, which means that -4°C is too cold when chilling fresh fish. It was not possible to keep the temperature of the baths down during this experiment, so the obtained results cannot adequately describe the temperature dependency of rigor at the desired temperatures. The next experiments were conducted to develop a method to keep the baths at the correct temperatures. It was observed that placing a pump in the bath would create a flow of water, ensuring even temperatures between the top and the bottom part. It was also observed that by placing the coldest bath in a freezer it was able to keep low temperatures, as the heat flow between the bath and surroundings decreased. A new experiment with fish was conducted: Three gutted chars were cooled down by three different methods; one fish was placed in a bath that varied between 0.2 and -0.4°C, one fish was placed in a bath that varied between -0.5 and -1.5°C and one fish was first placed in the warmest bath for one hour before it was transferred to the coldest bath. Rigor was measured after 2, 4 and 6 hours by calculating the rigor-index. The results showed that the fish put directly into the coldest bath had the lowest rigor-index and an unexpected

decrease in the rigor-index after 6 hours for all the cooling methods. From the results it was included that the experiment lasted too short to observe the development of rigor and that more fish should be stored according to the different cooling methods, as it would give results that can be analysed for statistical significance. To discover the lowest possible temperature that could be used to cool the fish without it freezing, storage of char for a short amount of time in cooling baths with different temperatures were tested. This temperature was measured to be  $-1.5^{\circ}\text{C}$  with an accuracy of  $\pm 0.6^{\circ}\text{C}$ . With the accuracy taken into account and to avoid freezing of the fish the lowest possible temperature of the cooling baths was determined to be  $-1.4^{\circ}\text{C}$ .

Experiment 7 and 8 were conducted at the Bremnes Seashore AS salmon slaughter plant. The development of rigor mortis in Atlantic salmon was examined the first 24 hours after slaughter. Two cooling baths consisting of RSW (refrigerated sea water) and crushed ice were used as cooling medium during the experiment, one bath at  $0^{\circ}\text{C}$  and one at  $-1.4^{\circ}\text{C}$ . Three fish from the pump from net pen and three fish from the live chilling system were placed in each cooling bath. The fish that were placed in the  $-1.4^{\circ}\text{C}$  bath had the highest average rigor-index throughout the experiment, but the difference was not significant due to the large variations between the fish that were cooled by the same method. There was no difference between the fish from the net pen and the live chilling system in either of the baths. A final experiment was conducted to examine if the fish in the  $-1.4^{\circ}\text{C}$  bath were partly frozen or if the observed stiffness was because of early rigor. When placing fish in a  $-1.4^{\circ}\text{C}$  bath for 3 hours and then transferring them to  $0^{\circ}\text{C}$  the fish would become softer after the transfer. These results suggests that salmon in a cooling bath at  $-1.4^{\circ}\text{C}$  could freeze and therefore be stiffer than salmon kept in a cooling bath at  $0^{\circ}\text{C}$ . As the salmon used in these experiments was not gutted, it is possible that the blood in the fish froze since the blood has a freeze point depression of  $-0.7^{\circ}\text{C}$ .

# Innholdsfortegnelse

<b>1. Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Kjøling av oppdrettslaks under produksjon og transport</b> .....	<b>3</b>
2.1 <i>Kjøling før slakt</i> .....	3
2.1.1 <i>Levendekjøling</i> .....	3
2.2 <i>Kjøling etter slakt</i> .....	4
2.2.1 <i>Våtis</i> .....	4
2.2.2 <i>Vannsystemer</i> .....	5
2.2.4 <i>Superkjøling</i> .....	8
2.2.5 <i>Bruk av tørris og gel-is</i> .....	9
<b>3. Rigor Mortis</b> .....	<b>10</b>
3.1 <i>Den biofysiske mekanismen</i> .....	10
3.2 <i>Rigor mortis i atlantisk laks</i> .....	11
3.3 <i>Pre vs. post rigor prosessering</i> .....	12
3.3 <i>Faktorer som påvirker utviklingen av rigor mortis</i> .....	13
3.3.1 <i>Stress og utmattelse</i> .....	13
3.3.2 <i>Bedøvelse/avlivingsmetode</i> .....	14
3.3.3 <i>Nedkjøling- og lagringstemperatur etter slakt</i> .....	15
<b>4. Kuldebad</b> .....	<b>18</b>
<b>5. Forsøk 1: Bruk av kuldebad ved ulike temperaturer til å kjøle ned røye etter slakt</b> .....	<b>20</b>
5.1 <i>Innledning</i> .....	20
5.2 <i>Materialer og metoder</i> .....	20
5.3 <i>Resultater</i> .....	22
5.4 <i>Diskusjon</i> .....	25
<b>6. Forsøk 2: Kuldebad med sirkulasjon fra luftbobling</b> .....	<b>29</b>
6.1 <i>Innledning</i> .....	29
6.2 <i>Materialer og metoder</i> .....	29
6.3 <i>Resultater</i> .....	30
6.4 <i>Diskusjon</i> .....	31
<b>7. Forsøk 3: Kuldebad med sirkulasjon i fryser</b> .....	<b>34</b>
7.1 <i>Innledning</i> .....	34
7.2 <i>Materialer og metoder</i> .....	34
7.3 <i>Resultater</i> .....	34
7.4 <i>Diskusjon</i> .....	35
<b>8. Forsøk 4: Nedkjøling av røye ved bruk av kuldebad ved 0 og -3°C</b> .....	<b>36</b>
8.1 <i>Innledning</i> .....	36
8.2 <i>Materialer og metoder</i> .....	36
8.3 <i>Resultater</i> .....	37
8.4 <i>Diskusjon</i> .....	38
<b>9. Forsøk 5: Nedkjøling av røye ved bruk av kuldebad ved 0 og mellom -0.5 til -1.5°C</b> ....	<b>40</b>
9.1 <i>Innledning</i> .....	40
9.2 <i>Materialer og metoder</i> .....	40
9.3 <i>Resultater</i> .....	42
9.4 <i>Diskusjon</i> .....	44
<b>10. Forsøk 6: Bruk av kuldebad med ulike temperaturer til å finne frysetemperaturen til røye</b> .....	<b>47</b>
10.1 <i>Innledning</i> .....	47
10.2 <i>Materialer og metoder</i> .....	47
10.3 <i>Resultater</i> .....	48
10.4 <i>Diskusjon</i> .....	48



<b>11. Forsøk 7: Nedkjøling av atlantisk laks ved bruk av kuldebad på 0 og -1.4°C .....</b>	<b>51</b>
11.1 Innledning.....	51
11.2 Materialer og metoder.....	51
11.3 Resultater.....	53
11.4 Diskusjon .....	58
<b>12. Forsøk 8: Grad av frysing i atlantisk laks lagret ved -1.4°C etter slakt .....</b>	<b>63</b>
12.1 Innledning.....	63
12.2 Materialer og metoder.....	63
12.3 Resultater.....	64
12.4 Diskusjon .....	66
<b>13. Konklusjon for oppgaven.....</b>	<b>68</b>
<b>14. Referanser .....</b>	<b>69</b>
<b>15. Vedlegg .....</b>	<b>74</b>
15.1 Forsøk 1 rådata.....	74
15.3 Forsøk 5 rådata.....	75
15.4 Forsøk 7 rådata.....	75
15.5 Forsøk 8 rådata.....	79

# 1. Introduksjon

Ved tradisjonell filetering av atlantisk laks (*Salmo Salar*) ”modnes” fisken noen dager på kjølelager etter slakt, slik at dødsstivheten, rigor mortis, er over før den prosesseres. De siste ti årene har stadig flere slakterier valgt å filetere laksen direkte etter slakt, pre rigor, ettersom denne metoden gir et produkt av høy kvalitet og med lengre holdbarhet enn ved post rigor filetering. Tiden til rigor inntreffer, pre rigor tiden, avhenger av flere faktorer og varierer etter hvordan fisken håndteres både før og etter slakt. Ved å optimalisere slaktemetoden vil rigor kunne utsettes. En faktorene som påvirker utvikling av rigor i fisken er nedkjølings- og lagringstemperatur etter slakt. Denne temperaturen er et viktig parameter ettersom den er enkel å kontrollere. Generelt har det blitt observert at en senkning av lagringstemperatur ned mot 0°C gir en lengre pre rigor tid for fisk som lever i temperert klima (Azam et al. 1990; Jerrett et al. 1998; Kiessling et al. 2006; Oliveira 2011; Sigholt et al. 1997). I tillegg vil lave temperaturer virke hemmende på vekst av mikroorganismer og kan dermed ha en positiv innvirkning på den hygieniske kvaliteten og holdbarheten til produktet (Sikorski 1990). Utvikling av rigor mortis er et viktig aspekt ved filetproduksjon, ettersom en lengre pre rigor tid vil gi lengre tid til å prosessere laksen. Forskning på temperaturavhengigheten til rigor har hittil kun blitt gjort ved kjøletemperaturer på over 0°C. Derfor vil det kunne være interessant å se om det er mulig å utsette inntreden av rigor ved å benytte seg av en enda lavere lagringstemperatur etter slakt, men likevel såpass høy at fisken ikke fryser slik at produktet forblir ferskt.

Det overordnede målet til denne oppgaven var å undersøke hvordan nedkjøling av atlantisk laks etter slakt ved bruk av vannsystemer med temperaturer på under 0°C påvirker utvikling og styrke til rigor i fisken. I teoridelen av oppgaven diskuteres først kjøling av laks under produksjon og transport og ulike nedkjølingssystemer blir presentert. Deretter presenteres mekanismen og utviklingen til rigor mortis i laks og de ulike faktorene som påvirker inntreden og styrke av rigor. Teoridelen avsluttes med å presentere konseptet kuldebad som ble benyttet som kjølesystem under forsøkene i oppgaven. Den eksperimentelle delen er delt inn i flere delforsøk, hvor den første delen består av forsøk utført på fiskeanlegget ved NMBU. I disse forsøkene ble arktisk røye (*Salvenius alpinus*) brukt ettersom det var denne fisken som var tilgjengelig til å bli benyttet til forsøkene. Hensikten med disse forsøkene var å utvikle en metode for å lage kuldebad til å kjøle fisken som holder de temperaturene det var ønskelig å ha i forsøkene og å se hvor lav temperatur på kuldebadene man kan ha før fisken

fryser. To ulike metoder for måling av rigor i fisken ble også testet; rigor score og rigor-indeks. Den andre delen av forsøkene ble utført på Bremnes Seashore AS sitt slakteri, hvor atlantisk laks ble benyttet. Hensikten med forsøkene her var å overvåke rigorutviklingen de første 24 timene etter slakt under nedkjøling ved bruk av kuldebad på 0°C og -1.4°C. Både rigorutvikling ved direkte nedkjøling (med fisk hentet fra pumpe fra ventemerd) og gradvis nedkjøling (med fisk hentet fra levendekjølingsbasseng) skulle undersøkes. Avslutningsvis ble det utført et forsøk med hensikt å se om observert stivhet i fiskene i kuldebadet med -1.4°C hadde en sammenheng med frysing eller høy grad av rigor.

## **2. Kjøling av oppdrettslaks under produksjon og transport**

I et ferskt fiskeprodukt vil de primære kvalitetssenkende faktorene være aktiviteten til endogene enzymer, uttørking og oksidasjon av lipider og pigmenter. Videre vil uønsket bakterievekst føre til ødeleggelse av produktet. Temperatur er en av de viktigste parameterne som styrer hastighet og grad av forfall på grunn av disse faktorene (Sikorski 1990). Selv om både mikroorganismer og enzymer er involvert i å senke kvaliteten på produktet er det den mikrobielle aktiviteten som er viktigst i temperaturområdet 0-25°C og forandringer i temperatur har mer å si for den mikrobielle aktiviteten enn den enzymatiske. Under produksjon og transport av laks vil tilfredsstillende kjøling være essensielt for å kunne levere et ferskt produkt av høy kvalitet til konsumentene. For høye eller varierende temperaturer har en negativ effekt på holdbarheten og matvaresikkerheten til produktet ved å gi bedre vekstmuligheter til uønskede mikroorganismer (Huss & Dalgaard 1995). Utvikling av metoder som skal kunne sikre tilstrekkelig og kontrollert nedkjøling er dermed svært viktig i slakterier, videreforedlingsfabrikker og ved transport av fisk til marked. Moderne slakterier med kommersiell produksjon krever kjølemetoder som er effektive men likevel skånsomme for å kunne håndtere store mengder med fisk. På grunn av dette forskes det stadig på nye metoder å kjøle ned fisken på. Under distribusjon av fisk fra slakteri/fabrikk til marked skal den ha en kjernetemperatur på maks 2°C (jf. forskrifter om internasjonal transport av lett bedervelige næringsmidler, annex 3.). For å oppnå dette benytter dagens slakterier seg av vannsystemer, kjølerom og lagring på is under produksjonsprosessen. Til transport benyttes hovedsakelig våtis, men også andre kjølemidler som gel-is og tørris brukes. Det har også nylig blitt utviklet en alternativ metode å kjøle laksen på, superkjøling, hvor den kjøles ned til en temperatur på 1-2°C under frysepunktet før den transporteres til markedet.

Kjøling av laks kan deles inn i to faser; kjøling før og etter slakt.

### **2.1 Kjøling før slakt**

#### **2.1.1 Levendekjøling**

Nedkjøling av laks starter ofte allerede før fisken blir overført inn i slakteriet. En viktig fordel med å kjøle ned fisken mens den fortsatt er levende er at nedkjølingen skjer raskere ettersom blodet i fisken kjøles ned over gjellene og deretter transporteres rundt i fisken. Dersom fisken skal pakkes i kasser med våtis etter slakt vil det også være behov for mindre is ettersom fisken allerede holder en lav temperatur. Levendekjøling skjer ved at fisken blir pumpet fra

ventemerd (eventuelt direkte fra brønnbåt) over i et levendekjølebasseng som er fylt med RSW (refrigerated sea water). I RSW systemer blir sjøvann kjølt ved å bruke et mekanisk nedkjølingssystem. Fisken oppbevares i levendekjølingsbassenget i 40-60 minutter før den overføres inn i slakteriet. Det har blitt vist at overføring av atlantisk laks fra 16-4°C ikke øker stressnivået mer enn ved overføring til samme temperatur, som betyr at laks tåler en relativt brå endring i temperatur. Ved direkte overføring fra 16-0°C vil fisken derimot kunne bli utsatt for kuldesjokk, slik at temperaturfallet likevel ikke kan være for stort for å sikre god dyrevelferd under kjølingen. Det anbefales derfor å ha en nedre temperaturgrense på 2°C i levendekjølingsbassenget ettersom lavere temperaturer enn dette kan føre til økt stressnivå, tap av balanse og dødelighet hos fisken. Dersom lavere temperaturer skal benyttes må nedkjølingen skje gradvis over flere timer. En slik gradvis nedkjøling brukes i noen brønnbåter hvor fisken kjøles ved at temperaturen senkes 1°C hver time til en vanntemperatur på 1-0°C er nådd (Slinde et al. 2013). I tillegg til å kjøle ned fisken har levendekjøling som hensikt å senke stressnivået før bløgging. Dette påvirker kvaliteten til fisken positivt på flere måter; fisken vil være roligere og ha et lavere aktivitetsnivå som igjen hindrer slagskader, gir en lavere laktatproduksjon og et mindre pH-fall i fiskemuskel, mindre *gaping* (filetspalting) og en fastere tekstur. Samtidig utsetter levendekjøling inntreden av rigor mortis, som gir mer tid til pre rigor prosessering (se avsnitt 3.3.1) (Skjervold et al. 2001b; Skjervold et al. 2002; Ådland Hansen et al. 2012).

## **2.2 Kjøling etter slakt**

### **2.2.1 Bruk av våtis**

Våtis benyttes ofte ved distribusjon og transport av fisken men også ved eventuell lagring på kjølerom under produksjonsprosessen. Fordeler med våtis er at den fukter fisken slik at overflaten ikke dehydreres. Isen hindrer på denne måten vekttap hos fisken. Is smelter ved 0°C. Denne egenskapen gjør at temperaturkontroll ved bruk av våtis er enkelt; dersom det fortsatt er is tilstede i kassen er man sikret at temperaturen holder seg nede. Dette hindrer brudd på kjølekjeden ved distribusjon og gjør at det er mulig å levere produkter med uniform kvalitet til markedet. Andre fordeler ved bruk av våtis er at det er et portabelt og relativt billig medium, råmaterialet er lett tilgjengelig og det er trygt med tanke på matsikkerhet dersom drikkevann benyttes. Det finnes flere typer våtis som brukes til kjøling av fisk; flakis, plateis, tubeis og blokkis. Flakis er den vanligste isen å bruke ved store slakterier og fabrikker. Flakis gir en jevn fordeling av is rundt fisken, liten eller ingen mekanisk skade og rask nedkjøling. Med knust is er det alltid en liten risiko for at store biter med skarpe kanter kan skade fisken. Samtidig består isen av mange små biter som smelter raskt på overflaten av fisken og gjør at

nedkjølingen skjer raskere. Blokkis må knuses før den benyttes som kjølemiddel til fisken og benyttes for det meste av fiskere som fisker for hånd i varmere områder (for eksempel i Colombia og Filipinene). Dette er fordi isblokkene er enkle å transportere, krever lite lagerplass og smelter saktere enn knust is. Ved valg av hvilken istype som skal brukes er det flere faktorer som må bli tatt hensyn til, som aspekter tilknyttet økonomi og vedlikehold i tillegg til grad av effektivitet og skånsomhet med fisken (Huss & Lupin 1995). Lagring av fisk på våtis har en del begrensninger. Atlantisk laks blir pakket i isoporkasser, hvor hver kasse inneholder typisk 22 kg fisk og 5-6 kg is. Dette betyr store fraktvolumer. I tillegg må fisken fraktes som ”våt transport” ettersom isen smelter under transporten (Erikson et al. 2011). Dersom fisken skades av isen vil dette kunne føre til at smakskomponenter, vannløselige vitaminer og proteiner lekker ut av fisken. Ved forlenget lagring av fileter av fisk på våtis vil teksturen på fisken kunne endre seg. Kjøling på våtis har vist å ha en uønsket effekt på proteinløseligheten, WHC (water holding capacity) og aktiviteten til enzymer som bryter ned kollagen i filetene, som kan føre til at filetenes hardhet og strekkfasthet reduseres. Derfor blir ofte alternative kjølemidler som gel-is eller tørris benyttet til kjøling av fileter. Denne typen kjøling kan heller ikke stoppe aktiviteten til psykotrofiske mikroorganismer i fisken. For å øke holdbarheten til produktet utover det som er mulig ved bruk av våtis er nedkjøling til temperaturer under 0°C nødvendig (Venugopal 2005).

### **2.2.2 Vannsystemer**

#### ***RSW og CSW***

I tillegg til levendekjøling kan RSW benyttes til å kjøle ned laks etter slakt, i utblødningskar og til bufferlagring. Ofte benyttes to eller flere av disse tankene under sløyeprosessen (Erikson et al. 2011). Som alternativ til RSW kan CSW (chilled sea water) benyttes. I CSW blir is tilsatt som kjølemiddel istedenfor å bruke et mekanisk system. CSW benyttes ofte ved lagring av pelagisk fisk på fabrikktrålere hvor det kan oppstå forsinkelser mellom fangst og prosessering. Både RSW og CSW kan brukes ved installasjon av en fast tank, mens CSW er generelt mer praktisk å bruke i portable tanker (Kelman 2001). Hovedfordelene med RSW og CSW systemer sammenliknet med bruk av våtis er raskere nedkjøling og mindre trykk og skader på fisken. Vannsystemer gir også lettere håndtering av fisken mens den beveger seg gjennom slakteriet. Fisk som kjøles i et vannsystem er mindre utsatt for oksygen, noe som hindrer oksidasjon av lipider og pigmenter. Ved bruk av vannsystemer kan lagringstemperaturer på under 0°C kunne oppnås, som i mange tilfeller vil føre til en bedre holdbarhet på produktet. RSW/CSW systemer har kapasitet til å gi temperaturer helt ned til -2°C, men da vil deler av vannet i fisken fryse og dette er ikke ønskelig dersom man vil at

fisken skal forbli fersk. Temperaturen bestemmes derfor av bruksområdet til systemet. Temperatur på utblødningskar og kjølekar er typisk 2°C eller kaldere ettersom slakteriet benytter seg av levendekjøling eller ikke. Bruk av RSW/CSW systemer har noen ulemper, som varierer etter temperaturen til systemet, hvor lenge fisken skal lagres i systemet og hvilken fiskeart det brukes på. De fleste av disse ulempene er forbundet med lagring av pelagisk fisk over lengre tid, ettersom oppdrettslaks uansett oppholder seg kort tid i tankene (30-60min). Ved lagring over lengre tid vil mikroorganismer kunne spre seg raskt i vannet dersom temperaturen ikke holdes lav nok og føre til raskere nedbrytning av fisken enn ved tradisjonell lagring på våtis. Videre kan fisken ta opp salt fra vannet, som vil føre til en salt smak av muskelen til flere fiskearter. Andre ulemper er avfarging, drypptap, denaturering av protein og hydrolyse av fosfolipider (Venugopal 2005). Forsøk ved Nofima har vist at ved bruk av RSW og CSW til lagring av atlantehavstorsk (*Gadus morhua*) fra 1 til 3 døgn tok fisken til seg salt og vann og flere kvalitetsaspekter (lukt, filetspalting, konsistens) ble dårligere enn ved lagring på is. Dette var spesielt tydelig etter 3 døgn. Ved sammenlikning av lagring av pukkellaks (*Oncorhynchus gorbuscha*) på is og i et CSW system over lengre tid ble det observert liknende resultater. Vannsystemet førte til mindre vekst av mikroorganismer, men raskere senkning av den sensoriske kvaliteten på fisken. Fisken i CSW hadde også en høyere vektøkning og saltkonsentrasjon og en mykere tekstur enn fisken på is. Derfor har det blitt anbefalt å bruke RSW/CSW som en korttids lagringsmetode, spesielt for fisk som blir fisket i store mengder av gangen (Akse et al. 2011; Himmelbloom et al. 1994).

Observasjonene nevnt ovenfor er det ikke like viktig å ta hensyn til når det gjelder oppdrettslaks, ettersom den ikke skal oppholde seg i vannsystemet over lengre tid. Likevel finnes det noen utfordringer ved bruk av slike kjølesystemer i utblødningskar og kjøletank i lakseslakterier. Ved nedkjøling av fisken skal temperaturen senkes så raskt som mulig og store mengder fisk skal kjøles ned på en gang. Dette betyr at effektivitetsnivået på nedkjølingen er en av de viktigste aspektene ved valg av kjølemetode i slakteriet. Mange slakterier har fjernet levendekjøling, slik at kjøling kun foregår i utblødningstanken og i kjøletank etter sløyting. I tillegg bruker slakteriene slag eller strøm til bedøving/avliving etter at bruk av CO<sub>2</sub> ble forbudt. Fisk som blir behandlet med disse metodene beveger seg lite i utblødningstanken, og synker til bunnen. Dette fører til både mindre effektiv kjøling og utblødning, ettersom fiskene legger seg opp hverandre og gjellelokkene klemmes inntil hodet til fisken. Atlantisk laks er en relativt stor fisk, så kjølingen går treigt på grunn av lav hastighet på varmeoverføringen fra innsiden av fisken til overflaten. Ved bruk av RSW til å kjøle ned rund laks direkte fra sjø ved sommertemperaturer vil det ta 80-90 minutter å nå en

kjernetemperatur på gjennomsnittlig 4°C. Dette fører til flaskehalser i prosesseringslinjen for å nå den temperaturen som kreves før pakking. Det er derfor ønskelig å finne alternative nedkjølingssystemer som kan gi en mer effektiv nedkjøling av fisken. Nedkjøling ved bruk av RSW/CSW systemer krever teknologi som er svært energikrevende, så å utvikle en effektiv nedkjølingsmetode som i tillegg har lavt energiforbruk hadde vært ideelt (Akse et al. 2013).

### *Slush is*

Slush is (eventuelt binary, slurry eller liquid ice) er en videreutviklet versjon av CSW systemet og består av en blanding av mikroskopiske sfæriske ispartikler (0.25-0.5mm) og sjø- eller saltvann, kjølt til en temperatur på under 0°C. Ved å variere saltmengden kan temperaturen på slush isen varieres, men den skal holdes over frysepunktet til fisken. Slush is er en flytende blanding med 20-25% is som enkelt kan pumpes av en sentrifugalpumpe. Hovedfordelene ved bruk av slush is er at nedkjølingen skjer svært raskt ettersom varmeoverføringskapasiteten er høyere enn både den til våtis og RSW/CSW systemer. De små partiklene sørger for minimalt med smelting på grunn av tap av varme til omgivelsene og maksimerer dermed utnyttelsesgraden til isen. Faren for mekanisk skade på fisken er også svært liten på grunn av størrelsen og formen på ispartiklene. Slush is har en 30-40 ganger så høy kontakt med fisken enn det flakis har og bevegelsen i vannsystemet sørger for en hurtig senkning av kjernetemperatur (Huidobro et al. 2001; Piñeiro et al. 2004; Venugopal 2005). I tillegg er det mulig å kombinere slush is med conserverende stoffer som ozon eller melanoseinhibitorer (Huidobro et al. 2002). Et slakteri i Chile (Patagonia Salmon Farming S.A) benytter slush is i hele produksjonslinjen, først til levendekjøling av laksen til 2-3°C, deretter i utblødningskar og til bufferlagring helt til den er ferdig filetert. Produsenten av slush is systemet mener selv at laksen fra dette slakteriet er av høyest mulig kvalitet (Sunwell Technologies inc.). Det finnes flere artikler fra yrkesmagasiner i sjømat sektoren som beskriver fordelene med bruk av slush is, men derimot få vitenskapelige artikler som fokuserer på bruk av slush is til å nedkjøling av oppdrettsfisk. Ut ifra de studiene som har blitt gjort hittil virker det som om det stor forskjell på hvordan ulike typer fisk og skaldyr reagerer på denne nedkjølingsmetoden, og det er ikke alle produkter det er like aktuelt for. Likevel mener flere forskere at ved å videreutvikle og ta i bruk slush is systemer til lagring av sjømat vil man i fremtiden ha tilgang til produkter av høyere kvalitet på markedet enn det som er tilgjengelig nå, ved at behandlingen av produktene vil bli mer automatisert og hygienisk. På grunn av dette har interessen for denne typen kjøling økt både for bruk om bord på fiskebåter og på fabrikker i havn og innland (Piñeiro et al. 2004).



#### 2.2.4 Superkjøling

Ettersom laksen som pakkes skal ha en temperatur på maks 2°C betyr dette at noe av isen den pakkes med (ca. 1/3) brukes til å senke temperaturen til 0°C og deretter til å opprettholde denne temperaturen. I 2010 ble 922 000 tonn med laks eksportert fra Norge, mesteparten pakket i isoporkasser med is, som betyr at omtrent 230 millioner liter vann ble fraktet med denne fisken. Det store isbehovet er upraktisk med tanke på transport, da 230 millioner liter vann tilsvarer 7500 trailere med is (Sivertsvik & Rotabakk 2013). Ved superkjøling blir temperaturen til produktet senket til 1-2 grader under produktets frysepunkt, som betyr at produktet delvis fryses og at isbehovet blir betraktelig mindre ved pakking. Dette har en positiv effekt på holdbarheten til produktet, hovedsakelig på grunn av lavere enzymatisk og mikrobiell aktivitet enn ved konvensjonell kjøling. Ved konvensjonell nedkjøling skal ingen frysing ta sted på overflaten til produktet og den interne varmeoverføringen vil da gå sakte på grunn av lav termisk konduktivitet. Ved superkjøling fryser små deler av vannet i produktet til is (mellom 5 og 20%), slik at denne varmeoverføringen skjer raskere. Produktet kan deretter legges på våtis slik at temperaturen holder seg konstant ved videre lagring og distribusjon. Nedkjølingen av produktet krever mindre tid i kjøleutstyr enn ved konvensjonell nedkjøling, ettersom is dannet i de ytterste lagene vil absorbere varme fra midten av produktet etter det er tatt ut av utstyret og gi en jevn, lav temperatur i hele produktet. Isen dannet i produktet fungerer også som et buffer som kan absorbere varme fra omgivelsene uten at temperaturen til produktet økes (Nordtvedt 2012). En metode for superkjøling er å utsette fisken for kald luft i en blåsefryser på -30°C i opptil fire minutter i en frysetunnel. Det vil da danne seg et islag på utsiden av produktet som flytter seg innover i fisken når det overføres til kjølelager (Berge 2014). Andre metoder for superkjøling er bruk av kryogeniske gasser, kontaktfrysere eller dynking av fisken i RSW eller slush is ved temperaturer under frysepunktet til fisken (Erikson et al. 2011). Utfordringer med superkjøling er å kontrollere mengde vann som fryser til is i produktet. Dersom det dannes mye iskrystaller vil dette ha en negativ effekt på produktkvaliteten. Videre kan det frosne laget på utsiden av produktet skape utfordringer ved noen typer prosesser og ved pakking av produktet, siden det blir stivt. Men dette kan igjen være en fordel ved andre prosesser så det kommer an på produktet som skal produseres. For eksempel kan superkjøling før filetering kunne gi høyere utbytte. Fiskemuskel er myk, som betyr at ved filetering vil muskelen bli utsatt for pressing og bøyning som kan gi feilskjæring og drypptap. Ved bruk av superkjøling vil muskelen bli stivere og det er dermed enklere å kutte riktig. Ved filetering av superkjølt torsk og makrell har det blitt observert et filettutbytte som er 1-2.5% høyere sammenliknet med vanlig filetering (Haugland et al. 1999; Nordtvedt 2012)

### 2.2.5 Bruk av tørris og gel-is

Som alternativ til våtis kan tørris eller gel-is benyttes under transport av fisken.

Tørris er CO<sub>2</sub> i fast form og kan produseres i pellets, som snø eller i skiver. Tørris smelter ikke men sublimerer over til gassform, som gjør at den har flere fordeler ved bruk både under fly- og trailertansport. Ved bruk av tørris trenger man ikke å ta hensyn til smeltevann og laksen kan dermed bli fraktet som tørr transport og i andre typer kasser enn isoporkasser. Tørris har også dobbelt så stor kuldeutnyttelse enn våtis, slik at mengde laks som kan fraktes pr. mengde is er større. Dette betyr at det er plass til mer fisk i hver kasse og den totale frakten vil ha et mindre volum (YaraPraxair). Ved frakt av fileter i pappesker kan mengde tørris tilpasses slik at temperaturen i kassene holder  $-1^{\circ}\text{C}$ , som er lavere enn konvensjonell kjøling og har holdbarhetsmessige fordeler i likhet med superkjøling. Dette krever emballasje av bølgepapp som skaper avstand mellom filetene og isen, slik at produktet ikke fryser (Nordberg 2012). Gel-is er et annet alternativt kjølemiddel, med mange av de samme fordelene som tørris. I Chile benyttes hovedsakelig gel-is til transport av både fileter og sløyd laks på grunn av at fisken må fraktes over lengre avstander til markedet. Gel-is brukes også til transport av fileter i Norge. Gel-is kan også fraktes som tørr transport og har også kuldeutnyttelse enn våtis. Ved sammenlikning av bruk av gel-is og våt is i isoporkasser med rund laks under 5 dagers flyfrakt ble det observert at gel-isen holdt temperaturen i kassene like bra som våtisen. En observert ulempe med gel-isen var at våtisen kjølte jevnere enn pakkene med gel-is ettersom isen dekket hele fisken. Lagring på gel-is førte også til et større vekttap for fisken enn det våtis gjorde, trolig fordi våtisen hindret uttørking av overflaten til fisken og holdt dermed bedre på fuktigheten. Ved frakting av filet er ikke dette like viktig å ta hensyn til ettersom fisken da er pakket i emballasje som hindrer direkte kontakt mellom produktet og kjølemiddelet (Hellevik & Fjørtoft 2008).

