



## FORORD

Denne masteroppgaven er utført ved Nofima Ås, og markerer avslutningen av min mastergrad i matvitenskap, retning matvarekvalitet, trygghet og hygiene, ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU).

Oppgaven er en del av et fireårig forskningsprosjekt, CATCH. Prosjektet jobber for å få bedre tilgang på fersk torsk av god kvalitet gjennom hele året. Prosjektet finansieres av Norges forskningsråd og avsluttes i 2017.

En stor takk går til min veileder ved Nofima, Anlaug Ådland Hansen, som lot meg ta del i prosjektet. Uten din kunnskap, veiledning og oppfølging hadde ikke dette vært mulig.

En spesiell takk går til Janina Sofie Berg for utrolig mye hjelp med det praktiske arbeidet på laboratoriet og god støtte gjennom hele min tid på Nofima. Jeg vil også takke alle som bidro i gjennomføringen av lagringsforsøket, både i forkant og underveis!

Jeg vil også rette en stor takk til min veileder ved NMBU, Hilde Marit Østlie, som har kommet med gode tilbakemeldinger og alltid vært tilgjengelig for å besvare spørsmål.

Sist men ikke minst vil jeg takke mine to samboere, Johanna Sande Mikkelsen og Anne Marte Minge Engh, som har holdt ut med meg og tatt vare på meg gjennom de siste månedene!

Ås, mai 2015

Linn Therese Hammernes



## SAMMENDRAG

Forbruket av fersk sjømat øker og forbrukere kjøper torsk oftere enn før, gjerne i porsjonspakninger. Fersk torsk er primært en sesongvare, som er ønsket tilgjengelig året rundt. Forskningsprosjektet CATCH jobber med å gjøre dette mulig, ved hjelp av levendelagring av villfanget torsk.

Målet med denne oppgaven var å undersøke effekten av to ulike pakkegasser på vekst av kvalitetsforringende bakterier på levendelagret torsk. Torskefilet ble inokulert med bakteriestammer tidligere isolert fra torsk i forbindelse med CATCH- prosjektet. Torskefiletene ble pakket i modifisert atmosfære (MAP) med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gass eller 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> gass og undersøkt gjennom en lagringsperiode på 13 dager, med prøveuttak ved dag 0, 6, 9 og 13.

Det er tre bakterier som er identifisert som ansvarlige for forringelsen av fersk torsk: *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomonas* spp. og *Shewanella putrefaciens*. Det ble ikke funnet *S. putrefaciens* ved bakterieisoleringen, derfor ble ikke bakterien benyttet i oppgaven. *Pseudomonas* spp. er en aerob bakterie som er følsom mot CO<sub>2</sub>. Bakterien danner forbindelser som gir fruktig, rått og svovelliknende lukt og smak. *Photobacterium phosphoreum* kan vokse under anaerobe forhold og er tolerant ovenfor høye CO<sub>2</sub> konsentrasjoner. Bakterien benytter seg av TMAO som terminal elektronakseptor slik at den svært illeluktende forbindelsen TMA dannes, en forbindelse som bidrar til fordervet fiskelukt.

Resultatene fra studiet antyder at pakking med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gass hadde best inhiberende effekt på de forringende bakteriene, og bevarte ferskheten i torskefiletene lengst. Det så ut til at den høye oksygenkonsentrasjonen bidro til å forsinke bakterieveksten og senket dannelsen av TMA i forhold til pakkegass uten oksygen. Ved sensorisk vurdering av lukt var torskefilet i 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gass fortsatt akseptabel etter 13 dagers lagring, mens torskefilet i 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> gass utviklet en uakseptabel lukt etter 9 dagers lagring.



## SUMMARY

The consumption of fresh seafood is increasing. Consumers buy cod more often than before, preferably in portion packs. Fresh cod is primarily available in season, but there is a demand to make it available all year around. The research program CATCH is working on making this possible by capturing wild cod and keeping them alive in net pens.

The aim of this study was to survey the effect of two different modified atmospheres on the growth of spoilage bacteria on live stored cod. Cod fillets were inoculated with strains of bacteria previously isolated in the CATCH research program. The cod fillets were then packed in modified atmosphere (MAP) either with 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gas or 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> gas. The storage trial lasted for 13 days where sampling was done on day 0, 6, 9 and 13.

There are three bacteria identified as specific spoilage bacteria of fresh cod: *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomonas* spp., and *Shewanella putrefaciens*. During the isolation of bacteria, no strains of *S. putrefaciens* were detected and therefore not used in this study. *Pseudomonas* spp. is an aerobic bacteria which is sensitive against CO<sub>2</sub>. The bacteria produce compounds which give a fruity, rotten and sulfur like taste and smell. *Photobacterium phosphoreum* is able to grow under anaerobic conditions and is tolerant to high CO<sub>2</sub> concentrations. The bacteria can use TMAO as a terminal electron acceptor which results in the formation of TMA, a compound that is associated with the smell of spoiled fish.

The results from this study indicates that the atmosphere containing 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gas had the best inhibition effect on the spoilage bacteria and the ability to preserve the fish freshness throughout the storage period. It looked like the high oxygen concentration helped in the retardation of the spoilage bacteria and also lowered the formation of TMA. A sensory evaluation of the smell from the cod fillets gave better results for the fillets packed in an atmosphere with oxygen compared to the atmosphere without oxygen. Filets packed in 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gas still had a acceptable smell after 13 days of storage, while filets packed in 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> gas had an unacceptable smell at this point of the storage trial.



## INNHOLDSFORTEGNELSE

<b>1.</b>	<b>INTRODUKSJON</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>MÅL MED OPPGAVEN</b> .....	2
<b>3.</b>	<b>TEORI</b> .....	3
	FISK SOM RÅVARE .....	3
	Bakteriologi .....	6
	Foringende bakterier .....	8
	<i>Photobacterium phosphoreum</i> .....	8
	<i>Pseudomonas</i> spp. ....	9
	<i>Shewanella putrefaciens</i> .....	9
	EMBALLERING AV FERSK FISK.....	10
	Pakking med modifisert atmosfære .....	12
	Pakkegasser .....	13
	Pakkemaskiner.....	15
	Emballasjemateriale .....	15
<b>4.</b>	<b>MATERIALER OG METODER</b> .....	16
	Bakteriestammer .....	16
	INNLEDENDE FORSØK.....	17
	Medietillaging.....	17
	Oppdyrking av bakteriestammer til vekstforsøk .....	19
	Vekstkurve i torskebuljong.....	19
	Vekstkurve i Long and Hammer buljong .....	20
	HOVEDFORSØK .....	21
	Fiskeråstoff .....	22
	Pakkekombinasjoner.....	22
	Filetstykker av torsk .....	23
	Bakterieinokulum .....	24
	Inokulering av torskefilet .....	25
	Pakking .....	25
	Uttak og analyser .....	26
	Gassutvikling .....	26
	Mikrobiologisk analyse .....	26
	Trimetylammin konsentrasjon.....	28





	Sensorisk vurdering av lukt .....	28
	pH .....	29
	Væsketap .....	29
	Statistisk analyse .....	29
<b>5.</b>	<b>RESULTATER</b> .....	<b>30</b>
	Gassutvikling .....	30
	Mikrobiologi .....	34
	Trimetylamin konsentrasjon .....	36
	Sensorisk vurdering av lukt .....	38
	pH .....	40
	Væsketap .....	42
<b>6.</b>	<b>DISKUSJON</b> .....	<b>44</b>
	Gassutvikling .....	44
	Mikrobiologi .....	45
	Trimetylamin konsentrasjon .....	46
	Sensorisk vurdering av lukt .....	48
	pH .....	49
	Væsketap .....	50
<b>7.</b>	<b>KONKLUSJON</b> .....	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>FORSLAG TIL VIDERE ARBEID</b> .....	<b>53</b>
	REFERANSER .....	54

1 Vedlegg



# 1. INTRODUKSJON

Etterspørselen etter fersk fisk i Norge er økende. En nylig utgitt rapport fra Norges sjømatråd (2015) viser at forbruket av sjømat har hatt en generell økning de siste 5 årene. I 2014 ble det for første gang solgt mer fersk enn frossen sjømat. Torsk lå på salgstoppen, etterfulgt av laks og reker. Salget av fersk torsk og laks har fått en enorm oppsving takket være satsning på forbrukerpakninger, noe som har gjort fersk fisk tilgjengelig i dagligvarebutikken. Forbrukere kjøper sjømat oftere enn før, men i mindre kvantum pr. gang, som for eksempel porsjonspakninger. Salget av ferdigpakket fersk filet har hatt en 5 ganger økning fra 2010 til i dag. Andelen utgjør nå nesten et like stort volum av omsatt filet som fersk filet solgt i løsvekt fra ferskvaredisken.

Fersk torsk er en sesongvare med høysesong fra januar til april. Samtidig ønsker dagligvarehandelen en kontinuerlig levering av fersk torsk gjennom hele året.

Denne oppgaven er en del av forskningsprosjektet CATCH. Prosjektet omhandler levendelagring av torsk gjennom hele verdikjeden fra fangst til forbruker.

CATCH- prosjektet jobber for å kunne tilby fersk torsk av god kvalitet året rundt. For å få til dette, forskes det på levendelagring av villfanget torsk i «torskehotell», som slaktes når etterspørselen er høy, med fokus på hvordan fisken kan foredles for å gi et høyverdig kvalitetsprodukt til forbruker.

Prosjektet er delt inn i åtte hovedområder, hvor denne oppgaven er en del av arbeidspakke 3: Emballering og holdbarhet. Her ligger fokuset på mikrobiell sammensetning i levendelagret torsk, og optimal emballering med tanke på kvalitet og holdbarhet.

CATCH er et fireårig prosjekt som ledes av Nofima, sammen med fem forskningspartnere og åtte næringsbedrifter. Prosjektet er finansiert av Norges Forskningsråd.

## 2. MÅL MED OPPGAVEN

Målet med dette studiet var å undersøke effekten av to ulike gassblandinger på vekst av kvalitetsforringende bakterier på fileten av levendelagret torsk (*Gadus morhua* L.). Fersk torskefilet ble inokulert med bakteriestammer av *Pseudomonas* og *Photobacterium* tidligere isolert fra torsk lagret en uke i merd. Vekst av de utvalgte bakteriestammene, enkeltvis og i blanding, ble sammen med den naturlige bakteriefloraen i torsk studert gjennom 13 dagers lagring av torskefilet i modifisert atmosfære ved 2 °C. Gassblandingene som ble benyttet var:

- 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub>
- 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub>

Effekten av modifisert atmosfærepakking (MAP) på kvalitetsforringende bakterier ble studert ved hjelp av ulike parametere som gassutvikling, totalt antall psykrotrofe bakterier, trimetylammin konsentrasjon, sensorisk vurdering av lukt, pH og væsketap.

### 3. TEORI

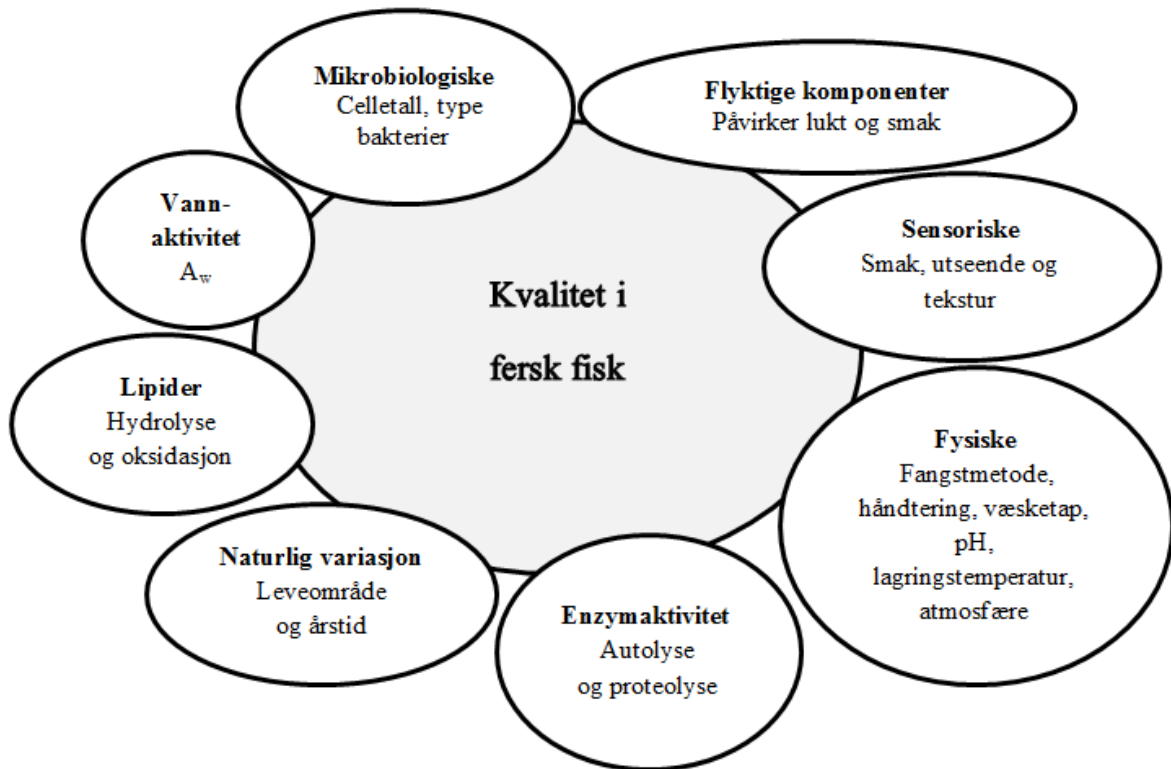
#### FISK SOM RÅVARE

Fiskekjøtt består hovedsakelig av vann og 16 – 20 % proteiner. En betydelig andel av det totale nitrogeninnholdet i fisk er ikke bundet til proteinene, men foreligger som forbindelser kjent som «non protein nitrogen» (NPN). Karbohydrater finnes det svært lite av i fisk, som oftest under 0,3 % av dens totale vekt. Fettinnhold varierer ut fra art, og sammen med vanninnhold utgjør det rundt 80 % av fiskekjøttet, hvor vanninnholdet blir lavere jo fetere fisken er. Torsk betegnes som en mager fisk med under 1 % fett i muskelen. Fisk fra kaldere områder har i stor grad flerumettet fett for å holde seg flytende ved lave vanntemperaturer (Lynum, 2005).

Fersk fisk forringes lett og har en holdbarhetstid på 2 – 14 dager ved kjølelagring på is (Stammen et al., 1990). Forringelsesprosessene er temperaturavhengige, og kan forsinkes ved bruk av lav lagringstemperatur (Sivertsvik et al., 2002). Fisk er en råvare med høy vannaktivitet og pH, noe som gjør den til et godt egnet vekstmedium for bakterier, som er hovedårsak til forringelse av fersk fisk (Gram og Dalgaard, 2002; Ólafsdóttir et al., 1997). Fisk har også et høyt innhold av proteolytiske enzymer som bidrar til forringelse (Sivertsvik et al., 2002). Kvaliteten i fersk fisk kan være svært varierende avhengig av iboende- og ytre faktorer som årstid, leveområde, fangstmetode og håndtering. Figur 3.1 viser faktorer som har betydning for kvalitet i fersk fisk.

Vurdering av kvalitet og når et produkt er uakseptabelt avhenger av forbrukers aksept. Kvalitetsforringelse kan defineres som en hver endring som gjør et produkt sensorisk uakseptabelt for forbruker (Gram et al., 2002). Holdbarhetstid defineres som tiden det tar fra fisk slaktes, til den er sensorisk uakseptabel (Hine, 1987). I løpet av denne tiden gjennomgår fisken tre faser, hvor den første karakteriseres av frisk fiskearoma (søt og «tangaktig»), etterfulgt av en fase hvor aroma er tilnærmet nøytral, som varer frem til siste fase hvor uakseptabel aroma oppstår (Gram og Huss, 1996). Evaluering av lukt er et av de viktigste hjelpemidlene for å bedømme kvalitet i fersk fisk (Ólafsdóttir et al., 1997). Det har blitt funnet at det er en sammenheng mellom lukt fra fersk laksefilet og kvaliteten i fileten etter varmebehandling (Rødbotten et al., 2009). Ved fordervelse av kjølelagret fersk fisk på is oppstår en karakteristisk ubehagelig lukt og smak av råten fisk som hovedsakelig skyldes dannelsen av hydrogensulfid ( $H_2S$ ) fra svovelholdige aminosyrer (Gram og Huss, 1996). Den

karakteristiske dårlige fiskelukten fra fisk som har fordervet under anaerobe forhold er ikke like ille, og forårsakes hovedsakelig av den volatile forbindelsen trimetylamin (TMA), som gir en stikkende, ammoniakkliggende lukt (Sivertsvik et al., 2002; Gram og Huss, 1996). På det tidspunktet fisk regnes som sensorisk uakseptabel er et totalt antall bakterier mellom 7 – 8 log kolonidannende enheter per gram (kde/g) vanlig (Ólafsdóttir et al., 1997).



**Figur 3.1:** Faktorer som påvirker kvalitet i fersk fisk. Figuren er basert på arbeid av Gram og Huss (1996), Ólafsdóttir et al. (1997) og Hovda et al. (2007).

Enzymer som er naturlig til stede i fisk vil fortsette sin aktivitet selv om fisken er død. Dette resulterer i at den enzymatiske nedbrytningen av fiskemuskelene starter umiddelbart etter slakting. Adenosintrifosfat (ATP) degraderes til inosinmonofosfat (IMP) som brytes videre ned til hypoxantin (HX). Inosinmonofosfat fungerer som en aromaforsterker på både godt og vondt, etter hvilke aromatiske forbindelser som er til stede (Lynum, 2005). Nedbrytning av IMP resulterer i tap av friskhet, både i form av lukt og smak (Gram og Huss, 1996). En bitter smak som er negativ for kvaliteten oppstår når HX konsentrasjonen øker (Lynum, 2005; Gram og Huss, 1996). Når de forringende bakteriene setter i gang sin metabolske aktivitet vil de også bidra til dannelsen av HX, da i større grad enn de autolytiske enzymene (Gram og Huss, 1996).

Enzymene vil også bryte ned glykogen til melkesyre, og pH i fiskemuskel synker til pH 6,2 – 6,5 (Lynum, 2005). Det lave innholdet av karbohydrater i fisk gjør at post mortem pH vil holde seg over pH 6 (Gram og Huss, 1996). Nedgang i pH er positivt for hemming av bakterier og lagringstid, men negativt for vannbindingsevne, som blir dårligere jo nærmere det isoelektriske punktet for proteiner man kommer, som er ved pH 5,4 (Lynum, 2005).

Hydrolyse av fettsyrer er ikke et vanlig problem i fisk som sløyes, men fiskefett utsettes lett for oksidativ harskning på grunn av en høy andel umettede fettsyrer (Lynum, 2005).

Harskning gir uønsket lukt og smak. Hansen et al. (2007) fant at oksidativ harskning hadde mindre innvirkning på den sensoriske kvaliteten i torskefilet (pakket i modifisert atmosfære med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub>) enn de andre forringende prosessene som fant sted. Fettet som er å finne i torskefilet forekommer hovedsakelig som funksjonelle lipider i muskelcellenes membraner (Castell, 1971).

Bakteriene på nyslaktet fisk vil benytte seg av tilgjengelige karbohydrater som energikilde. Når alt av karbohydrater er brukt opp, vil bakteriene se etter andre tilgjengelige energikilder, som nukleotider, frie aminosyrer og trimetylaminoksid (TMAO), som alle er NPN forbindelser (Lynum, 2005).

Non protein nitrogen forbindelser er små vannløselige molekyler som er essensielle for smak og aroma i fisk og skalldyr. Det meste av smak i fersk sjømat kommer fra frie aminosyrer, og det antas at forskjellig smak kommer av ulikt innhold og mengde av de frie aminosyrene (Lynum, 2005). Under lagring er NPN forbindelsene lett tilgjengelig for tilstedeværende bakterier og brukes som energikilde eller elektronakseptor. Forbindelsene kan da omdannes til aldehyder, alkoholer, aminer, ketoner, organiske syrer og sulfider, som alle kan gi vond lukt og smak (Gram og Dalgaard, 2002).

Trimetylaminoksid er en NPN forbindelse som finnes i saltvannsfisk, men ikke i ferskvannsfisk eller pattedyr. Kilden til TMAO er antakelig zooplankton. Hos bruskfisk, og mulig hos beinfisk benyttes forbindelsen for å opprettholde den osmotiske balansen mot sjøvann da fisken har en lavere saltkonsentrasjon (Lynum, 2005). Trimetylaminoksid har også evnen til å stabilisere enzymer og andre proteiner (Yancey og Siebenaller, 1999). Mager fisk inneholder mer TMAO enn fet fisk (Lynum, 2005). Ved nedbrytning av TMAO omdannes forbindelsen til TMA, som er en illeluktende forbindelse som er en av hovedkildene til bedervet fiskelukt (Gram og Huss, 1996). Bakterier benytter seg av TMAO som terminal elektronakseptor når det ikke er oksygen til stede. Eksempel på bakterier som har evnen til å



bruke TMAO er *Shewanella putrefaciens* og *Photobacterium phosphoreum*, som kan vokse under anaerobe forhold (Gram og Huss, 1996). Mengde TMA benyttes som et mål på grad av mikrobiell fordervelse av vakuumpakket og MA- pakket fisk, hvor 30 mg TMA-N/100 g ofte er benyttet som grense for akseptabel kvalitet (Dalgaard et al., 1993).