### 3. Rigor Mortis

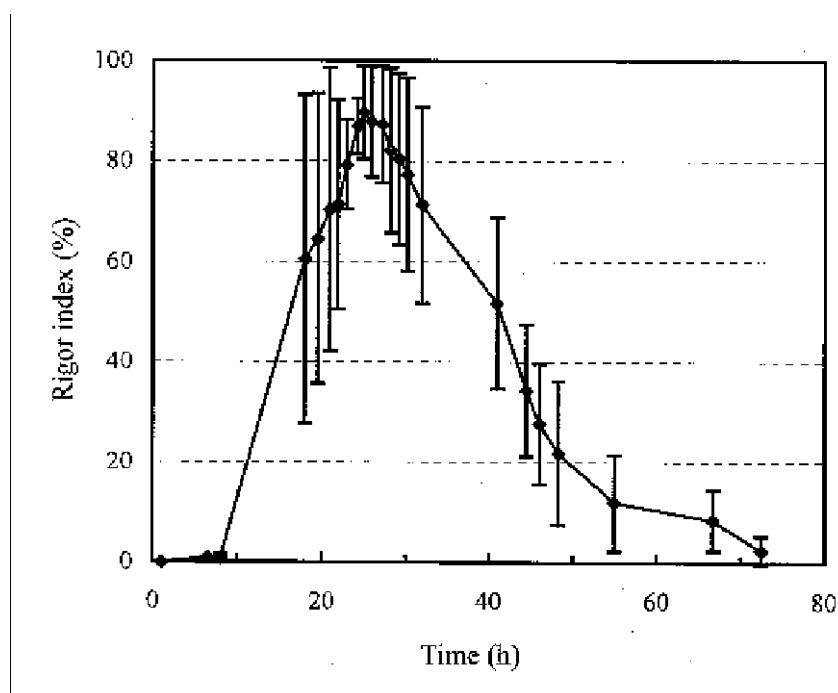
#### 3.1 Den biofysiske mekanismen

Rigor mortis, dødsstivhet, er et resultat av kjemiske forandringer i muskel post mortem. Rigor initieres ved at musklene trekker seg sammen som en respons på lavt ATP (Adenosin-5'-trifosfat) nivå og høyt  $\text{Ca}^{2+}$  nivå i muskelcellene. ATP er et energirikt molekyl som dannes ved oksidasjon av glukose. I en avslappet muskel holdes  $\text{Ca}^{2+}$  konsentrasjonen i cellene nede ved at ionene pumpes av ATP-drevne pumper ut gjennom cellemembranen eller inn i det sarkoplasmatiske retikulum. Hver muskelcelle (fiber) består av mange myofibriller som igjen er bygget opp av filamenter. Det finnes to typer filamenter, tykke filamenter (hovedsakelig bestående av proteinet myosin) og tynne filamenter (hovedsakelig bestående av proteinet actin). Ved å fjerne  $\text{Ca}^{2+}$  fra cellen hindrer ATP at actin og myosin danner komplekset actomyosin som fører til at musklene aktiverer seg og går over til spendt tilstand. Høye nivåer av  $\text{Ca}^{2+}$  vil forårsake konformasjonsendringer i proteinet tropomyosin slik at actin blir tilgjengelig for binding med myosin. I et dødt dyr vil mengde oksygen, glukose og frie fettsyrer i muskelen synke ettersom blodsirkulasjonen stopper opp. Metabolisme på dette stadiet må dermed skje anaerobt og ATP dannes via nedbrytning av glykogen under glykolysen. Dette fører til opphopning av laktat (melkesyre) og en senkning av pH i muskelen. Glykolysen blir etterhvert inhibert som et resultat av manglende substrat eller ugunstige forhold (for surt miljø) for enzymene i prosessen. For fiskemuskel er det mangel på substrat som har mest å si for utvikling av rigor da pH holder seg over 6,5, mens pH i muskel i pattedyr faller til typisk 5.5. Etter hvert som ATP nivået synker vil  $\text{Ca}^{2+}$  ioner hope seg opp i cellen ettersom de ATP-drevne pumpene ikke lenger er aktive. Når ATP nivået er på mindre enn  $10^{-4}$  M og  $\text{Ca}^{2+}$  nivået enn høyere enn  $10^{-6}$  M vil rigor mortis inntreffe ettersom musklene ikke lenger kan opprettholdes i avslappet tilstand. Actin og myosin danner actomyosin irreversibelt og muskelen mister sin elastisitet. Etter en tid vil rigor i dyret oppløses, og musklene vil mykes opp igjen. Dette er ikke fordi actomyosinkomplekset løses opp, men på grunn av aktiviteten til proteolytiske (proteinnedbrytende) enzymer i muskelen som degraderer deler av muskelfibrene (Fossum 2009; Roth et al. 2009; Sikorski 1990; Warris 2010). Mekanismene for oppløsningen av rigor er ikke fullstendig kjent, men den involverer aktiviteten til enzymene cathepsin og calpain. Aktiviteten til calpain er viktigst i rødt kjøtt, kylling og kalkun, mens i fisk er det trolig cathepsin som har størst effekt. Det finnes flere typer cathepsin enzymer, men for fisk er aktiviteten til cathepsin L og B høyest ettersom pH i muskelen under rigor er lik optimal pH til disse enzymene (Chéret et al. 2007). For laks har

det blitt observert at cathepsin L bryter ned både actomyosin og bindevev i muskelen og at aktiviteten til enzymet har en lineær sammenheng med tekstur i fiskemuskel ved instrumentell måling (Yamashita & Konagaya 1990).

### 3.2 Rigor mortis i atlantisk laks

Pre rigor tid og styrke og varighet av rigor varierer etter dyreart og innenfor hver dyreart etter flere faktorer (se avsnitt 3.4). For eksempel tar det for kylling ca. 4 timer før rigor inntreffer, mens for storfe kan det ta opp til 24 timer. For fisk kan det ta alt fra mindre enn en time (Grenadier (*Macrourus whitsoni*)) til 60 timer (karpe (*Cyprinus carpio*)). For noen arter kan rigor vare i flere dager før muskelen blir myk igjen, mens for andre arter er rigor over innen et døgn etter slakt (Nakayama et al. 1992; Oliveira 2011). I figur 1 er rigorutviklingen, presentert som rigor-indeks (%), til atlantisk laks lagret ved 0°C blitt beregnet over en periode på 80 timer.



Figur 1 Rigor-indeks (%) til atlantisk laks lagret på is i et kjølerom på  $3\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Wang et al.1998).

Større rigor-indeks betyr høyere grad av rigor. (Wang et al.1998) klassifiserte rigor mortis stadiene i laks etter følgende rigor-indeks verdier:

Rigor-indeks  $<10\%$  = pre/post rigor, full bevegelse av muskel.

Rigor-indeks  $10-80\%$  = fisk er i rigor

Rigor-indeks  $80-100\%$  = fisk er i rigor, maks stivhet.

Laksen benyttet dette forsøket var oppdrettslaks ( $2.1\pm 0,5$  kg) tatt direkte fra sjø med en vanntemperatur på  $5-9^{\circ}\text{C}$ . Fisken ble sultet i to dager før den ble avlivet med slag mot hodet. Ut ifra figuren kan det observeres at rigor til laks ved disse betingelsene inntreffer etter ca. 8-

10 timer og varer til 60-70 timer etter slakt. Rigor i fiskene nådde en maks styre omtrent 25 timer etter slakt. Dette betyr at atlantisk laks har en relativt kort pre rigor tid og en lang i rigor tid hvor fiskemuskelen er sårbar og bør behandles så lite som mulig. En slik rigorutvikling byr på flere utfordringer når det kommer til vidreforedling av laksen både med hensyn til produksjonseffektivitet og for å få så god kvalitet på produktet som mulig. Ved filetering kan man velge å enten gjøre dette pre rigor eller post rigor.

### **3.3 Pre vs. post rigor prosessering**

Ved slakteriene for oppdrettslaks er den vanligste prosedyren å bedøve, bløgge, sløye og legge fisken på is direkte etter at den har blitt tatt opp fra sjø eller levendekjølingsbasseng. Dette er for å unngå at fisken prosesseres mens den er i rigor, som vil kunne føre til skader og filetspalting i fiskemuskelen. Deretter blir fisken enten distribuert direkte til markedet eller den lagres 3-5 dager på kjølelager før den prosesseres videre. Da har fisken gått ut av rigor, som betyr at skinn og pinnbein enkelt kan fjernes maskinelt ved filetering. Lagringstiden gjør at fisken er mindre fersk og har kortere holdbarhet enn det den hadde hatt dersom den hadde blitt filetert direkte etter sløying. For å kunne tilby ferske fiskeprodukter av beste kvalitet er produsentene avhengige av rask prosessering og kortest mulig tid fra fisken kommer inn i slakteriet til produktet er tilgjengelig for konsumentene på markedet. Ferskhet er et av de viktigste parameterne når det gjelder kvalitetsbedømmelse av denne typen produkter. Et ferskere produkt kan ofte prises høyere ettersom konsumentene oppfatter et ferskere produkt som et bedre produkt. For norsk fiskeindustri er det lønnsomt å produsere mer videreforedlete fiskeprodukter både for eksport og salg innenfor Norge. Samtidig finnes det en økt interesse for fiskeprodukter av høyere kvalitet innenfor flere markeder (Sørensen et al. 1997). Derfor har flere slakterier skiftet taktikk og valgt å gjennomføre pre rigor filetering, filetering av fisken før den går inn i rigor. Pre rigor filetering har flere kvalitetsmessige fordeler over post rigor filetering; bedre farge, bedre lukt og en fastere tekstur med mindre filetspalting. Det har også blitt observert at pre rigor fileter har bedre mikrobiologisk kvalitet, med mindre bakterievekst (totaltall, H<sub>2</sub>S- produserende og psykotrofiske bakterier) både ved vakuumpakking og lagring på is sammenliknet med fileter fra post/i rigor prosessering. Pre rigor prosessering byr imidlertid på noen utfordringer med fjerning av pinnebein og skinn. Det er ikke mulig å nappe ut pinnebeina uten å skade muskelen slik som i en post rigor filet. Derfor vil det være nødvendig å enten fjerne dem manuelt, noe som er tidskrevende prosess, eller å skjære dem ut som vil etterlate hakk i fileten. Avskinning skjer ved å skjære bort skinnen og gir litt mindre utbytte enn ved post rigor avskinning der skinnen sitter løsere fast i muskel. Det arbeides stadig med å løse disse utfordringene og utvikle nye metoder for å

kunne gjennomføre pre rigor filetering like effektivt som post rigor filetering. Selv med disse utfordringene har pre rigor filetering blitt sett på som en revolusjonerende fordelingsmetode på grunn av den høye kvaliteten og forlengede holdbarheten, og produktene har hatt stor suksess på markedet (Misimi et al. 2008; Rosnes et al. 2003; Skjervold et al. 1999; Skjervold et al. 2001a; Skjervold et al. 2001c; Sørensen et al. 1997; Thielemann 2014).

### **3.4 Faktorer som påvirker utviklingen av rigor mortis**

Ved pre rigor videreforedling av laks er det ønskelig å optimalisere slaktemetoden slik at inntreden av rigor utsettes lengst mulig. Da får slakteriet mer tid til å prosessere fisken. Utvikling av rigor i fiskemuskelen er et resultat av mange prosesser som skjer i fisken post mortem. Som nevnt tidligere vil fiskeart ha mye å si for pre rigor tid. Dette forklares med at forskjellige fiskearter har ulik kjemiske komposisjonen i musklene. For eksempel har pukkellaks en høyere andel fett enn kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*) og vil gå senere inn i rigor. Videre vil det også være variasjon innenfor hver art, på grunn av individuelle forskjeller og ulik behandling av fisken både pre og post rigor. Et eksempel på individuelle forskjeller er størrelse på individet ettersom mindre fisk går raskere inn i rigor enn større fisk (Oliveira 2011). Under diskuteres tre viktige faktorer som påvirker utvikling, styrke og varighet til rigor mortis i fisken og som involverer hvordan fisken behandles: grad av stress og utmattelse, bedøvelse/avlivningsmetode og lagringstemperatur etter slakt.

#### **3.4.1 Stress og utmattelse**

Dersom dyr blir utsatt for en stressende situasjon eller føler frykt, vil hormonet adrenalin (epinefrin) bli sekretert som respons. Adrenalin fremmer nedbrytningen av glykogen i musklene ved å slippe løs energi (i form av ATP) gjennom glykolysen. Fisk som har vært gjennom langvarig stress før slakt har derfor et lavere glykogenlager og vil gå raskere inn i rigor. Fiskemuskelen vil også få dårlige tekstur og et høyere pH fall (Sigholt et al. 1997; Thomas et al. 1999; Warris 2010). Flere av trinnene ved produksjon av oppdrettslaks er med på å øke stressnivået i fisken; frakting i brønnbåt, trengeoperasjoner i ventemerden og pumping inn i slakteri. For å roe ned fisken etter transport i brønnbåten skal den oppholde seg i ventemerden minst et døgn før slakt. Levendekjøling (avsnitt 1.2.1) er også en metode utviklet for å dempe stressresponsen og roe ned fisken. I tillegg å utsette rigor gir levendekjøling en lavere maksstyrke på rigor. Samtidig vil levendekjølt fisk ha en lengre i rigor tid enn ikke-levendekjølt fisk med et høyere stressnivå (Skjervold et al. 2001b). En utmattet fisk i en dårligere fysisk tilstand vil også gå raskere i rigor på grunn av et lavt glykogenlager. Et eksempel på dette er at fisk som har gytt vil gå raskere i rigor enn fisk som ikke har gytt av samme art og størrelse. Sulting av fisken før slakt vil også minke glykogenlageret, som vil

kunne føre til en kortere pre rigor tid. Sulting, som begynner før transport i brønnbåt, er likevel en normal del av slakteprosessen ettersom det hindrer avføring i transportvann og gir bedre hygiene ved slakting. I tillegg reduseres fiskens oksygenbehov og fiskens stresstoleranse øker. Akseptabel sultetid avhenger av flere faktorer som størrelse, vekstperiode og vanntemperatur, men siden slakteklar laks generelt har mye fett (et stort energilager) kan den sultes ganske lenge uten at den utsettes for atferd- eller helsemessige problemer (Boziaris 2013; Oliveira 2011; Samuelsen & Kristiansen 2013).

### **3.4.2 Bedøvelse/avlivingsmetode**

I dagens lakseslakterier benyttes vanligvis elektrisk strøm eller slag mot hodet som bedøvelsesmetode. Dersom levendekjøling brukes er dette kun til å roe ned fisken og må kombineres med bedøvelse før bløgging av laksen (Prytz 2009). Før var det vanlig å benytte seg av CO<sub>2</sub> som bedøvelsesmetode. Dette er nå forbudt ettersom CO<sub>2</sub> øker stressnivået til laksen betydelig, noe som både er ugunstig dyrevelferdsmessig og fremskynder tiden til rigor inntreffer. Det har blitt observert at ved bruk av CO<sub>2</sub> som bedøvelsesmetode på atlantisk laks nådde fisken maks rigor etter 12 timer, mens ved bruk av elektrisitet eller slag tok det mellom 24-36 timer. Fisken som ble bedøvet med CO<sub>2</sub> hadde en gjennomsnittlig rigor-indeks på ca.75% etter kun 6 timer (Roth et al. 2002). Bruk av elektrisk strøm er en pålitelig og effektiv metode hvor laksen dør raskt dersom den bløgges rett etter bedøvelse. Ulempene med denne metoden er at den i likhet med CO<sub>2</sub> korter ned pre rigor tiden til fisken (med opp til 50%) og gir også en kraftigere maksstyrke på rigor. I tillegg er det en fare for at ryggsøylen til fisken knekker, som kan gi blødninger og blodflekker på muskel. Slag mot hodet har blitt ansett som best dyrevelferdsmessig dersom det utføres korrekt, gir lang pre rigor tid og få kvalitetsmessige problemer. Ulempen med maskinell slagbedøvelse er størrelsesvariasjonen på fisken, hvor fisk med ugunstig størrelse må sorteres ut på forhånd for å unngå at fisken blir feilbedøvet (FHL.no 2009; Midling et al. 2008). Ved sammenlikning av elektrisk bedøvelse og bedøvelse med slag har det blitt observert at laks bedøvet med el-bedøver gikk raskere inn i rigor enn laks som ble bedøvet med slag. Dette gjaldt både laks som hadde blitt bedøvet og bløgget direkte fra ventemerde, etter kun pumping og etter pumping og levendekjøling. Selv om bedøvelsesmetode gav en stor forskjell i pre rigor tid, var det likevel det som hadde minst å si for kvaliteten til fiskekjøttet i forhold til levendekjøling, pumping, fileteringsmetode (pre/post rigor) og prosessering med salting og røyking. Elektrisk bedøvelse er derfor likevel en aktuell metode å bruke i moderne slakterier, spesielt dersom fisken skal post rigor fileteres (Roth et al. 2002).

### 3.4.3 Nedkjøling- og lagringstemperatur etter slakt

Temperatur etter slakt er en viktig faktor som påvirker utviklingen av rigor mortis i fisken ettersom den kan varieres ved å endre kjølemetode. Det har blitt utført en del studier på hvordan ulike lagringstemperaturer påvirker rigorforløpet, med resultater som tyder på at forskjellige dyrearter blir svært ulikt påvirket av temperaturen etter slakt. For varmblodige dyr har det blitt observert en svakere rigor ved temperaturer på 10-20 grader under fysiologisk temperatur. Temperaturer lavere enn dette igjen vil gi en høyere grad av sammentrekning av muskelen som fører til en sterk rigor (Strasburg et al. 2008). Liknende resultater har blitt observert for fisk i subtropisk klima, hvor kjøling av muskel ved svært lave temperaturer fremskynder rigor og gir kraftigere muskelsammentrekning. For havkaruss (*Pagrus major*) ble det observert at ved oppbevaring av muskel ved 0°C inntraff rigor hurtigere enn ved oppbevaring ved 10°C. Samtidig var rigor raskere over ved oppbevaring ved den laveste temperaturen (Iwamoto 1985). Ved lagring av olive flounder (japansk flyndre, *Paralichthys olivaceus*) i temperaturer mellom 0-20°C ble det observert en saktere nedbrytning av ATP ved 5-15°C enn ved 0°C, som resulterte i en lengre pre rigor tid. Muskelsammentrekningen var også sterkere ved 0°C (Iwamoto et al. 1987). Videre forskning har vist at for fisk som karpe (*Cyprinus carpio*) som lever i både temperert og subtropisk klima og er vant til store variasjoner i vanntemperatur vil Mg<sup>2+</sup> ATP-ase aktiviteten i myofibrillene endres ettersom fisken akklimatiserer seg til en endret vanntemperatur. Dersom denne fisken blir lagret ved 0°C etter slakt kan rigor inntreffe tidligere, ved at det sarkoplasmatiske retikulum ikke tar opp like mye Ca<sup>2+</sup> som ved varmere temperaturer. Dette fører igjen til aktivering av Mg<sup>2+</sup> ATP-ase som øker nedbrytningen av ATP og gir en raskere rigorutvikling. Ved muskelanalyser av havkaruss og olive flounder lagret ved forskjellige temperaturer ble liknede resultater observert for også disse fiskeartene. Mg<sup>2+</sup> ATP-ase aktiviteten økte ved høyere temperaturer og Ca<sup>2+</sup> opptaket sank. Forløpet til rigor mortis korrelerte bra med Mg<sup>2+</sup> ATP-ase aktiviteten. Disse resultatene indikerer derfor at rigor inntreffer raskere ved lave temperaturer på grunn av høyere Ca<sup>2+</sup> konsentrasjon i muskelen (Watabe et al. 1989; Watabe et al. 1990). I en ny studie med de samme to fiskeartene, akklimatisert til en vanntemperatur på 25°C, gikk utviklingen av rigor raskere ved lavere lagringstemperatur i området 10-3°C samtidig som muskelsammentrekningene var sterkere. Ved lagringstemperaturer i temperaturområdet 25-12°C ble derimot rigor utsatt ved lavere temperaturer. Disse observasjonene ble konkludert med at ved under 10°C vil "kald rigor mortis" inntre, som da er raskere og kraftigere enn normal rigor (Lee et al. 1998). For karpe har det også blitt observert at dersom forskjellen mellom temperaturen til vannet fisken lever i og lagringstemperatur etter slakt er stor vil rigor inntreffe raskere enn dersom forskjellen mellom vann- og lagringstemperatur er liten. Under



lagringsperioden ble det observert en raskere nedgang av ATP- og glykogennivå i fisken som var akklimatisert til høye vanntemperaturer enn i fisken som var akklimatisert til lave vanntemperaturer (Abe & Okuma 1991).

For fisk som lever i et temperert klima er det generelt akseptert at lagring av fisken ved lavere temperaturer ned mot 0°C utsetter utviklingen av rigor. For trålt torsk lagret ved 2.8°C vil det for eksempel ta omtrent 60 timer for fisken har gått gjennom rigor, mens ved lagring ved 30.5°C tar det kun 1.5-2 timer (Stroud 2001). Det har også blitt observert at fileter produsert pre rigor av torsk hadde sterkere og raskere muskelsammentrekning ved oppbevaring ved 7°C enn ved 0°C ved måling i 48 timer etter slakt (Aune et al. 2014). (Kiessling et al. 2006) undersøkte hvilken effekt ulike temperaturer før og etter slakt har på utvikling av rigor i atlantisk laks. 4 forskjellige metoder til å måle rigor ble brukt; isometric tension målt i muskelstrimler av en Rigortech kjøttanalysator (IT, Newton), sammentrekning av hel muskel (WFC, whole filet contraction, %), forskjell i muskelhardhet ( $H$ , Newton) og beregning av rigor-indeks (%). Fisken ble kjølt ned ved bruk av 5 ulike metoder:

- 1) Fisk akklimatisert til 4°C (i 10 dager), ingen levendekjøling, lagret ved 4°C etter slakt
- 2) Fisk akklimatisert til 12°C, ingen levendekjøling, lagret ved 4°C etter slakt
- 3) Fisk akklimatisert til 12°C, ingen levendekjøling, lagret ved 12°C etter slakt
- 4) Fisk akklimatisert til 12°C, ingen levendekjøling, lagret ved 20°C etter slakt
- 5) Fisk akklimatisert til 12°C, levendekjølt ved 4°C i to timer, lagret ved 4°C etter slakt

Maksverdi av IT,  $H$  og rigor-indeks sank som en respons på høyere lagringstemperatur, mens WFC økte. Ved måling av IT,  $H$  og rigor-indeks måles muskelens spenning, hardhet og stivhet. Dette er den isometriske kontraksjonen til muskelen, der lengden er konstant mens spenningen i muskelen øker. Grunnen til at maksstyrken til rigor sank ved økende lagringstemperaturer ved disse metodene kan være på grunn av den proteolytiske aktiviteten til enzymer som reduserer bruddgrensen til bindevevet mellom muskelfibrene og myocommata, og ikke en direkte effekt av endret actin-myosin interaksjon i actomyosinkomplekset. Den proteolytiske aktiviteten vil kunne øke ved høyere lagringstemperaturer. Ved måling av WHC måles den isotoniske kontraksjonen i muskelen, hvor muskelen forkortes under konstant belastning. Denne type muskelkontrasjon kan øke ved høyere temperaturer, muligens fordi de høye temperaturene tillater muskelkontraksjon før degenerering av muskelen ved proteolyse. Denne observasjonen stemmer også overens med målingene av forkortning i torskefiletene analysert av (Aune et al. 2014). (Kiessling et al. 2006) observert også at rigorforløpet alltid ble utsatt ved lavere lagringstemperaturer for alle analysemetodene. Under måling av IT ble for eksempel maks rigor observert etter ca. 8,3

timer for fisken lagret ved 12 og 20°C, mens fisken lagret ved 4°C nådde maks rigor etter ca. 20 timer. Det var en variasjon i målt pre rigor tid mellom de forskjellige analysemetodene, som indikerer at disse ikke er fullstendig sammenliknbare. Effekten av temperatur før slakt viste seg å være mer kompleks i dette forsøket, da fisken som ble levendekjølt gikk raskest i rigor. En teori var at dette var på grunn av økt stressnivå i fisken ettersom den akklimaliserte seg til den nye vanntemperaturen (Kiessling et al. 2006; Taylor et al. 2002). Lignende resultater har blitt observert for kongelaks, lagret i RSW på 0-12°C etter slakt. Rigor til fisken ble målt av muskelstrimler ved å overvåke forkortning av strimlene med et videokamera (*time-lapse video rigorometry*). Temperaturavhengigheten til rigor for både fisk som var avslappet og delvis utslitt ved slakt ble undersøkt; muskelen som skulle være fra delvis utslitt fisk ble ”aktivert” ved å føre elektrisk strøm gjennom den post mortem for å simulere langvarig stress i fisken. Resultatene viste at rigor ble utsatt ved synkende lagringstemperaturer for muskelstrimlene som var i avslappet tilstand. Muskelstrimlene som ble aktivert med elektrisk strøm hadde derimot tilnærmet lik pre rigor tid ved de ulike lagringstemperaturene. Denne pre rigor tiden var vesentlig kortere enn for den avslappede fisken. Disse resultatene indikerer at en lagringstemperatur på 0°C etter slakt ikke kan gi samme utsettelse av rigor som slakting av fisk i avslappet tilstand, men dersom fisken blir slaktet i avslappet tilstand vil lave lagringstemperaturer kunne gi en lengre pre rigor tid (Jerrett et al. 1998).

## 4. Kuldebad

Et kuldebad er en flytende blanding som benyttes for å opprettholde lave temperaturer. Et kuldebad kan bestå av en eller to komponenter som flytende nitrogen eller en blanding av vann og is, men vanligvis er et kuldebad en betegnelse på en blanding av tre komponenter: et kjølemiddel, en flytende væske (løsemiddel) og en tilsetning av et stoff som senker frysepunktet til systemet. Som tilsetning kan forskjellige oppløselige stoffer som salter eller sukker brukes. Et eksempel på et kuldebad er vann, is og NaCl. NaCl vil senke frysepunktet til badet fordi saltpartiklene forstyrrer dannelsen av organiserte strukturer av væskemolekylene. Formasjon av disse strukturene er nødvendig for å få væsken til å gå over til en solid fase, og denne faseovergangen er betegnelsen på at væsken fryser (Stoker 2011). Frysepunktnedsettelsen i et kuldebad er en kolligativ egenskap, den bestemmes av mengde oppløselig stoff som tilsettes, og kan for løsninger av svak konsentrasjon beregnes ved bruk av Blagden's lov:

$$\Delta T_f = K_f * C_m * i$$

Hvor  $K_f$  er den kryoskopiske konstanten som kun bestemmes av løsemiddelet,  $C_m$  er den molare konsentrasjonen til løsningen og  $i$  er Van't Hoff's faktor. Van't Hoff's faktor angir antall partikler stoffet som tilsettes væsken løser seg opp i etter tilsetning. Elektrolytter som ioniseres i løsemiddelet vil ofte gi en høyere frysepunktnedsettelse enn ikke-elektrolytiske stoffer siden de deler seg opp i flere partikler pr. molekyl av det opprinnelige stoffet. For eksempel vil NaCl molekyler i vann løse seg opp til  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  ioner, som gir  $i=2$ . Andre stoffer vil kunne aggregere i løsemiddelet, og dermed gi en Van't Hoff's faktor på under 1 og en mindre frysepunktnedsettelse. Van't Hoff's faktor varierer ikke bare med stoffet som løses, men også med løsemiddelet og konsentrasjonen til løsningen. Blagden's lov behandler løsningen som en ideell løsning, det vil si at entalpien til løsningen,  $\Delta H_{\text{løsning}} = 0$  (Dayley & Larson 2008; Ebbing & Gammon 2010; Helmenstine 2014).

Sjøvann har en gjennomsnittlig saltprosent på 3.5% (Kennish 2001). Ved å benytte seg av likningen over kan frysetemperaturen beregnes. For vann er  $K_f = 1.853 \text{ }^\circ\text{C} / \text{mol}$ . NaCl har en molar masse på 58g/mol og en liter sjøvann inneholder 35 g salt:

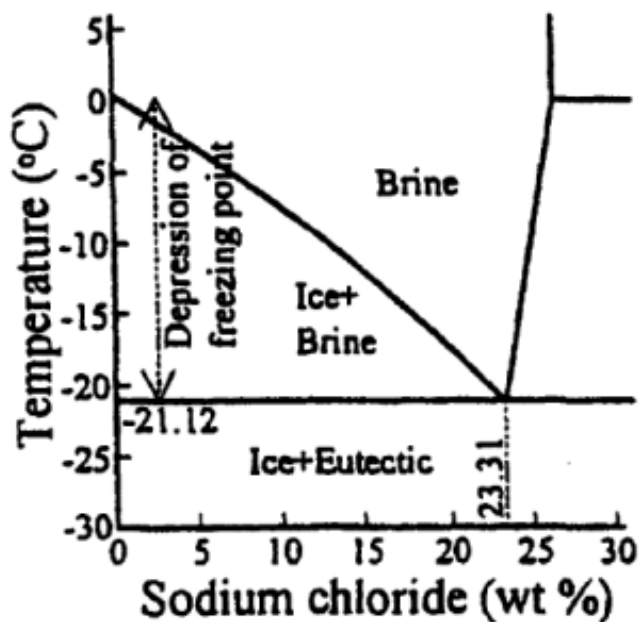
$$C_m = \frac{m}{M}$$

$$C_m = \frac{35 \text{ g}}{58 \text{ g/mol}} = 0.6 \text{ mol}$$

$$\Delta T_f = -1.853 \text{ }^\circ\text{C} / \text{mol} * 0.6 \text{ mol} * 2 = -2.2^\circ\text{C}$$

Beregnet frysepunktnedsettelse til sjøvann ligger på  $-2.2^{\circ}\text{C}$ .

Denne beregningen har blitt gjort ut ifra at saltet i sjøvann kun består av like mengder natrium og klor, men det finnes også andre ioner i vannet som har en effekt på frysepunktet. I realiteten har derfor sjøvann et frysepunkt på ca.  $-1.922^{\circ}\text{C}$  ved en saltkonsentrasjon på 3,5% (Kennish 2001). Økning av saltkonsentrasjon vil gi større senkning i frysetemperatur. En oversikt over hvordan frysetemperatur til vann varierer med NaCl konsentrasjon er gitt i figur 2.



Figur 2 Senkning av frysetempetemperatur ( $^{\circ}\text{C}$ ) som resultat av økende NaCl konsentrasjoner (%) (McArthur & Spalding 2004)

Maks senkning av frysetemperatur i et slikt kuldebad er ca.  $-21^{\circ}\text{C}$ , hvor badet har nådd det eutektiske punktet, det har blitt mettet av salt og dersom mer salt tilsettes vil det ikke kunne løse seg opp (Bodnar 1992). Ut ifra figuren over kan man se at dette skjer ved en saltkonsentrasjon på 23.31%. Både CSW og slush is er eksempler på kuldebad som brukes til kjøling av fisk, og begge systemene baserer seg på sjøvann eller en blanding av vann og salt og knust is. For å oppnå liknende effekt som disse vannsystemene og temperaturer på under  $0^{\circ}\text{C}$  ble kuldebad bestående av vann, salt og is benyttet til nedkjøling i de første forsøkene i den eksperimentelle delen av denne oppgaven.

## **5. Forsøk 1: Bruk av kuldebad ved 0, -2 og -4°C til å kjøle ned røye etter slakt**

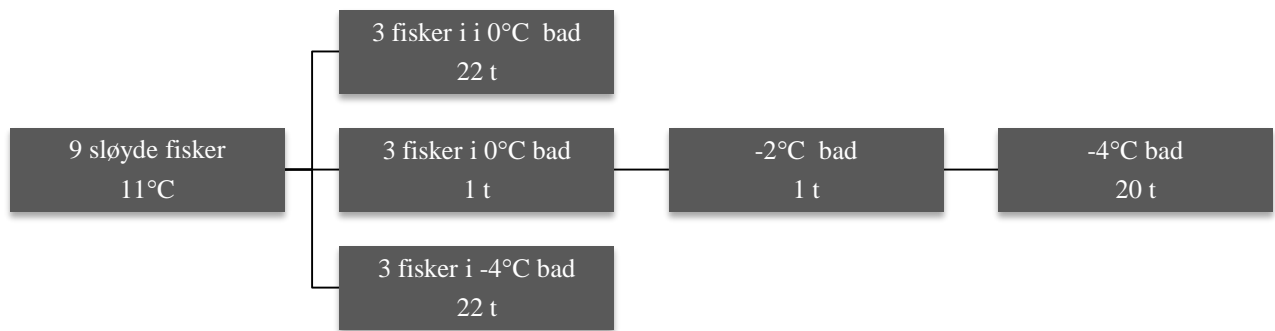
### **5.1 Innledning**

Dette forsøket hadde som hensikt å undersøke hvordan lagring av nysløyd fisk ved temperaturer på 0 og -4°C påvirker tiden til rigor mortis inntreffer, og om det utgjør en forskjell dersom temperaturen senkes gradvis sammenliknet med direkte overføring av fisken til -4°C. For å oppnå lave nok temperaturer ble kuldebad av vann og is med forskjellige konsentrasjoner av salt benyttet som kjølesystemer. Forsøket hadde også som hensikt å se om det var mulig å holde slike kuldebad ved riktig temperatur gjennom forsøket, eller om det ville være nødvendig å endre forsøksoppsettet for å få gode nok temperaturbetingelser. I tillegg skulle det undersøkes hvordan de ulike nedkjølingsmetodene påvirker kjernetemperaturen og vekten til fisken.

### **5.2 Materialer og metoder**

Forsøket ble utført 11. november på fiskeanlegget ved NMBU. Tre kar fylt med 10 liter vann ble brukt som utgangspunkt til kuldebadene. Kuldebadene skulle holde 0, -2 og -4°C. For å oppnå dette ble det tatt utgangspunkt i at et kuldebad med lik salinitet som sjøvann inneholder 3.5% salt og har et frysepunkt på -1.922°C. Kuldebadet som skulle ned til -2°C ble derfor tilsatt 4% salt, og badet som skulle ned til -4°C ble tilsatt 8% salt. Saltet som ble benyttet var Jozo havsalt. Deretter ble det tilsatt knust is i alle karene og rørt godt med en rørepinne. Rett før starten av forsøket ble det kontrollert at badene holdt riktig temperatur.

Forsøket ble utført på ni røyer, klekket i uke 8 2013 og med opphav fra Tydalsfisk AS. Røyen ble tatt fra et basseng som holdt 11°C. Etter sløyning ble fiskene veid, delt inn i tre grupper og kjølt ned som beskrevet i figur 3.



**Figur 3 Beskrivelse av forsøksoppsettet.**

For å kunne se forskjell mellom fiskene som skulle ligge i samme bad ble de merket med plastbånd med ulike farger rundt haleroten.

Fiskene lå i badene i totalt 22 timer, hvor følgene ble målt:

Grad av rigor etter 2, 4, 7, 10 og 22 timer. Dette ble gjort ved å gi hver fisk en rigor score fra 1-5, hvor 1 tilsvarer ingen grad av rigor og 5 tilsvarer høyest grad av rigor.

Kjernetemperatur til en av fiskene i hvert bad etter 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 7, 10 og 22 timer.

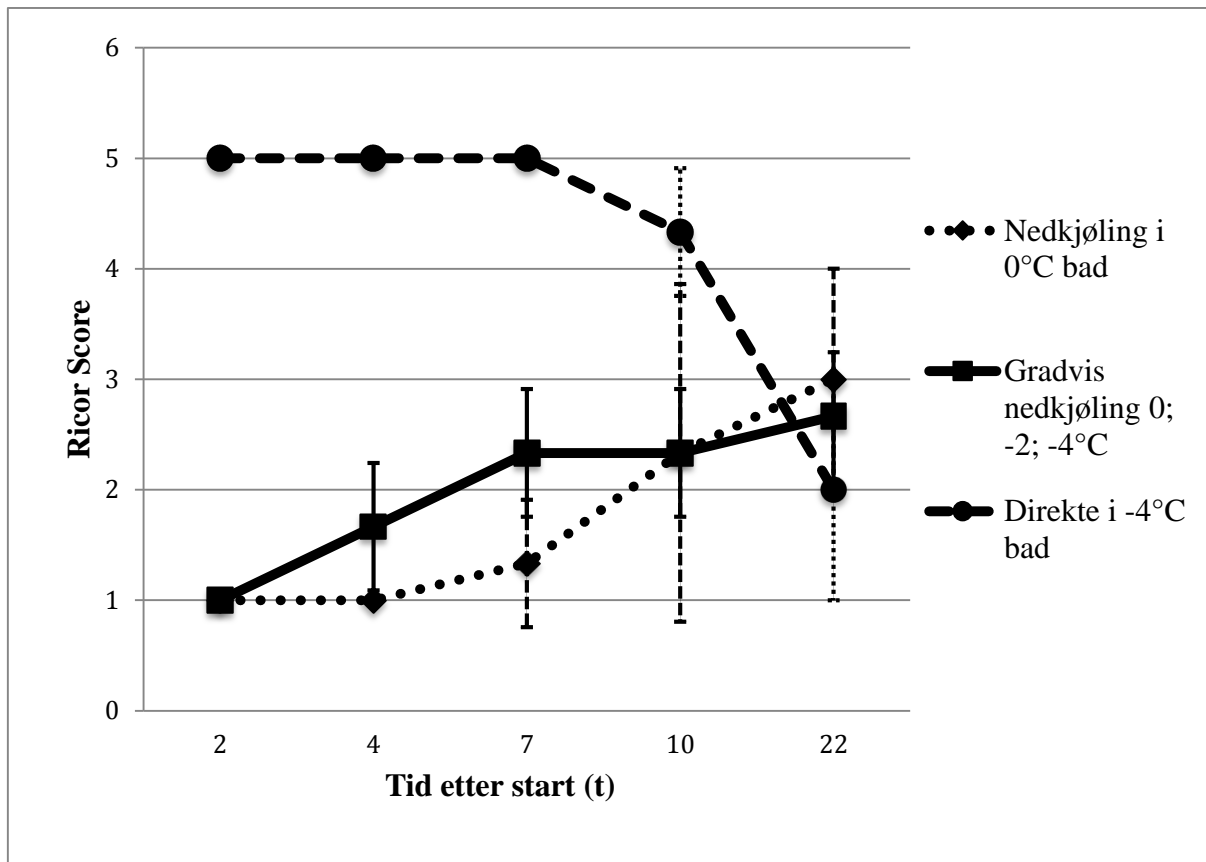
Temperaturen ble målt med et digitalt termometer (TENMA, modell 72-7715) ved å stikke temperatursensoren under ryggsøylen ved brystfinnen til fiskene. Samtidig ble vanntemperaturen i badene målt med samme termometer. Dette ble gjort ved å holde temperatursensoren vertikalt i vannet. Det ble rørt i badene rett før målingene ble utført.

Knust is ble ofte tilsatt slik at det alltid var litt is i badene. Salt ble også tilsatt etter de fleste temperaturmålingene i badene med  $-2^{\circ}\text{C}$  og  $-4^{\circ}\text{C}$  for å veie opp for utvanningen av saltkonsentrasjonene.

Fiskenes vekt ble notert ved start, etter to timer og ved forsøkets slutt. Veiing av både fisk og salt ble gjort med en bordvekt (Sartorius AG, Goettingen, Tyskland).

### 5.3 Resultater

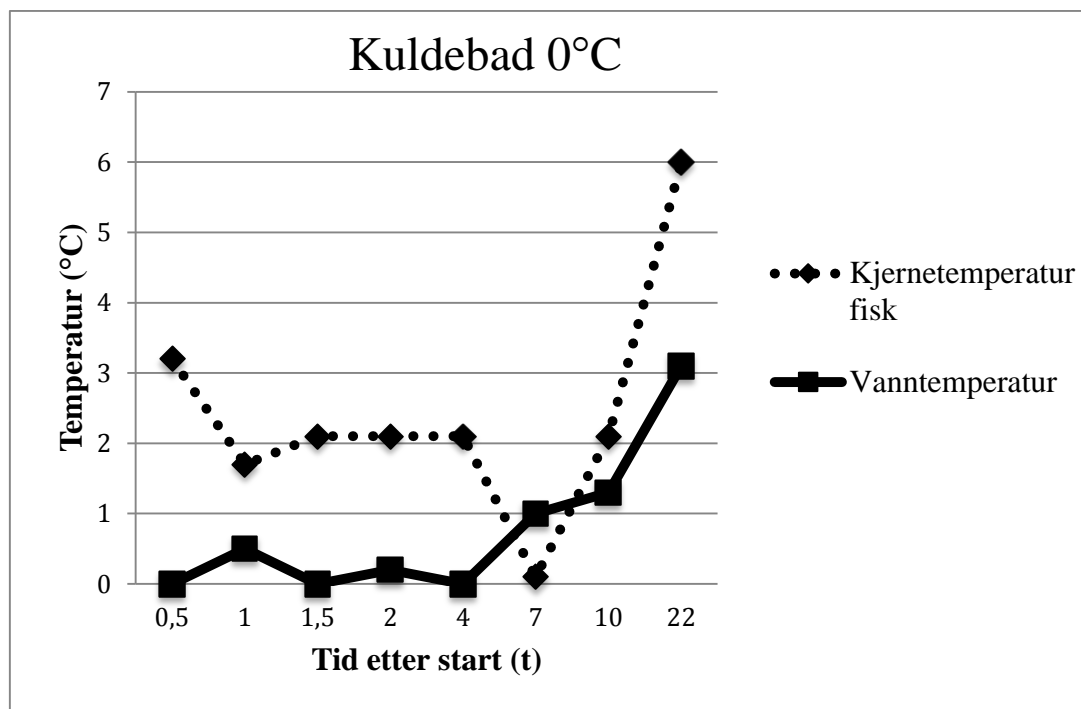
Figur 4 viser resultatet av rigor målingene i forsøket.



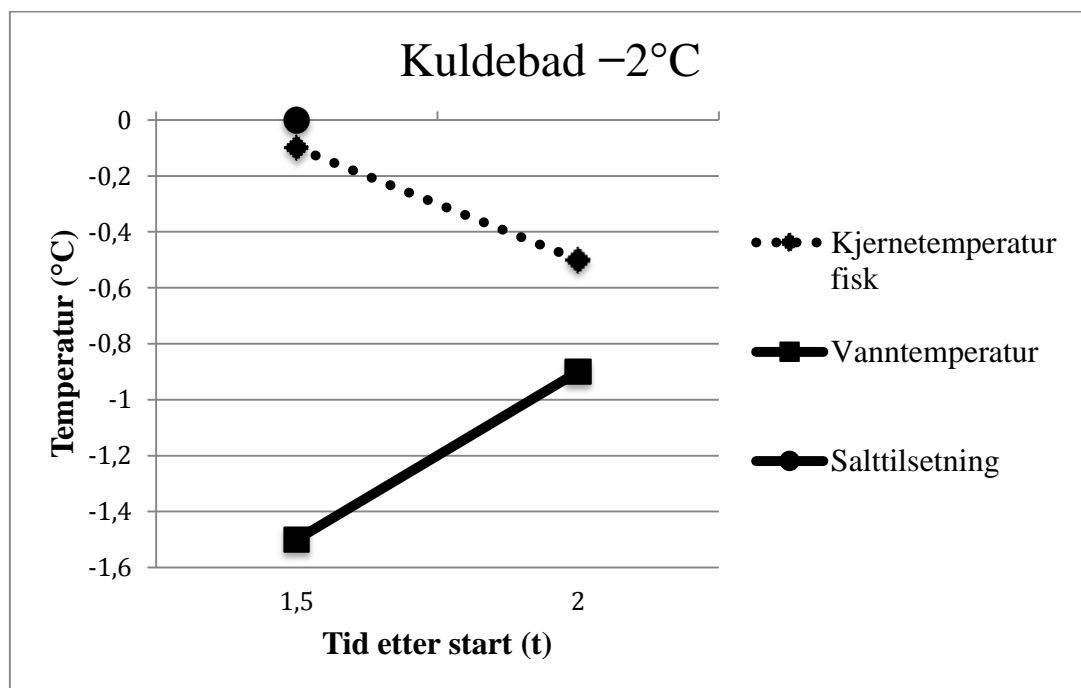
Figur 4 Gjennomsnittlig rigor score for hver av de tre nedkjølingsmetodene med tilhørende standardavvik. Gjennomsnittsverdier er beregnet ut ifra data i vedlegg 1.

Styrke av rigor varierte ved de ulike nedkjølingsmetodene. Fiskene som ble plassert direkte i  $-4^{\circ}\text{C}$  badet fryste raskt og ble derfor gitt høyest rigor score fra den første målingen. For fiskene som ble gradvis nedkjølt og fiskene i  $0^{\circ}\text{C}$  badet ble det observert en økende grad av rigor for hver måling. Fiskene som ble gradvis nedkjølt hadde en litt bråere stigning i rigor score enn fiskene i  $0^{\circ}\text{C}$  badet. Ut ifra standardavvikene kan man se at det var litt variasjon mellom fiskene som ble kjølt ned ved bruk av samme metode.

Temperaturene målt i fisk og kuldebad er presentert i figur 5, 6 og 7. Eventuell salttilsetning i badene er også fremstilt i figurene.

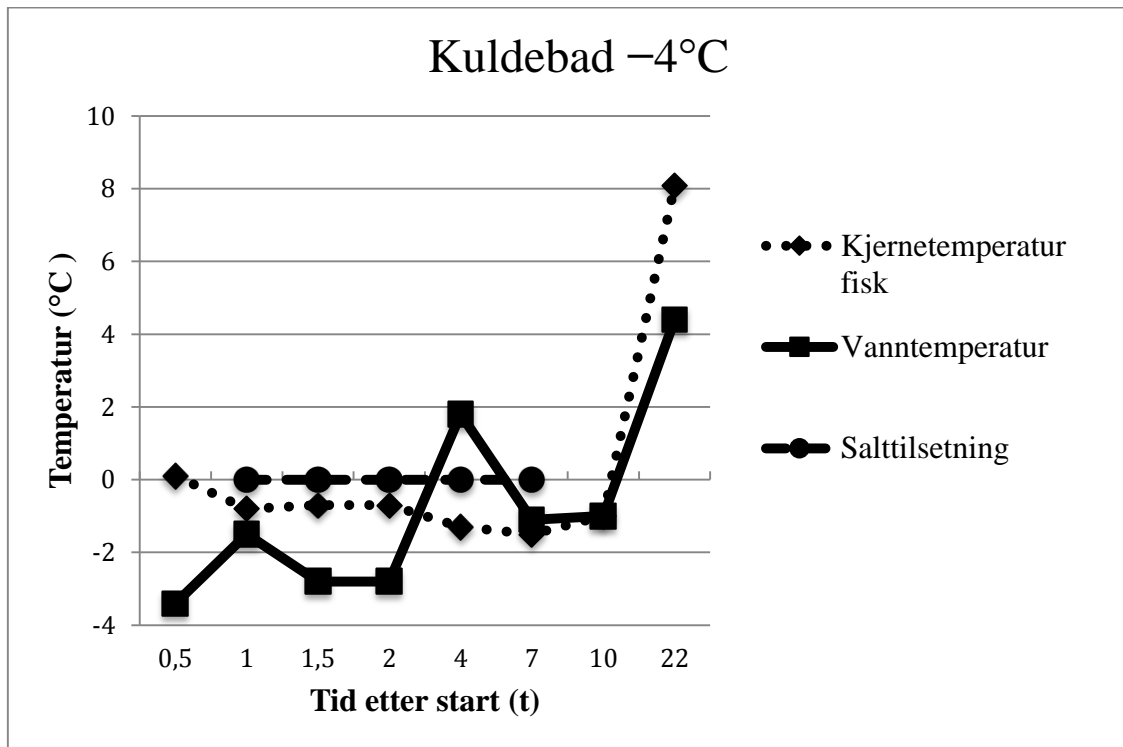


Figur 5 Målt vanntemperatur og kjernetemperatur til fisk i kuldebadet som skulle holde 0°C. Etter 22 timer var vanntemperaturen 5,7°C i bunnen av badet og 0,5°C øverst i badet. Gjennomsnittstemperaturen ved dette tidspunktet er presentert i tabellen.



Figur 6 Målt vanntemperatur og kjernetemperatur til fisk i kuldebadet som skulle holde -2°C. Etter 1,5 timer ble 50 g salt tilsatt.





**Figur 7** Målt vanntemperatur og kjernetemperatur til fisk i kuldebadet som skulle holde  $-4^{\circ}\text{C}$ . Etter 1, 2, 4, 7 og 10 timer ble henholdsvis 150, 50, 100, 200 og 300 g salt tilsatt. Etter 22 timer var vanntemperaturen  $9.9^{\circ}\text{C}$  i bunnen av badet og  $-1.1^{\circ}\text{C}$  øverst i badet. Gjennomsnittstemperaturen ved dette tidspunktet er presentert i figuren.

Temperaturen steg raskt i badene som skulle holde  $-2$  og  $-4^{\circ}\text{C}$  selv om det ble tilsatt mer is og salt. Etter 22 timer ble temperaturen både øverst og i bunnen av badene målt, ettersom det var store temperaturforskjeller mellom de øverste og nederste vannlagene. I badene som skulle holde 0 og  $-2^{\circ}\text{C}$  varierte kjernetemperaturen til fisken ettersom vanntemperaturen endret seg. I badet som skulle holde  $-4^{\circ}\text{C}$  holdt kjernetemperaturen i fisken seg ganske konstant på ca.  $-1.5^{\circ}\text{C}$ . Ved temperaturmåling etter 22 timer hadde både temperaturen til vannet og fisken steget betraktelig.

I løpet av forsøket ble fiskene veid tre ganger. Tabell 1 viser gjennomsnittlig vektøkning (%) til fiskene som ble kjølt ned ved bruk av de ulike metodene 2 og 22 timer etter starten av forsøket.

**Tabell 1 Gjennomsnittlig vektøkning i % til fiskene ved de forskjellige nedkjølingsmetodene etter 2 timer og ved slutten til forsøket, med tilhørende standardavvik. Verdier er beregnet ut ifra data i vedlegg 2.**

	Vektøkning 2 t	Vektøkning 22 t
Nedkjøling i 0°C bad	6.8	9.6
Standardavvik	4.3	5.5
Gradvis nedkjøling 0;-2;-4°C	0.4	8.6
Standardavvik	0.4	4.2
Direkte i -4°C bad	6.6	15
Standardavvik	0.7	4.7

Vekten til fiskene økte ettersom de hadde tilbrakt mer tid i kuldebadene. Fiskene som ble nedkjølt ved 0°C og direkte i -4°C hadde økt mer i vekt enn fiskene som ble gradvis nedkjølt etter to timer. Ved slutten av forsøket hadde fiskene som ble lagt direkte i -4°C badet økt mest i vekt. Etter 22 timer var det stor variasjon i vektøkning mellom fiskene som ble kjølt ned ved bruk av samme metode. For fiskene som ble kjølt ned i 0°C badet var det også stor variasjon etter 2 timer.

## 5.4 Diskusjon

Fra figur 4 kan man observere at fiskene hadde generelt lav rigor score under hele forsøket, dersom man ser bort ifra fiskene i -4°C badet. Disse fiskene ble gitt høyest rigor score fra første måling, men dette var fordi de hadde fryst og ikke på fordi de faktisk var i rigor. Fra målingene kan man anta at rigor enten nådde maks styrke i tidsrommet mellom 10-22 timer eller at maks styrke ennå ikke var nådd ved forsøkets slutt. (Wang et al. 1998) observerte at rigor i atlantisk laks nådde en maks styrke etter ca. 25 timer og var ikke over før etter 60-70 timer. Ut ifra dette kan man anta at fiskene fortsatt var på vei inn i rigor 22 timer etter start, men for å vite dette sikkert bør målinger i tidsrommet 10-22 timer også utføres.

Det ble observert at rigor inntraff raskere for fiskene som ble gradvis kjølt ned enn for fiskene i 0°C badet, som tyder på at rigorutviklingen har en temperaturavhengighet som det kan være interessant å se mer på. Fra temperaturmålingene gjort underveis i forsøket kan man se at forsøksbetingelsene ikke var tilfredsstillende for å opprettholde ønsket vanntemperatur. Temperaturene som ble målt i kuldebadene varierte på det meste med 1.9°C mellom to

målinger ( $-4^{\circ}\text{C}$  badet, figur 7), og var for høye gjennom hele forsøket. De store temperaturvariasjonene gjør at resultatene fra dette forsøket ikke er gode nok til å trekke noen konklusjoner for temperaturavhengigheten til rigor ved temperaturer under  $0^{\circ}\text{C}$ . En viktig observasjon er at ved direkte overføring av sløyd fisk til  $-4^{\circ}\text{C}$  vil fisken fryse som betyr at dette ikke en aktuell nedkjølingsmetode ved produksjon av fersk fisk. Fiskene som ble gradvis nedkjølt fryste derimot ikke, men da disse fiskene ble overført fra kuldebadet med  $-2^{\circ}\text{C}$  til badet som skulle holde  $-4^{\circ}\text{C}$  var temperaturen i dette badet  $-2.3^{\circ}\text{C}$ . Dette betyr at det må utføres et nytt forsøk med korrekte temperaturer før et ordentlig resultat kan diskuteres.

Grunnen til at temperaturen i badene steg var hovedsakelig fordi is ble tilsatt uten å tilsette tilstrekkelig mengde salt for å opprettholde saliniteten i kuldebadene, som resulterte i en fortynning av saltkonsentrasjonen. I tillegg var det vanskelig å røre ut det saltet som ble tilsatt ettersom fisken opptok en stor del av badet. Temperaturforskjellene mellom vannet øverst og nederst i karet kan forklares med at isen flyter på grunn av sin lave tetthet og vil derfor kun kjøle ned det øverste laget av vannet. Vann med høyere temperaturer har høyere tetthet og vil legge seg på bunnen av karet (Kotz et al. 2006). I tillegg vil fiskene, som ligger i bunnen av badet, gi fra seg varme. Dette skjer spesielt i starten av nedkjølingen ettersom fiskene har en kjernetemperatur som er ca. en grad lavere enn det vannet de ble hentet fra når de plasseres i kuldebadet (Schmidt-Nielsen 1997). Kuldebadene stod i litt under normal romtemperatur (ca.  $18^{\circ}\text{C}$ ), som betyr at temperaturforskjellen mellom vannet og omgivelsene var relativt stor. Dette skaper en temperaturgradient mellom vannet og omgivelsene, som fører til at energi i form av varme vil overføres fra omgivelsene til vannet for å utligne denne gradienten. Hastigheten til varmeoverføringen vil øke ettersom temperaturforskjellen øker (Sonntag & Borgnakke 2007). Dersom kuldebadene hadde stått plassert på et kjøligere sted ville ikke varmeoverføringen skjedd like raskt og det ville sannsynligvis vært enklere å holde en konstant lav temperatur i badet. Det ville også vært et mindre behov for påfylling av is og salt.

Temperaturmålingene viste at kjernetemperaturen til fiskene i  $0^{\circ}\text{C}$  badet varierte gjennom forsøket mens fiskene i  $-4^{\circ}\text{C}$  badet holdt en ganske jevn temperatur på rundt  $-1^{\circ}\text{C}$  selv om vanntemperaturen steg og sank. Ettersom fiskene i  $-4^{\circ}\text{C}$  badet var frosne vil de kunne holde på den lave temperaturen til de tiner igjen. Siden isen som dannes i fiskene består av rent vann, ikke saltvann, vil temperaturer på over  $0^{\circ}\text{C}$  grader kreves for at fiskene tines når de først har fryst. I tillegg vil tiningen skje saktere enn nedfrysingen, på grunn av den lavere

termiske konduktiviteten (Jensen et al. 2004). På grunn av den store temperaturforskjellen mellom den øverste delen og bunnen av badene og siden fiskene lå oppå hverandre kan man anta at de ble utsatt for forskjellige vanntemperaturer, spesielt i badet med  $-4^{\circ}\text{C}$  hvor det lå seks fisker den siste delen av forsøket. Dette kan forklare hvorfor det ble observert ulik grad av rigor mellom fiskene som ble kjølt ned ved bruk av samme metode. Temperaturen til kun en fisk i hvert kuldebad ble målt og det var det ikke samme fisk temperaturen ble målt i ved hver måling. Dette gir usikre resultater både siden nedkjølingstemperaturen varierte etter hvor fisken lå i badet og på grunn av varierende størrelse på fiskene, ettersom mindre fisker vil bli raskere nedkjølt enn større fisker. Variasjonen i kjernetemperatur som ikke følger utviklingen til vanntemperaturen kan være et resultat av dette, som for eksempel i  $0^{\circ}\text{C}$  badet etter 7 timer hvor vanntemperaturen hadde steget til  $1^{\circ}\text{C}$  mens kjernetemperaturen til fisken sank fra  $2.1$  til  $0.1^{\circ}\text{C}$  (figur 5).

Vekten til fiskene økte som forventet gjennom forsøket, ettersom de tok til seg vann fra vannbadet. (Bronstein et al.1985) observerte at ved oppbevaring av kongelaks ved  $0^{\circ}\text{C}$  i 7 dager i RSW, fortynnet RSW og kjølt ferskvann (*refrigerated fresh water*, RFW), var det fiskene som lå i badet uten salt (RFW) som økte mest i vekt, og det var liten forskjell på fiskene i de to badene med forskjellig saltkonsentrasjon (RSW og  $1/3$  RSW). Dette stemmer ikke overens med resultatene i dette forsøket, ettersom det var fiskene som lå i badet med høyest saltkonsentrasjon som tok til seg mest vann. Ettersom forsøket til (Bronstein et al.1985) varte i flere dager og ikke kun i noen timer så det er mulig at vekten til fiskene ville utviklet seg annerledes dersom forsøket hadde pågått over lengre tid. I tillegg ble ikke bad på  $-4^{\circ}\text{C}$  og  $-2^{\circ}\text{C}$  benyttet i (Bronstein et al.1985) sitt forsøk, kun vannsystemer ved  $0^{\circ}\text{C}$ , som betyr at det er mulig at temperaturen har en effekt på vannopptaket. Ved lagring av pukellaks ved  $-0.55$ ,  $1.11$  og  $2.78^{\circ}\text{C}$  har det blitt observert at fiskene tok til seg mer vann ettersom temperaturen sank (Crapo & Elliot 1987). Dette stemmer bedre overens med det som ble observert i dette forsøket. Generelt var vektøkningen i dette forsøket svært mye høyere enn den observert av både (Bronstein et al.1985) og (Crapo & Elliot 1987), hvor maks økning var 5-6% etter flere dager. Fra standardavviket til målingene kan det også observeres at det var en stor variasjon i vektøkning mellom fiskene, spesielt for fiskene som ble kjølt ved  $0^{\circ}\text{C}$ . Dette indikerer at det kan være flere faktorer enn nedkjølingsmetode som påvirker vannopptaket. Fisk av ulik størrelse ble benyttet i forsøket, som betyr at de hadde forskjellig vevsoppbygning og dette vil kunne påvirke fiskens evne til å ta til seg vann. Ut ifra vedlegg 2 kan man se at den største fisken i hver av nedkjølingsmetodene alltid økte minst i vekt. Dette

tyder på at de mindre fiskene tar til seg mer vann. Vektøkning kan være positivt med tanke på at man får høyere utbytte av fisken, men (Bronstein et al. 1985) observerte at ved overføring av fiskene som ble lagret i vannsystemene til kjøling på is vil fiskene miste den vannvekten de har tatt til seg og mer til, slik at fiskene totalt går ned i vekt under lagring. Fiskene gikk mest ned i vekt ved lagring i RFW og i minst ved lagring i RSW. Det er godt mulig at det samme hadde skjedd med røyen i dette forsøket, så det er ikke sikkert at vannsystemer er fordelaktig å bruke med hensyn på vekten til fisken, i hvert fall ikke over lengre tid.

Ut ifra observasjonene diskutert over ble det laget en liste over mulige forbedringer som kan gjøre at kuldebadene holder riktig og konstant temperatur i videre forsøk:

- Det bør utvikles en metode for å få kontinuerlig sirkulasjon av vannet i kuldebadet.
- Mengde is som blir tilsatt må veies for å kunne tilsette riktig mengde salt sammen med isen slik at saltkonsentrasjon ikke fortynnes.
- Kuldebadet bør plasseres på et kjøligere sted.

Dersom man skal få et bedre bilde av hvordan de ulike nedkjølingsmetodene påvirker kjernetemperaturen til fiskene og sørge for at de blir utsatt for like nedkjølingsbetingelser kan følgende gjøres:

- Temperaturen til alle fiskene bør måles, ikke bare en fra hvert kuldebad.
- Fiskene bør ligge i et lag i kuldebadet istedenfor oppå hverandre.
- Fiskene som benyttes bør ha av jevn størrelse.

Dette forsøket konkluderes med at man ikke har fått svar temperaturavhengigheten til rigor fordi det ikke var mulig å opprettholde riktig temperatur på kuldebadene. Likevel var det mulig å se at det var en forskjell i hvordan rigor utviklet seg mellom fisk som ble kjølt ned ved bruk av de ulike nedkjølingsmetodene. For å kunne undersøke dette nærmere må det først utvikles en metode for å holde kuldebadene ved ønsket temperatur.