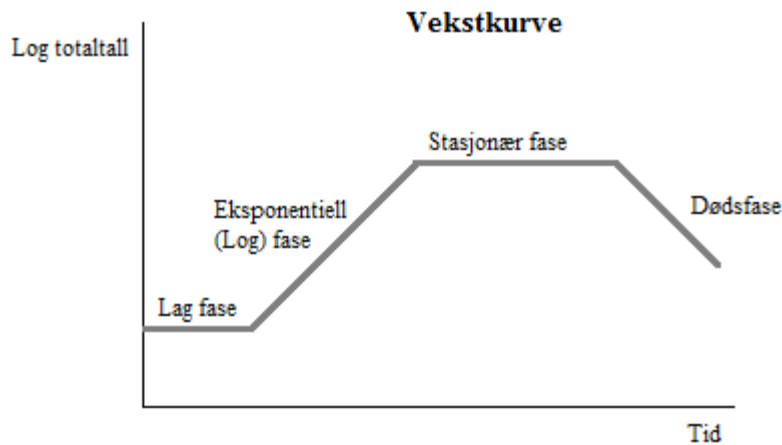
Frie aminosyrer kan også benyttes som energikilde av tilstedeværende bakterier. Enkelte aminosyrer vil da omdannes til volatile forbindelser som kan gi en søtlig lukt som kjennetegner at nedbrytningen i fisk har startet. Aminosyrer som inneholder svovel kan omdannes til volatile forbindelser som hydrogensulfid (H<sub>2</sub>S) og metantiol/metylmerkaptan (CH<sub>3</sub>SH), som gir svært ubehagelig lukt av fordervet fisk (Gram og Huss, 1996).

## **Bakteriologi**

Det finnes rikelig med bakterier på fiskens overflate, i gjellene og i fordøyelsessystemet. Konsentrasjonen kan være så høy som 9 log kde/g (Adams og Moss, 2010). På det tidspunktet fisk tas opp av havet, er fiskekjøttet tilnærmet sterilt (Sivertsvik et al., 2002). Fra fjord til bord skal fisken gjennom mange prosesstrinn, som alle er med på å tilføre bakterier til fiskekjøttet. Et totalt antall bakterier på 2 – 6 log kde/g er vanlig på industriprosessert filet (Ólafsdóttir et al., 1997).

Fiskens bakterieflora reflekterer bakteriefloraen i havområdet hvor den lever, noe som gjør at det kan være stor variasjon i fisk av samme art, basert på hvor den fanges (Ashie et al., 1996; Gram og Huss, 1996; Liston, 1980; Austin, 2002). Bakteriefloraen hos fisk som lever i nordlige farvann hvor temperaturen vanligvis ligger mellom - 2 °C til + 12 °C domineres av psykrotrofe, aerobe eller fakultativ anaerobe Gram- negative, stavformede bakterier som tilhører slektene *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio* og *Photobacterium* (Stammen et al., 1990; Gram og Huss, 1996). Det har også blitt isolert Gram- positive bakterier som tilhører slektene *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* og *Carnobacterium* (Gram og Huss, 1996). Psykrotrofe bakterier vokser fra - 5 til 35 °C med et vekstoptimum mellom 25 - 30 °C (Adams og Moss, 2010).

Alle bakterier formerer seg ved at en celle deler seg i to datterceller. Veksten kan fremstilles ved hjelp av en logaritmisk graf, hvor det er fire hovedvekstfaser: lag-, log-, stasjonær-, og dødsfase.



**Figur 3.2:** Skjematisk fremstilt vekstkurve for bakterier.

Adams og Moss (2010) forklarer de fire fasene slik: I lag fasen tilpasser bakteriene seg til mediet de er i. Skadde celler blir reparert og nødvendige enzymer og andre forbindelser blir produsert. Her skjer det liten eller ingen celledeling. I log fasen deler cellene seg aktivt og det er god tilgang på næringsstoffer. Det er i denne fasen generasjonstiden til en bakterie bestemmes. I stasjonærfasen begynner tilgangen på næringsstoffer å bli mindre. Veksten stagnerer og forholdet mellom nye celler og celler som dør utjevner hverandre. I dødsfasen er det flere celler som dør i forhold til nye som kommer til, og antallet bakterier går ned.

Hvor raskt en bakterie kommer opp i log fasen avhenger blant annet av lagringsforhold og konkurrerende flora. I nyfanget, kjølelagret fisk på is tar det vanligvis mellom 7 – 12 dager (Lynum, 2005). Ved pakking i modifisert atmosfære med kjølelagring kan CO<sub>2</sub> forsinke veksten av bakterier ved å forlenge lag fasen og minimere vekst i log fasen (Hansen, 2008). Når veksten av enkelte bakterier hemmes, vil andre få bedre mulighet til å vokse frem.

## **Førringende bakterier**

Som oftest er det bare en liten andel av den totale bakteriefloraen som bidrar i dannelsen av forbindelser som gjør at et produkt blir uspiselig (Gram og Dalgaard, 2002). *Shewanella* spp., *Pseudomonas* spp., *Photobacterium* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. og Enterobacteriaceae har alle vært assosiert i forbindelse med fordervelse av fisk (Dalgaard, 2006). Av gruppen bakterier som forbindes med fordervelse av fisk er det noen få som klassifiseres som ansvarlige for fordervelsen, «Specific Spoilage Organisms» (SSO). *Shewanella putrefaciens* og *Pseudomonas* spp. har blitt identifisert som SSO på fersk, islagret fisk, mens *Photobacterium phosphoreum* har blitt identifisert for fisk i modifisert atmosfære med CO<sub>2</sub> som en av komponentene i pakkegassen (Gram og Huss, 1996).

### ***Photobacterium phosphoreum***

*Photobacterium phosphoreum* er store (5 µm) kokkobasiller som krever Natrium (Na<sup>+</sup>) for å vokse (Dalgaard, 1995). Bakteriene er psykrotrofe, Gram- negative og fakultativt anaerobe (Dalgaard, 1995). Ved anaerob vekst vil *P. phosphoreum* benytte TMAO som elektronakseptor, noe som fører til dannelsen av TMA. Dalgaard (1995) fant at hver bakteriecelle kan produsere 30 ganger mer TMA sammenlignet med *S. putrefaciens*, men mye mindre mengder H<sub>2</sub>S og CH<sub>3</sub>SH. I et MAP studie utført av Dalgaard et al. (1993) ble det bevist at *P. phosphoreum* har høy toleranse ovenfor CO<sub>2</sub>. Bakteriekonsentrasjonen på tidspunktet for uakseptabilitet lå rundt 7 log kde/g, i forsøk med både 2, 3, 29, 48 og 97 % CO<sub>2</sub> i pakkegassen (i kombinasjon med N<sub>2</sub> gass). Lengst holdbarhet (20 dager) ble oppnådd med 48% CO<sub>2</sub> i pakkegassen.

For å unngå problemer med *P. phosphoreum* kan fisk fryses før pakking, noe som vil inaktivere bakterien. Det ble oppnådd en total inaktivering av bakterien og forlengelse av holdbarhetstiden fra 11 til over 20 dager i torskefilet som ble MA- pakket etter lagring ved - 20 °C i åtte uker (Guldager et al., 1998). Bakterien har spesifikt blitt identifisert som SSO på torsk (Hovda et al., 2007), sei (Rudi et al., 2004) og kveite (Poli et al., 2006). Kunnskapen om *P. phosphoreum* har økt betydelig i senere tid, hvor oppdagelsen av at bakterien ikke vokser over 25 °C har vært viktig (Gram og Huss, 1996). Eldre forsøk har konkludert med at *P. phosphoreum* ikke har noen, eller liten betydning for førringelse av fisk (Abgrall og Cleret, 1990; Shewan, 1971).

### ***Pseudomonas* spp.**

*Pseudomonas* er en stor bakterieslekt med mye variasjon mellom bakterier av ulik art og stamme (Franzetti og Scarpellini, 2007). Bakteriene er psykrotrofe, Gram- negative aerobe staver (Adams og Moss, 2010). *Pseudomonas* er identifisert som SSO på fersk, kjølelagret fisk (Gram og Huss, 1996). Kvalitetsødeleggelsespotensialet til *Pseudomonas* kommer av nedbryting av aminosyrer som gir aldehyder, ketoner, estere og sulfider som kan gi fruktig, rått og svovelliknende lukt og smak (Gram og Huss, 1996). Dannelse av TMA eller H<sub>2</sub>S er ikke karakteristisk for *Pseudomonas* (Gram et al., 1990). På tidspunktet hvor fersk kjølelagret fisk betegnes som uakseptabel er mengde SSO oppe i 8 – 9 log kde/g (Gram og Huss, 1996). Pakking i oksygenfri atmosfære eller med høy CO<sub>2</sub> konsentrasjon vil hemme vekst av *Pseudomonas* (Enfors og Molin, 1980; Enfors og Molin, 1981) og antallet *Pseudomonas* bakterier overstiger sjelden 5 – 6 log kde/g (Gram og Huss, 1996).

### ***Shewanella putrefaciens***

*Shewanella putrefaciens* er psykrotrofe, Gram- negative fakultativ anaerobe stavbakterier (Adams og Moss, 2010). I tillegg til å være SSO på fersk, kjølelagret fisk, er *S. putrefaciens* også en SSO ved vakuumpakking (Dalgaard et al., 1993). *Shewanella putrefaciens* kan vokse under anaerobe forhold og danner TMA når TMAO benyttes som endelig elektronakseptor. Bakterien vil også danne H<sub>2</sub>S og CH<sub>3</sub>SH ved nedbryting av aminosyrer som inneholder svovel (Dalgaard et al., 1993). Flyktige svovelforbindelser gir en svært ubehagelig rått lukt (Gram og Huss, 1996). Bakterien er følsom ovenfor CO<sub>2</sub> (Dalgaard, 1995), høy O<sub>2</sub> konsentrasjon i pakkegassen (Boskou og Debevere, 1997) og pH under 6,2 (Boskou og Debevere, 1998).

## **EMBALLERING AV FERSK FISK**

Fersk fisk er som tidligere nevnt en råvare hvor utgangskvaliteten aldri er den samme, samtidig som den er lett bederelig med en varierende holdbarhetstid ved kjølelagring på is fra 2 – 14 dager (Stammen et al., 1990).

Emballasjens hovedoppgave er å holde et produkt i et lukket miljø, fra produksjon til sluttbruker. Emballasjen skal bevare produktets kvalitet ved å beskytte mot ytre påkjenninger som mekanisk skade, mikrobiell kontaminasjon, lys, fuktighet, uttørking, odør og gass (Eie, 2007; Robertson, 2010). Et beskyttet produkt har lengre holdbarhetstid og gir mindre matsvinn enn et uemballert produkt (Eie, 2007).

Valg av emballasje og pakkemetode må gjøres basert på produktet og dets anvendelse (Sung et al., 2013; Robertson, 2010). Fersk fisk som skal selges i løsvekt blir ofte pakket og distribuert i kasser av ekspandert polystyren (EPS) med is, for å sikre kontinuerlig kjøling ved lav temperatur. Ferdigpakket fersk fisk som skal selges fra hyllene i dagligvarebutikken er å finne som vakuumpakket og MAP.

Emballasjen er med på å gjøre det mulig med selvbetjening i butikken. Den blir et hjelpemiddel for å markedsføre varen og formidle hva pakningen inneholder, holdbarhetstid, krav til oppbevaring og behandling. Det stilles strenge krav til at pakkematerialer ikke skal utøve en trussel for miljøet eller inneholde skadelige stoffer som kan migrer inn i matvaren og påvirke smak og aroma (Eie, 2007; Robertson, 2010).

Sammen med en god emballaseløsning er det også viktig å stille høye krav til råvarekvalitet, hygiene under bearbeiding og pakking og kontinuerlig kjøling (Church, 1994). Emballasje kan ikke forbedre kvaliteten i et produkt eller erstatte god hygiene og kontinuerlig kjøling. Emballasjen er et hjelpemiddel som gjør det mulig å forlenge tiden det tar før bederelsen i et produkt starter (Farber, 1991). Målet med alle faktorene er å danne barrierer slik at mikroorganismene hemmes, eller forhindres fra å vokse i næringsmiddelet (Adams og Moss, 2010; Eie, 2007). Konseptet med å sette sammen flere faktorer som alene ikke gir et sikkert produkt med god kvalitet, men til sammen sikrer et godt resultat er kjent som hurdle- teknologi (Eie, 2007).

De tre bakteriene som har blitt identifisert som forringelsesbakterier i torsk, *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomonas* spp. og *Shewanella putrefaciens* har forskjellige vekstvilkår og forringende egenskaper som gjør at de alle må tas hensyn til ved emballering av fersk fisk. Ved bruk av MAP har CO<sub>2</sub> en bakteriostatisk effekt som hemmer de fleste Gram- negative bakterier. Dette er tilfelle for *Pseudomonas* spp. (Enfors og Molin, 1980) og *Shewanella putrefaciens* (Dalgaard, 1995), men ikke for *Photobacterium phosphoreum* som er CO<sub>2</sub> tolerant og ofte å finne på torsk da den er naturlig til stede i tarm hos marin fisk (Adams og Moss, 2010; Dalgaard et al., 1993). I tilfeller hvor fisk pakkes med modifisert atmosfære hvor CO<sub>2</sub> utgjør en del av pakkegassen er det sannsynligvis *P. phosphoreum* og melkesyrebakterier, som for eksempel *Carnobacterium maltaromaticum*, som får bedre mulighet til å vokse frem under kjølelagring (Gram og Dalgaard, 2002). Er det fravær av oksygen i pakkegassen, vil ikke *Pseudomonas* kunne vokse da de er aerobe bakterier (Adams og Moss, 2010). *Photobacterium phosphoreum* og *Shewanella putrefaciens* er fakultativ anaerobe, og vil kunne vokse og produsere TMA som er en av hovedkomponentene i lukt av forringet torsk (Dalgaard et al., 1993; Dalgaard, 1995). Utnyttningen av oksygenet i TMAO gjør det vanskelig å forlenge holdbarheten til fisk ved hjelp av vakuumpakking eller MAP uten oksygen i pakkegassen med hensyn til veksthemming av *Photobacterium phosphoreum* og *Shewanella purefaciens* (Gram og Huss, 1996).

Det foreligger mange studier på holdbarhet i fersk fisk. Gram og Huss (1996) samlet resultater fra flere studier hvor holdbarhetstiden til fersk fisk ved 0 – 4 °C var 1 - 2 uker i luft, 1 - 2 uker i vakuum og 1 - 3 uker i MAP, både for mager og fet fisk. Emborg et al. (2002) oppnådde en lengre holdbarhetstid for laks enn hvit fisk ved MA- pakking, noe som kan forklares i en lavere pH grad i laks, 6,3 mot pH 6,6 i de fleste typer hvitfisk. Sivertsvik et al. (2002) samlet resultatene fra flere tidligere holdbarhetsstudier og fant at flertallet av studiene oppnådde en forlengelse av holdbarhetstiden ved bruk av MAP med CO<sub>2</sub> som en del av pakkegassen på 30 – 60 % til sammenligning med luftlagring. Tabell 3.1 viser resultater fra noen studier av holdbarhetstid i torskefilet.

**Tabell 3.1:** Holdbarhetstid i torskefilet under ulike lagringsforhold.

Lagringstemperatur °C	Atmosfære CO <sub>2</sub> :N <sub>2</sub> :O <sub>2</sub>	Holdbarhetstid dager	Referanse
0	50:50:0	>11	(Hovda et al., 2007)
0	50:0:50	>11	
2	40:60:0	11	(Guldager et al., 1998)
2	40:40:20	13	
0	40:30:30	12,5	(Cann et al., 1983)
5	40:30:30	<7	
10	40:30:30	3	
0	Luft	9 – 10	(Gram et al., 1987)
0	Vakuum	9 – 10	
20	Luft	1	
20	Vakuum	1	
1	60:0:40	14 – 21	(Hansen et al., 2007)
1	Vakuum	7 – 14	

### Pakking med modifisert atmosfære

Pakking med modifisert atmosfære blir stadig mer utbredt for å møte forbrukeres ønske om ferske kjølevarer med forlenget holdbarhet, uten konserveringsmidler (Sivertsvik et al., 2002; Farber, 1991). Modifisert atmosfærepakking kan bidra til å forlenge holdbarheten i et produkt ved å inhibere bakterievekst og hindre oksidative reaksjoner (Church, 1994). Ved bruk av MAP byttes luften i pakningen ut med en bestemt gass, eller gassblanding. Gasssammensetningen i et MAP produkt vil ikke bli kontrollert eller justert under lagringstiden men den vil endre seg som følge av absorpsjon inn i produktet, mikrobiologisk aktivitet og permeabilitet i pakkematerialet (Sivertsvik et al., 2002). Modifisert atmosfærepakking er ikke det samme som pakking med kontrollert atmosfære (CA), som hovedsakelig benyttes på større produktvolum, hvor gasssammensetning vil bli kontrollert og justert for å være lik gjennom hele lagringstiden (Church, 1994).

Anvendelsen av MAP på sjømat har vært studert siden tidlig på 1900 tallet (Killeffer, 1930; Coyne, 1932). Ved pakking i modifisert atmosfære er det mulig å forlenge holdbarhetstiden i et ferskt produkt med 50 til 400 % (Hotchkiss, 1988). Ved pakking av mager fisk er en

gassblanding bestående 40% CO<sub>2</sub> + 30 – 60% O<sub>2</sub> + 0 – 40% N<sub>2</sub> å anbefale, mens det for fet fisk anbefales 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> (Sivertsvik, 2007; Randell et al., 1995).

Forlengt holdbarhet ved MA- pakking avhenger av fiskeslag, fettinnhold, mikrobiell sammensetning, gassblanding, forholdet mellom gass og produkt volum (G/P- forhold) og lagringstemperatur (Sivertsvik et al., 2002). Holdbarhetstiden til fersk fisk begrenses som oftest av mikrobiell aktivitet, hvor log 7 - 8 kde/g bruker å være totalt antall bakterier på tidspunktet for sensorisk uakseptabilitet (Ólafsdóttir et al., 1997). I følge Gram og Huss (1996) avhenger tiden det tar før forringelse oppstår hovedsakelig av lagringstemperatur og fiskeslag. I noen tilfeller med fet fisk eller ved superkjøling kan det være andre årsaket til forringelse, som for eksempel harskning (Sivertsvik et al., 2002).

## **Pakkegasser**

Luft inneholder 78.08% nitrogen (N<sub>2</sub>), 20.95% oksygen (O<sub>2</sub>), 0.035% karbondioksid (CO<sub>2</sub>), vanddamp og spor av edelgasser. Gassblandingen som benyttes ved MAP bestemmes ut fra produktets sensitivitet mot O<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub>, mikrobiota og dets egenskaper. De vanligste gassene som benyttes i MAP er N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub> (Church, 1994).

## **CO<sub>2</sub>**

Karbondioksid er den viktigste gassen ved MA- pakking av fisk, fordi den har en bakteriostatisk- og fungistatisk effekt (Sivertsvik et al., 2002). Det har vist seg at 20% CO<sub>2</sub> i pakkegassen gir en betydelig hemming av mikroorganismer (Devlieghere og Debevere, 2000). For å oppnå best mulig inhiberende effekt ved MAP er det et nøkkelkriterium at tilstrekkelig mengde CO<sub>2</sub> blir løst i produktet (Devlieghere et al., 1998). I tillegg til mengde CO<sub>2</sub> som løses i produktet avhenger den inhiberende effekten av gass/produkt forhold, CO<sub>2</sub> konsentrasjon i pakkegassen, startkonsentrasjon av bakterier, hvor lenge produktet har vært lagret, type produkt og temperatur (Church, 1994). Devlieghere et al. (1998) fant at de viktigste parameterne for mengde CO<sub>2</sub> som ble løst i produktet var startkonsentrasjon av CO<sub>2</sub> i pakkegassen og gass/produkt forhold. Gass/produkt forholdet er forholdet mellom gass- og produktvolum i pakningen. Tidligere forskning har kommet frem til at et 3/1 forhold er å anbefale (Randell et al., 1995).



Karbondioksidgass forsinket mikrobiell vekst ved å forlenge lag fasen og minimere vekst i lag fasen til mikroorganismene (Reddy et al., 1992). Det er en kombinasjon av flere mekanismer som gir den hemmende effekten av CO<sub>2</sub>. Når CO<sub>2</sub> løser seg i vann ved pH under 8, som i fisk, kan nye forbindelser dannes, som vist i likevektsreaksjonen under (Dixon og Kell, 1989).



Når karbonsyre (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) dissosierer dannes bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) og hydrogenioner (H<sup>+</sup>) som bidrar til å senke pH i produktet (Farber, 1991). Karbonsyre har egenskaper som en svak organisk syre og kan transporteres udisosiert over cellemembraner, og gi en veksthemmende effekt (Daniels et al., 1985).

Karbondioksid gass løses godt i vann og fett (Sivertsvik et al., 2002). Løseligheten påvirkes av temperatur, og vil øke når temperaturen blir lavere (Farber, 1991). En kontinuerlig lav lagringstemperatur er essensiell for å kunne benytte seg av fordelene med MAP. Høyere temperatur fører til at mindre CO<sub>2</sub> blir løst i produktet, og en generelt dårligere inhiberende effekt fra både temperatur og CO<sub>2</sub>, som kan resultere i høyere mikrobiell og enzymatisk aktivitet (Sivertsvik et al., 2002).

Den veksthemmende effekten til CO<sub>2</sub> er varierende. De fleste Gram- negative bakterier inhiberes, det samme gjelder mugg og gjær, mens Gram- positive bakterier er mer motstandsdyktige, da de har et tykt peptidoglykanlag i cellevegg (Church, 1994).

## O<sub>2</sub>

Med oksygen som en del av pakkegassen kan dannelsen av den illeluktende forbindelsen TMA (Gram og Huss, 1996) og vekst av anaerobe bedervelsesbakterier hemmes (Farber, 1991). Boskou & Debevere (1998) fant at reduksjonen av TMAO til TMA hemmes ved tilsetning av et minimum av 10 % O<sub>2</sub> i pakkegassen. For noen bakterier kan oksygen i høye konsentrasjoner være toksisk (Huss, 1988). Pakkegass som inneholder O<sub>2</sub> kan gi problemer ved pakking fettrik fisk da det kan oppstå oksidativ harskning.

Tilstedeværelse av 1 – 2 % oksygen kan også hemme vekst av obligat anaerobe bakterier. Dette er en problemstilling man må ta hensyn til i produkter som er spiseklare, der forholdene er optimale for vekst av patogene bakterier som *Clostridium botulinum* (Eie, 2007).

*Clostridium botulinum* type E er naturlig å finne i tempererte farvann og kan vokse anaerobt

ned til 3,3 °C med en saltkonsentrasjon opp til 5 % (Huss et al., 1995). Under vekst i et produkt vil bakteriene kunne produsere type E toksin, som i verstefall kan være dødelig for konsumenten av produktet. Toksinet er varmelabilt og vil inaktiveres ved tilstrekkelig varmebehandling, 5 min ved 85 °C (Granum, 2007).

## **N<sub>2</sub>**

Nitrogengass er en inert gass uten smak som løser seg dårlig i vann og fett. Dens funksjon som pakkegass er å erstatte luft og hindre vakuumeffekt som oppstår ved for høy CO<sub>2</sub> konsentrasjon i pakningen. Dette gir nitrogen betegnelsen inert fyllgass (Church, 1994).

## **Pakkemaskiner**

Modifisert atmosfærepakking skjer enten ved hjelp av en dyptrekker (termoformer) eller skålpakker. En dyptrekker krever to plastfilmer, en tykkere underfilm som det formes skåler av, og en tynnere overfilm som forseglar hver enkelt pakning. Maskinen har et spesialtilpasset formverktøy som presser ut skåler i en forvarmet underfilm. Skålene fylles med produkt, enten manuelt eller automatisk, og føres inn under et sveiseverktøy. Her byttes luften ut med en gassblanding og overfilmen føres ned og sveises til underfilmen ved hjelp av varme og trykk. Prosessen avsluttes ved at hver enkelt forbrukerpakning stanses ut. En skålpakker krever ferdige plastskåler og en overfilm. Skålene plasseres i en skuff i maskinen, produktet legges i, og skuffen skyves inn. Her skjer den samme prosessen som under sveiseverktøyet i dyptrekkeren. Luften byttes ut med en ønsket gassblanding og overfilmen sveies på (Eie, 2007).

## **Emballasjemateriale**

Emballasjematerialet som anvendes for MAP er plast. Mye brukte polymerer er polyetylentereftalat (PET), polypropylen (PP), polyetylen (PE) og etylenvinylalkohol (EVOH) (Church, 1994; Eie, 2007). Polyetylen og polypropylen er gode fuktbarrierer, med god sveiseegenskap ved forsegling. Polyetylentereftalat og etylenvinylalkohol er gode gassbarrierer, som er sensitive mot fukt (Pettersen, 2004). Flere polymerer settes som oftest sammen til et laminat eller en film, slik at de forskjellige egenskapene kan kombineres for best mulig beskyttelse av produktet (Pettersen, 2004). Da beskyttes polymerene som er sensitive mot fukt mellom lag av polymerer som har høy fuktbarriere.

## 4. MATERIALER OG METODER

### Bakteriestammer

Bakteriestammene som ble benyttet i forsøket har blitt isolert fra torsk, slaktet ved Tromsø Havbruksstasjon 16. juni 2014. Torsken som ble benyttet til bakterieisoleringen ble fanget på samme tidspunkt som torsken benyttet i hovedforsøket, men hadde kort lagringstid i merd, ca. en uke. Det var forventet at stammer av alle de tre nevnte SSO ble isolert, men dette var ikke tilfelle for *Shewanella putrefaciens*, som derfor ikke har blitt brukt i oppgaven. Totalt har 11 isolerte bakteriestammer blitt benyttet i oppgaven, åtte stammer av *Pseudomonas* (*Pseu.*) og tre stammer av *Photobacterium* (*Photo.*):

- *Pseudomonas psychrophila*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Pseudomonas* sp.
- *Pseudomonas syringae*
- *Pseudomonas fragi*
- *Pseudomonas lundensis*
- *Pseudomonas rhodesiae*, stamme fra fersk fisk
- *Pseudomonas rhodesiae*, stamme fra fryst fisk
- *Photobacterium phosphoreum*, fra fersk fisk
- *Photobacterium phosphoreum*, fra fisk etter 9 dagers lagring
- *Photobacterium* sp.

## **INNLEDENDE FORSØK**

For å være i stand til å lage et inokulum med kjent bakteriekonsentrasjon i hovedforsøket ble det kjørt separate vekstforsøk med de 11 utvalgte bakteriestammene. Alle ble dyrket frem i Long and Hammer (L&H) buljong, og torskebuljong. Forsøket varte i 7 dager. Resultatene er fremstilt i Vedlegg 1.

## **Medietillaging**

### **Torskebuljong og agar**

Torskebuljong og agar ble laget for å best mulig kunne simulere vekstforholdene i fersk torskefilet. Metoden er utarbeidet for å påvise bedervelsesbakterier fra fisk (Chandrasekaran et al., 1985). Tillagingen krevde to arbeidsdager.

Fem kg fersk torskefilet, uten skinn og bein ble delt opp i mindre biter og veid inn i 100 g batcher i stomacherposer med filter (VWR International, Radnor, USA). Det ble tilsatt 100 g vann før homogenisering (Smasher lab blender – AESAP 1064, AES Laboratorie, Marcy l'Etoile, Frankrike) i 60 sekunder ved romtemperatur. Supernatanten ble overført til 200 ml sentrifugerør, som ble fylt 2/3 fulle. Rørene ble balansert og sentrifugert ved 8 120 rpm i 30 min (Sorvall RC 5C PLUS Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, USA). Supernatanten ble samlet i 500 ml Pyrex flasker til autolavering. Benyttet en certoklav (EL sterilizer, CertoClav GmbH, Traun, Østerrike) og steriliserte løsningen ved 121 °C i 15 minutter. For å unngå at løsningen skulle koke over ble det ikke fylt mer enn 400 ml i hver flaske. Proteinene denaturerte under varmebehandlingen og dannet hvitt bunnfall. Etter autoklavering ble løsningen kjølt ved 4 °C til neste dag. Dag 2 ble løsningen igjen fordelt i 200 ml sentrifugerør, som ble fylt 2/3 fulle og balansert. Rørene ble sentrifugert ved 8 120 rpm i 30 minutter (Sorvall RC 5C PLUS Centrifuge, Beckman Coulter) og torskebuljongen (supernatanten) ble fordelt i Pyrex flasker, 400 ml i hver. For å være sikker på at *P. phosphoreum* ville vokse i mediet ble buljongen tilsatt 1 % salt, i dette tilfellet 4 g per flaske. For å støpe agar ble det i tillegg tilsatt 1,5 % agar (Bacteriological Agar, Oxoid Ltd., Hampshire, Storbritannia), henholdsvis 6 g til hver flaske. Den ferdige blandingen ble sterilisert ved 121 °C i 15 minutter i certoklaven (EL sterilizer). Agaren ble avkjølt i vannbad til ca. 45 °C, før platestøping i sterilbenk. Hver petriskål ble fylt med rundt 20 ml agar. For å fjerne luftbobler ble en flammebrenner ført over skålene umiddelbart etter støping. Ferdige skåler og buljong ble oppbevart ved 4 °C. Fem kilo torskefilet gav omtrent 1,2 liter torskebuljong.

### Long and Hammer buljong og agar

Til forsøket ble det laget Long and Hammer agar (van Spreekens, 1974) etter følgende oppskrift (NMKL, 2006), med noen modifikasjoner:

Proteose- pepton no. 2	20,0 g (Bakteriologisk pepton ble benyttet)
Gelatin	40,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
NaCl	10,0 g (8 g ble benyttet)
Agar	15,0 g
Destillert vann, eller av tilsvarende kvalitet	1 000 ml
Fe(III)NH <sub>4</sub> Citrat (10 % løsning)	2,5 ml

Følgende ingredienser ble brukt: Bacteriological peptone (Oxoid Ltd., Hampshire, Storbritannia), Gelatine for microbiology (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck AB, Stockholm, Sverige), NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland), Bacteriological Agar (Oxoid Ltd.), Fe(III)NH<sub>4</sub>Citrat (Sigma- Aldrich CO., St. Louis, USA).

Det ble også laget L&H buljong basert på samme oppskrift, uten tilsetning av gelatin og agar. Long and Hammer ble valgt som medium på grunnlag av at det fremmer vekst av marine bakterier, både *Photobacterium* og *Pseudomonas*. *Photobacterium* er avhengig av salt for å kunne vokse, derfor er saltinnholdet i ferdig medie 1 %.

Proteose- pepton no. 2 ble erstattet med bakteriologisk pepton og mengde NaCl ble redusert til 8 g/1000 ml vann på grunn av høyere saltinnhold i bakteriologisk pepton enn i proteose-pepton. Alle ingrediensene til agaren ble veid inn, med unntak av jernammoniumcitrat-løsning, i 500 ml eller 1 000 ml Pyrex flasker som var beregnet for autoklaving. Det ble benyttet ionebyttet vann og flaskene ble aldri fylt over 400 ml/800 ml for å unngå at det kokte over under autoklaving. Oppskriften ble justert etter mengde væske som ble benyttet. Det var ikke nødvendig å løse opp ingrediensene og innstille pH før autoklaving, da ingrediensene til mediet holdt riktig pH. Ingrediensene ble blandet ved hjelp av magnet i flaska og magnetrører, før løsningen ble sterilisert i certoklaven (EL sterilizer) ved 121 °C i 15 min. Flytende agarmedium ble satt direkte på magnetrører etter autoklaving, for å røre opp gelatin som la seg i bunnen av flaska. Mediet ble deretter avkjølt til 45 °C i vannbad før jernammoniumcitrat- løsning ble tilsatt. Jernammoniumcitrat- løsning (10 %) ble laget med Fe(III)NH<sub>4</sub>Citrat (Sigma- Aldrich CO.) og destillert vann. Løsningen ble sterilfiltrert gjennom

filter med 0,22 µm poreåpning før bruk. Etter tilsetning av Fe(III)NH<sub>4</sub>Citrat- løsningsen ble agaren støpt i petriskåler i sterilbenk. Skålene ble oppbevart ved 4° C.

For å lage L&H buljong ble samme oppskrift som for agar benyttet, uten tilsetning av agar og gelatin. Fremgangsmåten var lik som for tillaging av agar, men røring etter autoklaving var ikke nødvendig. Buljongen ble oppbevart på Pyrex flasker ved 4 °C.

### **Oppdyrking av bakteriestammer til vekstforsøk**

Hver av de 11 bakteriestammene ble tatt opp fra frysestokk (- 80 °C, tryptone soya broth (TSB) tilsatt 20 % glyserol), og podet over på L&H agar ved hjelp av 1 µl steril podeøse. Agarskålene ble inkubert aerobt ved 15 °C i 5 dager. Fra hver skål ble en full 1 µl steril podeøse med bakterier overført til sterile rør med 15 ml L&H buljong. Rørene ble inkubert aerobt ved 15 °C i 5 dager.

### **Vekstkurve i torskebuljong**

Etter 5 dager ble bakterieløsning med oppdyrkede stammer podet over i nye sterile rør med 15 ml torskebuljong (1 % poding). Kvantifisering av bakterievekst ble utført på dag 0, 2, 3 og 6 ved utplating på torskeagar. Ved behov ble hver bakteriestamme fortynnet i sterilt peptonvann (0,1 % (w/v) pepton (Oxoid Ltd.) og 0,05 % (w/v) salt (Merck AB)). Fortynningsrekker ble laget ved å tilsette 100 µl bakterieløsning til et sterilt eppendorfrør med 0,9 ml peptonvann. Fortynningen ble godt blandet ved hjelp av vortex mikser (Stuart, SA8, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Storbritannia). Dette ble gjentatt til ønsket fortynning, med en 10x økning i fortynningen for hver overføring.

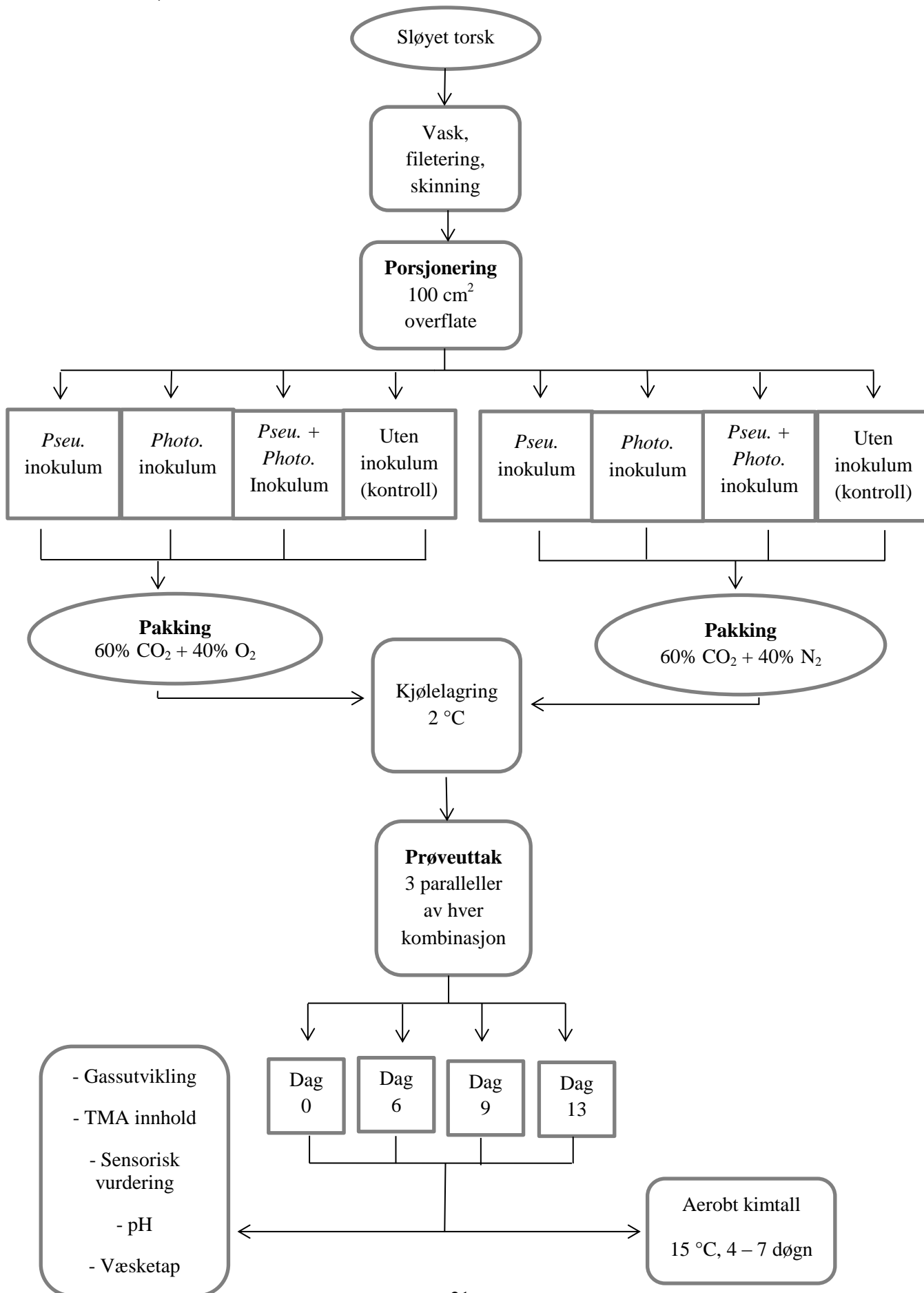
Fra ønsket fortynning ble sådd ut på torskeagar, manuelt eller ved hjelp av automatisk platespreder (Whitley Automatic Spiral Plater (WASP), WB03TJ, Don Whitley Scientific, West Yorkshire, Storbritannia). Ved manuell platespredning ble 100 µl prøve overført til agarskål og spredt ut ved hjelp av en steril vinkelstav. Ved bruk av WASP ble prøven overført til et beger, hvor fra maskinen sugde opp 50 µl som den spiral spredte ut på en agarskål. Maskinen var koblet til en vakuumpumpe (Whitley vacuum source 602, Don Whitley Scientific, West Yorkshire, Storbritannia) for å kunne suge opp prøver og rense systemet mellom hver platespredning. Etter utspredning ble skålene tørket uten lokk i sterilbenk, før aerob inkubering ved 15 °C i 4 – 7 dager før avlesning.

Ved avlesning ble skåler med 30 – 300 kolonier antatt å være representative, og antallet enkeltkolonier ble ganget med fortynningsfaktoren for å finne antall kde/ml. Der automatisk platespreder ble brukt ble en automatisk tellemaskin (Acolyte Colony Counter, Synbiosis, Cambridge, Storbritannia) benyttet til å beregne antall kde/ml.

### **Vekstkurve i Long and Hammer buljong**

Etter 5 dager ble bakterieløsning med oppdyrkede stammer podet (1 %) over i nye sterile rør med 15 ml L&H buljong. Kvantifisering ble utført på dag 0, 1, 2, 3, 4, 6 og 7 ved utplating på L&H agar. Fremgangsmåten var lik som beskrevet under dyrking i torskebuljong.

# HOVEDFORSØK





## **Fiskeråstoff**

Torsken som ble benyttet i denne masteroppgaven kom fra Tromsø havbruksstasjon, lokalitet Skulgam. Fisken ble villfanget med snurrevad utenfor Mehamn og mellomlagret ved Myre «torskehotell» i Honningsvåg før den ble fraktet til Tromsø Havbruksstasjon i juni 2014. Den har der stått i merd og blitt vedlikeholdsforet med lodde. Torsken ble tatt ut av merd og slaktet 23. februar 2015. Videre ble den sendt til Nofima Ås, hvor den ble filetert og pakket 25. februar 2015.

## **Pakkekombinasjoner**

Fiskeråstoffet skulle filetert og fordeles mellom fire ulike behandlinger:

- Inokulering med *Pseudomonas* inokulum (8 stammer)
- Inokulering med *Photobacterium* inokulum (3 stammer)
- Inokulering med *Pseudomonas* + *Photobacterium* inokulum (11 stammer)
- Uten inokulum (kontroll)

Fisken skulle så pakkes i to ulike gassblandinger, ferdig blandet hos leverandør (AGA AS, Oslo, Norge):

- 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub>
- 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub>

Behandling og pakkegass gav åtte ulike pakkekombinasjoner. Antall filetstykker som var nødvendig er vist i Tabell 4.1. Det ble beregnet tre ekstra pakninger av hver pakkekombinasjon i tilfelle noe skulle gå galt. Filetstykker uten pakkegass ble tatt som referanse og til dag 0 prøver, før MA- pakking.

**Tabell 4.1:** Fordeling av filetstykkene som ble benyttet i forsøket.

<b>Pakkegass</b>	<b>Inokulum</b>	<b>Antall filetstykker</b>
Ingen (Uttak før pakking)	<i>Photobacterium</i>	3
	<i>Pseudomonas</i>	3
	Blandet	3
	Kontroll	6
60% CO <sub>2</sub> + 40% O <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	12
	<i>Pseudomonas</i>	12
	Blandet	12
	Kontroll	12
60% CO <sub>2</sub> + 40% N <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	12
	<i>Pseudomonas</i>	12
	Blandet	12
	Kontroll	12
<b>Totalt</b>		<b>111</b>

### **Filetstykker av torsk**

Sløyet fisk ble vasket, filetert og skinnert, på mest mulig hygienisk måte. Målet var å få en tilnærmet «steril» behandling frem til pakking. Fileten ble delt opp i stykker, hvor overflaten på hvert enkelt stykke skulle være så nær 100 cm<sup>2</sup> (5 x 20 cm) som mulig. Vekt på filetstykkene skulle være rundt 300 g og gass/produkt forholdet i pakningene 2/1. Hvert enkelt filetstykke ble lagt i plastskåler (50 mm HDPE, Promens, Moss, Norge) for inokulering og pakking.

## Bakterieinokulum

Det ble laget tre ulike inokulum av CATCH- stammene, med celletall rundt 6 log kde/ml. Minimum 24 ml av hvert inokulum var nødvendig for å få nok til alle filetstykkene. Inokulum var som følger: *Pseudomonas* inokulum bestående av åtte *Pseudomonas* stammer, *Photobacterium* inokulum med tre *Photobacterium* stammer og et inokulum med en blanding av alle stammene, hvor forholdet mellom *Photobacterium* og *Pseudomonas* var 1:1.

Tiden som ble beregnet på å dyrke frem bakteriene var basert på vekstkurvene fra det innledende forsøket (Se Vedlegg 1). Samtidig med at bakteriene ble dyrket frem til hovedforsøket ble renheten til hver av bakteriestammene sjekket ved platespredning på L&H agar og kolonier fra hver av bakteriestammene ble sekvensert for å bekrefte at identitet til bakteriene var riktig før hovedforsøket skulle utføres.

De tre *Photobacterium* stammene ble tatt ut fra frysestokk (- 80 °C, TSB tilsatt 20 % glyserol) og podet over i separate sterile fortynningsrør med 5 ml L&H buljong 12 dager før hovedforsøkets start (dag 0). Stammene ble også strøket ut på L&H agar for å kontrollere vekst. Brukte 1 µl sterile podeøser til å gjennomføre overføringene. Rør og skåler ble inkubert aerobt ved 15 °C. Etter 6 dager med inkubering ved 15 °C ble 250 µl fra hver bakteriekultur podet over i sterile rør med 25 ml L&H buljong, som ble inkubert aerobt ved 15 °C frem til hovedforsøket skulle gjennomføres.