## **6. Forsøk 2: Kuldebad med sirkulasjon fra luftbobling**

### **6.1 Innledning**

Forsøk 1 ble konkludert med at før flere forsøk med fisk kan utføres må det utvikles en metode for å holde kuldebadene ved riktig temperatur over lengre tid samt å sørge for at temperaturen er jevn i hele badet. Med utgangspunkt i et kuldebad som beskrevet i forsøk 1 vil temperaturen kunne holdes nede ved at riktig mengde salt i forhold til knust is, slik at saltkonsentrasjonen i badet ikke blir fortynnet etterhvert som isen smelter. Ved å skape en sirkulasjon av vannet vil temperaturen kunne holdes jevn i hele badet ettersom det kalde vannet som legger seg mot bunnen av badet vil blande seg med det varmere vannet øverst i badet. Målet med dette forsøket var å undersøke om disse mulige forbedringene kan sikre tilfredsstillende temperatur i et kuldebad som skal holde  $-4^{\circ}\text{C}$ , ettersom dette var den ønskede temperaturen på det kuldebadet som utgjorde størst utfordring i forsøk 1. Dersom man får til dette vil det sannsynligvis også være mulig å få bad med høyere temperaturer til å holdes konstant ved bruk av samme metode.

### **6.2 Materialer og metoder**

Dette forsøket ble utført 24. november på fiskeanlegget ved NMBU. Det ble brukt to kar med 8 liter vann som utgangspunkt for kuldebadene. 2 kg knust is og 800 g salt (Jozo havsalt) ble tilsatt begge badene for å få et saltinnhold på 8%. Badene ble deretter plassert på et rom med en lufttemperatur på ca.  $15^{\circ}\text{C}$ . Luftbobling via en slange koblet til en pumpe ble plassert i et av badene, for å undersøke om dette er en brukbar metode til å skape sirkulasjon av vannet.

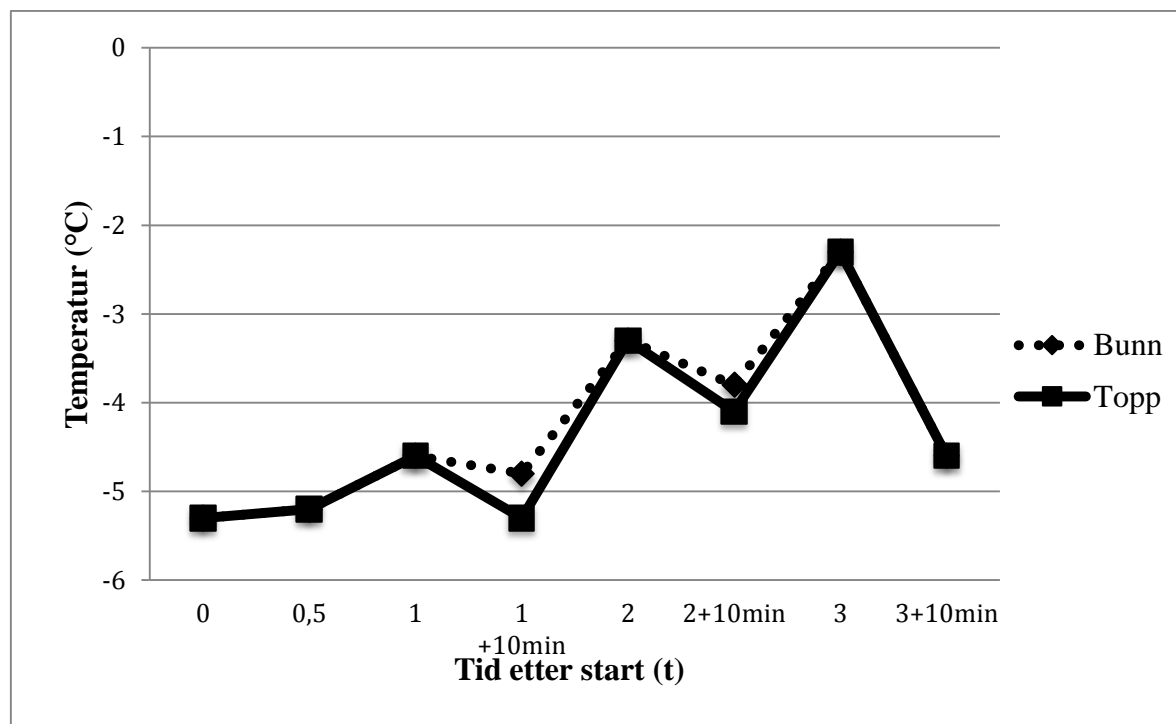
Temperaturen i badene ble målt 0.5, 1, 2, og 3 timer etter start av forsøket. Temperaturen både i bunn og øverst i badet ble målt, ved å holde temperatursensoren horisontalt i den nederste og den øverste delen av badet. Mer is og salt ble tilsatt ettersom isen smeltet (se tabell 2). Da temperaturen ble målt 1, 2 og 3 timer etter start ble den målt både før og etter tilsetning av salt og is. Temperaturene ble målt med termometeret fra TENMA og mengde salt og is ble veid med bordvekten fra Sartorius.

Tabell 2 Mengde is og salt som ble tilsatt til badene underveis i forsøket.

	Kuldebad med luftbobling	Kuldebad uten luftbobling
Tid etter start	Tilsetning	Tilsetning
1 t	1 kg is, 8 g salt	1 kg is, 8 g salt
2 t	1 kg is, 8 g salt	1 kg is, 8 g salt
3 t	3 kg is, 240 g salt	3 kg is, 8 g salt

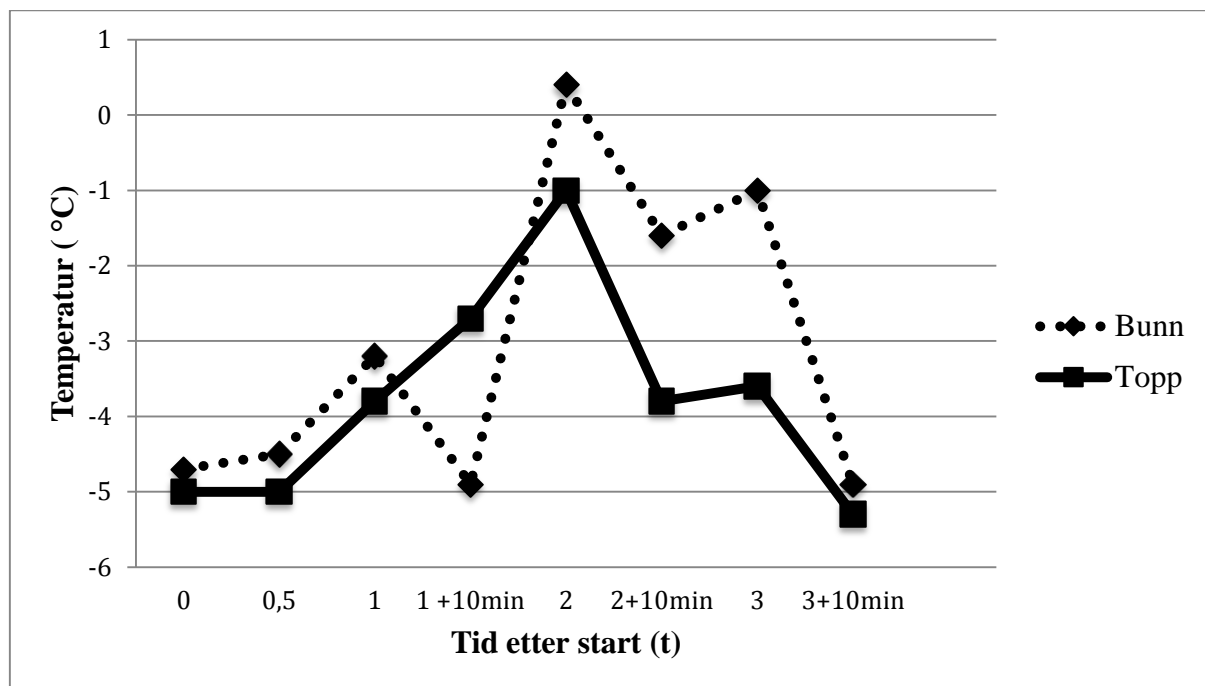
### 6.3 Resultater

Figur 8 viser resultatet av temperaturmålingene i kuldebadet med sirkulasjon via luftbobling.



Figur 8 Temperaturutvikling i bunnen og toppen av kuldebadet med luftbobling. 1, 2 og 3 timer etter starten av forsøket ble temperaturen målt rett før og ti minutter etter tilsetning av salt og is.

Figur 9 viser resultatet av temperaturmålingene i kuldebadet uten sirkulasjon.



Figur 9 Temperaturutvikling i bunnen og toppen av kuldebadet uten luftbobling. 1, 2 og 3 timer etter starten av forsøket ble temperaturen målt rett før og ti minutter etter tilsetning av salt og is.

Temperaturen i badet med luftbobling holdt seg jevn i hele badet under forsøket.

Temperaturen i badet uten bobling var høyere i bunnen av badet enn øverst i badet ved nesten alle målingene. Vanntemperaturen økte for hver måling i begge badene, og sank igjen etter mer salt og is ble tilsatt. Det ble observert større temperaturøkninger i badet uten luftbobling enn i badet med luftbobling.

Tabell 3 viser hvor mye is som hadde smeltet i badene 1, 2 og 3 timer inn i forsøket (før tilsetning av ny is).

Tabell 3 Mengde is i badene som hadde smeltet 1, 2 og 3 timer inn i forsøket.

Tid etter start	Kuldebad med luftbobling	Kuldebad uten luftbobling
1 t	90% smeltet	80% smeltet
2 t	100% smeltet	80% smeltet
3 t	100% smeltet	90% smeltet

Både etter 2 og 3 timer hadde all isen i badet med luftbobling smeltet, mens det var igjen små mengder is i badet uten luftbobling.

## 6.4 Diskusjon

Ved å sammenlikne figur 8 og 9 kan det observeres at sirkulasjon av vannet med luft fra slangen hadde en tydelig effekt ettersom temperaturen var lik mellom den øverste og nederste



delen i badet med luftbobling gjennom hele forsøket. I badet uten luftbobling var det derimot stor variasjon mellom temperaturen øverst og i bunnen av badet. Temperaturen i begge badene steg gradvis under forsøket. Dette var hovedsakelig fordi for lite salt ble tilsatt i forhold til is, og dermed ble saltkonsentrasjonen i badene fortynnet. Fra tabell 2 kan man se at det ble tilsatt 8 g salt etter 1 og 2 timer, ikke 80 g som egentlig skulle blitt tilsatt for å opprettholde lik saltkonsentrasjon. I tillegg skjedde det flere ganger under forsøket at all isen hadde smeltet i badet med bobling da temperaturen skulle måles. Når all isen i badet er smeltet vil ikke badet kunne opprettholde en konstant temperatur lengre. Derfor vil det være nødvendig å tilsette enten mer eller oftere is og salt enn det som ble gjort i dette forsøket. En annen mulig løsning er å plassere kuldebadene enda kjøligere, slik at mindre varme fra omgivelsene blir overført til badene. Isen vil da smelte med en lavere hastighet.

Starttemperaturen til i de to badene var for lave, spesielt i badet med luftbobling som hadde en starttemperatur på  $-5.3^{\circ}\text{C}$ . Dette kan forklares med at en del mer salt enn det som var nødvendig ble tilsatt. 80 g salt pr. liter vann ble tilsatt. Dette gir en frysepunktnedsettelse som beregnet under:

$$C_m = \frac{m}{M}$$

$$C_m = \frac{80\text{g}}{58\text{g/mol}} = 1.38 \text{ mol}$$

$$\Delta T_f = K_f * C_m * i$$

$$\Delta T_f = 1.38 \text{ mol} * -1.853 \text{ }^{\circ}\text{C/mol} * 2 = -5.1^{\circ}\text{C}$$

Mer salt enn det som trengs for å oppnå  $-4^{\circ}\text{C}$  ble tilsatt kuldebadene.

Da mengde salt som ble tilsatt ble beregnet tok man utgangspunkt i at badet består av 10 kg vann/is og at en tilsetning på 800g salt dermed gir en konsentrasjon på 8%. Men ettersom ikke all isen smeltet med en gang saltet ble tilsatt var ikke alle vannmolekylene i isen tilgjengelige til å reagere med saltet som igjen fører til høyere saltkonsentrasjon i vannfasen i badene.

Grunnen til at den laveste starttemperaturen ble målt i badet med luftbobling kan være fordi saltet løste seg bedre opp i badet med sirkulasjon. Sirkulasjonen i dette badet gav også en økning i konvektiv varmeoverføring, som gjenspeiles i at isen smeltet raskere i dette badet.

Konvektiv varmeoverføring er varmeoverføring assosiert med bevegelse av et fluid og involverer både konduktivitet (varmeoverføring ved diffusjon av partikler) og adveksjon (varmeoverføring ved flyt av fluid). Konvektiv varmeoverføring kan skje naturlig på grunn av forskjell i tetthet i et fluid, eller tvungen, på grunn av ytre krefter som skaper flyt som for eksempel luften benyttet i dette forsøket. I kuldebadet uten luft vil varmeoverføringen ved

konveksjon kun skje ved naturlig konveksjon og vil derfor være lavere enn i badet med luft hvor også tvungen konveksjon tok sted (Cengel & Ghajar 2011).

Forsøket konkluderes med at luftboblingen fra pumpen skapte sirkulasjon i vannet som førte til at temperaturen var jevn i hele badet. Metoden fungerte bra nok til å benyttes i videre forsøk. Temperaturen i begge badene steg under forsøket. For at temperaturen skal holdes nede må riktig mengde salt tilsettes og det må alltid være is igjen i badet.

## 7. Forsøk 3: Kuldebad med sirkulasjon i fryser

### 7.1 Innledning

I forsøk 2 ble det observert at luftbobling i kuldebadet førte til en sirkulasjon av vannet som gjorde at hele badet fikk en jevn temperatur. Det ble videre observert at denne sirkulasjonen gjorde at isen i badet smeltet raskere, og at det ikke var tilstrekkelig å tilsette en kilo is hver time. For å slippe å stadig tilsette mer is og salt for at badet skal holde en lav temperatur bør varmeoverføringshastigheten fra omgivelsene til badet senkes. Hensikten med dette forøket var å se om dette kan løses ved å plassere kuldebadet i kjøligere omgivelser.

### 7.2 Materialer og metoder

Forsøket ble utført 13. og 14. desember 2014 av Bjørn Reidar Hansen på fiskeanlegget ved NMBU. Et kuldebad bestående av ca. 10 liter vann og 40 g salt (Jozo havsalt) ble plassert i en dypfryser som holder  $-18^{\circ}\text{C}$ . Etersom fryseren holder en såpass lav temperatur ble det ikke tilsatt is. En akvariepumpe på 30W ble lagt i badet for å skape sirkulasjon av vannet tilsvarende badet med luftbobling i forsøk 2. Vanntemperaturen ble målt første gang etter 4 timer for at temperaturen i badet skulle ha fått tid til å stabilisere seg. Deretter ble den målt igjen etter 10 og 20 timer. Temperaturmålingene av badet ble utført med termometeret fra TENMA og saltet ble veid ut med bordvekten fra Sartorius.

### 7.3 Resultater

I tabell 4 er resultatet av temperaturmålingene presentert.

**Tabell 4 Resultatet av temperaturmålingene i badet 4, 10 og 20 timer etter start av forsøket.**

	4 t	10 t	20 t
Temperatur i kuldebad	$-3^{\circ}\text{C}$	$-3.4^{\circ}\text{C}$	$-3.8^{\circ}\text{C}$

Temperaturen sank gradvis gjennom forsøket, men var lik i hele kuldebadet. Det ble observert litt isdannelse rundt kanten ved overflaten på badet. Hastigheten på temperatursenkningen ble beregnet:

$$\frac{16 \text{ timer}}{0.8^{\circ}\text{C}} = 0.05^{\circ}\text{C}/\text{time}$$

Temperaturen sank med  $0.05^{\circ}\text{C}$  pr. time.

## **7.4 Diskusjon**

Temperaturen i badet sank gradvis og kontrollert ettersom varme fra badet ble overført til de kalde omgivelsene. Likevel kan man si at temperaturen i badet holdt seg godt ettersom hastigheten på temperatursenkningen var såpass liten. Selv om saltkonsentrasjonen i badet var svært lav (0.4%) fryste det ikke. Dette var mest sannsynlig på grunn av pumpen som sørget for tilstrekkelig sirkulasjon i badet og hindret at vannet frysing ved at varme fra motoren til pumpen ble overført til vannet i badet.

Forsøket konkluderes med at forsøksbetingelsene gav en tilfredsstillende temperatur på badet slik at et nytt forsøk med fisk kan utføres.

## **8. Forsøk 4: Nedkjøling av røye ved bruk av kuldebad ved 0 og $-3^{\circ}\text{C}$**

### **8.1 Innledning**

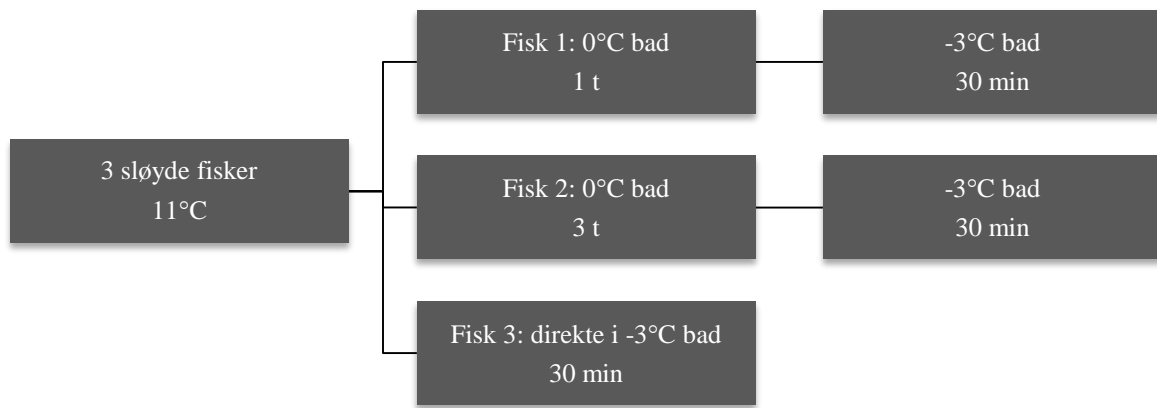
Ut ifra resultatene fra forsøk 2 og 3 har det blitt utviklet en metode for å holde temperaturen på kuldebadene nede samt å sikre en jevn temperatur i hele badet. En pumpe plassert i badet vil gi sirkulasjon av vannet og ved å plassere badet i en fryser vil en temperatur på mellom  $-3$  og  $-3.8^{\circ}\text{C}$  kunne opprettholdes i 20 timer. Ettersom kuldebadene skal brukes til å undersøke hvordan lave nedkjølingstemperaturer påvirker rigor mortis i fisken er det ønskelig å kunne benytte seg av så lav nedkjølingstemperatur som mulig uten at fisken fryser. Fra forsøk 1 ble det observert at ved direkte overføring til et kuldebad med  $-4^{\circ}\text{C}$  etter slakt vil fisken fryse. Målet med dette forsøket var å undersøke om et kuldebad på  $-3^{\circ}\text{C}$  er aktuelt å bruke til nedkjøling av fisken. Det var ønskelig å se på overføring av fisk både direkte til  $-3^{\circ}\text{C}$  etter slakt og gradvis nedkjøling ved først  $0^{\circ}\text{C}$  og deretter  $-3^{\circ}\text{C}$ .

### **8.2 Materialer og metoder**

Forsøket ble utført 5. og 6. januar 2015 på fiskeanlegget ved NMBU.

To kar fylt med 10 liter vann ble brukt som utgangspunkt til to kuldebad, et som skulle holde  $0^{\circ}\text{C}$  og et som skulle holde  $-3^{\circ}\text{C}$ . Badet som skulle holde  $-3^{\circ}\text{C}$  ble tilsatt Jozo havsalt til en saltkonsentrasjon på 4% (400g). Deretter ble badet satt i en fryser og en akvariepumpe på 30W ble plassert i badet. Dette ble gjort 5. januar kl.14:00, dagen før start av forsøket, for at temperaturen i badet skulle ha tid til å stabilisere seg. Dagen etter ble badet som skulle holde  $0^{\circ}\text{C}$  fylt med vann og knust is. Det ble rørt godt om i badet med en rørepinne og to akvariepumper, en på 9W og en på 15W, ble plassert i badet.

Tre røyer (klekket i uke 8 2013 fra Tydalsfisk AS) ble benyttet i forsøket. Fiskene var av omtrent lik størrelse. De ble tatt fra et basseng med en vanntemperatur på  $11^{\circ}\text{C}$ , avlivet med et slag mot hodet, sløyd og deretter kjølt ned som beskrevet i figur 10.



**Figur 10 Beskrivelse av forsøksoppsettet.**

Fisk 1 og 2 ble først plassert i 0°C badet. Etter en time ble fisk 1 merket med et hvitt bånd rundt haleroten og overført til -3°C badet. Fisk 3 ble samtidig avlivet, sløyd og plassert direkte i -3°C badet sammen med fisk 1. Etter 30 minutter ble begge fiskene i -3°C badet undersøkt for å vurdere grad av frysing. Etter 3 timer i 0°C badet ble fisk 2 overført til -3 °C. En halv time senere ble fisken tatt opp av badet slik at grad av frysing kunne vurderes. Temperaturen til badene ble målt 1, 1.5 og 3 timer etter start av forsøket med termometeret fra TENMA.

### 8.3 Resultater

Alle fiskene hadde fryst etter en halv time i badet med -3°C, uansett om de ble gradvis nedkjølt eller direkte plassert i badet.

Tabell 4 viser resultatet av temperaturmålingene i kuldebadene.

**Tabell 4 Temperatur i kuldebadene (°C) 1, 1.5, og 3 timer etter start av forsøket.**

Kuldebad	1 t	1.5 t	3 t
0°C	-0.2	-0.1	-0.1
-3°C	-3.1	-3	-3

Temperatuene i badene holdt seg konstante gjennom forsøket.

## 8.4 Diskusjon

Fisk 3 ble lagt direkte i  $-3^{\circ}\text{C}$ , mens både fisk 1 og 2 ble gradvis kjølt ned ved at de først ble plassert i badet med  $0^{\circ}\text{C}$  og så i badet med  $-3^{\circ}\text{C}$ . Fisk 1 oppholdt seg kun en time i  $0^{\circ}\text{C}$  badet mens fisk 2 oppholdt seg der i to og en halv time, men begge fryste like rask og i like stor grad som fisk 3 etter at de ble overført til  $-3^{\circ}\text{C}$  badet. Det ble dermed ikke observert noen forskjell mellom å legge fisken direkte i et bad med  $-3^{\circ}\text{C}$  og ved rask eller langsom to trinns nedkjøling fra  $0$  til  $-3^{\circ}\text{C}$ . Ved å delvis fryse fisken blir nedkjølingen en form for superkjøling, og dette kan som nevnt i avsnitt 2.2.4 ha fordeler med tanke på mindre mikrobiologisk og enzymatisk aktivitet, men ettersom om det er utvikling av rigor som skal undersøkes i denne oppgaven er det ikke ønskelig med noen grad av frysing i fisken.  $-3^{\circ}\text{C}$  er derfor for lav temperatur å benytte til kjølingen.

For å finne ut av hvor lav temperatur som kan benyttes til kjølingen må frysepunktet til røyen defineres. (Fellows 2000) oppgir at frysepunktet til fisk varierer fra  $-0.6^{\circ}\text{C}$  til  $-2^{\circ}\text{C}$  avhengig av oppbyggingen av vevet i fisken. Andre steder blir et frysepunkt til laks på  $-2.2^{\circ}\text{C}$  og torsk helt ned til  $-3.5^{\circ}\text{C}$  oppgitt. Frysepunktet til fisken kan defineres som den temperaturen hvor en iskrystall er i likevekt med vannet rundt. Ettersom krystalldannelsen er en eksoterm reaksjon vil temperaturen i fisken først synke lavere enn frysepunktet og deretter øke litt da latent varme frigjøres når formasjon av iskrystaller starter. Frysepunktet er den temperaturen som produktet har etter denne temperaturøkningen. Man kan forvente variasjoner i beregnet frysepunkt etter hvilken metode som ble benyttet til å finne det. Både teoretiske metoder, som tar utgangspunkt i at fisken er et ideelt binært system, og empiriske og semiempiriske metoder som baserer seg på eksperimentelle målinger finnes. Frysepunktet vil også kunne variere i ulike deler av fisken. Derfor kan det være vanskelig å gå ut ifra tabellverdier når man skal finne lavest mulig kjøletemperatur (Fellows 2000; Rahman 2009). I forsøkene i denne oppgaven defineres frysepunktet som den temperaturen hvor det er merkbart at fisken har blitt stivere ved fysisk undersøkelse av fisken. Det er dermed mulig at frysepunktet til fisken egentlig er høyere enn det som observeres, ettersom små mengder iskrystaller kan være vanskelig å legge merke til dersom ikke nærmere analyser av fisken utføres. I forsøk 1 ble en kjernetemperatur på  $-0.5^{\circ}\text{C}$  målt uten at fiskene fryste (figur 7). Kuldebadet fiskene lå i hadde en temperatur på  $-0.9^{\circ}\text{C}$  ved dette tidspunktet, som betyr at man i hvert fall kan benytte et bad med denne temperaturen til å kjøle ned røye. I videre forsøk vil det være hensiktsmessig å overvåke kjernetemperaturen til fiskene slik at man har kontroll på hvordan de forskjellige nedkjølingsmetodene påvirker denne temperaturen og ved hvilken

kjernetemperatur fisken fryser. Lavest mulig temperatur på kuldebadet bestemmes ikke bare av frysepunktet til fisken, men også hvor lenge fisken skal ligge i badet. Dersom fisken har et frysepunkt på  $-0.5^{\circ}\text{C}$  kan ikke vanntemperaturen være lavere enn  $-0.5^{\circ}\text{C}$  dersom fisken skal ligge i kuldebadet lenge, ettersom fisken etter hvert vil få samme temperatur som badet. Dersom fisken skal ligge kort tid i badet vil det kanskje være mulig å benytte lavere temperaturer, så lenge fiskens kjernetemperatur ikke synker til under frysepunktet.

I et slakteri av større skala vil det ikke lønne seg å kjøle ned fisken i to trinn dersom den må ligge mer enn en time i det første badet, siden det da vil være behov for et basseng med veldig stor kapasitet, noe som både er dyrt og arealkrevende. I videre forsøk bør det derfor fokuseres på å finne lavest mulig temperatur hvor fisken ikke fryser ved direkte overføring eller ved trinnvis nedkjøling hvor fisken først blir kjølt ved  $0^{\circ}\text{C}$  i maks en time. Deretter kan det undersøkes hvilken effekt disse nedkjølingsmetodene har på utvikling av rigor mortis i fisken.

Dette forsøket konkluderes med at  $-3^{\circ}\text{C}$  er en for lav temperatur å benytte på kuldebad ved nedkjøling av røye ettersom fiskene fryste slik at det ikke var mulig å måle grad av rigor. I videre forsøk må kuldebad med høyere temperaturer benyttes.



## **9. Forsøk 5: Nedkjøling av røye ved bruk av kuldebad ved 0 og mellom $-0.5$ til $-1.5^{\circ}\text{C}$**

### **9.1 Innledning**

Fra forsøk 4 har det blitt observert at et kuldebad på  $-3^{\circ}\text{C}$  er for kaldt for nedkjøling av røye ettersom man vil unngå at fisken fryser. For å kunne undersøke utvikling av rigor mortis må man dermed øke temperaturen på badet. Hensikten med dette forsøket var å undersøke om nedkjøling ved å plassere fisken direkte i et bad på mellom  $-0.5$  og  $-1.5^{\circ}\text{C}$  eller gradvis nedkjøling i et bad på  $0^{\circ}\text{C}$  og deretter i det kaldeste badet kan gjennomføres uten at fisken fryser. Dersom fisken ikke fryser skulle det videre undersøkes hvilken effekt disse nedkjølingsmetodene har på utviklingen og styrken på rigor sammenliknet med kjøling ved kun  $0^{\circ}\text{C}$ . I tillegg skulle kjernetemperaturen til fisken overvåkes for å se hvordan den synker ved de forskjellige nedkjølingsmetodene og eventuelt ved hvilke temperaturer fisken fryser. I dette forsøket ble rigor-indeks benyttet som en metode for å måle grad av rigor, for å undersøke hvordan denne metoden fungerer sammenliknet med å gi fisken en rigor score.

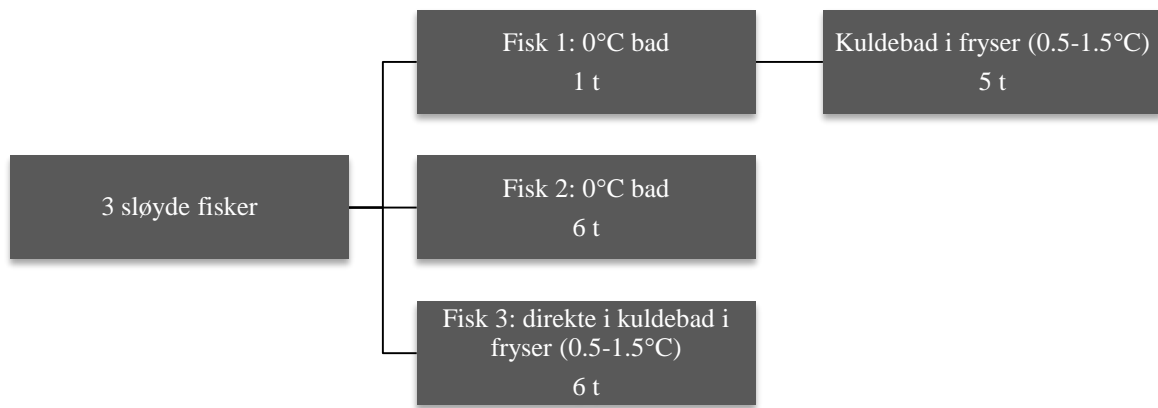
### **9.2 Materialer og metoder**

Dette forsøket ble utført 8. og 9. januar på fiskeanlegget ved NMBU.

To vannbad ble forberedt til forsøket, et på  $0^{\circ}\text{C}$  og et som skulle holde høyest  $-0.5^{\circ}\text{C}$  og lavest  $-1.5^{\circ}\text{C}$ . Vannbadet med  $-0.5$  til  $-1.5^{\circ}\text{C}$  ble forberedt ved å tilsette 400 g salt (Jozo havsalt) til 10 liter vann slik at badet hadde en saltkonsentrasjon på 4% slik som i forsøk 4. Saltet ble veid ut med bordvekten fra Sartorius. Badet ble så plassert i en fryser som holdt  $-18^{\circ}\text{C}$ . Deretter ble det plassert akvariepumper i badet, en på 30W, en på 15W og to på 6W. Badet stod over natten og fikk en stabil temperatur på  $-2.1^{\circ}\text{C}$ . Neste morgen ble de to pumpene på 6W fjernet og vann på  $11^{\circ}\text{C}$  ble tilsatt til temperaturen til badet økte til  $-0.5^{\circ}\text{C}$ .

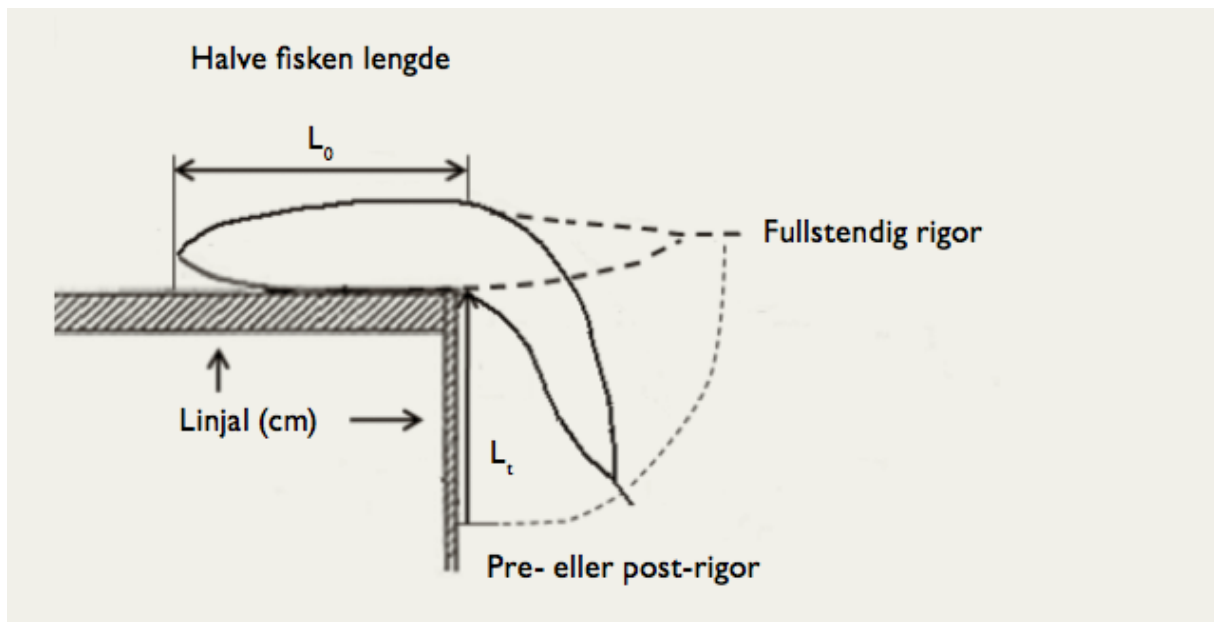
Vannbadet med  $0^{\circ}\text{C}$  ble forberedt ved å blande 10 liter vann med knust is. En akvariepumpe på 15W ble plassert i badet. Gjennom hele forsøket ble det sørget for at det alltid var is igjen i badet.

Til sammen ble tre røyer (klekket i uke 8 2013 fra Tydalsfisk AS) benyttet i forsøket. Røyene var omtrent like store (lengde ca.45 cm) og ble hentet fra et basseng med en vanntemperatur på  $11^{\circ}\text{C}$ . Fiskene ble avlivet med slag mot hodet, sløyd og kjølt ned som beskrevet i figur 11.



**Figur 11 Beskrivelse av forsøkesoppsettet.**

Styrke av Rigor mortis i fiskene ble målt ved å beregne rigor-indeks,  $I_R$  (%). Dette ble gjort ved å legge fiskene på en bordflate og måle  $L_0$  og  $L_t$  som beskrevet i figur 12.



**Figur 12 Metode for å beregne rigor-indeks (Bjørlykke et al. 2011).**

$L_0$  er halve lengden til fisken og  $L_t$  er den vertikale lengden fra haletippen til bordflaten som måles ved ulike tidsintervall etter slakt. I dette forsøket ble  $L_t$  målt av alle fiskene 2, 4 og 6 timer etter slakt.

Likningen til å beregne rigor-indeks er som følger:

$$I_R = \frac{(L_0 - L_t)}{L_t} \times 100$$

En høyere rigor indeks betyr større grad av rigor i fisken (som beskrevet i avsnitt 3.2).

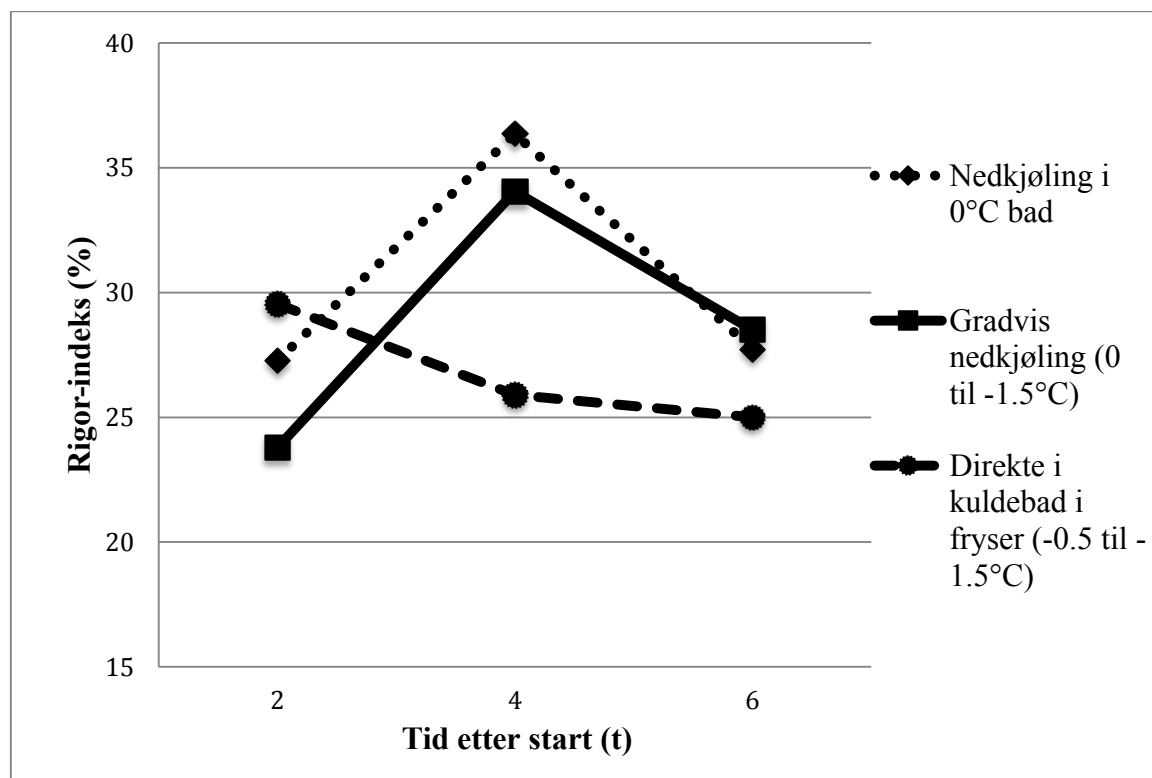
Temperaturen til alle fiskene ble målt hver time til 6 timer etter forsøkets start ved å bruke

samme metode som i de tidligere forsøkene. Samtidig ble vanntemperaturen i kuldebadene målt. Termometeret fra TENMA ble benyttet til målingene.

Fire timer etter forsøkets start ble 15W pumpen i vannbadet i fryseren byttet ut med en 30W pumpe for at ikke temperaturen skulle bli for lav, ettersom den har større motor som gir fra seg mer varme. Etter en halv time ble 30W pumpen byttet tilbake til en 15W pumpe igjen.

### 9.3 Resultater

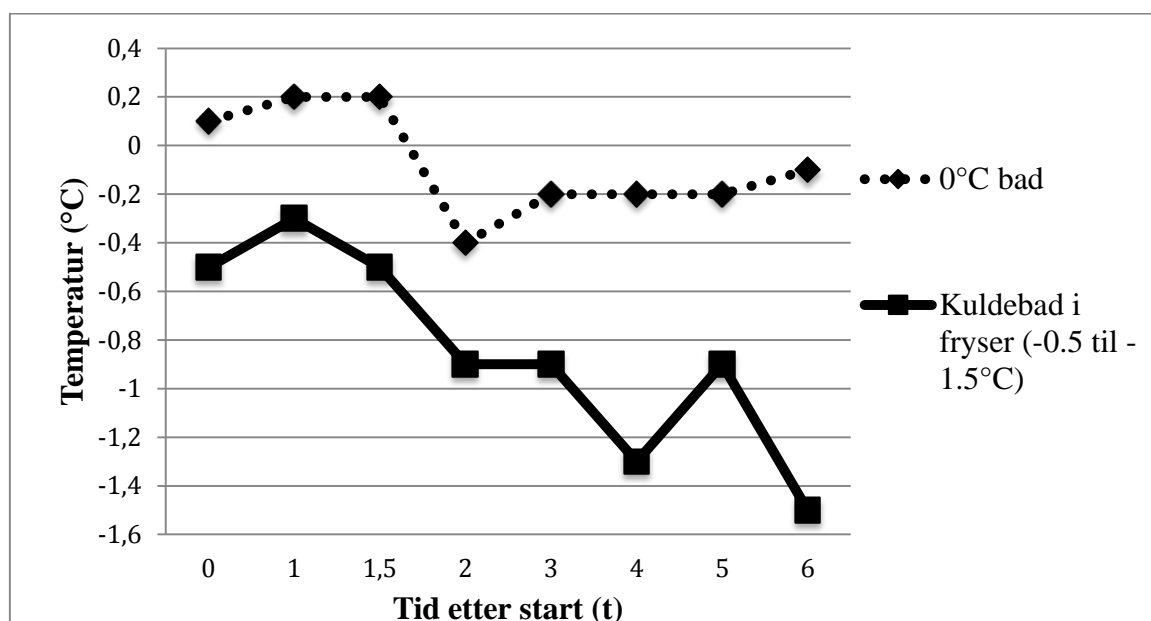
Figur 13 viser hvordan rigor-indeksen til fiskene utviklet seg under forsøket.



Figur 13 Rigor-indeks (%) til fiskene som ble kjølt ned ved bruk av de ulike metodene 2, 4 og 6 timer etter forsøkets start. Rigor-indeks ble beregnet fra data i vedlegg 3.

Ved den første målingen av  $L_t$  hadde fisken som ble lagt direkte i det kaldeste badet høyest rigor-indeks og fisken som ble gradvis nedkjølt minst, mens ved den siste målingen hadde dette snudd seg. Det ble også observert at rigor-indeksen først steg og så sank både for fisken som ble gradvis nedkjølt og for fisken kjølt ved 0°C, mens den bare sank for fisken som ble lagt direkte i det kaldeste badet.

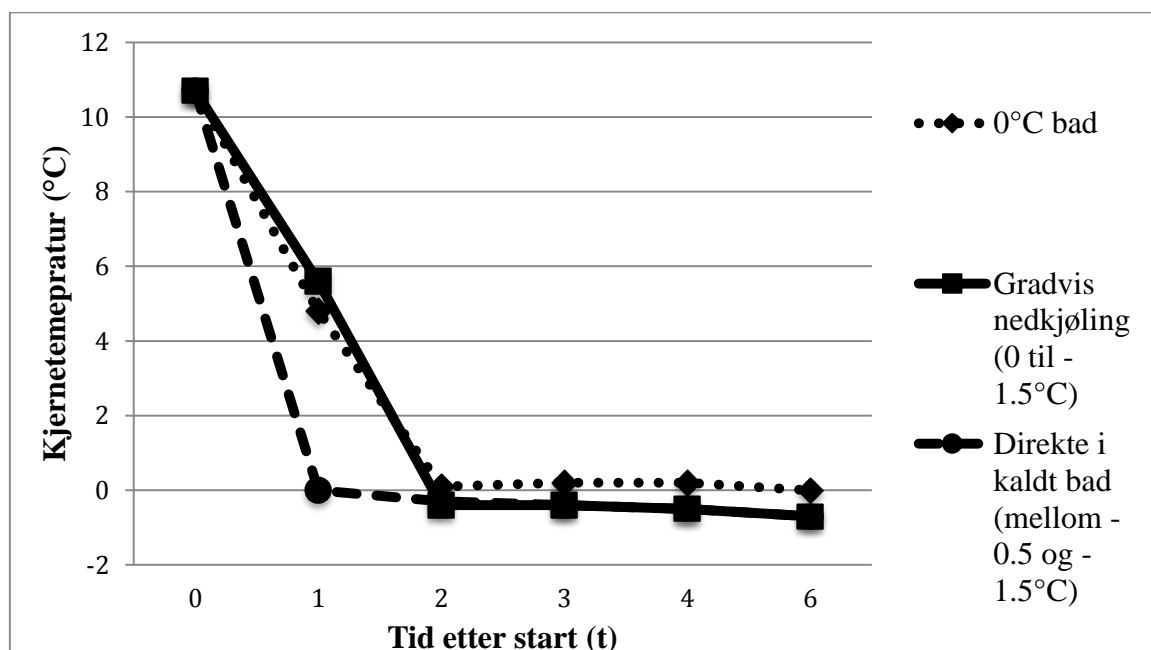
Resultatet av temperaturmålingene i kuldebadene er presentert i figur 14.



Figur 14 Temperaturutviklingen i de to vannbadene. Målingene ble gjort hver time til seks timer etter start av forsøket.

Temperaturen i kuldebadet som skulle holde 0°C varierte en del under forsøket, den laveste temperaturen som ble målt var -0.4°C og den høyeste temperaturen var 0.2°C. Temperaturen i kuldebadet i fryseren varierte ettersom akvariepumpene ble tatt inn og ut av badet, men var generelt lavere mot slutten av forsøket enn ved start.

Figur 15 viser hvordan kjernetemperaturen til fisken sank ved de forskjellige nedkjølingsmetodene.



Figur 15 Temperaturutvikling (°C) i fisken fra rett etter slakt og til seks timer etter starten av forsøket ved de forskjellige nedkjølingsmetodene.

Kjernetemperaturen til fisken som ble lagt direkte i det kaldeste badet sank til 0°C i løpet av den første timen og deretter gradvis til -0.7°C. Kjernetemperaturen til fisken i 0°C badet og fisken som ble gradvis nedkjølt nådde en temperatur på 0.1°C etter to timer og holdt seg ved denne temperaturen resten av forsøket.

#### 9.4 Diskusjon

I dette forsøket ble beregning av rigor-indeks brukt til å bestemme grad av rigor mortis ettersom dette er lettere å utføre for en person som ikke er trent i å bedømme styrke av rigor i fisk. Rigor-indeksen steg og deretter sank for fisken som ble gradvis nedkjølt og for fisken i 0°C badet, mens den kun sank for fisken som ble direkte overført til badet i fryseren. Dette var uventet ettersom man forventer at rigor-indeksen kun stiger de første timene etter slakt til den når et maksimum, som observert av (Wang et al. 1998). En mulig forklaring på dette er at fisken ble stiv etter 4 timer som en reaksjon på at den ble plassert i det kalde badet ved at små mengder vann fryste ytterst i fisken, men at dette gikk over ettersom temperaturen i fisken ble jevnet ut slik at forskjellen mellom kuldebadet og fisken ikke var like stor. Dette forklarer derimot ikke hvorfor rigor-indeksen også sank i fisken som lå i 0°C badet. Derfor er det mer sannsynlig at grunnen til at resultatene ble slik er at beregning av rigor-indeks krever at  $L_0$  og  $L_t$  til fiskene måles svært nøyaktig og at målingene ikke ble utført godt nok. Det er mulig at man kunne ha observert en økning i rigor-indeks fra rett etter slakt, men første måling av rigor-indeks ble ikke gjort før etter 2 timer. I videre forsøk bør en måling gjennomføres rett etter slakt. I tillegg bør det utvikles en metode å sørge for at  $L_t$  måles så nøyaktig som mulig. Ettersom kun en fisk ble kjølt ned ved bruk av hver av metodene kan det ikke trekkes noen konklusjoner om temperaturavhengigheten til rigor i dette forsøket fordi variasjonen også kan ha vært på grunn av individuelle forskjeller mellom fiskene. Flere fisk bør derfor kjøles ned ved bruk av de ulike metodene.

(Wang et al. 1998) observert at ved lagring av laks på is ved 0°C vil rigor inntreffe etter ca. 8 timer og at før det har gått 8 timer ligger rigor-indeksen på under 10%. Dette betyr at verdiene for rigor-indeks beregnet i dette forsøket var betydelig høyere. Forsøket ble utført på røye, ikke laks, og det er sannsynlig at rigorforløpet er noe forskjellig for disse to artene. Ingen litteratur er tilgjengelig på forventet rigorutvikling for røye. Røyen ble også kultivert annerledes og hadde blitt ulikt behandlet før slakt sammenliknet med laksen i forsøket til (Wang et al. 1998), noe som vil kunne påvirke utvikling av rigor. Røyen ble kultivert i små innendørs bassenger, mens det er lite informasjon om bassenget til laksen bortsett fra at det bestod av sjøvann tilsatt luft. Stressnivået til fisken påvirkes etter tetthet og vannkvalitet i det

bassenget den befinner seg i. Bedre vannkvalitet og lavere tetthet av fisk vil gi et lavere stressnivå og en lengre pre rigor tid i fisken (Erikson et al. 1997). Vanntemperaturen på bassenget til røyen var noen grader høyere enn vanntemperaturen til laksen (5-9°C), som kan ha bidratt til et noe høyere stressnivå. Laksen hadde blitt sultet i to dager før slakt, det hadde ikke røyen. Sulting vil føre til et lavere glykogenlager, men siden to dager ikke er lang tid å sulte fisken vil det mest sannsynligvis ikke ha hatt en stor effekt på pre rigor tiden. En annen forklaring på den lavere rigor-indeksen til laksen er at det ble benyttet en annen metode til å beregne  $L_0$  i forsøket til (Wang et al. 1998) enn i dette forsøket.  $L_0$  til laksen ble målt på samme måte som  $L_t$  rett etter slakt, det vil si ved å måle den vertikale avstanden fra bordflaten til tuppen av halefinnen på fisken. Dette betyr at  $L_0$  da er lik  $L_t$  ved  $t=0$  timer, som vil gi en mindre  $L_0$  verdi enn ved å måle halvparten av lengden til fisken slik som i metoden beskrevet av (Bjørlykke et al. 2011), ettersom fisken aldri vil kunne bøye seg fullstendig 90°. En mindre  $L_0$  verdi gir en lavere rigor-indeks. Beregning av rigor-indeks er en metode som ble introdusert i 1930-årene og har blitt modifisert flere ganger siden. Enda en alternativ metode til de to nevnt overfor er å kun legge 1/3 av fisken på bordet istedenfor halve.  $L_t$  måles så på samme måte som beskrevet av (Wang et al. 1998), ved å måle den vertikale lengden på fisken. Dette vil igjen gi en høyere rigor-indeks, ettersom  $L_t$  blir større (Bito et al. 1983; Cutting 1939). På grunn av disse variasjonene i metodebeskrivelsen er det viktig å merke seg at ikke alle resultater er fullstendig sammenliknbare ettersom de ulike målemetodene gir litt forskjellige rigor kurver. I dette forsøket valgte man å benytte seg av den nyeste metodebeskrivelsen.

Grunnen til at forsøket ble avsluttet etter kun 6 timer var delvis fordi hovedmålet med forsøket var å teste ut temperatur på kuldebad med hensyn til om fisken ville fryse, men også fordi det var vanskelig å holde vannbadene ved konstante temperaturer. Temperaturen til badet i fryseren ville ikke stabilisere seg og pumpene i badet måtte stadig byttes ut for at temperaturen ikke skulle bli høyere/lavere enn det ønskede temperaturområdet. Den høye temperaturgradienten mellom fryseren og vannbadet og mangel på isolasjon rundt badet gjorde at en høy grad av varmeoverføring tok sted. Temperaturen i 0°C badet varierte ettersom badet stod varmt og ofte måtte tilføres ny is. I dette badet hadde også tilsetning av fisk mye å si for vanntemperaturen ettersom det var såpass lite vann i badet. Temperaturen steg da fisken ble lagt ned i badet og så sank den igjen etter hvert som kjernetemperaturen til fisken ble lavere. I videre forsøk bør man benytte seg av kuldebad av større volum slik at temperaturøkning på grunn av fisken blir mindre. Ettersom temperaturforskjellene kan ha en innvirkning på resultatene og siden det var viktig å holde kjernetemperaturen til fiskene over

frysepunktet er det ønskelig å ha bedre temperaturkontroll under et slikt forsøk. Av kjernetemperaturmålingene i figur 15 kan man se at fisken som ble gradvis nedkjølt og fisken i 0°C badet hadde en tilnærmet lik nedkjølingskurve. Disse fiskene lå begge i 0°C badet den første timen av forsøket, som betyr at den første tiden i nedkjølingsfasen har mye å si for hvilken temperatur fisken ender opp med å få under kjølingen. Når fisken først har fått en kjernetemperatur som er nærme temperaturen til kuldebadet vil varmeoverføringen gå saktere og det skal mer til for å endre temperaturen til fisken. Fra dette forsøket kan man observere at ingen av fiskene fryste. Den laveste kjernetemperaturen som ble målt var  $-0.7^{\circ}\text{C}$ , og dette var av fisk i det kaldeste vannbadet. Dette betyr at det bør være mulig å benytte seg av et kuldebad på helt ned til  $-1.5^{\circ}\text{C}$  til nedkjøling av røye, i hvert fall de første 6 timene etter slakt.

Forsøket konkluderes med at temperaturene benyttet i forsøket kan brukes til å kjøle ned fisken uten at den fryser. Den laveste kjernetemperaturen som ble målt var  $-0.7^{\circ}\text{C}$ , som betyr at frysepunktet til fisken er lavere enn dette. Rigorutviklingen ved nedkjøling direkte i det kaldeste badet skilte seg fra nedkjøling ved 0°C og gradvis nedkjøling. Alle de forskjellige nedkjølingsmetodene gav en uventet nedgang i rigor-indeks etter 6 timer. For å undersøke nærmere temperaturavhengigheten til rigor må vanntemperaturen holdes konstant slik at forsøket kan vare lengre og flere fisker kjøles ned ved bruk av de forskjellige metodene.

## 10. Forsøk 6: Bruk av kuldebad med ulike temperaturer til å finne frysetemperaturen til røye

### 10.1 Innledning

I forsøk 4 ble det observert at røyene vil fryse innen 30 minutter dersom de blir plassert i et kuldebad med  $-3^{\circ}\text{C}$ , uansett om nedkjølingen skjer gradvis eller ikke. Fra forsøk 5 ble det observert at røyene ikke fryser dersom de blir direkte overført til et bad med  $-0.5^{\circ}\text{C}$  eller ved gradvis nedkjøling hvor vanntemperaturen er på  $-1.5^{\circ}\text{C}$  på det laveste. Målet med dette forsøket var å finne lavest mulig temperatur det er mulig å ha i kuldebadet som skal brukes som kjølesystem ved å bestemme frysetemperaturen til røyen.

### 10.2 Materialer og metoder

I dette forsøket ble røyer lagt i kuldebad med ulike temperaturer under  $0^{\circ}\text{C}$  for å se ved hvilken temperatur fiskene fryser. Som kuldebad ble blandinger av vann og is med ulik saltkonsentrasjon benyttet. Tre temperaturer ble testet:  $-1.5$ ,  $-1.7$  og  $-2^{\circ}\text{C}$ .

Forsøket ble utført 20. januar 2015 på fiskeanlegget ved NMBU. Først ble kuldebadene på  $-1.5^{\circ}\text{C}$  og  $-2^{\circ}\text{C}$  forberedt. To kar ble fylt med 25 liter vann, knust is og salt (industrivakuumsalt fra European Salt Company). Mengde salt som skulle tilsettes ble beregnet ved å bruke likningen for frysepunktnedsettelse:

Vannbad  $-1.5^{\circ}\text{C}$ :

$$\begin{aligned}\Delta T_f &= K_f * C_m * i \\ 1.5^{\circ}\text{C} &= 1.853^{\circ}\text{C} * C_m * 2 \\ C_m &= \frac{1.5^{\circ}\text{C}}{2 * 1.853} = 0.405 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}m &= C_m * M \\ m &= 0.405 \text{ mol} * 58 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 23.49 \text{ g}\end{aligned}$$

23.49 g salt må tilsettes pr. liter vann/isblanding. Kuldebadet er på til sammen 25 liter:

$$23.49 \text{ g} * 25 = 587.25 \text{ g}$$

587 g salt ble tilsatt (saltkonsentrasjon 2.35%).

Vannbad  $-2^{\circ}\text{C}$ :

$$2^{\circ}\text{C} = 1.853^{\circ}\text{C} * C_m * 2$$



$$C_m = \frac{2^{\circ}\text{C}}{2 * 1.853^{\circ}\text{C}} = 0.539 \text{ mol}$$

$$m = 0.539 \text{ mol} * 58 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 31.26 \text{ g}$$

$$31.26 \text{ g} * 25 = 781.55 \text{ g}$$

782 g salt ble tilsatt (saltkonsentrasjon 3.13%).

Saltet ble veid ut ved å bruke bordvekten fra Sartorius.

Nysløyd røye (klekket i uke 8 2013 fra Tydalsfisk AS) ble benyttet i forsøket. Alle fiskene hadde en tilnærmet lik størrelse (lengde ca. 45 cm). To fisker ble lagt i hvert bad. Etter 15 minutter ble fiskene tatt opp av badene og undersøkt for å se om de hadde fryst. Et nytt vannbad ble deretter forberedt.

Vannbad  $-1.7^{\circ}\text{C}$ : Vannbade5t med  $-2^{\circ}\text{C}$  grader ble tilsatt vann (på ca.  $11^{\circ}\text{C}$ ) til ønsket temperatur ble målt i badet.

To fisker ble lagt i badet. Etter 15 minutter ble fiskene tatt opp av badet og undersøkt.

Kjernetemperaturen til disse to fiskene ble deretter målt ved å bruke samme metode som i forsøk 1. Temperaturen til alle kuldebadene ble overvåket under forsøket og det ble rørt ofte for å sikre riktig og jevn temperatur. Temperaturen til fisk og kuldebad ble målt ved å bruke termometeret fra TENMA.

### 10.3 Resultater

Fisken i kuldebadet med  $-1.5^{\circ}\text{C}$  hadde ikke fryst i løpet av 15 minutter. Kuldebadet holdt en temperatur på  $-1.5$  til  $-1.4^{\circ}\text{C}$  under forsøket.

Fisken i badet med  $-2^{\circ}\text{C}$  hadde begynt å fryse etter 15 minutter og var derfor blitt litt stiv, spesielt i halepartiet. Bukdelen var fortsatt ganske myk. Temperaturen i kuldebadet varierte fra  $-2$  til  $-2.5^{\circ}\text{C}$ .

Fisken i badet med  $-1.7^{\circ}\text{C}$  begynte også å fryse etter 15 minutter, men kun i halepartiet.

Kjernetemperaturen til de to fiskene i dette badet ble målt til å være  $2.3^{\circ}\text{C}$  og  $2.2^{\circ}\text{C}$ .

Kuldebadet holdt  $-1.6$  til  $-1.7^{\circ}\text{C}$  gjennom forsøket.

Det ble ikke observert noen forskjell mellom fiskene som lå i samme bad ved noen av temperaturene.

### 10.4 Diskusjon

I dette forsøket ble det observert at fiskene som ble lagt i badet med  $-1.5^{\circ}\text{C}$  ikke hadde fryst etter 15 min, mens fiskene i de to kaldere badene hadde delvis fryst. Det ble observert høyest grad av frysing i fiskene som ble lagt i det kaldeste badet. Det var ingen forskjell mellom fiskene i samme bad, som heller ikke var forventet ettersom det ble brukt røyer av omtrent lik

størrelse. For de fiskene som var delvis frosne var det halepartiet som fryste først, mens buksidene holdt seg relativt myke og bevegelige. Dette kan forklares med at sammensetningen av vevet er ulik i de forskjellige delene av fisken. Fettmengden i fiskemuskelen øker fra haleenden til hodeenden og fra dorsalside til bukside. Mengde vann i fiskemuskelen er distribuert slik at i deler av muskelen med mye fett er det lite vann og i deler av muskelen med lite fett er det mye vann (Zhu et al. 2014). De termiske egenskapene til et materiale bestemmer materialets evne til å lagre, lede og miste varme. Termisk diffusivitet bestemmer hvor raskt varme vil kunne diffusere gjennom materialet og kan dermed brukes til å beregne varme- og kjøletid ved prosessering av materialet. Et materiale med høy termisk diffusivitet vil raskere varmes opp/kjøles ned enn et materiale med lav termisk diffusivitet under de samme betingelsene. I en fisk har vann høyere termisk diffusivitet enn fett og en høyere andel vann vil dermed øke varmeledningsevnen, mens fett har lavere termisk diffusivitet og virker isolerende (Dinwiddie 2005). Derfor kan det magreste området, haleenden, fryse mens buksidene forblir myke. Dette forklarer også hvorfor temperaturen til fisken i badet med  $-1.7^{\circ}\text{C}$  var på  $2.2^{\circ}\text{C}$  og  $2.3^{\circ}\text{C}$  selv om fisken var delvis frossen. Dersom temperaturen til halepartiet til fiskene hadde blitt målt kan man tenke seg at denne var lavere, og det er denne temperaturen som burde blitt målt for å se hva som er frysepunktet til fisken. Det er likevel ikke mengde vann eller fett som bestemmer frysepunktet i fisken, kun hastigheten til fryseprosessen. Dersom fiskene hadde ligget lengre i badene ville også bukdelen ha fryst etterhvert. Frysepunktet bestemmes av mengde oppløst stoff (hovedsakelig salter, sukker og syre) i vannfasen i fisken (Hui 2006). Frysepunktet vil kunne variere noe i ulike deler av fisken. Musklene til fisk kan deles inn i to typer; hvit og rød muskel. Mesteparten av muskelen er hvit muskel, mens den røde muskelen er plassert rett innenfor skinnen til fisken. Når fisken svømmer i normalt tempo er det kun den røde muskelen som brukes, mens den hvite muskelen brukes dersom fisken har behov for mye energi og vil føre til utmattelse (Sumich & Morrissey 2004). Den røde muskelen har en høyere konsentrasjon av glykogen i sarkoplasma. Etter avliving av fisken vil glykogenet brytes ned til glukose som kan bidra til å øke konsentrasjonen av oppløste stoffer i den intracellulære væsken, og dermed senke frysepunktet (Buttkus 1963). Den røde muskelen er tykkest rundt midten av siden på fisken og kan være litt av grunnen til at denne delen var mykere mens halepartiet hadde fryst. I de sløyde røyene vil det være den ekstracellulære væsken som fryser først, siden den har en lavere konsentrasjon av oppløste stoffer. Innholdet i den ekstracellulære væsken blir regulert av homeostase, som betyr at den har samme konsentrasjon i hele fisken. Det er derfor mest sannsynlig at buksidene hovedsakelig var myke på grunn av at de er isolert av fett ettersom også den røde muskelen inneholder ekstracellulær væske som vil fryse (Fellows 2000).