*Pseudomonas* stammene ble tatt ut fra frysestokk (- 80 °C, TSB tilsatt 20 % glyserol) ni dager før hovedforsøkets start (dag 0). Stammene ble strøket ut på L&H agar for å kontrollere vekst og podet over i L&H buljong før inkubering ved 15 °C i fire dager. Stammene ble så podet om, på samme måte som *Photobacterium* stammene og inkubert aerobt ved 15 °C til hovedforsøket skulle gjennomføres.

På dagen for hovedforsøket ble det med grunnlag i resultatene fra det innledende forsøket (Vedlegg 1) antatt at *Pseudomonas* stammene hadde kommet opp i en konsentrasjon på 9 log kde/ml. Alle stammene ble fortynnet ned til 6 log kde/ml ved hjelp av sterile fortynningsrør med 9 ml peptonvann. Hver enkelt stamme ble blandet godt, og 1 ml løsning overført til fortynningsrøret. Ved å gjenta denne overføringen tre ganger for alle *Pseudomonas* stammene kom bakteriekonsentrasjonen ned i 6 log kde/ml. Fortynt bakteriekultur à 4 ml fra hver av de 8 *Pseudomonas* stammene ble blandet sammen i et sterilt 50 ml rør. Dette ble utført i to paralleller, og gav to rør med 32 ml *Pseudomonas* inokulum i hver.

*Photobacterium* stammene ble antatt å ha kommet opp i en konsentrasjon på 8 log kde/ml (Vedlegg 1). Hver stamme ble fortynnet ned til 6 log kde/ml ved å overføre 200 µl bakteriekultur til sterile fortynningsrør med 19,8 ml peptonvann. 10 ml fra hver av *Photobacterium* stammene ble overført til et sterilt 50 ml rør, dette gav 30 ml *Photobacterium* inokulum. Til et siste 50 ml rør ble det tilsatt 5 ml av hver av de tre *Photobacterium* stammene og 15 ml *Pseudomonas* inokulum. Fikk da tre inokulum: 32 ml *Pseudomonas* inokulum, 30 ml *Photobacterium* inokulum og 30 ml *Pseudomonas* + *Photobacterium* inokulum.

Alt arbeid med bakteriestammene ble utført i sterilbenk. Etter tillaging av inokulum ble de oppbevart på is frem til bruk.

### **Inokulering av torskefilet**

Filetstykkene ble inokulert med 1 ml bakterieinokulum, som var forventet å gi en startkonsentrasjon på fiskens overflate rundt 4 log kde/g. Inokulum ble umiddelbart fordelt på fiskens overflate ved hjelp av en steril vinkelstav. Det ble inokulert 27 filetstykker med hvert bakterieinokulum, samt 30 fiskebiter uten inokulum.

### **Pakking**

To og to skåler ble pakket i en skålpakkemaskin (Polimoon 511 VG, Promens, Kristiansand, Norge). Pakkemaskinen erstattet lufta i pakningene med ønsket gassblanding og sveiset på en klar overfilm bestående av PET/PE/EVOH/PE (Biaxer 65 XX HPF AF, Wihuri Oy, Wipak, Nastola, Finland) som hadde en sveisetemperatur på 160 °C. 12 filetstykker med hvert inokulum samt 12 filetstykker uten inokulum ble pakket i 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gass. Like mange prøver ble pakket i 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> gass. Dette resulterte i åtte ulike pakkekombinasjoner av inokulum og pakkegass, 96 skåler totalt. 3 fiskestykker uten inokulum ble vakuumpakket individuelt for å ha en referanse til den sensoriske vurderingen på de kommende uttaksdagene.

De MA- pakkede fiskestykkene ble lagret ved 2 °C i opp til 13 dager. Temperatur ble kontrollert ved hjelp av tre automatiske loggere (KOOLTRACK data loggers, KoolTrack Inc., Palm Beach Gardens, USA) som registrerte temperatur hvert 15. minutt. Referansestykkene ble fryst ved – 40 °C.

## **Uttak og analyser**

Lagringsforsøket varte i 13 dager, med prøveuttak ved dag 0, 6, 9 og 13. På hver uttaksdag ble 3 paralleller fra hver pakkekombinasjon analysert. Dag 0 ble prøvene tatt ut før MA- pakking. Følgende analyser ble utført i forsøket:

- Gassutvikling (1)
- Mikrobiologisk analyse (4)
- Trimetylammin konsentrasjon (5)
- Sensorisk vurdering av lukt (3)
- pH (6)
- Væsketap (2)
- Statistisk analyse

Nummerering indikerer rekkefølgen av analysene ved hver uttaksdag.

## **Gassutvikling**

Gass- sammensetning i pakningene ble målt ved dag 6, 9 og 13, ved hjelp av en O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> headspace analyser (CheckMate3, PBI- Dansensor A/S, Ringsted, Danmark). Maskinen målte prosentvis konsentrasjon av oksygen (O<sub>2</sub>) og karbondioksid (CO<sub>2</sub>) ved å suge opp 3 ml headspace gass gjennom en sprøytespiss. Spissen ble manuelt ført inn i pakningen gjennom et gummisepta (PBI- Dansensor A/S) som ble feset på overfilmen for å hindre gasslekkasje.

## **Mikrobiologisk analyse**

Mikrobiologisk analyse ble utført for å finne totalantall av psykrotrofe aerobe bakterier i torskefiletene. Analysen ble utført ved hjelp av L&H agar, fremgangsmåte for tillaging er å finne under innledende forsøk.

## **Prøvepreparering**

En fiskebit på rundt 3 x 3 x 1 cm ble skjært ut av overflaten på hver filet og veid inn i en stomacherpose med filter (VWR International). Arbeidet ble utført ved hjelp av en steril skalpell og pinsett, som ble brent av mellom hver parallell. Skalpellbladet ble byttet ut mellom hver serie. Hver enkelt bit ble fortynnet 1:10 i peptonvann ved hjelp av en automatisk doserer som tilsatte væske basert på prøvens vekt (Dilumat 3 MK2 – AESAP 1055, AES

Laboratorie, Marcy l'Etoile, Frankrike). Prøven ble så homogenisert (Smasher lab blender, AES Laboratorie) i 60 sekunder ved romtemperatur. Supernatanten ble overført til sterile rør og benyttet videre i den mikrobiologiske analysen. Etter alle uttak var ferdige ble resterende supernatant fryst ned for å ha en kontroll i tilfelle noe skulle gå galt.

### **Fortynning av prøver**

Ved behov ble prøvene fortynnet på uttaksdagen, etter antatt mengde bakterier til stede på torskefiletene. Fortynningsrekker ble laget ved å tilsette 500 µl prøve i et sterilt fortynningsrør med 4,5 ml peptonvann. Fortynningen ble godt blandet før 500 µl ble overført til neste fortynningsrør med 4,5 ml peptonvann. Dette ble gjentatt til ønsket fortynning, med en 10x økning i fortynningen for hver overføring.

### **Platespredning**

Ønsket fortynning fra de ulike prøvene ble spredt på L&H agar, enten for hånd eller maskinelt, med WASP (Don Whitley Scientific). Ved manuell platespredning ble 100 µl prøve overført til agarskål og spredt ut ved hjelp av en steril vinkelstav. Ved bruk av WASP ble prøven overført til et beger, hvor fra maskinen sugde opp 50 µl som den spiral spredte ut på en agarskål. Maskinen var koblet til en vakuumpumpe (Don Whitley Scientific) for å kunne suge opp prøver og rense systemet mellom hver platespredning. Etter utspredning ble skålene tørket uten lokk i sterilbenk, før inkubering ved 15 °C i 4 – 7 dager.

### **Avlesning av skåler**

Ved avlesning ble skåler med 30 – 300 kolonier benyttet, og antallet enkeltkolonier ble ganget med fortynningsfaktoren for å bestemme celletallet (kde/g). Der automatisk platespreder ble benyttet ble en automatisk tellemaskin (Acolyte Colony Counter, Synbiosis) benyttet til å beregne celletallet (kde/g).

## **Trimetylammin konsentrasjon**

Mengde TMA ble analysert ved hjelp av Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC- MS), en analysemetode som måler flyktige komponenter i en prøve.

### **Prøvepreparering**

Til analysen ble det skjært ut en fiskebit på rundt 5 x 2 x 1 cm fra overflaten på hver torskefilet. Hver fiskebit ble pakket i aluminiumsfolie, merket med prøvenummer og vakuumbært i en samlepose for hver uttaksdag. Arbeidet ble utført ved hjelp av en steril skalpell og pinsett, som ble brent av mellom hver parallell. Skalpellbladet ble byttet ut mellom hver serie. Prøvene ble oppbevart ved - 40 °C frem til GC- MS analysen ble utført.

For hver prøve ble halvtint fisk homogenisert og 5 g av den homogeniserte massen ble analysert for å finne mengde TMA. Det ble tatt utgangspunkt i Olsen et al. (2006) sin fremgangsmåte for GC- MS, med noen modifikasjoner, som er beskrevet av Hansen et al. (2007) under materialer og metoder.

### **Sensorisk vurdering av lukt**

Et utrent panel på 4 – 6 deltakere deltok ved uttaksdag 6, 9 og 13 for å bedømme om prøvene var akseptable for konsum, basert på lukt. En karakterskala fra 1 – 5 ble benyttet, hvor 1 indikerte frisk og god lukt med høy grad av ferskhet mens 5 indikerte svært dårlig lukt med liten grad av ferskhet. Halve karakterer var tillatt og dommerne ble oppfordret til å komme med beskrivelse av lukten. Bedømmingen skilte mellom akseptabel og uakseptabel lukt, hvor karakter over 3 ble regnet som uakseptabel kvalitet for konsum.

Et hjørne av hver prøvepakning ble åpnet fem minutter før bedømmingen, slik at pakkegassen ikke skulle påvirke resultatet. Prøvene ble randomisert og sammenlignet med kontrolltorsk som ble vakuumpakket og fryst ved - 40 °C på dag 0, og tatt opp til tining ved 2 °C dagen før prøveuttak. Kontrolltorsk ble satt til å ha beste vurdering på skalaen, karakter 1. For å forhindre kontaminering av prøvene ble den sensoriske analysen utført uten å fysisk være i kontakt med fisken.

## **pH**

Etter prøver til GC– MS og mikrobiologisk analyse hadde blitt tatt ut ble pH målt i det resterende fiskestykket ved hjelp av et Knick pH meter (Knick GmbH & Co, Berlin, Germany). pH metret ble kalibrert med pH 4.01 buffer (WTW) og pH 7 buffer (WTW) ved hver uttaksdag. Benyttet da en pH elektrode som var beregnet for fisk og kjøtt (N/S 5290739, Mettler Toledo, Urdorf, Sveits), som ble ført 0,5 -1 cm inn i fiskefileten. Elektroden ble vasket med destillert vann mellom hver måling.

## **Væsketap**

Ved hver uttaksdag ble pakningene veid før de ble åpnet. Den tomme pakningen med overflødig væske ble igjen veid etter at fisken hadde blitt tatt ut, for å finne væsketapet fra hver torskefilet. Prosentvis ble væsketapet beregnet etter følgende formel:

$$\frac{\text{Vekt av tom pakning med væske på uttaksdag}}{\text{Vekt av pakning med torskefilet}} \times 100$$

## **Statistisk analyse**

Den statistiske analysen ble gjennomført ved hjelp av dataprogrammet Minitab, versjon 17. Enveis variansanalyse ble kjørt ved hjelp av One- way ANOVA test for å se om de ulike pakkekombinasjonene gav signifikant forskjellig innvirkning på analysene som ble utført. Signifikante forskjeller mellom pakkekombinasjonene ble gruppert ved hjelp av «Tukey Pairwise Comparison» som fordelte pakkekombinasjonene i grupper. A og/eller B og/eller C, hvor de som ikke hadde noen bokstaver til felles var signifikant forskjellige fra hverandre. Testen ble utført med et 5 % signifikansnivå. Kjørte statistisk analyse på rådata fra gassutvikling, mikrobiologisk vekst, TMA konsentrasjon, sensorisk bedømming, pH verdi og væsketap. Det ble kjørt separate variansanalyser for oksygenkonsentrasjon i pakningene med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> og 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub>.

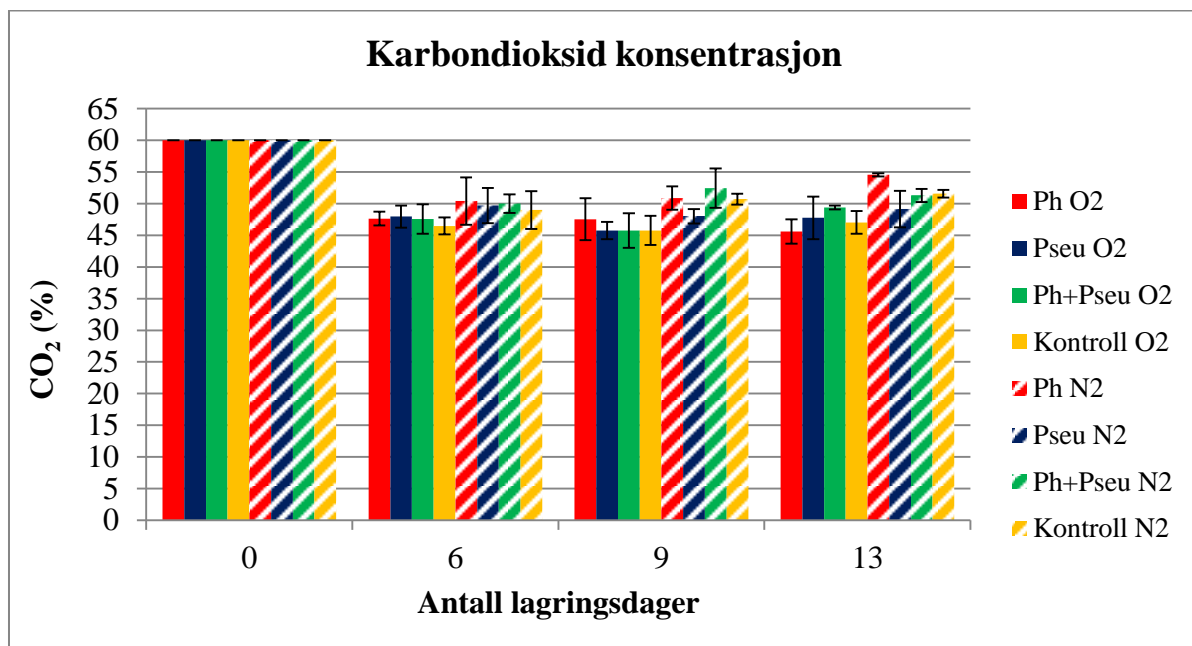


## 5. RESULTATER

Torskefilet pakket i modifisert atmosfære ble lagret i opp til 13 dager ved  $1,8 \pm 0,4$  °C. Pakkegassens innvirkning på kvalitetsforringende bakterier har blitt studert ut fra gassutvikling, totalt antall psykrotrofe bakterier, trimetylammin konsentrasjon, sensorisk vurdering av lukt, pH og væsketap. Pakkegass med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> omtales som O<sub>2</sub> gassblanding og pakkegass bestående av 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> omtales som N<sub>2</sub> gassblanding.

### Gassutvikling

Figur 5.1 viser utviklingen i karbondioksid konsentrasjon gjennom 13 dagers lagring målt i frivolumet av pakninger med torskefilet hvor åtte ulike pakkekombinasjoner ble benyttet. Konsentrasjonen ved dag 0 var startkonsentrasjon i den ferdige gassblandingen fra leverandør.



**Figur 5.1:** CO<sub>2</sub> konsentrasjon i frivolumet av ulike pakninger med MA- pakket torskefilet i løpet av 13 dagers lagring ved 2 °C. Hele søyler representerer pakking med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gass, stripede søyler representerer pakking med 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> gass. Benyttet bakterieinokulum: Ph = *Photobacterium*, Pseu = *Pseudomonas*, Ph + Pseu = blandet, kontroll = uten inokulum. Hver søyle representerer gjennomsnittet av tre paralleller ± standardavvik.

Alle pakkekombinasjonene hadde en nedgang i CO<sub>2</sub> konsentrasjon på rundt 10 - 14 prosentpoeng fra dag 0 til dag 6. Det var ingen signifikant forskjell mellom noen av pakkekombinasjonene ved dag 6 (Tabell 5.1). Det kan sees fra Figur 5.1 at CO<sub>2</sub> konsentrasjonen endret seg lite i alle pakningene etter dag 6.

Ved dag 9 lå gjennomsnittlig CO<sub>2</sub> konsentrasjon mellom 46 – 52 %. Torsk med blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding hadde signifikant høyere CO<sub>2</sub> konsentrasjon enn torsk med *Pseudomonas* inokulum, *Photobacterium* inokulum og kontroll i O<sub>2</sub> gassblanding (Tabell 5.1).

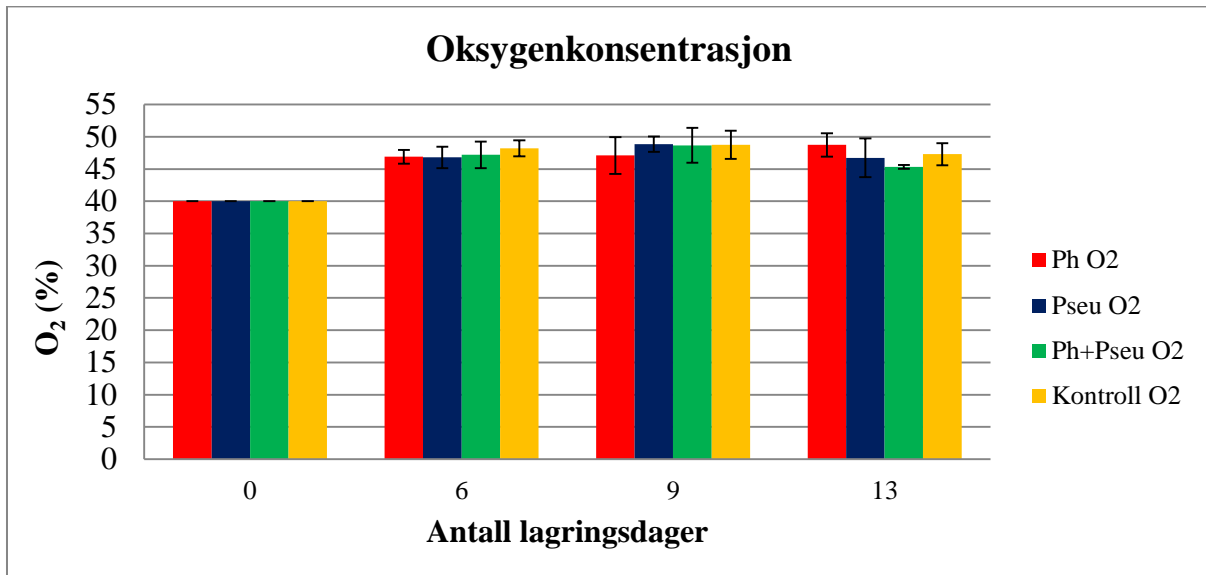
Ved dag 13 lå gjennomsnittlig CO<sub>2</sub> konsentrasjon mellom 45 – 54 %. Torsk inokulert med *Photobacterium* i O<sub>2</sub> gassblanding hadde en signifikant lavere CO<sub>2</sub> konsentrasjon enn torsk med *Photobacterium* inokulum, blandet inokulum og kontroll i N<sub>2</sub> gassblanding (Tabell 5.1).

Visuelt kan det synes fra Figur 5.1 at pakningene med O<sub>2</sub> gassblanding hadde en relativt noe lavere CO<sub>2</sub> konsentrasjon enn pakningene med N<sub>2</sub> gassblanding gjennom lagringsforsøket, men forskjellene er kun signifikant lavere i noen pakninger (Tabell 5.1).

**Tabell 5.1:** Enveis variansanalyse av endring i CO<sub>2</sub> konsentrasjon i forhold til pakkekombinasjon, og gjennomsnittlig CO<sub>2</sub> verdi (n = 3) ± standardavvik. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller mellom pakkekombinasjonene pr. dag (P<0,05).

Pakkegass	Inokulum	Dag 6	Dag 9	Dag 13
		% CO <sub>2</sub>	% CO <sub>2</sub>	% CO <sub>2</sub>
60% CO <sub>2</sub> + 40% O <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	47,63 ± 1,1 <sup>a</sup>	47,53 ± 3,3 <sup>ab</sup>	45,60 ± 1,9 <sup>c</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	47,97 ± 1,7 <sup>a</sup>	45,73 ± 1,4 <sup>b</sup>	47,77 ± 3,4 <sup>bc</sup>
	Blandet	47,57 ± 2,4 <sup>a</sup>	45,73 ± 2,7 <sup>b</sup>	49,37 ± 0,3 <sup>abc</sup>
	Kontroll	46,47 ± 1,3 <sup>a</sup>	45,77 ± 2,3 <sup>b</sup>	47,03 ± 1,8 <sup>bc</sup>
60% CO <sub>2</sub> + 40% N <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	50,40 ± 3,7 <sup>a</sup>	50,87 ± 1,9 <sup>ab</sup>	54,53 ± 0,3 <sup>a</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	49,70 ± 2,8 <sup>a</sup>	48,00 ± 1,1 <sup>ab</sup>	49,13 ± 2,9 <sup>bc</sup>
	Blandet	50,00 ± 1,5 <sup>a</sup>	52,43 ± 3,1 <sup>a</sup>	51,30 ± 1,0 <sup>ab</sup>
	Kontroll	48,97 ± 3,0 <sup>a</sup>	50,70 ± 0,9 <sup>ab</sup>	51,57 ± 0,6 <sup>ab</sup>

Figur 5.2 viser utviklingen i oksygenkonsentrasjon i frivolumet av pakninger med torskefilet over 13 dager, hvor fire pakkekombinasjoner med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gass ble benyttet. Konsentrasjonen ved dag 0, var startkonsentrasjon i den ferdige gassblandingen fra leverandør.