Dette forsøket ble utført på røye. I videre forsøk skal laks benyttes, men man kan ta utgangspunkt i at frysepunktet til disse to fiskeartene er relativt likt ettersom de har liknede sammensetning av vev. Ut i fra dette forsøket kan man observere at kuldebadet ikke kan være  $-1.7^{\circ}\text{C}$  eller kaldere. Ettersom det ikke ble observert noen grad av frysing ved  $-1.5^{\circ}\text{C}$  verken i dette forsøket eller i forsøk 5 kan man ta utgangspunkt i at dette er den kaldeste temperaturen som kan benyttes til nedkjølingen. Likevel, ettersom det var såpass små marginer ( $0.1$  til  $0.2^{\circ}\text{C}$ ) som bestemte om fisken fryste eller ikke kan det være lurt å ha enda litt høyere temperaturer i badene, spesielt siden fisken skal ligge i badet over lengre tid. Termometeret som ble brukt har en nøyaktighet på  $\pm 0.2\% + 0.6^{\circ}\text{C}$  som betyr at temperaturen i badet kan ha vært litt høyere eller lavere enn det som ble målt (TENMA 2007). Denne nøyaktigheten gir en usikkerhet på  $\pm 0.603 \approx 0.6^{\circ}\text{C}$  innenfor det temperaturområdet som ble benyttet i forsøket. Etter å ha tatt hensyn til dette ble det valgt å gå ut ifra en minimumstemperatur på  $-1.4^{\circ}\text{C}$  i kuldebadene for å sikre at fisken ikke fryser.

Forsøket kan dermed konkluderes med at laveste temperatur som kan benyttes på kuldebadene er  $-1.4^{\circ}\text{C}$ . Da burde det være mulig å overføre fisker til badet direkte etter slakt uten at de fryser.

## **11. Forsøk 7: Nedkjøling av atlantisk laks ved bruk av kuldebad på 0 og $-1.4^{\circ}\text{C}$**

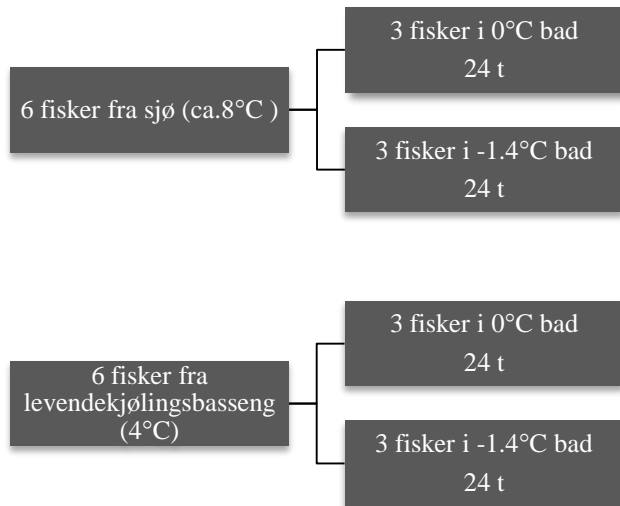
### **11.1 Innledning**

Hensikten med dette forsøket var å undersøke hvordan rigor mortis utvikler seg i atlantisk laks ved bruk ulike nedkjølingsmetoder etter slakt. Oppsett og betingelser for dette forsøket har blitt bestemt ut ifra observasjoner fra de tidligere forsøkene med røye. To kuldebad, et på  $0^{\circ}\text{C}$  og et på  $-1.4^{\circ}\text{C}$  ble benyttet for å undersøke hvordan kjøling ved disse temperaturene påvirker rigorutviklingen. For å kunne sammenlikne gradvis og direkte nedkjøling ble både levendekjølt laks og laks tatt fra pumpe fra ventemerde benyttet i forsøket.

### **11.2 Materialer og metoder**

Forsøket ble utført 28. og 29. januar på Bremnes Seashore AS sitt slakteri på Bømlo. To kuldebad på ca. 700 liter ble benyttet i forsøket, et på  $0^{\circ}\text{C}$  og et på  $-1.4^{\circ}\text{C}$ . Badene ble fylt med RSW på  $2^{\circ}\text{C}$  og knust is til de ønskede temperaturene var oppnådd. Badene bestod av hard plast med lokk, og var plassert utendørs i en lufttemperatur som sank fra  $5.6$  til  $3.5^{\circ}\text{C}$  under forsøket. Forsøket ble utført på til sammen 12 atlantisk laks av SalmoBreed stamme. Laksen var klekket 03.12.12, overført til sjø 10.04.13 og hadde en gjennomsnittsvekt på  $3.97$  kg. Fiskene hadde blitt sultet i 10 dager og oppholdt seg 2 dager i ventemerden da de ble tatt ut til forsøket.

Seks laks fra pumpe fra ventemerde (ca.  $8^{\circ}\text{C}$ ) og seks laks fra levendekjølingsbasseng (RSW,  $4^{\circ}\text{C}$ ) ble avlivet med slag mot hodet mellom kl. 08:50 og 09:30 28. januar. Laksen som ble hentet fra levendekjølingsbassenget ble avlivet først. Deretter ble fiskene kjølt ned som beskrevet i figur 16.



**Figur 16 Beskrivelse av forsøksoppsettet.**

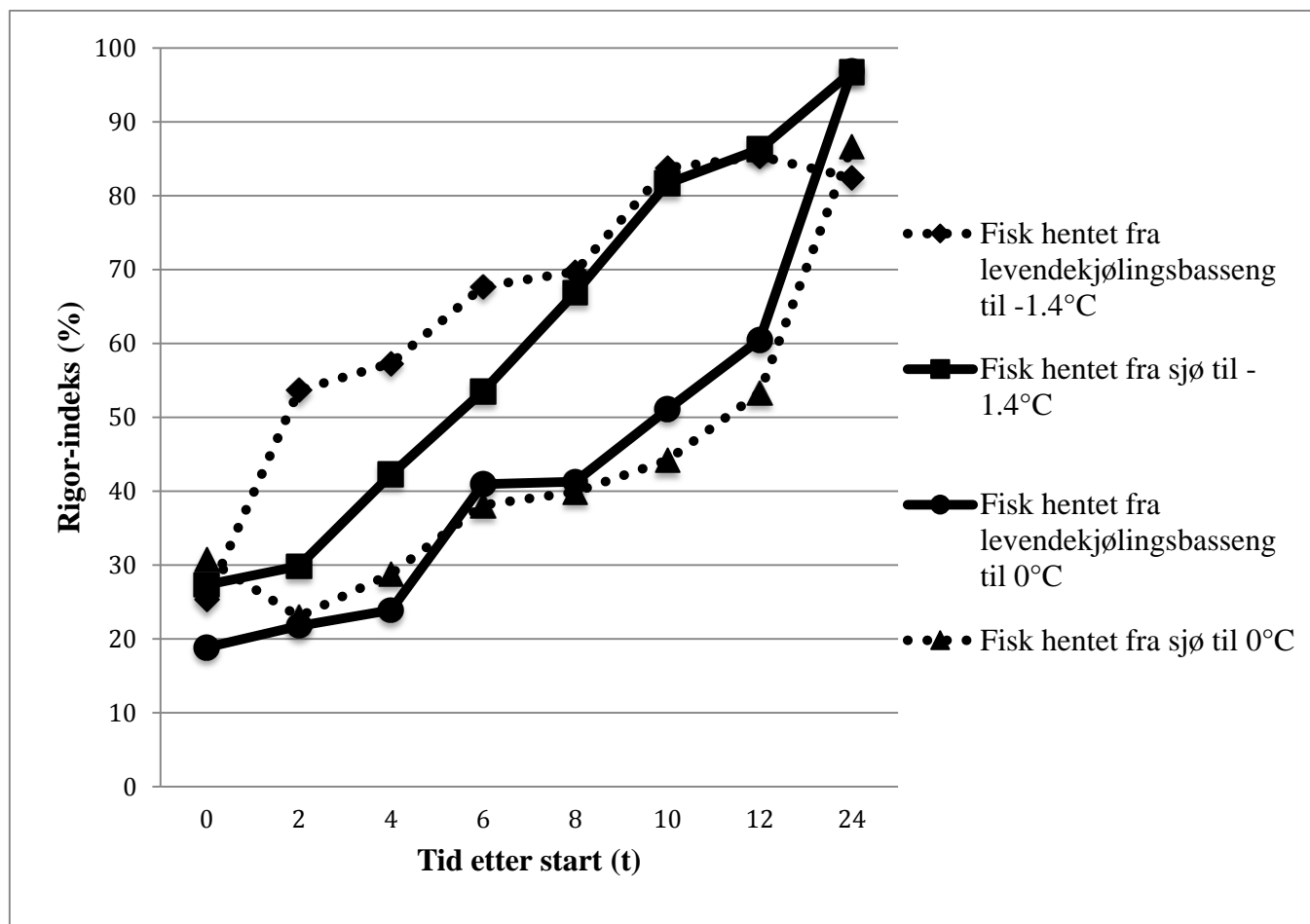
Grad av rigor i fiskene ble målt ved å beregne rigor-indeks slik som i forsøk 5, men en annen metode å måle  $L_t$  ble benyttet.  $L_t$  ble målt ved å måle lengden fra halefinnen ned til gulvet og trekke dette fra høyden på bordet fiskene ble lagt på, for at det skulle være enklere å måle nøyaktig.  $L_0$  og første måling av  $L_t$  ble utført rett etter avliving, og deretter ble  $L_t$  til alle fiskene målt hver andre time til 12 timer etter forsøkets start, og en siste gang etter 24 timer.

Temperaturen til en fisk fra levendekjølingsbassenget og en fra sjø i de to kuldebadene ble målt første gang etter to timer og deretter samtidig som  $L_t$ . Temperaturen ble alltid målt av samme fisk, ved å stikke sensoren i tykkmuskelen til fisken. Temperaturen til vannbadene ble også målt samtidig som fiskene. Dersom det var nødvendig ble mer RSW tilsatt for at ikke temperaturen i badene skulle bli for lav. Det ble rørt regelmessig i badene. Alle temperaturmålingene ble utført med termometeret fra TENMA.

For å undersøke om de ulike nedkjølingsmetodene gav signifikante forskjeller i rigor-indeks ble resultatene analysert ved bruk av variansanalyse (enveis ANOVA). ANOVA testen ble utført for hver av målingstidspunktene til rigor-indeksen under forsøket. Dersom det var observert signifikante forskjeller ble en Tukey contrasts test utført for å se mellom hvilke av nedkjølingsmetodene forskjellen ligger. Et signifikansnivå på 5% ble benyttet i begge testene. De statistiske analysen ble utført i *R* (<http://www.r-project.org/>) med tilleggspakken *R commander* for NMBU.

### 11.3 Resultater

Figur 17 viser hvordan den gjennomsnittlige rigor-indeksen til fiskene som ble kjølt ned ved bruk av de ulike metodene utviklet seg gjennom forsøket.



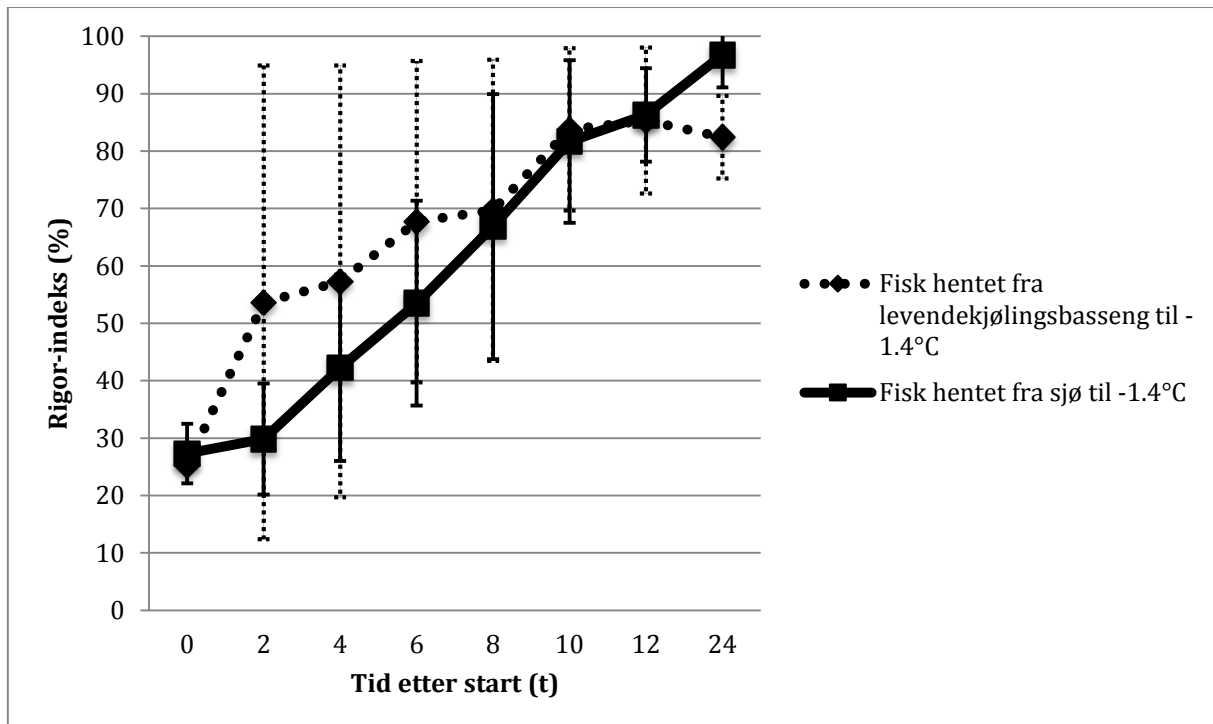
Figur 17 Gjennomsnittlig rigor-indeks til fiskene som ble kjølt ned ved bruk av de ulike nedkjølingsmetodene. Verdiene er beregnet ut ifra data i vedlegg 4 og 5.

Fiskene som ble kjølt ned i 0°C badet hadde generelt en lavere gjennomsnittlig rigor-indeks enn fiskene som ble lagt i -1.4°C badet under hele forsøket unntatt ved den siste målingen, hvor rigor-indeksen til fiskene fra levendekjølingsbassenget som ble lagt i -1.4°C badet hadde sunket litt. Av fiskene som ble lagt i -1.4°C badet var det fiskene fra levendekjølingsbassenget som viste høyest gjennomsnittlig rigor-indeks. En av fiskene i denne gruppen hadde fryst slik at den var helt stiv to timer etter forsøkets start og fikk dermed en rigor-indeks på 100% under resten av forsøket bortsett fra den siste målingen (se vedlegg 4). For fiskene i 0°C badet var det liten forskjell mellom fisk fra levendekjølingsbasseng og fisk fra sjø. Alle fiskene hadde gjennomsnittlig samme rigor-indeks ved start av forsøket (ca. 27%) bortsett fra fiskene hentet fra levendekjølingsbasseng og lagt i 0°C badet som hadde en rigor-indeks som var omtrent 10% lavere. Den høyeste gjennomsnittlige rigor-indeksen (ca.

97%) ble målt etter 24 timer i fiskene fra levendekjølingsbassenget som ble plassert i 0°C badet og i fiskene fra sjø som ble plassert i -1.4°C badet.

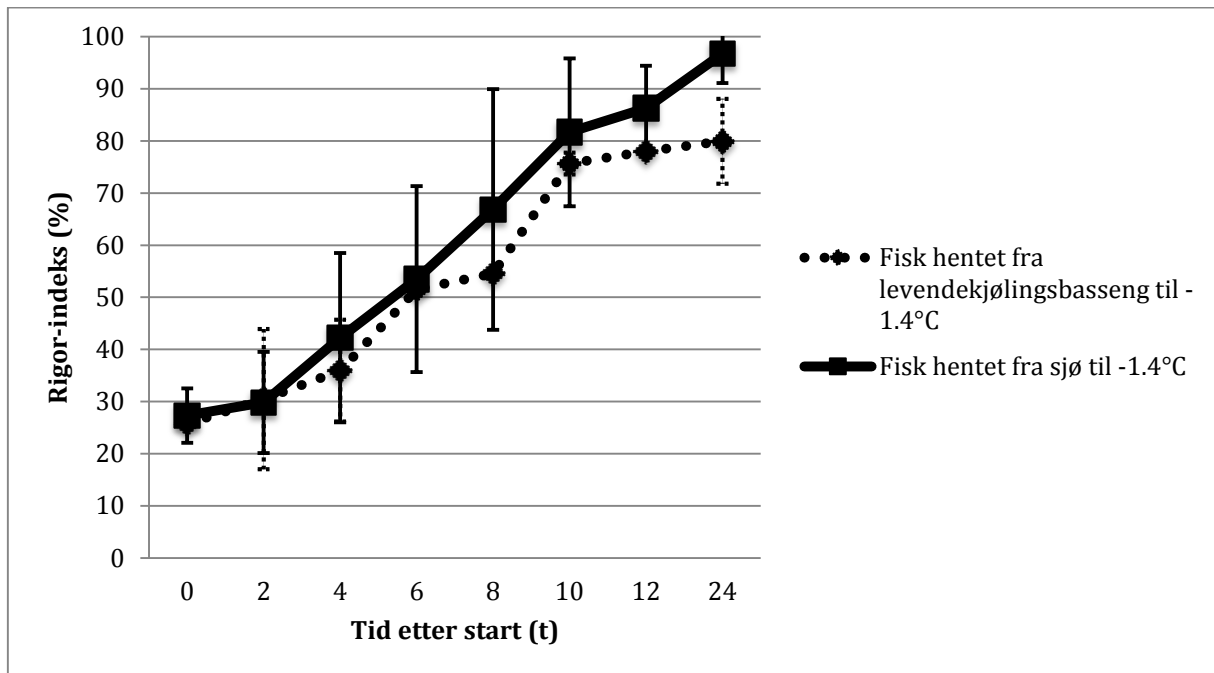
De statistiske analysene viste at det var det kun den ved første målingen at rigor-indeksen var signifikant forskjellig for de ulike nedkjølingsmetodene. Tukey contrast testen viste at det var fisk fra levendekjølingsbassenget og fisk fra sjø som ble lagt i 0°C badet som hadde en signifikant ulik rigor-indeks ved dette tidspunktet. Resultatet fra alle de statistiske analysene er presentert i vedlegg 6.

Figur 18 og 19 viser gjennomsnittlig rigor-indeks med standardavvik for fiskene fra sjø og levendekjølingsbasseng i kuldebadet med -1.4°C, henholdsvis med og uten fisken som var frossen.



**Figur 18** Gjennomsnittlig rigor-indeks til fiskene fra levendekjølingsbasseng og sjø som ble lagt i -1.4°C badet med standardavvik for hver av målingene. Verdiene er beregnet ut ifra data i vedlegg 4.

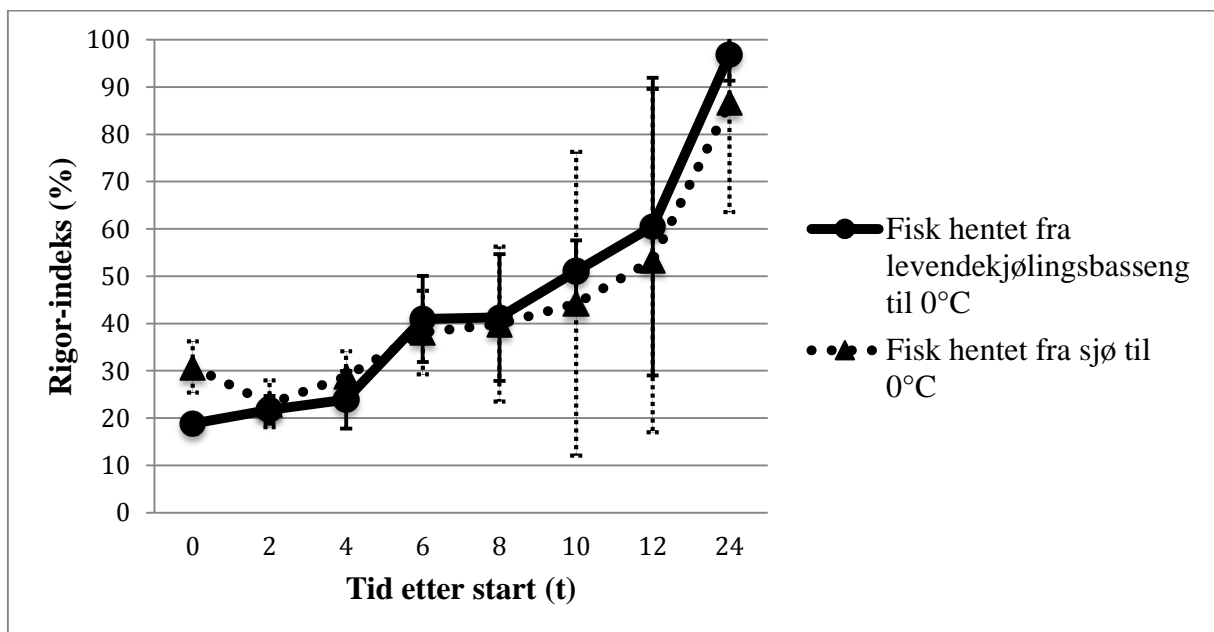
Den gjennomsnittlige rigor-indeksen til fisken som ble hentet fra levendekjølingsbassenget hadde en tendens til å være høyere enn til fisken som ble tatt fra sjø de 10 første timene etter slakt. Ved slutten av forsøket ble det observert en liten nedgang i rigor-indeksen til fisken fra levendekjølingsbassenget. Standardavviket til rigor-indeksen til fiskene fra var svært høy for begge nedkjølingsmetodene, spesielt for fisken fra levendekjølingsbassenget mellom 2 og 8 timer etter start.



Figur 19 Gjennomsnittlig rigor-indeks til fiskene fra levendekjølingsbasseng og sjø som ble lagt i -1.4°C badet med standardavvik for hver av målingene. Fiskene som var frosne er ikke tatt med. Verdier er beregnet ut ifra data i vedlegg 4.

Ved å ikke ta med beregnet rigor-indeks til fisken som var frosne endrer resultatene seg og kan man observere at fiskene tatt fra levendekjølingsbasseng og sjø hadde en tilnærmet lik gjennomsnittlig rigor-indeks. Standardavviket til fiskene fra levendekjølingsbassenget er nå betydelig mindre og det er ingen nedgang i rigor-indeks ved den siste målingen.

Figur 20 viser gjennomsnittlig rigor-indeks med standardavvik for fiskene fra sjø og levendekjølingsbasseng i kuldebadet med 0°C.

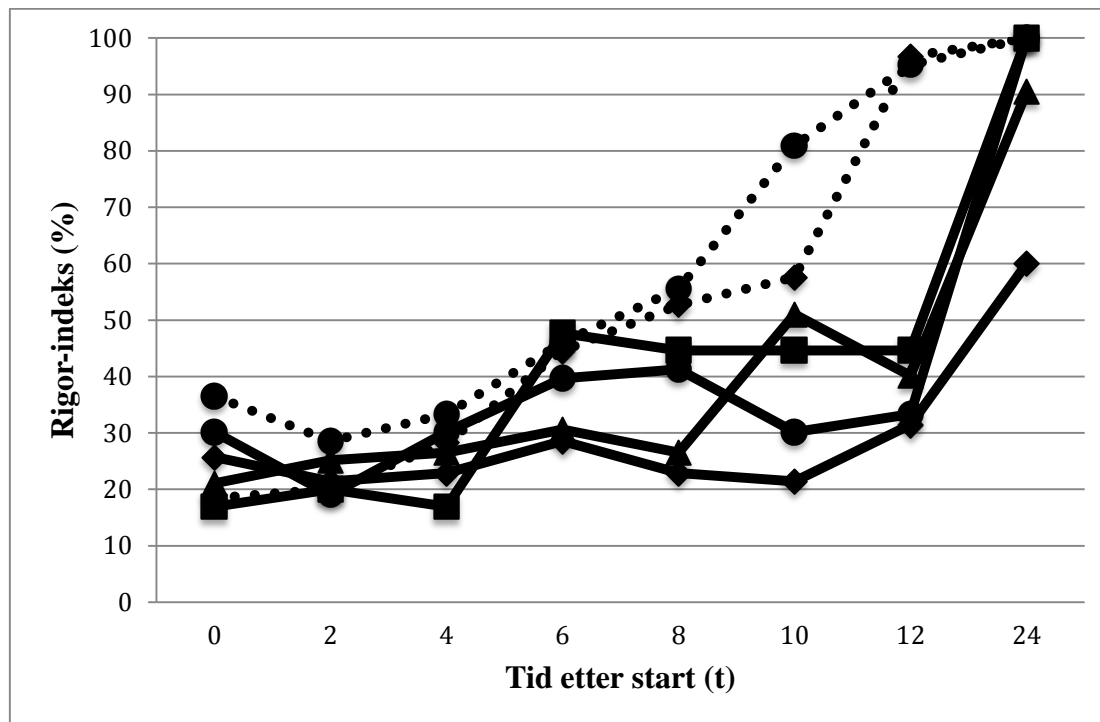


Figur 20 Gjennomsnittlig rigor-indeks til fiskene fra levendekjølingsbasseng og sjø som ble lagt i 0°C badet med standardavvik for hver av målingene. Verdier er beregnet ut ifra data i vedlegg 5.



Gjennomsnittlig rigor-indeks til fiskene som ble hentet fra sjø og fiskene som ble hentet fra levendekjølingsbasseng var veldig lik gjennom forsøket. Mellom 10-12 timer etter start kan man ut ifra det store standardavviket observere at det var det svært stor variasjon mellom fiskene som ble nedkjølt ved bruk av samme metode, spesielt for fiskene hentet fra sjø.

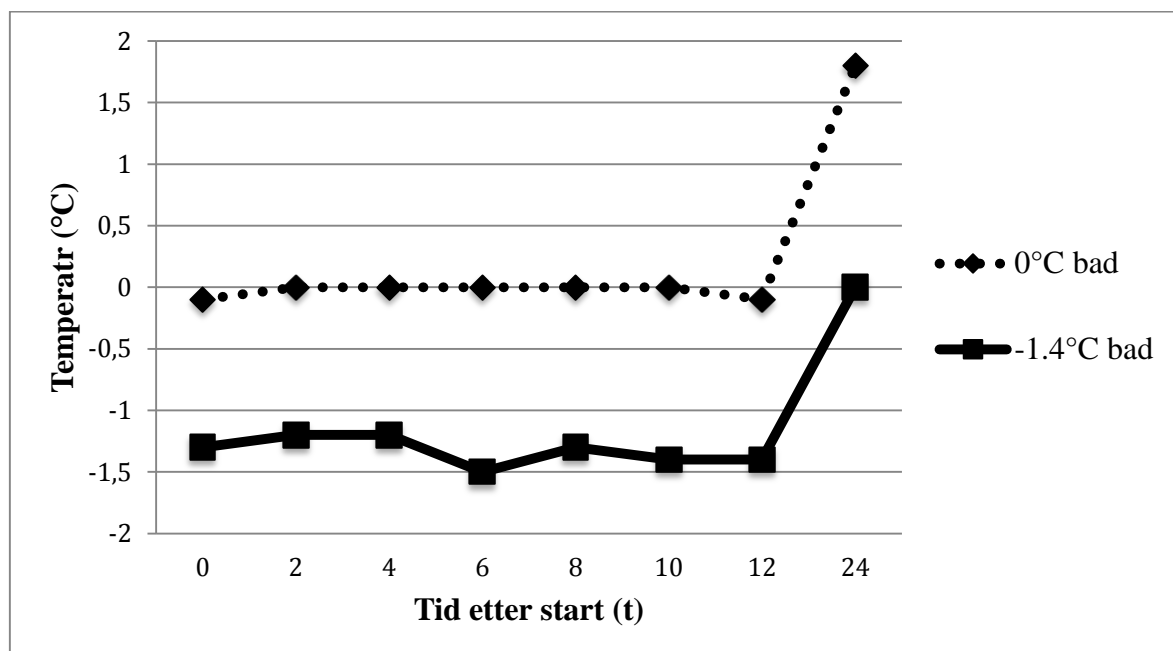
Figur 21 viser rigor-indeks til alle fiskene i kuldebadet med 0°C.



Figur 21 Beregnet rigor-indeks til alle fiskene i kuldebadet med 0°C. Prikkete linje viser at det ble målt temperatur av fisken. Rigor-indeks er beregnet ut ifra data i vedlegg 5.

Fra figuren kan man observere at de to fiskene det ble målt temperatur av hadde en høyere rigor-indeks i den siste delen av forsøket enn resten av fiskene.

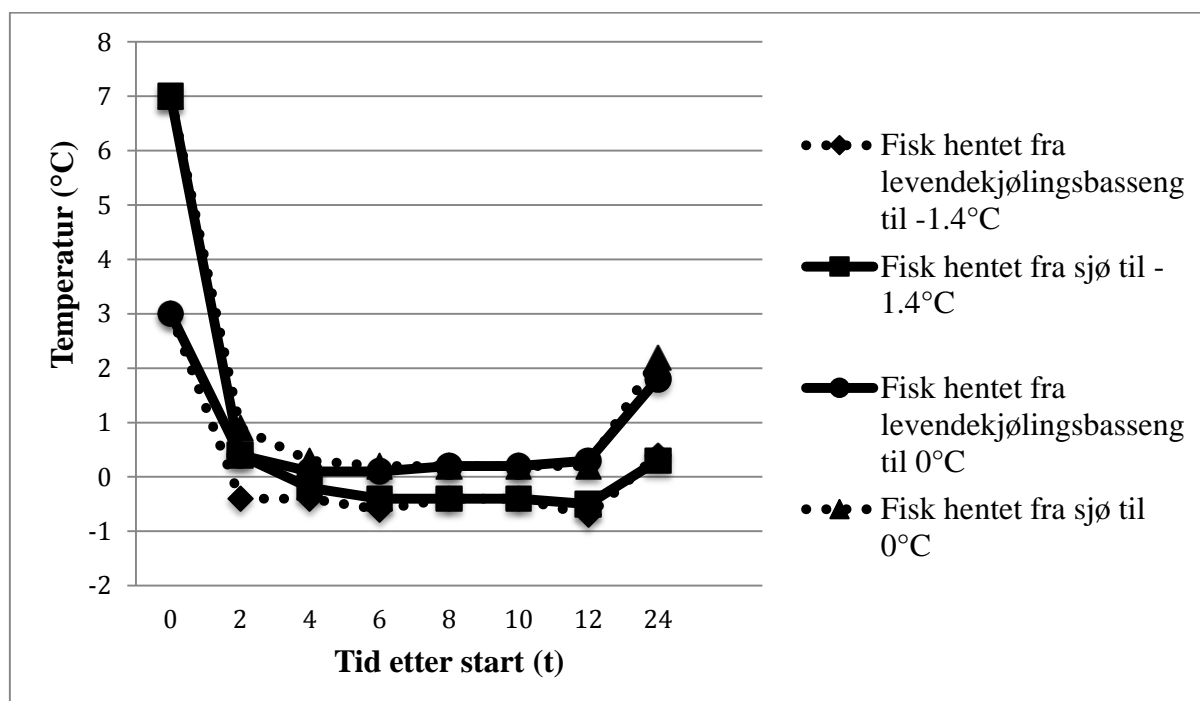
Resultatet av temperaturmålingene av kuldebadene er presentert i figur 22.