**Figur 5.2:** O<sub>2</sub> konsentrasjon i frivolumet av ulike pakninger med MA- pakket torskefilet i løpet av 13 dagers lagring ved 2 °C. Benyttet bakterieinokulum: Ph = *Photobacterium*, Pseu = *Pseudomonas*, Ph + Pseu = blandet, kontroll = uten inokulum. Figuren viser kun pakninger som var pakket med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gass. Hver søyle representerer gjennomsnittet av tre paralleller ± standardavvik.

Visuelt kan det synes i Figur 5.2 som at alle pakkekombinasjonene hadde en stigning i O<sub>2</sub> konsentrasjon fra dag 0 til dag 6, med 6 – 8 prosentpoeng. Resten av lagringsperioden var det relativt små endring i O<sub>2</sub> konsentrasjon i alle kombinasjonene. Det var ingen signifikante forskjeller i O<sub>2</sub> konsentrasjon mellom pakkekombinasjonene ved noen av uttaksdagene (Tabell 5.2). Torsk med *Photobacterium* inokulum var den eneste pakkekombinasjonen som hadde en synlig økning i O<sub>2</sub> konsentrasjon gjennom hele lagringsperioden fra 40 til 48 %, som prosentvis var den høyeste konsentrasjonen ved dag 13. Torsk med blandet inokulum hadde prosentvis lavest O<sub>2</sub> konsentrasjon (45 %) ved dag 13.

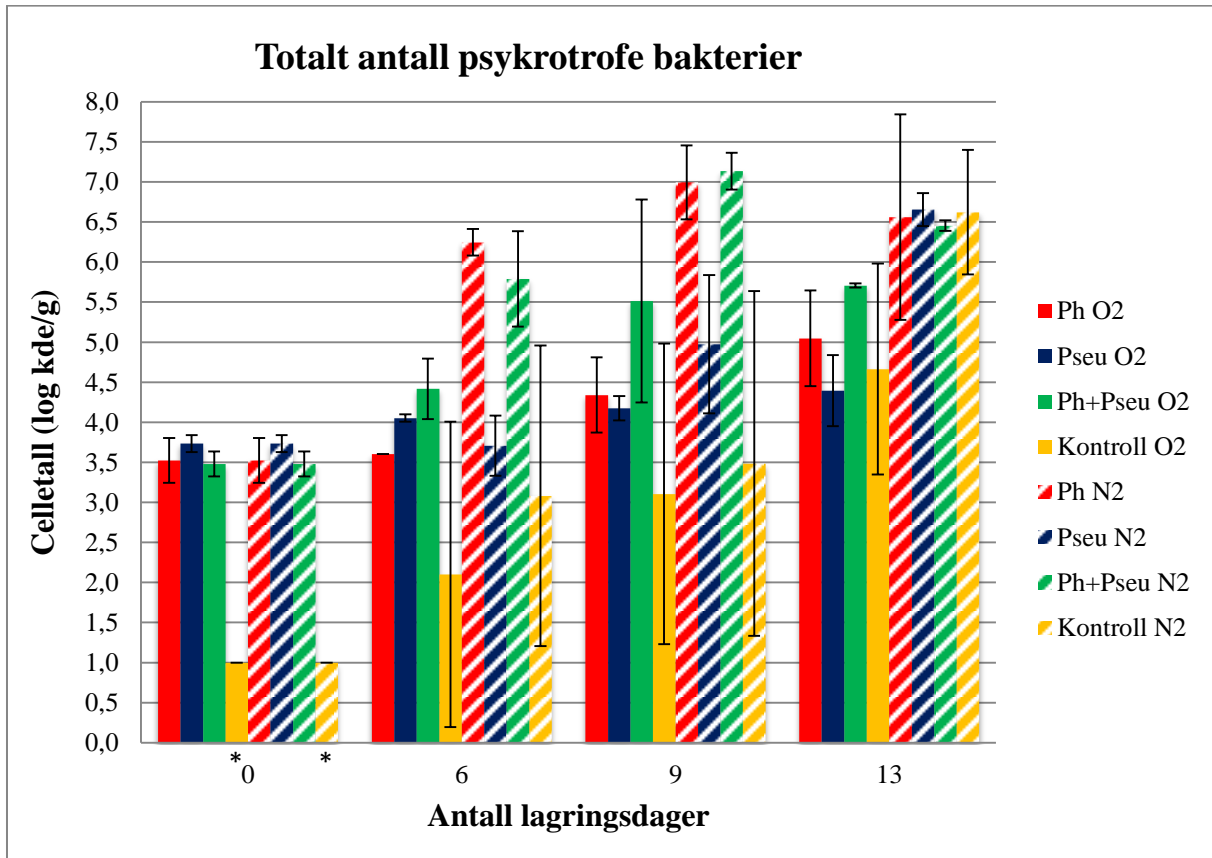
Restoksygen ble målt i pakningene med de fire pakkekombinasjonene hvor gassblandingen besto av 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub>. Resultatet er ikke grafisk fremstilt. Her var endringene i O<sub>2</sub> konsentrasjon minimale, gjennomsnittlig oversteg den ikke 0,046 % i noen av pakningene med torsk ved noe tidspunkt, og den ble lavere mot slutten av lagringsforsøket (Tabell 5.2). Ved dag 9 var det signifikant lavere O<sub>2</sub> konsentrasjon i torskefilet med blandet inokulum enn filet med *Pseudomonas* inokulum og kontrollfilet.

**Tabell 5.2:** Enveis variansanalyse av endring i O<sub>2</sub> konsentrasjon i forhold til pakkekombinasjoner med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> og pakkekombinasjoner med 60% CO<sub>2</sub> og 40% N<sub>2</sub>, samt gjennomsnittlige O<sub>2</sub> verdier (n = 3) ± standardavvik. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller mellom pakkekombinasjonene pr. dag (P<0,05).

Pakkegass	Inokulum	Dag 6	Dag 9	Dag 13
		% O <sub>2</sub>	% O <sub>2</sub>	% O <sub>2</sub>
60% CO <sub>2</sub> + 40% O <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	46,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	47,1 ± 2,9 <sup>a</sup>	48,7 ± 1,8 <sup>a</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	46,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	48,9 ± 1,2 <sup>a</sup>	46,7 ± 3,0 <sup>a</sup>
	Blandet	47,2 ± 2,1 <sup>a</sup>	48,7 ± 2,7 <sup>a</sup>	45,3 ± 0,3 <sup>a</sup>
	Kontroll	48,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	48,8 ± 2,2 <sup>a</sup>	47,3 ± 1,7 <sup>a</sup>
Pakkegass	Inokulum	Dag 6	Dag 9	Dag 13
		% O <sub>2</sub>	% O <sub>2</sub>	% O <sub>2</sub>
60% CO <sub>2</sub> + 40% N <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	0,027 ± 0,016 <sup>a</sup>	0,021 ± 0,011 <sup>ab</sup>	0,015 ± 0,015 <sup>a</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	0,026 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,025 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,002 ± 0,003 <sup>a</sup>
	Blandet	0,015 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,009 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,005 ± 0,002 <sup>a</sup>
	Kontroll	0,030 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,034 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,007 ± 0,004 <sup>a</sup>

## Mikrobiologi

Figur 5.3 viser utviklingen av psykotrofe bakterier i torskfilet pakket med åtte ulike pakkekombinasjoner i løpet av 13 dagers lagring. Celletallet i kontrolltorsk ved dag 0 var under deteksjonsgrensen ( $< 2 \log \text{kde/g}$ ) og ble satt til  $1 \log \text{kde/g}$ .



**Figur 5.3:** Vekst av psykotrofe bakterier på overflaten av MA- pakket torskfilet i løpet av 13 dagers lagring ved  $2^\circ\text{C}$ . Hele søyler representerer pakking med  $60\% \text{CO}_2 + 40\% \text{O}_2$  gass, stripede søyler representerer pakking med  $60\% \text{CO}_2 + 40\% \text{N}_2$  gass. Benyttet bakterieinokulum: Ph = *Photobacterium*, Pseu = *Pseudomonas*, Ph + Pseu = blandet, kontroll = uten inokulum. Hver søyle representerer gjennomsnittet av tre paralleller  $\pm$  standardavvik. \*Under deteksjonsgrensen ( $< 2 \log \text{kde/g}$ ) satt =  $1 \log \text{kde/g}$ .

Figur 5.3 viser en trend til økning i totalt antall psykotrofe bakterie for alle pakkekombinasjonene ut over i lagringsperioden. Ved dag 0 hadde alle torskfileter med inokulum en startkonsentrasjon på ca.  $3,5 \log \text{kde/g}$ . Kontrolltorsk uten inokulum hadde en startkonsentrasjon av bakterier under deteksjonsgrensen ( $< 2 \log \text{kde/g}$ ), verdien ble derfor satt til  $1 \log \text{kde/g}$ . De store standardavvikene på torsk uten inokulum ved dag 6 og 9 kommer av at enkelte paralleller hadde et celletall under deteksjonsgrensen.

Ut fra den grafiske fremstillingen av totalt antall psykrotrofe bakterier i Figur 5.3 kan det se ut til at celletallet var høyest i torskfilet med *Photobacterium*- og blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding ved dag 6 (5,8 – 6,2 log kde/g). Torskfilet med *Photobacterium* inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding hadde på tidspunktet et signifikant høyere antall psykrotrofe bakterier enn kontrollfilet i begge gassblandingen (Tabell 5.3). Torskfilet med blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding hadde et signifikant høyere antall psykrotrofe bakterier enn kontrollfilet i O<sub>2</sub> gassblanding (Tabell 5.3).

Ved dag 9 kan det se ut til at antall psykrotrofe bakterier i filet med *Photobacterium*- og blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding fortsatt var høyest, basert på den grafiske fremstillingen i Figur 5.3. De to pakkekombinasjonene hadde et signifikant høyere antall psykrotrofe bakterier enn kontrolltorsk i begge gassblanding (Tabell 5.3).

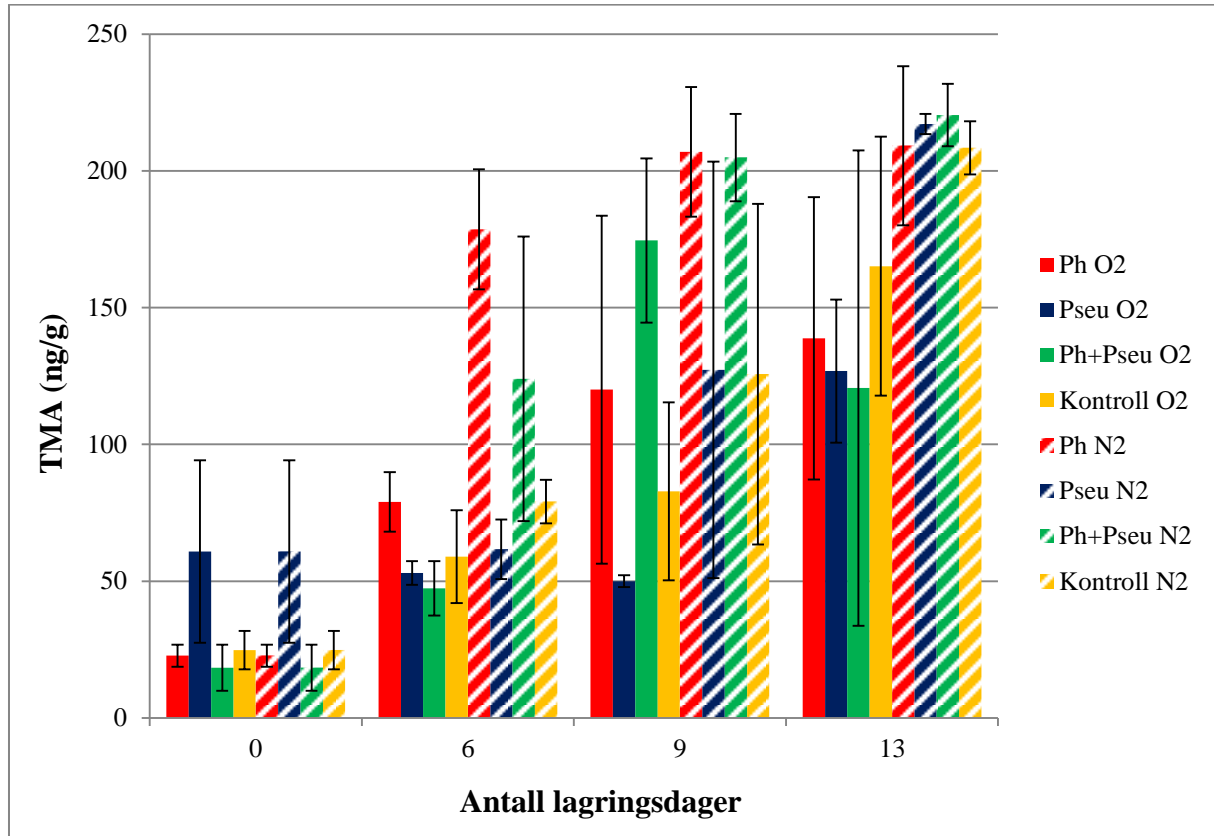
Det kan antydes fra den grafiske fremstillingen i Figur 5.3 at gjennomsnittlige psykrotroftall ved dag 13 var noe lavere for torskfileter pakket i O<sub>2</sub> gassblanding enn torskfileter pakket i N<sub>2</sub> gassblanding. Høyeste psykrotroftall for pakkekombinasjonene med O<sub>2</sub> gassblanding var 5,7 log kde/g, mot et totaltall på over 6,5 log kde/g i alle pakkekombinasjonene i N<sub>2</sub> gassblanding (Tabell 5.3). Det var et signifikant lavere antall psykrotrofe bakterier i torskfilet med *Pseudomonas* inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding enn i torskfilet med *Pseudomonas* inokulum, *Photobacterium* inokulum og kontrollfilet i N<sub>2</sub> gassblanding.

**Tabell 5.3:** Enveis variansanalyse av endring i antall psykrotrofe bakterier i forhold til pakkekombinasjon, og gjennomsnittlig totaltall (n = 3) ± standardavvik. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller mellom pakkekombinasjonene pr. dag (P<0,05).

Pakkegass	Inokulum	Dag 6	Dag 9	Dag 13
		Celletall (log kde/g)	Celletall (log kde/g)	Celletall (log kde/g)
60% CO <sub>2</sub> + 40% O <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	3,6 ± 0,00 <sup>abc</sup>	4,3 ± 0,47 <sup>ab</sup>	5,0 ± 0,60 <sup>ab</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	4,1 ± 0,05 <sup>abc</sup>	4,2 ± 0,15 <sup>ab</sup>	4,4 ± 0,44 <sup>b</sup>
	Blandet	4,4 ± 0,38 <sup>abc</sup>	5,5 ± 1,27 <sup>ab</sup>	5,7 ± 0,03 <sup>ab</sup>
	Kontroll	2,1 ± 1,91 <sup>c</sup>	3,1 ± 1,88 <sup>b</sup>	4,7 ± 1,32 <sup>ab</sup>
60% CO <sub>2</sub> + 40% N <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	6,2 ± 0,17 <sup>a</sup>	7,0 ± 0,46 <sup>a</sup>	6,6 ± 1,28 <sup>a</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	3,7 ± 0,38 <sup>abc</sup>	5,0 ± 0,86 <sup>ab</sup>	6,7 ± 0,21 <sup>a</sup>
	Blandet	5,8 ± 0,60 <sup>ab</sup>	7,1 ± 0,23 <sup>a</sup>	6,5 ± 0,07 <sup>ab</sup>
	Kontroll	3,1 ± 1,88 <sup>bc</sup>	3,5 ± 2,15 <sup>b</sup>	6,6 ± 0,78 <sup>a</sup>

## Trimetylammin konsentrasjon

Figur 5.4 viser utviklingen i TMA konsentrasjon i torskfilet pakket med åtte ulike pakkekombinasjoner i løpet av 13 dagers lagring.



**Figur 5.4:** Mengde trimetylammin i MA- pakket torskfilet i løpet av 13 dagers lagring ved 2 °C. Hele søyler representerer pakninger med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gass, stripete søyler representerer pakninger med 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> gass. Benyttet bakterieinokulum: Ph = *Photobacterium*, Pseu = *Pseudomonas*, Ph + Pseu = blandet, kontroll = uten inokulum. Hver søyle representerer gjennomsnittet av tre paralleller ± standardavvik.

Figur 5.4 viser en tendens til økning i TMA konsentrasjon for alle pakkekombinasjonene gjennom lagringsperioden. Ut fra den grafiske fremstillingen kan det se ut til at TMA konsentrasjon var noe høyere i torskfilet med *Pseudomonas* inokulum enn i de andre filetene ved dag 0, men det var ingen signifikant forskjell (Tabell 5.4). Fra dag 0 til dag 6 var det visuelt en økning i TMA konsentrasjon i torsk med *Photobacterium* inokulum og blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding (Figur 5.4). Konsentrasjon av TMA i torsk med *Photobacterium* inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding var signifikant høyere enn i de andre pakkekombinasjonene, med unntak av torsk med blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding (Tabell 5.4). Konsentrasjonen av TMA i torsk med blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding var signifikant høyere enn i torsk med tre av fire pakkekombinasjoner med O<sub>2</sub> gassblanding.

Ut fra den grafiske fremstillingen i Figur 5.4 hadde torsk med *Photobacterium* inokulum og blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding fortsatt en av de høyeste konsentrasjonene med TMA ved dag 9. Torskefiletene i begge pakkekombinasjonene hadde en signifikant høyere mengde TMA enn torsk med *Pseudomonas* inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding. Fra dag 6 til 9 hadde torsk med blandet inokulum og *Photobacterium* inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding visuelt en økning i TMA konsentrasjon (Figur 5.4).

Ved dag 13 var det ingen signifikante forskjeller i TMA konsentrasjon mellom pakkekombinasjonene. Det kan antydes fra den grafiske fremstillingen i Figur 5.4 at gjennomsnittlige mengde TMA ved dag 13 var noe høyere for torskefileter pakket i N<sub>2</sub> gassblanding (208 – 220 ng/g) enn torskefileter pakket i O<sub>2</sub> gassblanding (120 – 165 ng/g). Det var mye variasjon i TMA konsentrasjon mellom prøveparallellene, variasjonen kan skyldes andre volatile komponenter som lå skjult under TMA toppene i kromatogrammet.

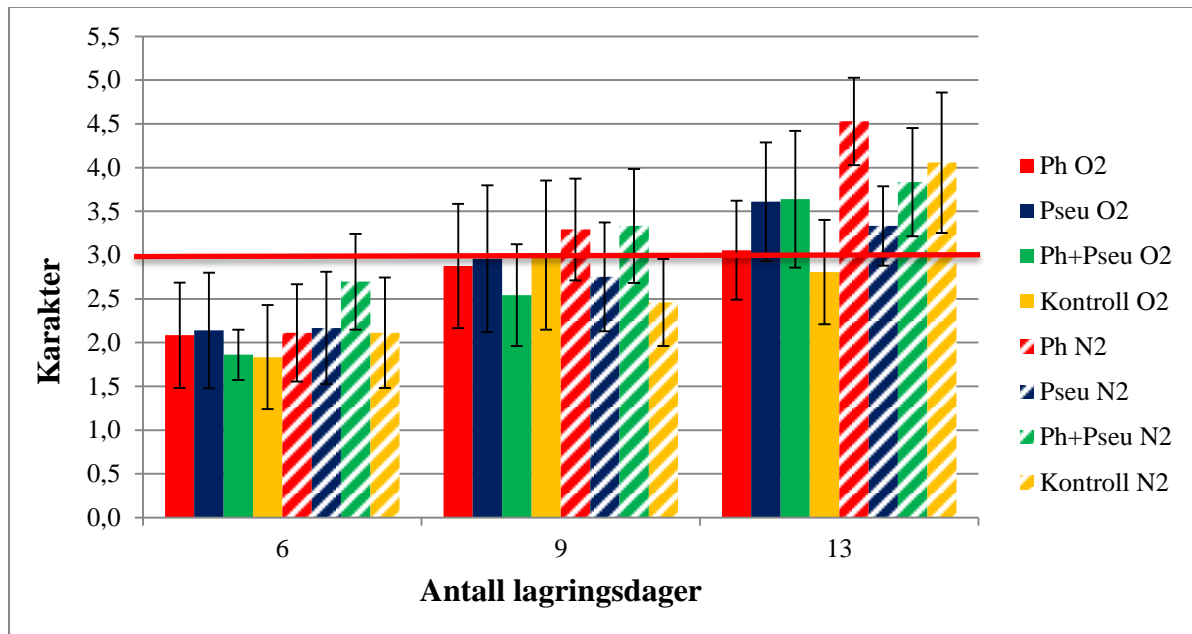
**Tabell 5.4:** Enveis variansanalyse av mengde TMA i forhold til pakkekombinasjon, og gjennomsnittlig totaltall (n = 3) ± standardavvik. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller mellom pakkekombinasjonene pr. dag (P<0,05).