**Figur 22** Temperaturene målt i kuldebadene under forsøket.

Temperaturen i vannbadene holdt seg relativt konstant gjennom forsøket, bortsett fra ved den siste målingen hvor temperaturen i begge badene hadde steget med ca. 1.5°C.

Figur 23 viser hvordan kjernetemperaturen til de fiskene sank for de ulike nedkjølingsmetodene.



**Figur 23** Målt temperatur i en av fiskene fra hver av de ulike nedkjølingsmetodene under forsøket. Starttemperatur (0 t) er ca. temperatur på fiskene, 1 grad under vanntemperatur, ettersom første temperaturmåling ble utført etter 2 timer.

Temperaturen til alle fiskene sank raskt da de ble lagt i kuldebadene. Både fisken fra

levendekjølingsbasseng og fisken fra sjø i 0°C badet stabiliserte seg på ca. -0.2°C. Fiskene som ble lagt i -1.4°C badet hadde generelt en lavere temperatur, hvor laveste målt verdi var -0.7°C (etter 12 timer). Denne temperaturen ble målt i fisken som var frossen. Temperaturen til fiskene steg etter 24 timer i likhet med temperaturen til kuldebadene. Det var ikke like stor temperaturforskjell mellom fiskene som det var mellom de to kuldebadene under forsøket.

## 11.4 Diskusjon

Fra rigor-indeks beregningene i dette forsøket kan man observere fisken som ble lagt i -1.4°C badet hadde en tendens til å ha høyere gjennomsnittlig rigor-indeks enn fisken i 0°C badet gjennom forsøket, men det var ikke en statistisk signifikant forskjell mellom noe av nedkjølingsmetodene. Grunnen til dette er de store standardavvikene til rigor-indeks målingene (se figur 18 og 20). Størrelsen på standardavvikene indikerer at det var store individuelle forskjeller mellom fiskene. Kun tre fisk ble kjølt ned ved hver av de forskjellige nedkjølingsmetodene i forsøket. Ved å måle rigor av flere fisk ville man kunne sett tydeligere om rigorutviklingen var forskjellig ved de ulike nedkjølingsmetodene dersom standardavviket hadde blitt mindre. I tillegg ble fisken som var frossen tatt med i de statiske beregningene, som forklarer mye av variasjonen i rigor-indeks mellom fiskene fra levendekjølingsbassenget som ble kjølt ned i -1.4°C badet. Rigor-indeks verdiene til (Wang et al. 1998) hadde også store standardavvik, selv om flere fisk (17) ble benyttet i forsøket. Dette ble forklart med at fiskene var av forskjellig størrelse og hadde et ulikt stressnivå ved slakt. Det at like store standardavvik ble observert i dette forsøket kan tyde på at individuelle forskjeller mellom fiskene har mer å si for utvikling av rigor enn nedkjølingstemperatur ved de temperaturene som ble benyttet i badene. Likevel kan man observere at fisken i det kaldeste badet hadde en tendens til å bli raskere stive enn fisken i 0°C badet. Denne tendensen er omvendt enn det som ble observert av (Kiessling et al. 2006), hvor rigor ble utsatt ved synkende temperaturer ved lagring i mellom 4 og 24°C. Om stivheten til fisken i -1.4°C badet kommer av at den var delvis frossen eller fordi den var i rigor er det vanskelig å si noe sikkert om. Dersom man skulle ha funnet ut av dette under forsøket kunne man ha tatt blodprøve av fiskene i de to badene og målt mengde laktat og glykogen i blodet, eller ved å analysere en prøve av fiskemuskelen for å bestemme mengde ATP og CP (creatin phosphate). Høye nivåer av laktat og lave nivåer av glykogen, ATP og CP indikerer større grad av rigor, og forskjeller i verdier mellom fiskene i de to badene ville indikert at rigor hadde blitt påvirket av nedkjølingstemperatur (Mørkøre et al. 2008; Skjervold et al. 1999). Ettersom det ble målt temperaturer som var lavere enn ønsket temperatur i badet (se figur 21) og siden den ene fisken hadde fryst er det en mulighet for at de andre fiskene også var delvis frosne. Lavest

mulig sjøtemperatur laks kan leve i er  $-0.7^{\circ}\text{C}$ , ettersom dette er frysepunktnedsettelsen til blodet i laksen (saltinnhold 9-10 ‰) (Pennell & Barton 1996). Siden laksen i dette forsøket kun ble avlivet og ikke bløgget kan grunnen til at den ble oppfattet som stivere i det kaldeste bade være fordi blodet hadde fryst.

En annen mulighet er at laksen i det kaldeste badet var stiv fordi fett i fisken hadde begynt å stivne. Atlantisk laks består av ca. 3% mettede fettsyrer, 5.9% enumettede fettsyrer og 5% flerumettede fettsyrer. Mettede fettsyrer har et høyt størkningspunkt og er vanligvis faste i romtemperatur fordi de består av lange rette molekylkjeder som kan danne en krystallinsk struktur. Enumettede og flerumettede fettsyrer har kortere molekylkjeder og dobbeltbindinger som senker størkningspunktet ettersom de ikke kan "pakkes" på samme måte som de mettede fettsyrene. Siden fett i laks består av mye umettet fett vil det ha et lavt størkningspunkt, som er naturlig ettersom fisken må tåle lave vanntemperaturer (Matvaretabellen 2014a; Penfield & Campbell 1990). Den røde muskelen til fisken har et høyere fettinnhold enn den hvite muskelen (Alexander 1981). Ettersom den røde muskelen ligger som et lag under skinnet til fisken vil det være mulig at dersom fett hadde begynt å størkne kan fisken oppleves som stiv og få en høy rigor-score slik som observert i dette forsøket. I forsøk 6 ble det ikke observert en slik stivhet, men heller at de delene av røyen med mest fett stivnet minst. Dette kan være fordi røyen har et mindre innhold av fett (7%) og en annen komposisjon av fettsyrer, og vil derfor kunne stivne ved en annen temperatur (Matvaretabellen 2014b).

Dersom man går ut ifra at fiskene i  $-1.4^{\circ}\text{C}$  badet var stiv fordi de var i rigor, kan dette skyldes at enzymene som er involvert i nedbrytningen av ATP er temperaturavhengige. Det har blitt observert at for flere fiskearter i subtropisk klima vil pre rigor tiden kunne økes ved lagring ved lavere temperaturer til man kommer til temperaturer under  $10^{\circ}\text{C}$ , hvor rigor vil inntreffe raskere. Dette forklares av en økt  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP-ase aktivitet (avsnitt 3.4.3). Disse fiskene lever i et subtropisk klima med høyere vanntemperatur enn det den atlantiske laksen lever i. Dersom liknende enzymaktivitet gjelder for laks, kan man se for seg at temperaturer under  $0^{\circ}\text{C}$  vil gi en økt enzymaktivitet og en "kald rigor" tilsvarende den som har blitt observert for de subtropiske fiskene. Dette betyr at ved lagring ned mot  $0^{\circ}\text{C}$  vil rigor utsettes, mens ved temperaturer lavere enn dette igjen vil rigor kunne fremskyndes. For å verifisere at dette stemmer kan man måle enzymaktivitet i fiskemuskel ved de ulike temperaturene.

Det ble ikke observert noen forskjell for rigorutviklingen mellom fiskene som var levendekjølt eller hentet fra pumpe fra ventemerd. Fiskene som var hentet fra pumpen kan

man forvente at er i en mer stresset tilstand enn fiskene fra levendekjølingsbassenget, slik at et lavere glykogenlager gjør at rigor vil inntreffe raskere. Det at levendekjøling ikke gav noen tydelig effekt på rigorutviklingen indikerer at levendekjøling i praksis ikke er så effektivt som man ønsker. Ettersom levendekjøling også trenger fisken vil den ikke bli fullstendig roet ned. I tillegg er vannkvaliteten i levendekjølingsbassenget ofte ikke god nok som et resultat av trengingen (for lite  $O_2$  og oppsamling av metabolske avfallsstoffer), noe som vil bidra til å stresser fisken (Erikson et al. 1997). Fiskene som ble hentet fra levendekjølingsbassenget hadde tilbrakt varierende tid i bassenget. Dette vil gi ulikt stressnivå ved slakt og forklare en del av variasjonen i beregnet rigor-indeks mellom fiskene fra levendekjølingsbassenget som ble nedkjølt i samme bad. Dersom man hadde benyttet seg kun av fisk som var ”ferdig” levendekjølt ville det kanskje vært mulig å se en tydelige effekt levendekjølingen i rigor-indeksen til fiskene.

I figur 21 kan man se at de to fiskene det ble målt temperatur av hadde en høyere rigor-indeks enn de andre fiskene mellom 8-24 timer etter start av forsøket, noe som gjenspeiles i det store standardavviket til den gjennomsnittlige rigor-indeksen i  $0^{\circ}C$  kuldebadet. Det samme ble observert for  $-1.4^{\circ}C$  badet, der fisken det ble målt temperatur av hadde lavest  $L_t$  verdier, som gir høyest rigor-indeks (se vedlegg 5). Temperaturen ble målt ved å stikke sensoren ganske dypt inn i tykkmuskel på fisken slik at den skadet muskelcellene. Dette indikerer at liknede behandling av muskel, som kutting og skjæring, vil kunne fremskynde rigor. En skadet muskelcelle vil sekretere myoglobin som øker aktiviteten til flere enzymer, blant annet creatin kinase (CK) og laktat dehydrogenase (LDH). CK katalyserer omdannelsen av creatin phosphate til creatin; en prosess som krever ATP. LDH katalyserer omdannelse av pyruvat til laktat. En forhøyet aktivitet av disse enzymene vil bidra til å fremme rigor og et sterkere pH fall i muskelen, ved raskere ATP reduksjon og økning av laktat (Devarajan 2014; Fox et al. 2006). For å unngå å få denne effekten i resultatene burde temperatur blitt målt ved bruk av en annen metode eller eventuelt blitt målt av fisk som ikke skal brukes til å beregne rigor-indeks. Dette ville bidratt til å minske standardavviket til rigor-indeks målingene.

Høyest gjennomsnittlig rigor-indeks for alle nedkjølingsmetodene ble målt i fiskene etter 24 timer dersom man ser bort ifra målingene til fisken som var frossen. Denne fisken viste en nedgang i rigor-indeks fra 12 til 24 timer. Dette kan forklares med at den hadde tint ettersom vanntemperaturen steg med ca.  $1.5^{\circ}C$  i dette tidsrommet. Fiskene hadde høy grad av rigor da forsøket ble avsluttet. Dette stemmer med observasjonene til (Wang et al. 1998) som beskriver en maks styrke av rigor etter ca. 25 timer for atlantisk laks. For subtropiske fisker

har det blitt observert at dersom fisken går inn i "kald rigor" vil rigor ha høyere maksstyrke og være raskere over (Iwamoto et al. 1987; Lee et al. 1998). Den høyeste gjennomsnittlige rigor-indeksen målt i dette forsøket ble målt i fisken fra sjø i  $-1.4^{\circ}\text{C}$  bassenget og i fisken fra levendekjølingsbasseng i  $0^{\circ}\text{C}$  badet, men disse målingene var ikke signifikant forskjellige fra de andre nedkjølingsmetodene. Det ble dermed ikke observert noen sammenheng mellom de ulike nedkjølingsmetodene og maks styrke på rigor, i hvert fall ikke i løpet av det tidsrommet hvor målinger ble utført. Om rigor gikk raskere over i fisken som ble lagt i kaldeste badet kan man ikke si noe om ut ifra resultatene fra dette forsøket, ettersom fisken fortsatt var i rigor da forsøket ble avsluttet.

Ved sammenlikning med resultatene fra forsøk 5 kan man observere at kjøletemperaturene hadde en annerledes effekt på rigorutviklingen for laks enn for røye. Rigorutviklingen som ble observert i laksen var også mer som forventet ettersom den kun steg i tiden etter slakt. I forsøk 5 var det fisken i det kaldeste badet som hadde lavest rigor-indeks, mens i dette forsøket var det omvendt. I forsøk 5 hadde alle fiskene en rigor-indeks på mellom 24-30% etter to timer (figur 13). Dette stemmer godt med rigor-indeksen til fiskene i dette forsøket ved samme tidspunkt, som var mellom 20 og 30%, bortsett fra fiskene fra levendekjøling som ble lagt i  $-1.4^{\circ}\text{C}$  badet. De hadde en betydelig høyere gjennomsnittlig rigor-indeks på litt over 50%. Dette er fordi den frosne fisken ble tatt med i beregningen. Dersom man ser bort ifra denne fisken hadde fiskene fra levendekjølingsbassenget en gjennomsnittlig rigor-indeks på ca.30%. Etter 6 timer hadde all laksen en høyere rigor-indeks enn det som ble beregnet for røyen i forsøk 5. Som nevnt tidligere kan det være frossent blod som gjorde at laksen i det kaldeste badet hadde en høy grad av rigor. Ettersom røyen var blødd ut er det mulig at fryser ved en lavere temperatur og at den derfor hadde en lavere rigor-indeks. Men dette forklarer ikke hvorfor laksen  $0^{\circ}\text{C}$  også hadde en større gjennomsnittlig rigor-indeks enn røyen. Dette betyr at andre faktorer som fysiologiske forskjeller mellom de to artene, ulike forsøksbetingelser og ulik behandling av fisken før slakt er med på å forklare hvorfor rigor kurvene fra de to forsøkene er ulike. En annen forklaring kan være unøyaktighet i målingene i forsøk 6. I dette forsøket ble en enklere metode benyttet til å måle  $L_t$  som kan ha gitt mer nøyaktige resultater. Som nevnt tidligere tyder standardavvikene til rigor målingene på at det er en individuell variasjon mellom fiskene. I forsøk 6 ble bare en fisk benyttet ved hver nedkjølingsmetode og dette er ikke tilstrekkelig for å gi et presist nok mål på temperaturavhengigheten til rigorutviklingen i røyen. Dersom flere fisk hadde blitt benyttet i forsøk 5 hadde man hatt et bedre grunnlag for sammenlikne resultatene fra det forsøket med resultatene fra dette forsøket.

I figur 22 kan man se at badene holdt godt på temperaturen og kun små endringer ble observert i løpet av de første 12 timene, sannsynligvis på grunn av at lufttemperaturen endret seg. Mellom 12-24 timer steg temperaturen i begge badene med ca.  $1.5^{\circ}\text{C}$  ettersom badene stod uten å bli fylt på med is. Temperaturmålingene av fiskene viste at etter omtrent 6 timer hadde fisk hentet fra levendekjølingsbasseng og sjø blitt nedkjølt til lik temperatur. Temperaturen til fiskene i  $-1.4^{\circ}\text{C}$  badet stabiliserte seg på ca.  $-0.5^{\circ}\text{C}$  og temperaturen til fiskene i  $0^{\circ}\text{C}$  badet stabiliserte seg på  $-0.2^{\circ}\text{C}$ . Av fiskene fra levendekjølningsbassenget som ble lagt i  $-1.4^{\circ}\text{C}$  badet var det fisken som fryste som temperaturen ble målt av. Denne fisken hadde den raskeste nedkjølingsraten og lavest kjernetemperatur gjennom forsøket. Hvorfor denne fisken fryste slik at den ble helt stiv mens resten av fiskene i samme gruppe ikke gjorde dette er mest sannsynlig et resultat av ulik størrelse og fettinnhold som påvirker varmeoverføringen i fiskene. Det er også mulig at denne fisken hadde tilbrakt lengre tid i levendekjølingsbassenget enn de andre fiskene og derfor hadde en lavere utgangstemperatur. Dette viser hvor små temperaturforskjeller som skal til før fisken begynner å fryse og at det er viktig å ha fullstendig kontroll over dette ved produksjon av ferske produkter.

Forsøket konkluderes med at de ulike nedkjølingsmetodene ikke gav signifikante forskjeller i rigor-indeks til laksen. Grunnen til dette er at variasjonen i rigor-indeks mellom fiskene som ble kjølt ned ved bruk av samme metode var svært stor. Likevel ble det observert at fiskene i kuldebadet med  $-1.4^{\circ}\text{C}$  hadde en tendens til å ha høyere rigor-indeks enn fiskene lagt i  $0^{\circ}\text{C}$  badet. Om denne stivheten kommer av at fiskene var i rigor eller av at de var delvis frosne kan undersøkes nærmere.

## 12. Forsøk 8: Grad av frysing i atlantisk laks lagret ved $-1.4^{\circ}\text{C}$ etter slakt

### 12.1 Innledning

I forsøk 7 ble det observert at laks lagret i et kuldebad med  $-1.4^{\circ}\text{C}$  de første 24 timene etter slakt hadde en tendens til å bli stivere enn laks lagret i et kuldebad med  $0^{\circ}\text{C}$ . Hensikten med dette forsøket var å undersøke om den observerte stivheten skyldes tidligere utvikling av rigor mortis eller at fiskene vil delvis fryse i det kaldeste badet. Allerede noen timer inn i forsøk 7 hadde fiskene i det kaldeste badet en høyere gjennomsnittlig rigor-indeks enn fiskene i  $0^{\circ}\text{C}$  badet. Ved å kjøle ned fisker ved bruk av et kuldebad med  $-1.4^{\circ}\text{C}$ , og etter 3 timer overføre fiskene til  $0^{\circ}\text{C}$  kan man observere om det skjer en endring i stivhet eller ikke. En fisk som er i rigor vil ikke bli mer fleksibel om lagringstemperaturen endres, mens en frossen fisk vil kunne tine igjen og derfor bli mykere.

### 12.2 Materialer og metoder

Dette forsøket ble utført 25. mars 2015 av Svein Olav Fjæra på Bremnes Seashore sitt slakteri på Bømlo. Forsøket ble utført på 6 atlantisk laks av SalmoBreed stamme. Laksen var klekket 09.01.13, overført til sjø 01.10.13 og hadde en gjennomsnittsvekt på 5.08 kg. Fiskene hadde oppholdt seg 3 dager i ventemerde og hadde blitt sultet i 10 dager da de ble tatt ut til forsøket. To kuldebad med RSW og knust is tilsvarende badene i forsøk 7 ble benyttet som kjølesystemer.

Fiskene som ble brukt i forsøket ble tatt fra pumpen som overfører fisk fra ventemerde til levendekjølingsbassenget. Sjøtemperaturen var på ca.  $7^{\circ}\text{C}$ . Laksen ble avlivet med slag mot hodet og deretter kjølt ned som beskrevet i figur 24.



Figur 24 Beskrivelse av forsøksoppsettet.

Utvikling av stivhet i fiskene ble målt ved å gi fiskene en rigor score (tilsvarende som i forsøk

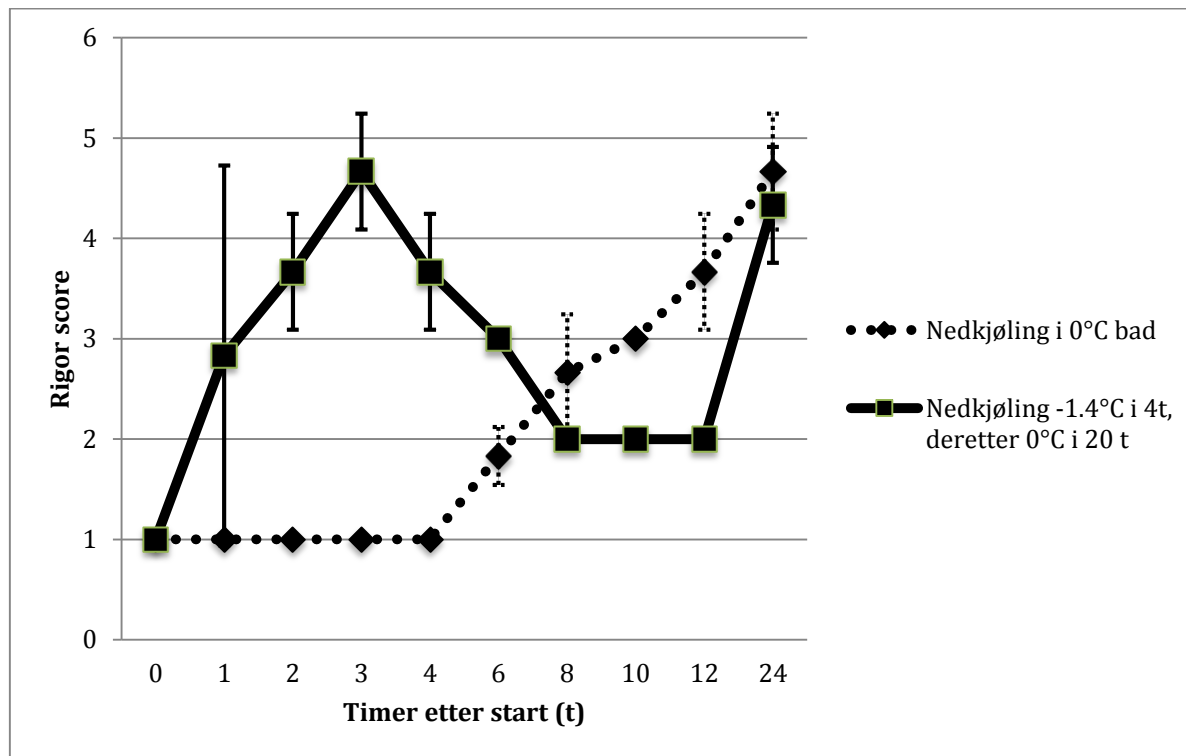


1) rett etter slakt og deretter etter 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 og 24 timer.

Temperaturen på kuldebadene ble målt samtidig som rigor score med et digitalt termometer (Digitron Food, modell FM35).

### 12.3 Resultater

Resultatet av rigor score målingene er presentert i figur 25.

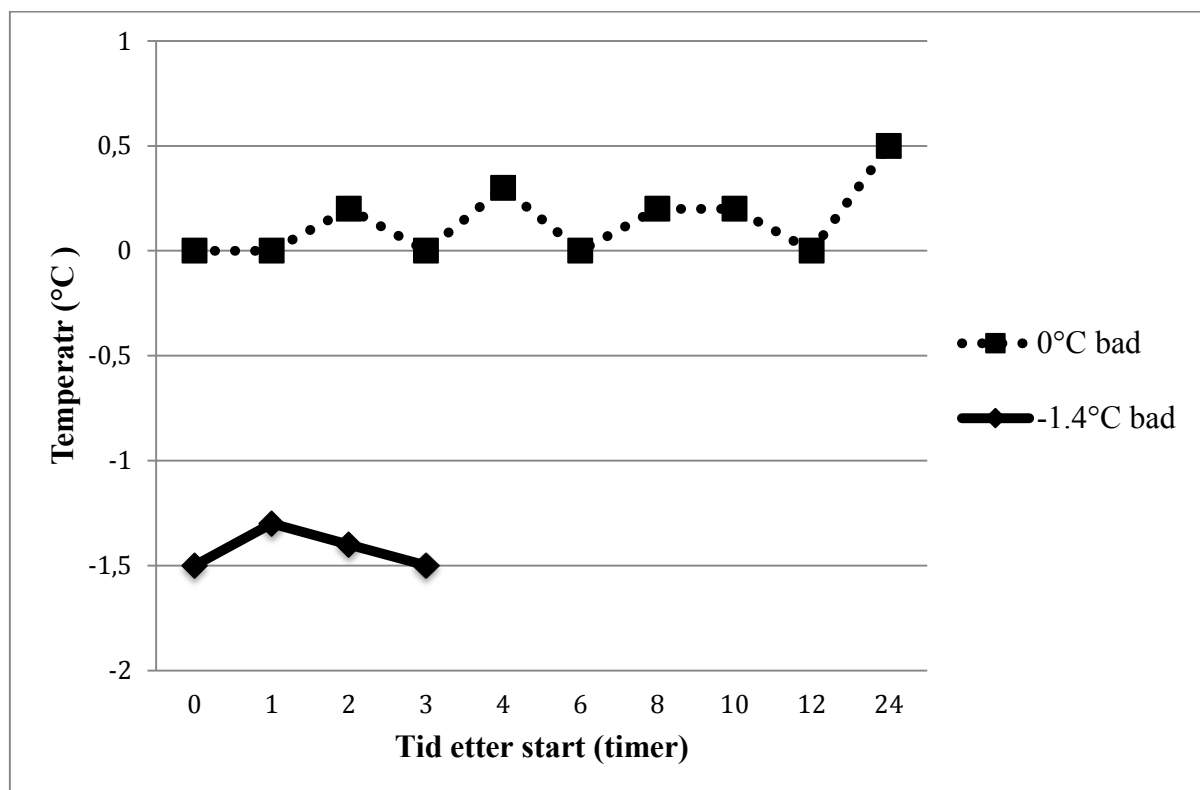


Figur 25 Gjennomsnittlig rigor score til fiskene som ble kjølt ned ved bruk av de to forskjellige metodene med standardavvik til målingene. Verdier er beregnet fra data i vedlegg 7.

Fiskene som ble lagt i det kaldeste badet i 3 timer og deretter overført til 0°C fikk raskt en høy rigor score. Rigor score til disse fiskene nådde et makspunkt etter tre timer, deretter sank den igjen, før den viste en stigning mot slutten av forsøket. Det var en svært stor variasjon i rigor score etter en time. Fiskene som ble kjølt ned i kun 0°C badet hadde en rigor score på 1 frem til fire timer etter start hvor den gradvis begynte å stige til en maksverdi på ca. 4.7 etter 24 timer.



Figur 26 presenterer temperaturmålingene i kuldebadene under forsøket.



Figur 26 Temperaturer målt i kuldebadene under forsøket.

Det var små variasjoner i temperatur i badene under forsøket. 0°C badet steg en halv grad mellom 12 og 24 timer ettersom badet stod lenge uten å bli fylt på med is.

## 12.4 Diskusjon

For fiskene som først ble lagt i det kaldeste badet steg rigor score de første 3 timene, og deretter sank den igjen samtidig som fiskene ble overført til 0°C badet. Dette kan tyde på at fiskene ble oppfattet som stive fordi de var delvis frosne og ikke fordi de var i rigor. Da ville ikke rigor scoren ha sunket selv om fisken hadde blitt overført til en varmere temperatur. For å få størknet fett til å bli flytende igjen krever dette en temperaturøkning som er høyere enn fettets vanlige smeltepunkt. I tillegg har fett vanligvis et bredt temperaturintervall som smeltepunkt hvor fett gradvis går fra fast til flytende form (Penfield & Campbell 1990). Dette betyr at siden det ikke var så stor temperaturforskjell mellom de to badene i forsøket er det mest sannsynlig andre deler av fisken som hadde fryst, og ikke fett som hadde størknet. Som nevnt i det forrige forsøket har blodet til laksen en frysepunktnedsettelse på  $-0.7^{\circ}\text{C}$ , så en mulighet er at det er fryst blod som har gjort at fiskene ble stive. Etter en time var det stor variasjon i rigor score, som kan komme av at fisk av ulik størrelse ble brukt og dette vil som nevnt tidligere påvirke varmeoverføringen da mindre fiks blir raskere kjølt ned enn større fisk. For fiskene som kun lå i 0°C badet ble det observert en rigorutvikling som var som forventet, med en gradvis økning i rigor score.

I det kaldeste badet ble det målt  $-1.5^{\circ}\text{C}$ , som er så vidt litt kaldere enn det som var ønsket men ikke kaldere enn de temperaturene som ble målt i forsøk 7. Termometeret som ble benyttet i dette forsøket har en nøyaktighet på  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  ved måling av temperaturer på under  $0^{\circ}\text{C}$  (Digitron). Dette gir en høyere usikkerhet sammenliknet med termometeret til TENMA og betyr at temperaturen kan ha vært litt varmere/kaldere enn det som var ønsket. Man kan likevel si at fisken mest sannsynlig ble utsatt for tilnærmet like forhold som i det forrige forsøket, og at  $-1.4^{\circ}\text{C}$  er for lav temperatur å bruke til nedkjøling av laks som ikke er sløyd.

Forsøket konkluderes med at grunnen til at atlantisk laks var stivere og fikk høyere rigorindeks ved nedkjøling i bad på  $-1.4^{\circ}\text{C}$  de første timene etter slakt enn ved nedkjøling i bad på  $0^{\circ}\text{C}$  er mest sannsynlig fordi fiskene delvis fryste.

### 13. Samlet konklusjon for oppgaven

Denne oppgaven konkluderes med at inntreden av rigor mortis i atlantisk laks ikke kan utsettes ved lagring ved  $-1.4^{\circ}\text{C}$  sammenliknet med lagring ved  $0^{\circ}\text{C}$  etter slakt, verken ved gradvis eller direkte nedkjøling (med eller uten levendekjøling). Laksen som ble kjølt ved  $-1.4^{\circ}\text{C}$  hadde en tendens til å bli raskere stive enn laksen som ble kjølt ved  $0^{\circ}\text{C}$ , men dette er mest sannsynligvis på grunn av at fiskene delvis fryste ved den laveste temperaturen og ikke på grunn av tidligere rigorutvikling. Ettersom laksen ikke var blødd ut er det mulig at det var blodet i laksen som fryste og gjorde den stiv, siden blodet har en frysepunktnedsettelse på  $-0.7^{\circ}\text{C}$ . Dersom man skal undersøke hvordan temperaturer under  $0^{\circ}\text{C}$  påvirker utviklingen av rigor må høyere temperaturer enn  $-1.4^{\circ}\text{C}$  benyttes for at fisken skal forbli fersk. I de forsøkene der røye ble benyttet hadde man problemer med å holde kuldebadene ved riktig temperatur over lengre tid. Det ble observert at for å få kuldebad til å holde en konstant temperatur bør det være en høy vann:fisk ratio, sirkulasjon av vannet og liten forskjell mellom lufttemperatur og vanntemperatur slik kan holdes kaldt nok. For røye i kuldebad ved ca.  $0^{\circ}\text{C}$  og mellom  $-0.5$  og  $-1.5^{\circ}\text{C}$  ble det observert en annerledes effekt av lagringstemperatur på rigor-indeks enn i laksen, hvor røyen i det kaldeste badet hadde lavest rigor-indeks og rigor-indeksen til alle røyene sank etter 6 timer. Dette kan være et resultat av ulik behandling før slakt, fysiologiske forskjeller mellom de to fiskeartene, unøyaktig målingsmetode eller at røyen som ble benyttet var sløyd og tømt for blod, som vil kunne påvirke frysepunktet til fisken. I tillegg ble bare en røye benyttet til hver nedkjølingsmetode som betyr at forskjell i rigor-indeks kan ha vært på grunn av individuelle forskjeller mellom fiskene, slik at man ikke kan konkludere noe om temperaturavhengigheten til rigor i røye ut ifra disse resultatene. Det ble også observert at det er små marginer som bestemmer om fiskene fryser eller ikke, som betyr at et system med bedre temperaturkontroll enn det som var tilgjengelig til forsøkene i denne oppgaven bør benyttes dersom liknende forsøk skal utføres. For å kunne skille mellom ulik rigorutvikling på grunn av individuelle forskjeller mellom fiskene og ulik rigorutvikling på grunn av forskjellig nedkjølingsmetode bør flere fisk kjøles ved bruk av de ulike metodene som skal testes. Dersom store mengder skal fisk benyttes kan det være hensiktsmessig å benytte seg av en raskere metode som ikke krever like nøyaktige målinger som beregning av rigor-indeks, som for eksempel å gi fisken en rigor score.