Pakkegass	Inokulum	Dag 0	Dag 6	Dag 9	Dag 13
		TMA (ng/g)	TMA (ng/g)	TMA (ng/g)	TMA (ng/g)
60% CO <sub>2</sub> + 40% O <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	22,8 ± 4,1 <sup>a</sup>	79,0 ± 10,9 <sup>bc</sup>	120,0 ± 63,6 <sup>ab</sup>	138,8 ± 51,6 <sup>a</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	60,8 ± 33,3 <sup>a</sup>	53,0 ± 4,3 <sup>c</sup>	50,0 ± 2,15 <sup>b</sup>	126,8 ± 26,1 <sup>a</sup>
	Blandet	18,4 ± 8,4 <sup>a</sup>	47,4 ± 10,0 <sup>c</sup>	174,5 ± 30,1 <sup>ab</sup>	120,6 ± 86,9 <sup>a</sup>
	Kontroll	24,8 ± 7,1 <sup>a</sup>	59,0 ± 16,9 <sup>c</sup>	83,0 ± 32,5 <sup>ab</sup>	165,2 ± 47,3 <sup>a</sup>
60% CO <sub>2</sub> + 40% N <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	22,8 ± 4,1 <sup>a</sup>	178,6 ± 21,9 <sup>a</sup>	206,9 ± 23,7 <sup>a</sup>	209,2 ± 29,1 <sup>a</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	60,8 ± 33,3 <sup>a</sup>	61,6 ± 10,9 <sup>bc</sup>	127,2 ± 76,2 <sup>ab</sup>	217,1 ± 3,7 <sup>a</sup>
	Blandet	18,4 ± 8,4 <sup>a</sup>	124,0 ± 52,0 <sup>ab</sup>	204,88 ± 16,0 <sup>a</sup>	220,4 ± 11,4 <sup>a</sup>
	Kontroll	24,8 ± 7,1 <sup>a</sup>	79,1 ± 8,0 <sup>bc</sup>	125,7 ± 62,3 <sup>ab</sup>	208,4 ± 9,7 <sup>a</sup>



## Sensorisk vurdering av lukt

Figur 5.5 viser den sensoriske bedømmingen av lukt fra torsk pakket med åtte ulike pakkekombinasjoner i løpet av 13 dagers lagring. Den horisontale røde streken indikerer grenseverdi for akseptabel lukt.



**Figur 5.5:** Sensorisk bedømmelse av lukt (karakter 1 – 5, med 1 som beste og 3 som høyeste akseptable karakter, indikert med horisontal linje) fra MA- pakket torskfilet i løpet av 13 dagers lagring ved 2 °C. Hele søyler representerer pakking med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gass, stripede søyler representerer pakking med 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> gass. Benyttet bakterieinokulum: Ph = *Photobacterium*, Pseu = *Pseudomonas*, Ph + Pseu = blandet, kontroll = uten inokulum. Hver søyle representerer gjennomsnittet av tre paralleller ± standardavvik.

Figur 5.5 viser en tendens til dårligere lukt fra torskfiletene i alle pakkekombinasjonene gjennom lagringsperioden, hvor akseptabel grense er markert med rød linje. Den grafiske fremstillingen av den sensoriske vurderingen i Figur 5.5 viser at alle torskfiletene ble vurdert til å fortsatt lukte akseptabelt etter 6 dagers lagring. Torsk med blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding synes å være nærmest den uakseptable grensen og fikk en signifikant dårligere bedømming enn kontrollfilet i O<sub>2</sub> gassblanding.

Statistisk sett var det ingen signifikante forskjeller mellom bedømmingen av pakkekombinasjonene ved dag 9. Ut fra den grafiske fremstillingen (Figur 5.5) var samtlige torskfileter pakket i O<sub>2</sub> gassblanding fortsatt på den akseptable siden av karakterskalaen for lukt ved dag 9. For torsk med *Photobacterium*- og blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding gav gjennomsnittsbedømmingen en uakseptabel lukt.

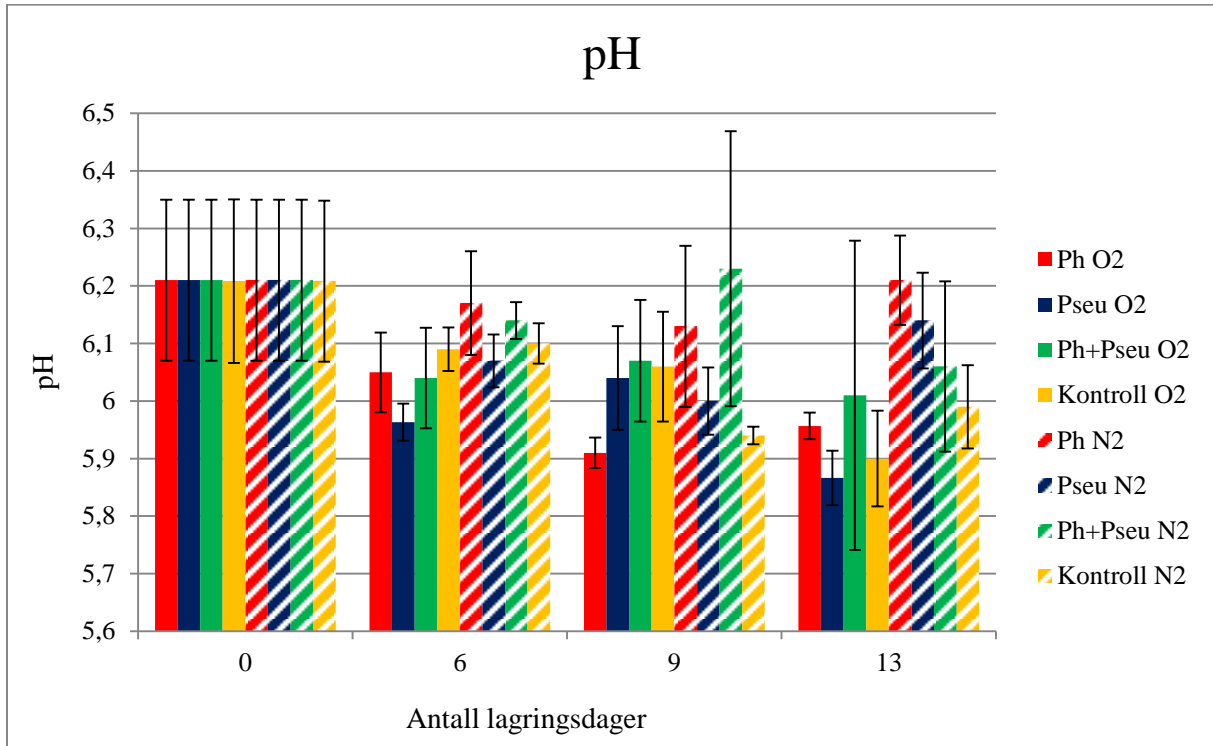
Ved dag 13 fikk kontrolltorsk i O<sub>2</sub> gassblanding en signifikant bedre bedømming av lukt enn kontrollfilet og filet med *Photobacterium* inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding. Dommerpanelet har i sin vurdering beskrevet lukten av torskefilet uten inokulum lagret i O<sub>2</sub> gassblanding som frisk, tilnærmet luktfri, skalldyraktig, metallisk, syrlig og kokt melk. Med tanke på den akseptable grensen for lukt var kontrolltorsk i O<sub>2</sub> den eneste som lå på den akseptable siden av grense ved dag 13 (Figur 5.5). Torsk med *Photobacterium* inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding fikk den nest beste bedømmingen ved dag 13, men lå på den uakseptable siden av grensen for lukt. Torsk med *Photobacterium* inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding lå også på den uakseptable siden av grensen for lukt, og fikk den dårligste bedømmingen av alle pakkekombinasjonene. Lukten fra torskefilet med *Photobacterium* inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding var signifikant dårligere enn fra filet i O<sub>2</sub> gassblanding med samme inokulum (Tabell 5.5). Dommerpanelet beskrev lukten som (i rangert rekkefølge etter flest til færrest kommentarer) stikkende, sur, skalldyraktig, sur melk og rått.

**Tabell 5.5:** Enveis variansanalyse av sensorisk bedømming i forhold til pakkekombinasjon, og gjennomsnittlig karakter (n = 3) ± standardavvik. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller mellom pakkekombinasjonene pr. dag (P<0,05).

Pakkegass	Inokulum	Dag 6	Dag 9	Dag 13
		Karakter	Karakter	Karakter
60% CO <sub>2</sub> + 40% O <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	2,1 ± 0,1 <sup>ab</sup>	2,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,1 <sup>bc</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	2,1 ± 0,5 <sup>ab</sup>	3,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,5 <sup>abc</sup>
	Blandet	1,9 ± 0,1 <sup>ab</sup>	2,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,3 <sup>abc</sup>
	Kontroll	1,8 ± 0,2 <sup>b</sup>	3,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>c</sup>
60% CO <sub>2</sub> + 40% N <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	2,1 ± 0,2 <sup>ab</sup>	3,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	2,2 ± 0,4 <sup>ab</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,3 <sup>bc</sup>
	Blandet	2,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,4 <sup>abc</sup>
	Kontroll	2,1 ± 0,2 <sup>ab</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,1 ± 0,7 <sup>ab</sup>

## pH

Figur 5.6 viser utviklingen i pH verdi i torskfilet pakket med åtte ulike pakkekombinasjoner i løpet av 13 dagers lagring.



**Figur 5.6:** pH verdi i MA- pakket torskfilet i løpet av 13 dagers lagring ved 2 °C. Hele søyler representerer pakking med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gass, stripede søyler representerer pakking med 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> gass. Benyttet bakterieinokulum: Ph = *Photobacterium*, Pseu = *Pseudomonas*, Ph + Pseu = blandet, kontroll = uten inokulum. Hver søyle representerer gjennomsnittet av tre paralleller ± standardavvik.

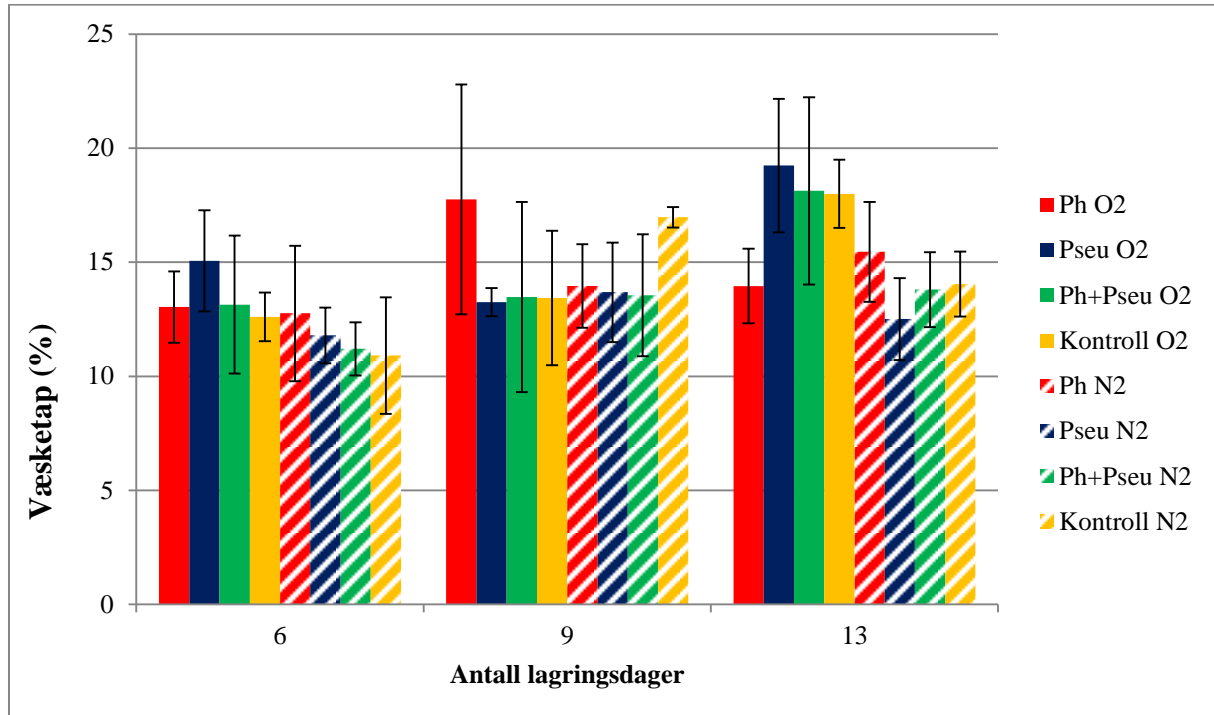
Figur 5.6 viser en tendens til nedgang i pH i torsk med alle pakkekombinasjonene gjennom lagringsforsøket. Ved dag 6 var det signifikant lavere pH verdi i torsk med *Pseudomonas* inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding enn i torsk med blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding (Tabell 5.6). Ved dag 9 og 13 var det ingen signifikante forskjeller mellom pakkekombinasjonene (Tabell 5.6). Torsk med *Photobacterium* inokulum, uavhengig av gasskombinasjon, var de eneste prøvene som hadde en synlig økning i pH verdi fra dag 9 til dag 13 (Figur 5.6).

**Tabell 5.6:** Enveis variansanalyse av endring i pH verdi i forhold til pakkekombinasjon, og gjennomsnittlig pH verdi ( $n = 3$ )  $\pm$  standardavvik. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller mellom pakkekombinasjonene pr. dag ( $P < 0,05$ ).

Pakkegass	Inokulum	Dag 6	Dag 9	Dag 13
		pH	pH	pH
60% CO <sub>2</sub> + 40% O <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	6,05 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>	5,91 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	5,96 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	5,96 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>	6,04 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	5,87 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
	Blandet	6,04 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>	6,07 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	6,01 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>
	Kontroll	6,09 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	6,06 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	5,90 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
60% CO <sub>2</sub> + 40% N <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	6,17 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	6,13 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	6,21 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	6,07 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>	6,00 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	6,14 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
	Blandet	6,14 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	6,23 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	6,06 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>
	Kontroll	6,10 $\pm$ 0,04 <sup>ab</sup>	5,94 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	5,99 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>

## Væsketap

Figur 5.7 viser væsketap fra torskefilet pakket med åtte ulike pakkekombinasjoner i løpet av 13 dagers lagring.



**Figur 5.7:** Væsketap fra MA- pakket torskefilet i løpet av 13 dagers lagring ved 2 °C. Hele søyler representerer pakking med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> gass, striped søyler representerer pakking med 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> gass. Benyttet bakterieinokulum: Ph = *Photobacterium*, Pseu = *Pseudomonas*, Ph + Pseu = blandet, kontroll = uten inokulum. Hver søyle representerer gjennomsnittet av tre paralleller ± standardavvik.

Figur 5.7 viser at væsketapet fra torsk var relativt jevnt for alle pakkekombinasjonene gjennom lagringsperioden, hvor gjennomsnittet varierte fra 12 til 19 %. Ved dag 13 var det signifikant høyere væsketap fra torsk med *Pseudomonas* inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding enn torsk med samme inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding (Tabell 5.7).

**Tabell 5.7:** Enveis variansanalyse av væsketap fra torsk i forhold til pakkekombinasjon, og gjennomsnittlig væsketap ( $n = 3$ )  $\pm$  standardavvik. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller mellom pakkekombinasjonene pr. dag ( $P < 0,05$ ).

Pakkegass	Inokulum	Dag 6	Dag 9	Dag 13
		Væsketap (%)	Væsketap (%)	Væsketap (%)
60% CO <sub>2</sub> + 40% O <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	13,0 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>	17,8 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>	14,0 $\pm$ 1,6 <sup>ab</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	15,1 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	13,2 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	19,2 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>
	Blandet	13,1 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>	13,5 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>	18,1 $\pm$ 4,1 <sup>ab</sup>
	Kontroll	12,6 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	13,4 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>	18,0 $\pm$ 1,5 <sup>ab</sup>
60% CO <sub>2</sub> + 40% N <sub>2</sub>	<i>Photobacterium</i>	12,8 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>	14,0 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	15,5 $\pm$ 2,2 <sup>ab</sup>
	<i>Pseudomonas</i>	11,8 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	13,7 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	12,5 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>
	Blandet	11,2 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	13,6 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	13,8 $\pm$ 1,6 <sup>ab</sup>
	Kontroll	10,9 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	17,0 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	14,0 $\pm$ 1,4 <sup>ab</sup>

## 6. DISKUSJON

### Gassutvikling

Etter en klar nedgang i CO<sub>2</sub> konsentrasjon i frivolumet i samtlige pakkekombinasjoner fra 60 % til 46 – 50 % fra dag 0 til dag 6 holdt konsentrasjonen seg relativt stabil (45 – 51 %) gjennom resten av lagringsperioden. En reduksjon i CO<sub>2</sub> konsentrasjon var å forvente etter som CO<sub>2</sub> løser seg godt i vann og fett (Sivertsvik et al., 2002). Løseligheten øker ved lavere temperatur (Farber, 1991). Karbondioksid vil løse seg i fiskemuskelen frem til et metningspunkt eller inntil likevekt mellom mengde CO<sub>2</sub> i fisk og pakkegass inntreffer (Zhao et al., 1995). I torsk er det funnet en sammenheng mellom mengde løst CO<sub>2</sub> og vanninnhold i fiskemuskelen (Sivertsvik et al., 2004).

Nedgangen i CO<sub>2</sub> konsentrasjon førte til et undertrykk i pakningene som gav en liten vakuumeffekt. Sivertsvik (2007) fant at mer CO<sub>2</sub> løste seg i fiskemuskelen og vakuumeffekten ble større jo høyere andel av CO<sub>2</sub> det var i pakkegassen. En tydelig nedgang i CO<sub>2</sub> konsentrasjon tidlig i pakkeforsøk, etterfulgt av stabilisering ut over i lagringsperioden har også vært observert i andre studier (Dalgaard et al., 1993; Hansen et al., 2007; Debevere og Boskou, 1996; Sivertsvik et al., 2002; Farber, 1991).

Basert på den grafiske fremstillingen av CO<sub>2</sub> konsentrasjon i frivolumet i pakninger med MA-pakket torsk så det ut til at konsentrasjonen var noe høyere i pakkekombinasjonene med N<sub>2</sub> gassblanding enn med O<sub>2</sub> gassblanding gjennom lagringsperioden. En økning i CO<sub>2</sub> konsentrasjon i pakkeatmosfæren gir en tilsvarende økning i inhibering av forringende bakterier (Devlieghere og Debevere, 2000). Det lavere CO<sub>2</sub> nivået i pakningene med O<sub>2</sub> gassblanding kan også bety at mer CO<sub>2</sub> hadde løst seg i fisken. Devlieghere et al. (1998) fant at den bakteriostatiske effekten til CO<sub>2</sub> økte jo mer CO<sub>2</sub> som ble løst i vannfasen av et produkt. Mengde CO<sub>2</sub> som blir løst i vannfasen øker når gass/produkt forholdet økes, og når startkonsentrasjon av CO<sub>2</sub> i pakkegassen blir forhøyet (Devlieghere og Debevere, 2000).

Oksygenkonsentrasjonen i frivolumet av alle pakkekombinasjonene med O<sub>2</sub> gassblanding økte i startfasen av forsøket, dette var en invers utvikling i forhold til endringene i CO<sub>2</sub> konsentrasjon. Den prosentvise økningen i O<sub>2</sub> konsentrasjon oppsto troligvis som en følge av at frivolumet i pakningene ble mindre da det oppsto en vakuumeffekt som følge av at CO<sub>2</sub> ble løst i fisken, noe som førte til at O<sub>2</sub> gass utgjorde en større prosentandel av det tilgjengelige gassvolumet (Mitz, 1979).

I pakningene med N<sub>2</sub> gassblanding var det en minimal økning av restoksygen i startfasen av lagringsforsøket, som eventuelt kan skyldes at O<sub>2</sub> trengte gjennom emballasjen fra omgivelsene. Mot slutten av lagringsforsøket gikk restoksygen- nivået i frivolumet ned igjen, helt ned til 0 i enkelte pakninger, noe som mest sannsynlig kom av at bakterier hadde forbrukt det lille som var av tilgjengelig oksygen (Randell et al., 1995). For fileter med inokulum sank konsentrasjonen av O<sub>2</sub> i frivolumet etter dag 6, mens for kontroll fileten kom ikke nedgangen før etter dag 9. Dette kan skyldes at den mikrobielle aktiviteten var høyere ved et tidligere tidspunkt i filetene med inokulum enn fileten uten inokulum.

## Mikrobiologi

Ut fra resultatene fra utplating av psykrotrofe bakterier på L&H agar var det en antydning til høyere nivå av psykrotrofe bakterier i torskfilet pakket i N<sub>2</sub> gassblanding enn i torskfilet pakket i O<sub>2</sub> gassblanding gjennom lagringsperioden. Dette samsvarer med resultater fra Sivertsvik (2007) som utførte pakkeforsøk med flere forskjellige CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> forhold for å finne optimal gassblanding for MA- pakking av oppdrettstorsk. Ved dag 6 var totalt antall psykrotrofe bakterier i fileten med *Photobacterium* inokulum (6,2 log kde/g) og blandet inokulum (5,8 log kde/g) i N<sub>2</sub> gassblanding høyere enn totaltallet ble i alle pakkekombinasjonene med O<sub>2</sub> gassblanding gjennom hele lagringsperioden.

Ved dag 13 var det et signifikant høyere antall av psykrotrofe bakterier i torskfilet med *Pseudomonas* inokulum, *Photobacterium* inokulum og kontroll i N<sub>2</sub> gassblanding enn i fileten med *Pseudomonas* inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding. Totalantallet psykrotrofe bakterier hadde utjevnet seg for alle pakkekombinasjonene med N<sub>2</sub> gassblanding og varierte mellom 6,5 – 6,7 log kde/g. Av de to pakkekombinasjonene med *Pseudomonas* inokulum, som begge var pakket i en gass med høy CO<sub>2</sub> konsentrasjon som er hemmende for *Pseudomonas* (Enfors og Molin, 1980; Enfors og Molin, 1981), var det forventet høyest vekst i torskfilet i O<sub>2</sub> gassblandingen, da bakterien er aerob og vil bli hemmet i en oksygenfri atmosfære (Adams og Moss, 2010). Resultatet viste seg å være motsatt, hvor psykrotroftallet i torskfilet med *Pseudomonas* inokulum pakket i N<sub>2</sub> gassblanding var 6,7 log kde/g mot 4,4 log kde/g i torskfilet med tilsvarende inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding. Det lave totaltallet på fileten i O<sub>2</sub> gassblanding viser at totalantallet psykrotrofe bakterier bare økte med 1 log- enhet gjennom hele lagringsperioden. Dette kan indikere at kombinasjonen av høy CO<sub>2</sub> konsentrasjon sammen med høy O<sub>2</sub> konsentrasjon har hatt en hemmende effekt på *Pseudomonas*. Dette støttes av tidligere studier hvor økt O<sub>2</sub> konsentrasjon bidro til en økt



inhiberende effekt på vekst av aerobe psykrotrofe bakterier (Boskou og Debevere, 1997; Boskou og Debevere, 1998; Sivertsvik, 2007).

I pakkekombinasjonene med *Photobacterium* inokulum var det ikke forventet stor forskjell i totalt antall psykrotrofe bakterier mellom de to pakkegassene, da *Photobacterium* har høy toleranse ovenfor CO<sub>2</sub> (Dalgaard et al., 1993). Uten å være signifikant forskjellig hadde torskfilet med *Photobacterium* inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding gjennomsnittlig et lavere totalt antall psykrotrofe bakterier gjennom hele lagringsperioden. Dette kan tyde på at den høye oksygenkonsentrasjonen har hatt en hemmende effekt på *Photobacterium*. Dette samsvarer med resultater fra Hansen et al. (2007), som hadde en teori om at en høy oksygenkonsentrasjon (40 %) hadde en inhiberende effekt på *P. phosphoreum*.

I og med at det var en antydning til høyere nivå av totalt antall psykrotrofe bakterier i alle pakkekombinasjonene med N<sub>2</sub> gassblanding mot O<sub>2</sub> gassblanding kan det se ut til at den høye O<sub>2</sub> konsentrasjonen generelt har bidratt til den inhiberende virkning på bakterievekst sammen med CO<sub>2</sub>.

### **Trimetylammin konsentrasjon**

Ut fra den grafiske fremstillingen av resultatene ser det ut til å være en tendens til økning i TMA konsentrasjon ut over i lagringsperioden. Pakkekombinasjoner som ble inokulert med *Photobacterium*, enten som rent inokulum eller som blanding, skilte seg ut med en synlig høy økning i mengde TMA allerede fra dag 6.

Ved dag 6 hadde torskfilet med *Photobacterium* inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding en signifikant høyere TMA konsentrasjon enn alle filetene pakket i O<sub>2</sub> gassblanding, henholdsvis 179 ng/g mot 47 – 79 ng/g. Torskfilet med blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding hadde signifikant høyere TMA konsentrasjon enn tre av fire pakkekombinasjoner med O<sub>2</sub> gassblanding. Ser man på totalt antall psykrotrofe bakterier hadde torskfiletene med signifikant høyest TMA konsentrasjon et totalt antall psykrotrofe bakterier mellom 5,8 – 6,2 log cfu/g ved dag 6. Filetene i O<sub>2</sub> gassblanding hadde et psykrotroftall mellom 2,1 – 4,4 log cfu/g. Felles for begge pakkekombinasjonene med høyest TMA konsentrasjon er at torskfiletene ble inokulert med *Photobacterium*, som er store kokkobasiller hvor hver enkelt bakterie kan danne mye TMA, 30 ganger mer enn en *Shewanella putrefaciens* bakterie (Dalgaard, 1995).

Ved dag 9 var gjennomsnittlig TMA konsentrasjon fortsatt synlig høyest i filet med *Photobacterium*- og blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding. Konsentrasjonene var signifikant høyere enn i torskfilet med *Pseudomonas* inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding som ikke hadde hatt noen økning i mengde TMA til og med dag 9. Dette indikerer at *Pseudomonas* som ikke danner TMA (Gram et al., 1990) fortsatt kan være den dominerende bakterien. Torskfilet med *Photobacterium* og blandet inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding hadde en synlig økning i TMA konsentrasjon fra dag 6 til dag 9. Etter 9 dagers lagring så det ut til at TMA konsentrasjonen hadde økt mest i de fire pakkekombinasjonene hvor *Photobacterium* hadde blitt tilført torskfiletene.

Det var ingen signifikante forskjeller mellom mengde TMA ved dag 13, men visuelt viser gjennomsnittsverdiene en tendens til å være høyere i torskfilet som hadde vært pakket i N<sub>2</sub> gassblanding enn O<sub>2</sub> gassblanding. Dette støttes av tidligere forskning hvor en økning av O<sub>2</sub> konsentrasjon ved MA- pakking av torskfilet gav en liten reduksjon i dannelsen av TMA (Debevere og Boskou, 1996; Boskou og Debevere, 1998; Sivertsvik, 2007; Hovda et al., 2007). Boskou og Debevere (1997) fant at kombinasjonen av CO<sub>2</sub> og O<sub>2</sub> gav en større inhiberende effekt på både TMA dannelse og bakterievekst enn ved bruk av hver av gassene alene. Mengde TMA som hadde blitt dannet i alle pakkekombinasjonene med N<sub>2</sub> gassblanding ved dag 13 var tilnærmet lik, og lå mellom 208 – 220 ng/g. I pakkekombinasjonene med O<sub>2</sub> gassblanding varierte TMA mengden mellom 120 – 165 ng/g. Verdiene ble ikke fremstilt ved hjelp av Conways metode, og kan derfor ikke sammenlignes med grenseverdien på 30 mg TMA-N/100 g som er mye benyttet i industrien og i andre studier (Ólafsdóttir et al., 1997).

Ved dag 13 indikerte bakteriekonsentrasjon og mengde TMA i kontrollfilet pakket i begge gassblandinger at det hadde vært mikrobiell aktivitet i begge pakkekombinasjonene. En naturlig bakterieflora som tolererer høye CO<sub>2</sub> konsentrasjoner og kan danne TMA hadde troligvis etablert seg. *Carnobacterium*, *Brochothrix*, og *P. phosphoreum* har utgjort en stor andel av den dominerende bakteriefloraen ved tidligere MA- pakkeforsøk på fisk (Hansen et al., 2007; Rudi et al., 2004). *Carnobacterium* og *Brochothrix* er derimot ikke kjent for å danne TMA slik som *P. phosphoreum* (Fall et al., 2010; Dalgaard et al., 1993; Laursen et al., 2006). *Shewanella putrefaciens* er også kjent for å danne TMA, men er følsom ovenfor høye CO<sub>2</sub> konsentrasjoner (Dalgaard, 1995; Dalgaard et al., 1993). I og med at det hadde blitt dannet TMA i varierende grad i alle åtte pakkekombinasjoner ved dag 13 er det trolig at *P. phosphoreum* utgjorde en del av bakteriefloraen i alle torskfiletene.

## Sensorisk vurdering av lukt

Ut fra sensorikkresultatene kan det sees at den sensoriske karakterbedømmingen av lukt ble dårligere jo lengre torskefiletene hadde vært lagret. Ved dag 6 var lukt fra torskefiletene i alle pakkekombinasjonene akseptabel. Ved dag 9 hadde to av pakkekombinasjonene oversteget grensen for uakseptabel lukt, filet med *Photobacterium* inokulum og filet med blandet inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding. Dette var de to pakkekombinasjonene med høyest TMA konsentrasjon og psykrotroftall på dette tidspunktet. Det var ingen signifikant forskjell mellom lukt fra filetene ved dag 9.

Ved dag 13 var det kun filet uten inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding som fortsatt luktet akseptabelt. De resterende filetene i O<sub>2</sub> gassblanding ved dag 13 fikk gjennomsnittlig en bedre bedømming av lukt enn tre av fire torskefileter i pakkekombinasjon med N<sub>2</sub> gassblanding. Rødbotten et al. (2009) fant at det var en korrelasjon mellom lukt fra fersk laksefilet som samsvarte med kvaliteten i fileten etter varmebehandling. Lukt kan derfor ansees å være et godt parameter for vurdering av kvalitet i fersk fiskefilet.

Torsk med *Photobacterium* inokulum pakket i N<sub>2</sub> gassblanding fikk den dårligste bedømmingen ved dag 13, og var signifikant forskjellig fra torsk med samme inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding, som også lå på den uakseptable siden av karakterskalaen, men totalt sett ble vurdert til å være filet med nest best lukt. Med tanke på mengde TMA (209 ng/g) og psykrotroftall (6,6 log kde/g) var verdiene gjennomsnittlig blant de høyeste for torsk med *Photobacterium* inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding. Torsk med *Photobacterium* inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding hadde et lavere totalantall psykrotrofe bakterier (5 log kde/g), og en lavere TMA konsentrasjon (138 ng/g), men ikke signifikant lavere. Kontrollfilet i O<sub>2</sub> gassblanding som fortsatt luktet akseptabelt ved dag 13 skilte seg lite fra torsk med *Photobacterium* inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding, som lå nærmest akseptabelt nivå for lukt av de andre pakkekombinasjonene. Antall psykrotrofe bakterier var gjennomsnittlig noe lavere i kontrollfilet med 4,7 log kde/g, mens total mengde TMA på 165 ng/g var noe høyere.

De mikrobiologiske resultatene og resultatene for mengde TMA antyder at det var høyere psykrotroftall og TMA konsentrasjon i torskefileter pakket med N<sub>2</sub> gassblanding enn O<sub>2</sub> gassblanding gjennom lagringsforsøket. Verdiene var tilnærmet like for alle pakkekombinasjonene i N<sub>2</sub> gassblanding ved dag 13. Ved vurdering av lukt fikk torskefilet med *Pseudomonas* inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding den tredje beste bedømmingen. Totalt antall psykrotrofe bakterier trenger ikke å være et godt mål på den sensoriske kvaliteten i fisk da det

kan være stor forskjell på totalt antall psykrotrofe bakterier og hvor stor andel av bakteriene som faktisk bidrar i forringelsen (Ólafsdóttir et al., 1997; Gram et al., 1987). Det er som oftest bare en liten andel av den totale bakteriefloraen som bidrar til forringelse (Gram og Dalgaard, 2002). *Photobacterium phosphoreum* er klassifisert som SSO i MA- pakket fisk og kan utgjøre en liten andel av den totale bakteriefloraen men fortsatt danne mye TMA per bakteriecelle på grunn av sin store størrelse som gjør at det er mer aktivitet i cellene som bidrar til høyere omdannelse av TMAO til TMA (Dalgaard et al., 1993; Gram og Huss, 1996). Med tanke på at TMA konsentrasjon var tilnærmet lik i de fire pakkekombinasjonene med N<sub>2</sub> gassblanding tyder det på at TMA mengde alene heller ikke er et godt mål for å bedømme grad av ferskhet i fisk, noe som er vanlig i industrien i dag (Ólafsdóttir et al., 1997). Tilstedeværelse av *Pseudomonas* spp. kan gi dannelsen av flyktige forbindelser som gir en råttne og svovelaktig lukt (Gram og Huss, 1996). Om *Shewanella purefaciens* utgjør en del av bakteriefloraen kan det i tillegg til TMA dannes flyktige svovelforbindelser som gir en svært ubehagelig lukt av råttne fisk (Dalgaard et al., 1993).

Det er tidligere vist at MAP kan forlenge sensorisk kvalitet i torsk til sammenligning med vakuumblanding og luftlagring (Dalgaard et al., 1993). Resultatene fra dette forsøket antyder at en høy oksygenkonsentrasjon sammen med CO<sub>2</sub> gir friskere lukt i torskfilet over en lengre lagringsperiode enn N<sub>2</sub> sammen med CO<sub>2</sub>.

## pH

Alle pakkekombinasjonene gav en liten nedgang i pH i torskfiletene fra dag 0 til dag 6, fra henholdsvis 6,2 til 5,96 – 6,17, noe som kan komme av at det fortsatt var noe restglykogen i fiskemuskel som ble omdannet til melkesyre og videre at CO<sub>2</sub> ble løst i produktet og forårsaket pH nedgang. Resten av lagringsperioden skjedde det små endringer i pH.

Med tanke på CO<sub>2</sub> konsentrasjon så det ut til at den utgjorde en mindre prosentandel av total mengde pakkegass i frivolumet til pakningene med O<sub>2</sub> gassblanding enn N<sub>2</sub> gassblanding gjennom lagringsforsøket. Dette synes ikke å gjenspeile seg i pH verdiene, hvor det heller ikke var noen signifikante forskjeller i pH verdi mellom pakkekombinasjonene ved dag 9 eller dag 13.

Ved dag 13 var CO<sub>2</sub> nivået signifikant lavere i pakninger med torskfilet med *Photobacterium* inokulum i O<sub>2</sub> gassblanding enn fileten med tilsvarende inokulum i N<sub>2</sub> gassblanding. Her var pH verdien gjennomsnittlig 0,2 enheter lavere i torsk i O<sub>2</sub> gassblanding, noe som stemmer

overens med teorien som sier at pH blir lavere jo mer CO<sub>2</sub> som er løst i fiskemuskel (Farber, 1991). Flere av pakkekombinasjonene gav en liten økning i pH i fiskefiletene fra dag 9 til dag 13. Mot slutten av lagringsperioden kan pH stige på grunn av dannelsen av flyktige baser i fiskekjøttet, som for eksempel TMA som dannes av *P. phosphoreum* og *S. putrefaciens* (Lynum, 2005; Debevere og Boskou, 1996; Bøknæs et al., 2002).

Andre forsøk på oppdrettstorsk har fått en tilnærmet lik utvikling i pH ved pakking og lagring med høy CO<sub>2</sub> konsentrasjon (Hansen et al., 2007; Hovda et al., 2007; Kristoffersen et al., 2006). Til sammenligning med pH verdi i villfanget torsk som ikke har vært levendelagret som har stabilisert seg mellom 6,5 – 6,8 under lagring (Debevere og Boskou, 1996; Dalgaard et al., 1993) er pH verdiene i dette forsøket lave (5,87 – 6,21). Ofstad et al. (1996) sammenlignet pH i villfanget torsk som ble levendelagret og foret i et år mot torsk som ble slaktet etter fangst, og fant også at pH var lavest i torsk som hadde vært levendelagret, pH 6,28 mot pH 6,77. Ved oppdrett av fisk er ofte tilgangen på fôr så stor at karbohydratnivået i fiskemuskel øker, noe som gir en lavere post mortem pH (Kristoffersen et al., 2006).

## **Væsketap**

Væsketapet var relativt jevnt gjennom hele lagringsperioden, fra 11 – 19 %. Ut fra den grafiske fremstillingen av resultatene kunne det synes at væsketapet var noe høyere for fileter i O<sub>2</sub> gassblanding ved dag 13, med det var signifikant forskjell kun mellom fileter med *Pseudomonas* inokulum, hvor det var signifikant høyest væsketap fra fileten i O<sub>2</sub> gassblanding. Her var det ingen signifikant forskjell i pH verdi, men gjennomsnittet var 0,27 pH enheter lavere i fileten med O<sub>2</sub> gassblanding, noe som støtter tidligere resultater hvor det var en negativ korrelasjon mellom pH og væsketap (Dalgaard et al., 1993). Jo nærmere pH kommer det isoelektriske punktet for proteiner ved pH 5,4, jo dårligere blir vannbindingsevnen (Lynum, 2005).

I forhold til væsketap fra villfanget torsk uten mellomlagring på 4,7 – 9,5 % (Dalgaard et al., 1993) er væsketapet på 11 – 19 % et noe høyt væsketap, som potensielt kan ha sammenheng med råstoffet. Ved å se på væsketap og pH samlet for alle pakkekombinasjonene, er pH lav og væsketapet høyt sammenlignet med studier på torsk som ikke har vært levendelagret (Dalgaard et al., 1993; Ofstad et al., 1996). Kristoffersen et al. (2006) fant signifikant korrelasjon mellom væsketap og pH i torsk som hadde vært mellomlagret i 9 måneder. Ofstad et al. (1996) fant at pH var lavere i foret torsk enn vill torsk, og registrerte et væsketap på 19%

48 t etter slakt, mot 11% fra vill torsk. Væsketapet fra vill torsk varierte også ut fra årstid, hvor det var 5% lavere på høsten enn om sommeren. I kveite har det blitt funnet at væsketapet øker når pH synker under 6.3 (Olsson et al., 1993).

## 7. KONKLUSJON

Samlet tyder resultatene på at det er pakkegassen bestående av 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub>, som kan gi best kvalitetsbevaring og dermed lengst holdbarhet i fileten fra levendelagret torsk.

Torskefilet som var filetert på best mulig hygienisk måte og pakket med 60% CO<sub>2</sub> + 40% O<sub>2</sub> var fortsatt av sensorisk akseptabel kvalitet etter 13 dagers lagring, mens tilsvarende fileten pakket i 60% CO<sub>2</sub> + 40% N<sub>2</sub> oppnådde en holdbarhetstid mellom 9 - 13 dager.

Det var en antydning til lavere CO<sub>2</sub> nivå i frivolumet av pakninger med CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> gass mot CO<sub>2</sub> + N<sub>2</sub> gass gjennom lagringsperioden, noe som tydet på at mer CO<sub>2</sub> var løst i fiskefiletene, som kan gi en høyere bakteriostatisk effekt. Dette så ut til å gjenspeile seg i det totale antallet psykrotrofe bakterier, der det var en antydning til lavere nivå av psykrotrofe bakterier i torskefileten pakket i CO<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> gass sammenlignet med CO<sub>2</sub> + N<sub>2</sub> gass. Det så ut til at pakking med en høy oksygenkonsentrasjon var med på å øke den bakteriostatiske effekten til CO<sub>2</sub>, med en forsterkende inhiberende effekt eller mulig toksisk virkning på bakteriene. Den høye O<sub>2</sub> konsentrasjonen så også ut til å gi en liten reduksjon i dannelse av TMA til sammenligning med pakking uten oksygen. Ut fra den sensoriske bedømmingen av lukt så det ut til at pakking med O<sub>2</sub> gassblanding bevarte den friske lukten i torskefiletene lengre enn pakking med N<sub>2</sub> gassblanding. pH var lavere enn forventet basert på villfanget torsk. Væsketap var generelt høyt i alle pakkekombinasjonene, uavhengig av pakkegass. Både pH verdi og høyt væsketap skyldes trolig råstoffet i større grad enn effekt fra pakkekombinasjonene.

## 8. FORSLAG TIL VIDERE ARBEID

- Identifiser bakteriestammene som utviklet seg på kontrollfiletene for å se hvilke bakterier som dominerer i de ulike pakkegassene
- Undersøk om en enda høyere O<sub>2</sub> konsentrasjon vil ha en bedre hemmende effekt på bakterievekst og TMA dannelse
- Utfør forsøk på levendelagret torsk med ulik lagringstid i merd for å se etter likheter og forskjeller
- Isoler bakteriestammer fra torsk som har vært lengre i merd enn 1 uke for å se om bakteriefloraen har endret seg
- Finne mulige løsninger for det høye væsketapet
- Se på effekten av ulike gass/produkt forhold



## REFERANSER

- ABGRALL, B. & CLERET, J. J. 1990. Evaluation of Petrifilm™ SM for the enumeration of the aerobic flora of fish. *Journal of Food Protection*, 3, 213-216.
- ADAMS, M. R. & MOSS, M. O. 2010. *Food Microbiology*, Cambridge, The Royal Society of Chemistry.
- ASHIE, I. N., SMITH, J. P. & SIMPSON, B. K. 1996. Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical reviews in Food Science and Technology*, 36, 87-121.
- AUSTIN, B. 2002. The bacterial microflora of fish. *The Scientific World Journal*, 2, 558-572.
- BOSKOU, G. & DEBEVERE, J. 1997. Reduction of trimethylamine oxide by *Shewanella* spp. under modified atmosphere in vitro. *Food Microbiology*, 14, 543-553.
- BOSKOU, G. & DEBEVERE, J. 1998. In vitro study of TMAO reduction by *Shewanella putrefaciens* isolated from cod fillets packaged in modified atmosphere. *Food Additives and Contaminants*, 15, 229-236.
- BØKNÆS, N., JENSEN, K. N., GULDAGER, H. S., ØSTERBERG, C., NIELSEN, J. & DALGAARD, P. 2002. Thawed chilled Barents Sea cod fillets in modified atmosphere packaging-application of multivariate data analysis to select key parameters in good manufacturing practice. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie- Food Science and Technology*, 35, 436-443.
- CANN, D. C., SMITH, G. L. & HOUSTON, N. C. 1983. Further studies on marine fish stored under modified atmosphere packaging. Aberdeen: Torry Research Station.
- CASTELL, C. H. 1971. Metal-catalyzed lipid oxidation and changes in proteins in fish. *journal of the American Oil Chemists` Society*, 48, 645-649.
- CHANDRASEKARAN, M., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. & CHANDRAMOHAN, D. 1985. Fish flesh agar medium- a suitable experimental medium for the detection of spoilage bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 51, 219-25.
- CHURCH, N. 1994. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 5, 345-352.
- COYNE, F. P. 1932. The effect of carbon dioxide on bacterial growth with special reference to the preservation of fish. Part I. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 51.
- DALGAARD, P. 1995. Quantitative and qualitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 319-333.
- DALGAARD, P. 2006. Microbiology of marine muscle foods. In: YH, H. (ed.) *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

- DALGAARD, P., GRAM, L. & HUSS, H. H. 1993. Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 19, 283-294.
- DANIELS, J. A., KRISHNAMURTHI, R. & RIZVI, S. S. H. 1985. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal of Food Protection*, 48, 532-537.
- DEBEVERE, J. & BOSKOU, G. 1996. Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 221-229.
- DEVLIEGHERE, F. & DEBEVERE, J. 2000. Influence of dissolved carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*, 33, 531-537.
- DEVLIEGHERE, F., DEBEVERE, J. & VAN IMPE, J. 1998. Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 105-113.
- DIXON, N. M. & KELL, D. B. 1989. The inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 67, 109-136.
- EIE, T. 2007. *Emballering av næringsmidler bind 1 og 2*, Ås, Matforsk.
- EMBORG, J., LAURSEN, B. G., RATHJEN, T. & DALGAARD, P. 2002. Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2 °C. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 790-799.
- ENFORS, S. O. & MOLIN, G. 1980. Effect of high-concentrations of carbon-dioxide on growth-rate of *Pseudomonas fragi*, *Bacillus cereus*, and *Streptococcus cremoris*. *Journal of Applied Microbiology*, 48, 409-419.
- ENFORS, S. O. & MOLIN, G. 1981. The influence of temperature on the growth inhibitory effect of carbon-dioxide on *Pseudomonas fragi* and *Bacillus cereus*. . *Canadian Journal of Microbiology*, 27, 15-19.
- FALL, P. A., LEROI, F., CARDINAL, M., CHEVALIER, F. & PILET, M. F. 2010. Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 357-361.
- FARBER, J. M. 1991. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology- a review. *Journal of Food Protection*, 54, 58-70.