## 14. Referanser

- Abe, H. & Okuma, E. (1991). Rigor mortis progress of carp acclimated to different water temperatures. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 5.
- Akse, L., Tobiassen, T., Wang, P. A., Beiland, M. S. W. & Dahl, R. W. (2011). RSW-, CSW- og iskjøling av råstoff (torsk), konsekvenser for filetkvaliteten (38).
- Akse, L., Olsen, S. H., Nordtvedt, T. S. & Tobiassen, T. (2013). Workshop om utblødning og kjøling av laks, med fokus på kvalitet. (37). Tilgjengelig fra: [http://www.nofima.no/filearchive/Rapport\\_37-2013.pdf](http://www.nofima.no/filearchive/Rapport_37-2013.pdf).
- Alexander, R. M. (1981). *The chordates*: CUP Archive.
- Aune, T. F., Olsen, R. L., Akse, L., Ytterstad, E. & Esaiassen, M. (2014). Influence of different cold storage temperatures during the Rigor mortis phase on fillet contraction and longer-term quality changes of Atlantic cod fillets. *LWT- Food Science and Technology*.
- Azam, K., Mackie, I. & Smith, J. (1990). Effect of stunning method on the time of onset, duration and resolution of rigor in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as measured by visual observation and analysis for lactic acid, nucleotide-degradation products and glycogen. *Science et Technique du Froid (France)*.
- Berge, A. (2014). *Kan holde laksen fersk en måned*: iLaks. Tilgjengelig fra: <http://www.ilaks.no/kan-holde-laksen-fersk-en-maned/> (lest 16/10).
- Bito, M., Yamada, K., Mikumo, Y. & Amano, K. (1983). Studies on rigor mortis of fish. I. difference in the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified cutting's method. *Bulletin-Tokai Regional Fisheries Research Laboratory*.
- Bjørlykke, G. A., Kvamme, B. O., Slinde, E., Roth, B. & Mejdell, C. M. (2011). *Velferd og Slakting*. Havforskningsrapporten. Havforskningsinstituttet. Tilgjengelig fra: <http://www.imr.no/filarkiv/2011/04/havforskningsrapporten2011.pdf/nb-no>.
- Bodnar, R. J. (1992). Revised equation and table for determining the freezing point depression of H<sub>2</sub>O-NaCl solutions *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 57: 2.
- Boziaris, I. S. (2013). *Seafood Processing: Technology, Quality and Safety*: Wiley.
- Bronstein, M., Price, R., Strange, E., Melvin, E., Dewees, C. & Wyatt, B. (1985). Storage of dressed Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, in refrigerated freshwater, diluted seawater, seawater, and in ice. *Marine Fisheries Review*, 47: 68-72.
- Buttkus, H. (1963). Red and White Muscle of Fish in Relation to Rigor Mortis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 20 (1): 45-58.
- Cengel, Y. A. & Ghajar, A. J. (2011). *Heat and Mass Transfer*, b. 4. New York: McGraw-Hill Companies.
- Chéret, R., Delbarre-Ladrat, C., de Lamballerie-Anton, M. & Verrez-Bagnis, V. (2007). Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry*, 101 (4): 1474-1479.
- Crapo, C. A. & Elliot, E. (1987). *Salmon Quality: The Effects of Elevated Refrigerated Seawater Chilling Temperatures*: Alaska Sea Grant College Program, University of Alaska.
- Cutting, C. (1939). Immediate post-mortem changes in trawled fish. *Ann. Rep. Food Invest. Bd.(Gt. Britain)*, 39.
- Dayley & Larson. (2008). *Freezing Point depression, the Van't Hoff Factor, and Molar Mass*. Fothill College. Tilgjengelig fra: <http://www.foothill.edu/attach/psme/sinha.fpdepression.pdf> (lest 21.04).
- Devarajan, P. (2014). *Myoglobinuria*. Medscape. Tilgjengelig fra: <http://emedicine.medscape.com/article/982711-overview> (lest 18/02).

- Digitron. *TECHNICAL DATA SHEET FM35 - Hand-Held Digital Thermometer*. <http://docs-europe.electrocomponents.com/webdocs/0e62/0900766b80e626c3.pdf>. Digitron.
- Dinwiddie, R. B. (2005). *Thermal Conductivity 26: Thermal Expansion 14 : Joint Conferences*. USA: DEStech Publications, Inc.
- Ebbing, D. & Gammon, S. D. (2010). *General Chemistry Enhanced Edition*, b. 9: Cengage Learning.
- Erikson, U., Sigholt, T. & Seland, A. (1997). Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 149 (3): 243-252.
- Erikson, U., Misimi, E. & Gallart-Jornet, L. (2011). Superchilling of rested Atlantic salmon: Different chilling strategies and effects on fish and fillet quality. *Food Chemistry*, 127 (4): 1427-1437.
- Fellows, P. J. (2000). *Food Process Technology - Principles and Practices*, b. 2nd. Cambridge: Woodhead Publishing.
- FHL.no. (2009). *Om lakseslaktning, bedøvelse og kvalitet*. FHL.no: Fiskeri- og havbruksnæringens landsforening. Tilgjengelig fra: <http://fhl.no/om-lakseslaktning-bedovelse-og-kvalitet/>.
- Fossum, S. (2009). *Sarkoplasmatiske Retikulum*. Det Store Medisinske Leksikon. Tilgjengelig fra: [https://sml.snl.no/sarkoplasmatisk\\_retikulum](https://sml.snl.no/sarkoplasmatisk_retikulum) (lest 07.04).
- Fox, J. G., Barthold, S., Davisson, M., Newcomer, C. E., Quimby, F. W. & Smith, A. (2006). *The Mouse in Biomedical Research: Normative biology, husbandry, and models*, b. 3: Academic Press.
- Haugland, A., NORDTVEDT, T. S. & JOHANSEN, S. (1999). *Pre-process tempering of fish products: impact on the refrigeration system, and effect on end quality and yield*. 20th International Congress of Refrigeration: Refrigeration into the Third Millennium. Tilgjengelig fra: [http://www.iifir.org/clientBookline/service/reference.asp?INSTANCE=EXPLOITATION&OUTPUT=PORTAL&DOCID=I\\_IFD\\_REFDOC\\_2000-1482&DOCBASE=IFD\\_REFDOC\\_EN&SETLANGUAGE=EN](http://www.iifir.org/clientBookline/service/reference.asp?INSTANCE=EXPLOITATION&OUTPUT=PORTAL&DOCID=I_IFD_REFDOC_2000-1482&DOCBASE=IFD_REFDOC_EN&SETLANGUAGE=EN) (lest 28.04).
- Hellevik, A. H. & Fjørtoft, K. L. (2008). Gelis vs. våtis som kjølemedium under transport av hel laks.
- Helmenstine, A. M. (2014). *Freezing Point Depression*. About Education. Tilgjengelig fra: <http://chemistry.about.com/od/solutionsmixtures/a/freezingpointde.-Nxc.htm> (lest 13/01).
- Himelbloom, B. H., Crapo, C., Brown, E. K., Babbit, J. & Reppond, K. (1994). Pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) quality during ice and chilled seawater storage. *Journal of food quality*, 17 (3): 197-210.
- Hui, Y. H. (2006). *Handbook of food science, technology, and engineering*, b. 149: CRC press.
- Huidobro, A., Mendes, R. & Nunes, M. (2001). Slaughtering of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in liquid ice: influence on fish quality. *European Food Research and Technology*, 213 (4-5): 267-272.
- Huidobro, A., López-Caballero, M. & Mendes, R. (2002). Onboard processing of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) with liquid ice: effect on quality. *European Food Research and Technology*, 214 (6): 469-475.
- Huss, H. H. & Dalgaard, P. (1995). *Quality changes and shelf life of chilled fish*. Fresh fish - quality and quality changes. FAO Document Repository. Tilgjengelig fra: <http://www.fao.org/docrep/v7180e/v7180e07.htm> (lest 20/10).
- Huss, H. H. & Lupin, H. M. (1995). *Improved fresh fish handling methods*. Fresh fish - quality and quality changes. FAO Document Repository: Food and Agriculture Organization of the United Nations (lest 17/10/2014).

- Iwamoto, M. (1985). *Relationship Between Rigor Mortis of Sea Bream and Storage Temperatures*.
- Iwamoto, M., Yamanaka, H., Watabe, S. & Hashimoto, K. (1987). Effect of Storage Temperature on Rigor- Mortis and ATP Degradation in Plaice *Paralichthys olivaceus* Muscle. *Journal of Food Science*, 52 (6): 1514-1517.
- Jensen, W. K., Devine, C. & Dikeman, M. (2004). Encyclopedia of meat sciences.
- Jerrett, A. R., Holland, A. J. & Cleaver, S. E. (1998). Rigor Contractions in "Rested" and "Partially Exercised" Chinook Salmon White Muscle as Affected by Temperature. *Journal of Food Science*, 63 (1): 53-56.
- Kelman, J. H. (2001). *Stowage of Fish in Chilled Sea Water*. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Torry Research Station. Tilgjengelig fra: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5944e/x5944e01.htm>.
- Kennish, M. J. (2001). *Practical Handbook of marine Science*, b. 3. Florida: CRC Press LLC.
- Kiessling, A., Helge Stien, L., Torslett, Ø., Suontama, J. & Slinde, E. (2006). Effect of pre- and post-mortem temperature on rigor in Atlantic salmon muscle as measured by four different techniques. *Aquaculture*, 259 (1-4): 390-402.
- Kotz, J. C., Treichel, P. M. & Weaver, G. C. (2006). *Chemistry & Chemical Reactivity*, b. 6. Belmont: Thomson Brooks/Cole.
- Lee, K. H., Tsuchimoto, M., Onishi, T., Wu, Z.-h., Jabarsyah, A., Misima, T. & Tachibana, K. (1998). Differences in Progress of Rigor Mortis between Cultured Red Sea Bream and Cultured Japanese Flounder. *Fisheries science*, 64 (2): 309-313.
- Matvaretabellen. (2014a). *Laks, oppdrett, rå*. Matvaretabellen.no. Tilgjengelig fra: <http://www.matvaretabellen.no/laks-oppdrett-raa-04.220> (lest 23.04).
- Matvaretabellen. (2014b). *Røye, rå*. Matvaretabellen.no. Tilgjengelig fra: <http://www.matvaretabellen.no/roeye-raa-04.117> (lest 23.04).
- McArthur, H. & Spalding, D. (2004). *Engineering Materials Science: Properties, Uses, Degradation, Remediation*, b. 1st. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Midling, K. Ø., Mejdell, C., Oslon, S. H., Tobiassen, T., Aas-Hansen, Ø., Aas, K., Harris, S., Oppedal, K. & Femsteinevik, Å. (2008). *Slakting av oppdrettslaks på båt, direkte fra oppdrettsmerd*: Nofima. Tilgjengelig fra: [http://www.nofima.no/filearchive/Rapport 06-2008.pdf](http://www.nofima.no/filearchive/Rapport%2006-2008.pdf).
- Misimi, E., Erikson, U., Digre, H., Skavhaug, A. & Mathiassen, J. (2008). Computer Vision-Based Evaluation of Pre-and Postrigor Changes in Size and Shape of Atlantic Cod (*Gadus morhua*) and Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets during Rigor Mortis and Ice Storage: Effects of Perimortem Handling Stress. *Journal of food science*, 73 (2): E57-E68.
- Mørkøre, T., Mazo T, P. I., Tahirovic, V. & Einen, O. (2008). Impact of starvation and handling stress on rigor development and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *Aquaculture*, 277 (3-4): 231-238.
- Nakayama, T., Liu, D.-J. & Ooi, A. (1992). Tension change of stressed and unstressed carp muscles in isometric rigor contraction and resolution. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*.
- Nordberg, P. (2012). Våget seg ut på tørris. *Matindustrien* (lest 03.02.2012).
- Nordtvedt, T. S. (2012). *Industrial superchilling, a cool approach*. The journal of the Institute of Food Science and Technology. Tilgjengelig fra: <https://fstjournal.org/feature/26-3/superchilling> (lest 15/10).
- Oliveira, A. (2011). *Rigor Mortis in Fish*. Kodiak, AK Fishery Industrial Technology Center Tilgjengelig fra: <https://seagrant.uaf.edu/map/aspli/2011/presentations/rigormortis.pdf> (lest 05.02).



- Penfield, M. P. & Campbell, A. M. (1990). CHAPTER 15 - FATS AND THEIR LIPID CONSTITUENTS. I: Penfield, M. P. & Campbell, A. M. (red.) *Experimental Food Science (Third Edition)*, s. 331-357. San Diego: Academic Press.
- Pennell, W. & Barton, B. A. (1996). *Principles of salmonid culture*, b. 29: Elsevier.
- Piñeiro, C., Barros-Velázquez, J. & Aubourg, S. P. (2004). Effects of newer slurry ice systems on the quality of aquatic food products: a comparative review versus flake-ice chilling methods. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (12): 575-582.
- Prytz, K. (2009). *Moderne Slakting av Laks*. FHL.no: Fiskeri- og havbruksernæringens landsforening. Tilgjengelig fra: [http://fhl.no/wp-content/uploads/importedfiles/FHL\\_slaktebrosjyre\\_A5.PDF](http://fhl.no/wp-content/uploads/importedfiles/FHL_slaktebrosjyre_A5.PDF).
- Rahman, M. S. (2009). *Food properties handbook*: CRC press.
- Rosnes, J. T., Vorre, A., Folkvord, L., Hovda, M., Fjæra, S. O. & Skjervold, P. O. (2003). Effects of pre-, in-, and post-rigor filleted Atlantic salmon (*Salmo salar*) on microbial spoilage and quality characteristics during chilled storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 12 (2): 17-31.
- Roth, B., Moeller, D., Veland, J., Imsland, A. & Slinde, E. (2002). The effect of stunning methods on rigor mortis and texture properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science*, 67 (4): 1462-1466.
- Roth, B., Birkeland, S. & Oyarzun, F. (2009). Stunning, pre slaughter and filleting conditions of Atlantic salmon and subsequent effect on flesh quality on fresh and smoked fillets. *Aquaculture*, 289 (3): 350-356.
- Samuelsen, O. B. & Kristiansen, S. K. (2013). FISKEVELFERD VED BRUK AV SLAKTEMERD FOR OPPDRETTSFISK Utredning for Mattilsynet: Havforskningsinstituttet, Bergen.
- Schmidt-Nielsen, K. (1997). *Animal Physiology*, b. 5. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, S., Nordtvedt, T. & Seland, A. (1997). Handling Stress and Storage Temperature Affect Meat Quality of Farmed-raised Atlantic Salmon (*Salmo Salar*). *Journal of Food Science*, 62 (4): 898-905.
- Sikorski, Z. E. (1990). *Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation*: Taylor & Francis.
- Sivertsvik, M. & Rotabakk, B. T. (2013). *Den siste istid*. Nofima. Tilgjengelig fra: <http://nofima.no/nyhet/2013/01/den-siste-istid/> (lest 03.02).
- Skjervold, P. O., Fjæra, S. O. & Østby, P. B. (1999). Rigor in Atlantic salmon as affected by crowding stress prior to chilling before slaughter. *Aquaculture*, 175 (1-2): 93-101.
- Skjervold, P. O., Bencze Rørå, A. M., Fjæra, S. O., Vegusdal, A., Vorre, A. & Einen, O. (2001a). Effects of pre-, in-, or post-rigor filleting of live chilled Atlantic salmon. *Aquaculture*, 194 (3-4): 315-326.
- Skjervold, P. O., Fjæra, S. O., Østby, P. B. & Einen, O. (2001b). Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 192 (2-4): 265-280.
- Skjervold, P. O., Fjæra, S. O., Østby, P. B., Isaksson, T., Einen, O. & Taylor, R. (2001c). Properties of salmon flesh from different locations on pre- and post-rigor fillets. *Aquaculture*, 201 (1-2): 91-106.
- Skjervold, P. O., Fjæra, S. O. & Snipen, L. (2002). Predicting live-chilling dynamics of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 209 (1-4): 185-195.
- Slinde, E., Grimsbø, E. & Kristiansen, T. K. (2013). Slakting av oppdrettsfisk. *Rapport fra havforskningen*: Havforskningsinstituttet.
- Sonntag, R. E. & Borgnakke, C. (2007). *Introduction to Engineering Thermodynamics*, b. 2. Hoboken: John Wiley and Sons, Inc.

- Stoker, S. H. (2011). *General, Organic, and Biological Chemistry*, b. 6: Cengage Learning. 225 s.
- Strasburg, G., Xiong, Y. & Chiang, W. (2008). Physiology and chemistry of edible muscle tissues. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 169: 923.
- Stroud, G. D. (2001). Rigor in Fish - The Effect on Quality. Tilgjengelig fra: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5914E/x5914e00.htm> - Contents (lest 09.02.2014).
- Sumich, J. L. & Morrissey, J. F. (2004). *Introduction to the biology of marine life*: Jones & Bartlett Learning.
- Sunwell. (2013). *Deepchill™ Variable-State Ice Slurry in a Salmon Farming Application in Chile*: Sunwell Technologies inc. Tilgjengelig fra: <http://www.sunwell.com/salmon.html> (lest 03.02).
- Sørensen, N. K., Brataas, R., Nyvold, T. E. & Lauritzen, K. (1997). Influence of early processing (pre-rigor) on fish quality. *Seafoods from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality*: 10.
- Taylor, R. G., Fjaera, S. O. & Skjervold, P. O. (2002). Salmon Fillet Texture is Determined by Myofiber-Myofiber and Myofiber-Myocommata Attachment. *Journal of Food Science*, 67 (6): 2067-2071.
- TENMA. (2007). *Model 72-7712/72-7715: OPERATING MANUAL*. Equipment, T. T. (red.). <http://www.tenma.com>.
- Thielemann, J. T. (2014). *Pinbone removal in pre-rigor salmon*. SINTEF. Tilgjengelig fra: <http://www.sintef.no/home/projects/information-and-communication-technology-ict/Pinbone-removal-in-pre-rigor-salmon/> (lest 16/03).
- Thomas, P., Pankhurst, N. & Bremner, H. (1999). The effect of stress and exercise on post-mortem biochemistry of Atlantic salmon and rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 54 (6): 1177-1196.
- Venugopal, V. (2005). *Seafood processing: adding value through quick freezing, retortable packaging and cook-chilling*: CRC press.
- Wang, D., Tang, J., Correia, L. R. & Gill, T. A. (1998). Postmortem Changes of Cultivated Atlantic Salmon and Their Effects on Salt Uptake. *Journal of Food Science*, 63 (4): 4.
- Warris, P. D. (2010). *Meat Science: An introductory text*. 2 utg. Oxfordshire, UK: CABI.
- Watabe, S., Ushio, H., Iwamoto, M., Yamanaka, H. & Hashimoto, K. (1989). Temperature-Dependency of Rigor-Mortis of Fish Muscle: Myofibrillar Mg<sup>2+</sup>-ATPase Activity and Ca<sup>2+</sup> Uptake by Sarcoplasmic Reticulum. *Journal of Food Science*, 54 (5): 1107-1107.
- Watabe, S., Hwang, G.-C., Ushio, H. & Hashimoto, K. (1990). Changes in rigor-mortis progress of carp induced by temperature acclimation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54 (1): 219-221.
- Yamashita, M. & Konagaya, S. (1990). Participation of cathepsin L into extensive softening of the muscle of chum salmon caught during spawning migration. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56 (8): 1271-1277.
- YaraPraxair. *Superkjøling - flyfrakt av laksefilet*: YaraPraxair. Tilgjengelig fra: <http://archive-no.com/page/1151406/2013-01-14/http://www.yarapraxair.no/Losninger/Superkjøling---flyfrakt-av-laksefilet/> (lest 16/10).
- Zhu, F., Zhang, H., Shao, Y., He, Y. & Ngadi, M. (2014). Mapping of fat and moisture distribution in Atlantic salmon using near-infrared hyperspectral imaging. *Food and Bioprocess Technology*, 7 (4): 1208-1214.
- Ådland Hansen, A., Rødbotten, M., Eie, T., Lea, P., Rudi, K. & Mørkøre, T. (2012). The Effect of Crowding Stress on Bacterial Growth and Sensory Properties of Chilled Atlantic Salmon Fillets. *Journal of food science*, 77 (1): S84-S90.

## 15. Vedlegg

### 15.1 Forsøk 1 rådata

Vedlegg 1) Rigor score til alle fiskene under forsøket. Fiskene er gruppert etter nedkjølingsmetode.

	2 t	4 t	7 t	10 t	22 t
Gradvis nedkjøling 0; -2; -4°C	1	2	2	2	3
	1	1	3	3	3
	1	2	2	2	2
Nedkjøling direkte i -4°C	5	5	5	5	3
	5	5	5	4	2
	5	5	5	4	1
Nedkjøling i 0°C bad	1	1	1	1	3
	1	1	1	2	2
	1	1	2	4	4

Vedlegg 2) Vekten (kg) til fiskene ved start, etter to timer og ved slutten av forsøket. Fiskene er gruppert etter nedkjølingsmetode.

	0 t	2 t	22 t
Gradvis nedkjøling 0; -2; -4°C	1,048	1,056	1,088
	0,580	0,580	0,648
	0,528	0,531	0,582
Nedkjøling direkte i -4°C	0,587	0,627	0,665
	0,739	0,782	0,823
	0,660	0,707	0,794
Nedkjøling i 0°C bad	0,382	0,423	0,441
	0,582	0,626	0,633
	0,756	0,773	0,791

### 15.3 Forsøk 5 rådata

Vedlegg 3) Målt  $L_0$  og  $L_t$  (cm) 2, 4 og 6 timer etter start av forsøket.

	$L_0$	$L_t$ 2 t	$L_t$ 4 t	$L_t$ 6 t
Fisk 1: Gradvis nedkjøling (0 til $-1.5^{\circ}\text{C}$ )	23.50	16.50	15.50	16.80
Fisk 2: $0^{\circ}\text{C}$ bad	22.00	15.50	16.30	16.50
Fisk 3: Direkte i kaldt bad (mellom $-0.5$ og $-1.5^{\circ}\text{C}$ )	22.00	16.00	14.00	15.90

### 15.4 Forsøk 7 rådata

Vedlegg 4) Måling av  $L_0$  og  $L_t$  (cm) av alle fiskene i badet med  $-1.4^{\circ}\text{C}$ . Uthevede målinger indikerer at temperatur ble målt i fisken.

Fisk hentet fra	$L_0$	$L_t$ 0 t	$L_t$ 2 t	$L_t$ 4 t	$L_t$ 6 t	$L_t$ 8 t	$L_t$ 10 t	$L_t$ 12 t	$L_t$ 24 t
Levendekjølingsbasseng $4^{\circ}\text{C}$	31.75	24.00	frossen	frossen	frossen	frossen	frossen	frossen	4.00
	31.00	23.00	24.50	22.00	15.00	14.00	8.00	7.00	8.00
	35.00	26.00	21.00	20.00	17.00	16.00	8.00	7.50	5.00
Sjø $8^{\circ}\text{C}$	30.75	21.00	19.00	12.00	8.00	2.00	1.00	1.50	3.00
	39.25	28.00	31.70	26.00	23.00	18.00	8.00	6.00	0.00
	38.25	30.00	26.00	26.00	21.00	18.00	12.00	8.00	0.00

Vedlegg 5) Måling av  $L_0$  og  $L_t$  (cm) av alle fiskene i badet med  $0^{\circ}\text{C}$ . Uthevede målinger indikerer at temperatur ble målt i fisken.

Fisk hentet fra	$L_0$	$L_t$ 0 t	$L_t$ 2 t	$L_t$ 4 t	$L_t$ 6 t	$L_t$ 8 t	$L_t$ 10 t	$L_t$ 12 t	$L_t$ 24 t
Levendekjølingsbasseng $4^{\circ}\text{C}$	30.65	25.00	24.50	22.00	17.00	14.50	13.00	1.00	0.00
	32.50	27.00	26.00	27.00	17.00	18.00	18.00	18.00	0.00
	36.75	29.00	27.50	27.00	25.50	27.00	18.00	22.00	3.50
Sjø $8^{\circ}\text{C}$	31.50	20.00	22.50	21.00	17.00	14.00	6.00	1.50	0.00
	35.00	26.00	27.50	27.00	25.00	27.00	27.50	24.00	14.00
	31.50	22.00	25.50	22.00	19.00	18.50	22.00	21.00	0.00

Vedlegg 6) Utskrift fra *R commander*.

Enveis ANOVA analyse ble utført på rigor-indeks verdiene til de ulike nedkjølingsmetodene ved alle målingene (fra 0 til 24 timer etter start av forsøket). Tukey contrasts test ble kun utført dersom det var signifikant forskjell mellom nedkjølingsmetodene. A= fra levendekjølingsbasseng til 0°C, B= fra sjø til 0°C, C= fra levendekjølingsbasseng til -1.4°C og D= fra sjø til -1.4°C. Et signifikansnivå på 5% ble benyttet i testene.

0 t ANOVA

```
> summary(AnovaModel.1)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
nedkjolingsmetode	3	228.1	76.04	4.938	0.0315 *
Residuals	8	123.2	15.40		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```
> numSummary(StackedData$rigor , groups=StackedData$nedkjolingsmetode,
statistics=c("mean",
+ "sd"))
```

	mean	sd	data:n
A	18.81333	2.111263	3
B	30.79333	5.427783	3
C	25.31000	0.781025	3
D	27.31333	5.202406	3

0 t Tukey contrasts

```
> print(simple.glht(AnovaModel.1,'nedkjolingsmetode', level=0.95))
```

### Simultaneous Confidence Intervals and Tests for General Linear Hypotheses

#### Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts

Fit: aov(formula = rigor ~ nedkjolingsmetode, data = StackedData)

Quantile = 3.2003

95% family-wise confidence level

#### Linear Hypotheses:

	Estimate	lwr	upr	Std. Error	t value	Pr(> t )
B - A == 0	11.980	1.726	22.234	3.204	3.739	0.0237 *
C - A == 0	6.497	-3.757	16.751	3.204	2.028	0.2548
D - A == 0	8.500	-1.754	18.754	3.204	2.653	0.1084
C - B == 0	-5.483	-15.737	4.771	3.204	-1.711	0.3777
D - B == 0	-3.480	-13.734	6.774	3.204	-1.086	0.7071
D - C == 0	2.003	-8.251	12.257	3.204	0.625	0.9211

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

(Adjusted p values reported -- single-step method)

2 t ANOVA

```
> summary(AnovaModel.2)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
nedkjolingsmetode	3	1979	659.8	1.444	0.301
Residuals	8	3656	457.0		

```
> numSummary(StackedData2$rigor , groups=StackedData2$nedkjolingsmetode,  
statistics=c("mean",  
+ "sd"))
```

	mean	sd	data:n
A	21.74333	2.967732	3
B	23.01667	4.954365	3
C	53.66000	41.243021	3
D	29.82667	9.675031	3

4 t ANOVA

```
> summary(AnovaModel.3)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
nedkjolingsmetode	3	2032	677.2	1.55	0.275
Residuals	8	3495	436.9		

```
> numSummary(StackedData3$rigor , groups=StackedData3$nedkjolingsmetode,  
statistics=c("mean",  
+ "sd"))
```

	mean	sd	data:n
A	23.88667	6.091505	3
B	28.64000	5.606719	3
C	57.29667	37.623108	3
D	42.25333	16.232173	3

6 t ANOVA

```
> summary(AnovaModel.5)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
nedkjolingsmetode	3	1646	548.6	1.738	0.236
Residuals	8	2525	315.6		

```
> numSummary(StackedData$rigor , groups=StackedData$nedkjolingsmetode,  
statistics=c("mean",  
+ "sd"))
```

	mean	sd	data:n
A	40.94333	9.087339	3
B	38.09333	8.837479	3
C	67.68000	27.990086	3
D	53.49333	17.838165	3

8 t ANOVA

```
> summary(AnovaModel.4)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
nedkjolingsmetode	3	2331	777.0	1.853	0.216
Residuals	8	3355	419.4		

```
> numSummary(StackedData5$rigor , groups=StackedData5$nedkjolingsmetode,
```

```

statistics=c("mean",
+ "sd"))
  mean    sd    data:n
A 41.28 13.39601    3
B 39.73 16.65349    3
C 69.71 26.23335    3
D 66.86 23.07872    3

```

10 t ANOVA

```

> summary(AnovaModel.6)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
nedkjolingsmetode 3 3772 1257.4   3.408  0.0735 .
Residuals         8 2951  368.9

```

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

> numSummary(StackedData6$rigor , groups=StackedData6$nedkjolingsmetode,
statistics=c("mean",
+ "sd"))
  mean    sd    data:n
A 51.07667 6.485186    3
B 44.18000 32.141529    3
C 83.77667 14.127032    3
D 81.66333 14.175882    3

```

12 t ANOVA

```

> summary(AnovaModel.7)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
nedkjolingsmetode 3 2584  861.4   1.359  0.323
Residuals         8 5072  634.0

```

```

> numSummary(StackedData9$rigor , groups=StackedData9$nedkjolingsmetode,
statistics=c("mean",
+ "sd"))
  mean    sd    data:n
A 60.49667 31.46712    3
B 53.33333 36.30467    3
C 85.33000 12.71760    3
D 86.30333  8.13784    3

```

24 t ANOVA

```

> summary(AnovaModel.9)
              Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
nedkjolingsmetode 3 476.1  158.7   0.981  0.449
Residuals         8 1293.9  161.7

```

```

> numSummary(StackedData$rigor , groups=StackedData$nedkjolingsmetode,
statistics=c("mean",
+ "sd"))
  mean    sd    data:n
A 96.82667 5.496375    3

```

**B 86.66667 23.094011 3**  
**C 82.43333 7.188771 3**  
**D 96.74667 5.634939 3**

### 15.5 Forsøk 8 rådata

Vedlegg 7) Rigor score til alle fiskene under forsøket. Fisk er gruppert etter nedkjølingsmetode.

	0 t	1 t	2 t	3 t	4 t	6 t	8 t	10 t	12 t	24 t
Nedkjøling i 0°C bad	1	1	1	1	1	2	3	3	4	5
	1	1	1	1	1	1,5	2	3	3	4
	1	1	1	1	1	2	3	3	4	5
Nedkjøling -1.4°C i 4 t, deretter 0°C 20 t	1	1.5	3	4	3	3	2	2	2	4
	1	5	4	5	4	3	2	2	2	4
	1	2	4	5	4	3	2	2	2	5





Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
67 23 00 00  
[www.nmbu.no](http://www.nmbu.no)