- FRANZETTI, L. & SCARPELLINI, M. 2007. Characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 57, 39-47.
- GRAM, L. & DALGAARD, P. 2002. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 262-266.
- GRAM, L. & HUSS, H. H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121-137.
- GRAM, L., RAVN, L., RASCH, M., BRUHN, J. B., CHRISTENSEN, A. B. & GIVSKOV, M. 2002. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 79 - 97.
- GRAM, L., TROLLE, G. & HUSS, H. H. 1987. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 4, 65-72.
- GRAM, L., WEDELL-NEERGAARD, C. & HUSS, H. H. 1990. The bacteriology of fresh spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology*, 10, 303-316.
- GRANUM, P. E. 2007. *Matforgiftning. Næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner*, Kristiansand, Norge, Høyskoleforlaget, Norwegian Academic Press.
- GULDAGER, H. S., BØKNÆS, N., ØSTERBERG, C., NIELSEN, J. & DALGAARD, P. 1998. Thawed cod fillets spoil less rapidly than unfrozen fillets when stored under modified atmosphere at 2 °C. *Journal of Food Protection*, 61, 1129-1136.
- HANSEN, A. A., MØRKØRE, T., RUDI, K., OLSEN, E. & EIE, T. 2007. Quality changes during refrigerated storage of MA-packaged pre-rigor fillets of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) using traditional MAP, CO<sub>2</sub> emitter, and vacuum. *Journal of Food Science*, 72, M423-M430.
- HANSEN, A. Å. 2008. *Reduced headspace volume of modified atmosphere packaged fresh salmon (*Salmo salar* L.) and cod (*Gadus morhua* L.) by use of a carbon dioxide emitter*. Philosophiae Doctor Thesis, UMB.
- HINE, D. J. 1987. Shelf-life prediction. In: PAINE, F. A. (ed.) *Modern processing, packaging and distribution systems for food*. Blackie, Glasgow & London.
- HOTCHKISS, J. H. 1988. Experimental approaches to determining the safety of food packaged in modified atmospheres. *Food Technology*, 42, 55-64.
- HOVDA, M. B., LUNESTAD, B. T., SIVERTSVIK, M. & ROSNES, J. T. 2007. Characterization of the bacterial flora of modified atmosphere packaged farmed

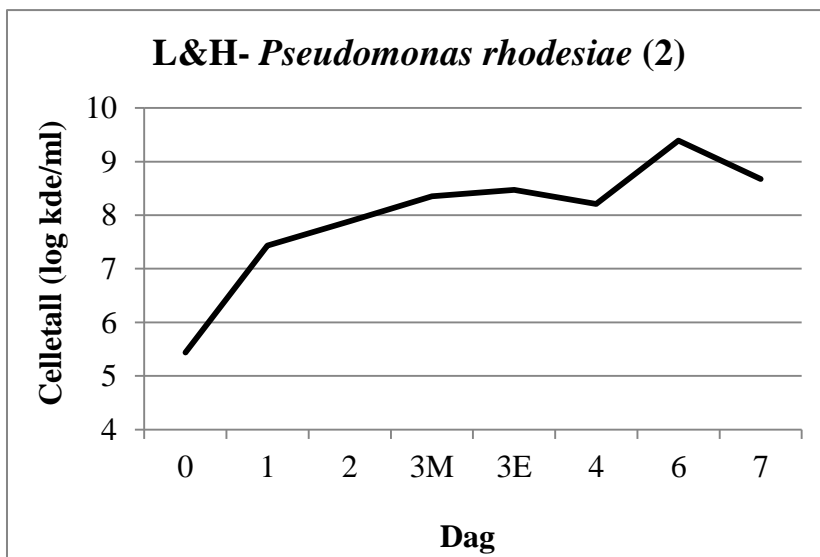
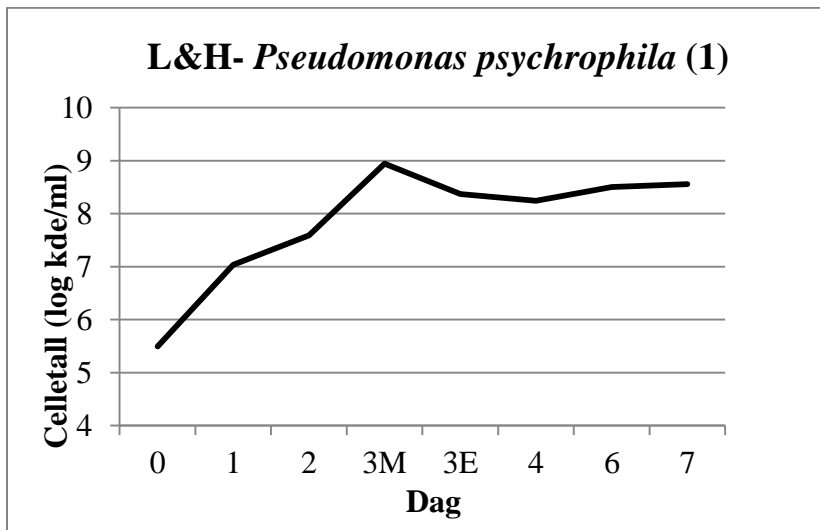
- Atlantic cod (*Gadus morhua*) by PCR-DGGE of conserved 16S rRNA gene regions. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 68-75.
- HUSS, H. H. 1988. Fresh fish- quality and quality changes. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations
- HUSS, H. H., EMBAREK, P. K. B. & JEPPESEN, V. F. 1995. Control of biological hazards in cold smoked salmon production. *Food Control*, 6, 335-340.
- KILLEFFER, D. H. 1930. Carbon dioxide preservation of meat and fish. *Industrial and Engineering Chemistry*, 22, 140-143.
- KRISTOFFERSEN, S., TOBIASSEN, T., ESAIASSEN, M., OLSSON, G. B., GODVIK, L. A., SEPPOLA, M. A. & OLSEN, R. L. 2006. Effects of pre-rigor filleting on quality aspects of Atlantic cod (*Gadus morhua* L). *Aquaculture Research*, 37, 1556-1564.
- LAURSEN, B. G., LEISNER, J. J. & DALGAARD, P. 2006. *Carnobacterium* species: effect of metabolic activity and interaction with *Brochothrix thermosphacta* on sensory characteristics of modified atmosphere packed shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3604-3611.
- LISTON, J. 1980. Microbiology in fisheries science. In: CONNELL, J. J. (ed.) *Advances in Fish Science and Technology*. Farnham, Surrey: Fishing News Books.
- LYNUM, L. 2005. *Fisk som råstoff - 2. utgave*, Trondheim, Tapir Akademisk Forlag.
- MITZ, M. A. 1979. CO<sub>2</sub> biodynamics-new concept of cellular control. *Journal of Theoretical Biology*, 80, 537-551.
- NMKL 2006. NMKL metode nr. 184. In: NÆRINGSMIDLER, N. M. F. (ed.). Oslo.
- NORGES SJØMATRÅD. 2015. *Utviklingstrender i norsk sjømatkonsum* [Online]. Tromsø. Available:  
<http://www.seafood.no/content/download/151169/1571447/file/Utviklingstrender%20i%20norsk%20sj%C3%B8matkonsum%202014.pdf> [Accessed 15.4.2015].
- OFSTAD, R., EGELANDSDAL, B., KIDMAN, S., MYKLEBUST, R., OLSEN, R. L. & HERMANSSON, A.-M. 1996. Liquid loss as effected by post mortem ultrastructural changes in fish muscle: Cod (*Gadus morhua* L) and salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 301-312.
- ÓLAFSDÓTTIR, G., MARTINSDÓTTIR, E., OEHLENSCHLÄGER, J., DALGAARD, P., JENSEN, B., UNDELAND, I., MACKIE, I. M., HENEHAN, G., NIELSEN, J. & NILSEN, H. 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 258-265.

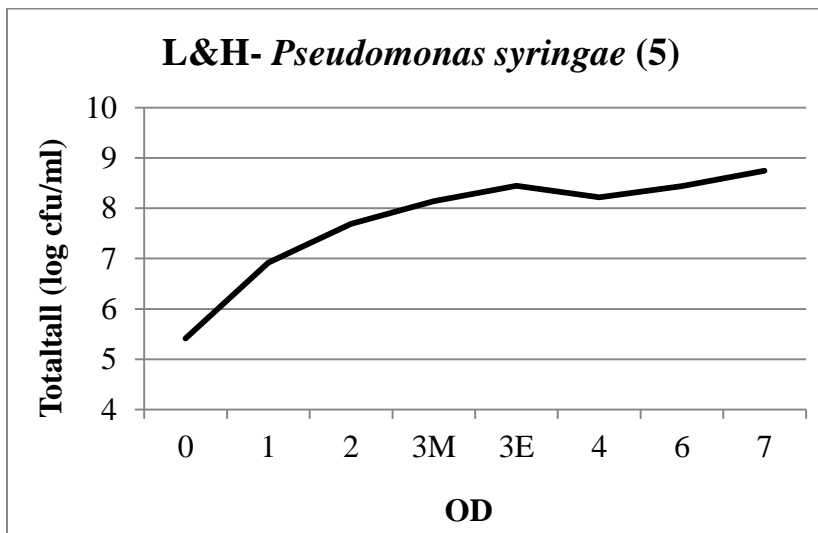
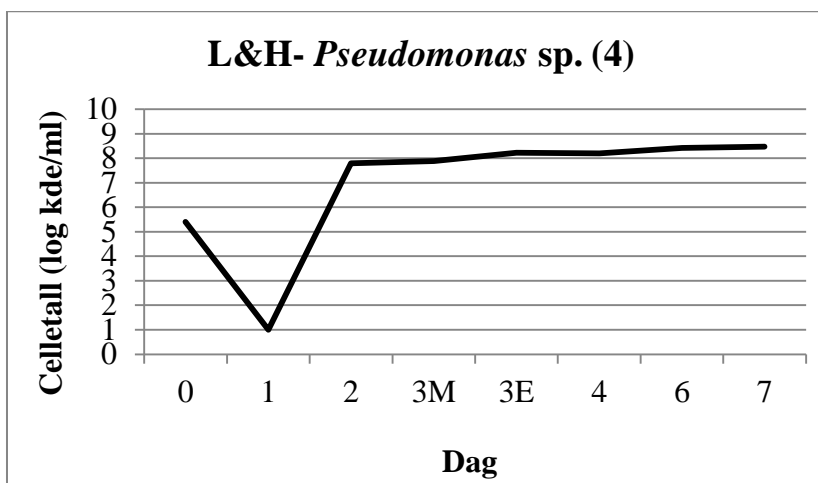
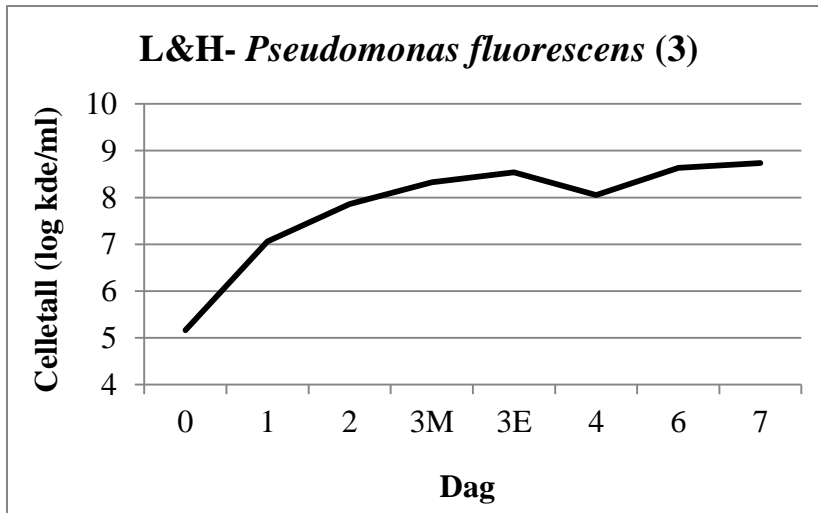
- OLSEN, E., VEBERG, A., VOGT, G., TOMIC, O., KIRKHUS, B., EKEBERG, D. & NILSSON, A. 2006. Analysis of early lipid oxidation in salmon pate with cod liver oil and antioxidants. *Journal of Food Science*, 71, 284-292.
- OLSSON, G. B., OLSEN, R. L., CARLEHØG, M. & OFSTAD, R. 1993. Seasonal variations in chemical and sensory characteristics of farmed and wild Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 217, 191-205.
- PETTERSEN, M. K. 2004. *The influence of thermoforming method, drawing depth and stability of selected food products*. Philosophiae Doctor Thesis, UMB.
- POLI, B. M., MESSINI, A., PARISI, G., SCAPPINI, F., VIGIANI, V., GIORGI, G. & VINCENZINI, M. 2006. Sensory, physical, chemical and microbiological changes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets packed under modified atmosphere/air or prepared from whole fish stored in ice. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 444-454.
- RANDELL, K., AHVENAINEN, R. & HATTULA, T. 1995. Effect of the Gas/Product ratio and CO<sub>2</sub> concentration on the shelf-life of MA packed fish. *Packaging technology and science*, 8, 205-218.
- REDDY, N. R., ARMSTRONG, D. J., RHODEHAMEL, E. J. & KAUTTER, D. A. 1992. Shelf-life extension and safety concerns about fresh fishery products packaged under modified atmospheres: a review. *Journal of Food Safety*, 12, 87-118.
- ROBERTSON, G. L. 2010. Food Packaging and Shelf Life. In: ROBERTSON, G. L. (ed.) *Food Packaging and Shelf Life, A Practical Guide*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- RUDI, K., MAUGSTEN, T., HANNEVIK, S. & NISSEN, H. 2004. Explorative multivariate analyses of 16S rDNA microbial community data from modified atmosphere-packed (MAP) salmon and coalfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5010-5018.
- RØDBOTTEN, M., LEA, P. & UELAND, Ø. 2009. Quality of raw salmon as a predictor of cooked salmon quality. *Food Quality and Preference*, 20, 13-23.
- SHEWAN, J. M. 1971. The microbiology of fish and fishery products- a progress report. *Journal of Applied Bacteriology*, 34, 299-315.
- SIVERTSVIK, M. 2007. The optimized modified atmosphere for packaging of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua*) is 63 ml/100 ml oxygen and 37 ml/100 ml carbon dioxide. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie- Food Science and Technology*, 40, 430-438.

- SIVERTSVIK, M., JEKSRUD, W. K. & ROSNES, T. J. 2002. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products - significance of microbial growth, activity and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 107-127.
- SIVERTSVIK, M., ROSNES, J. T. & JEKSRUD, W. K. 2004. Solubility and absorption rate of carbon dioxide into non-respiring foods. Part 2: Raw fish fillets. *Journal of Food Engineering*, 63, 451-458.
- STAMMEN, K., GERDES, D. & CAPORASO, F. 1990. Modified atmosphere packaging of seafood. *Critical reviews in Food Science and Technology*, 29, 301-331.
- SUNG, S.-Y., SIN, L. T., TEE, T.-T., BEE, S.-T., RAHMAT, A. R., RAHMAN, W. A. W. A., TAN, A.-C. & VIKHRAMAN, M. 2013. Antimicrobial agents for food packaging application. *Trends in Food Science & Technology*, 33, 110-123.
- VAN SPREEKENS, K. J. A. 1974. The suitability of a modification of Long and Hammer's medium for the enumeration of more fastidious bacteria from fresh fishery products. *Archiv Lebensmittelhygiene*, 10, 213-219.
- YANCEY, P. H. & SIEBENALLER, J. F. 1999. Trimethylamine oxide stabilizes teleost and mammalian lactate dehydrogenases against inactivation by hydrostatic pressure and trypsinolysis. *The Journal of Experimental Biology*, 202, 3597-3603.
- ZHAO, Y., WELLS, J. H. & MCMILLIN, K. W. 1995. Dynamic changes of headspace gases in CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> packaged fresh beef. *Journal of Food Science*, 60, 571-575.

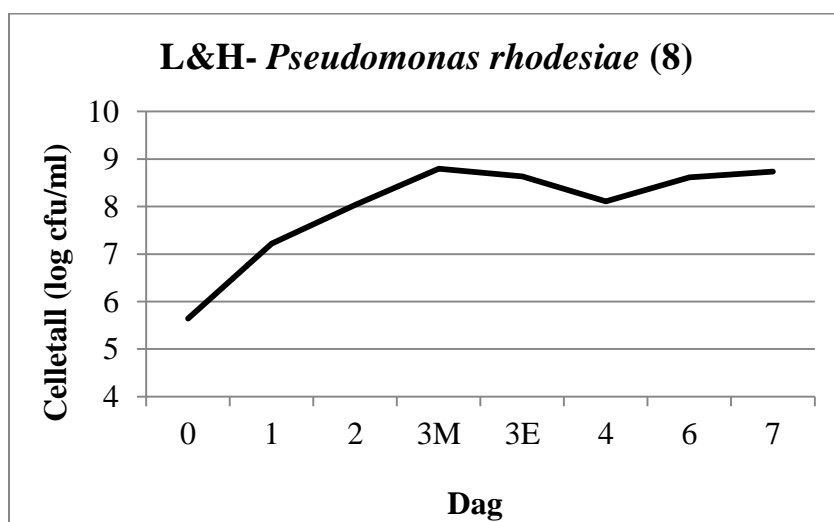
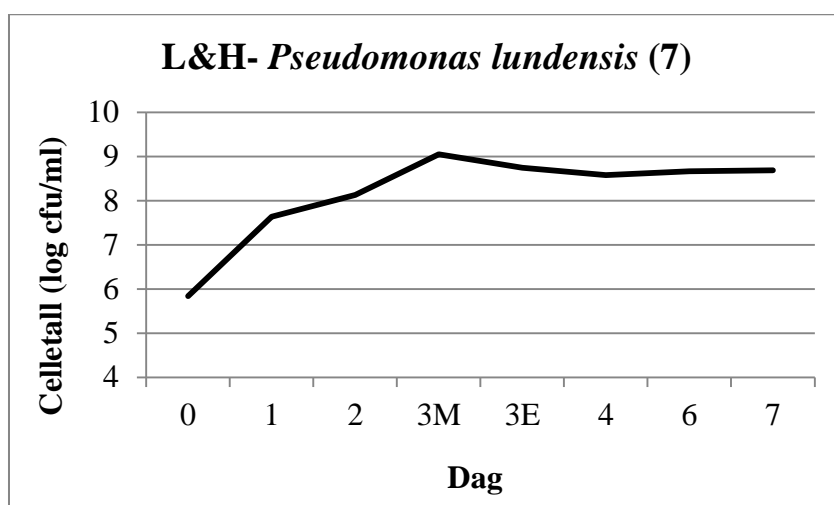
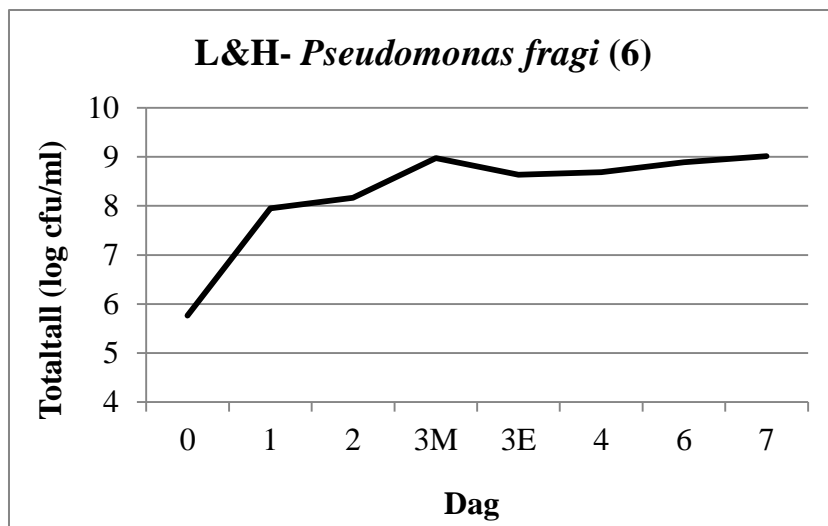
## Vedlegg 1

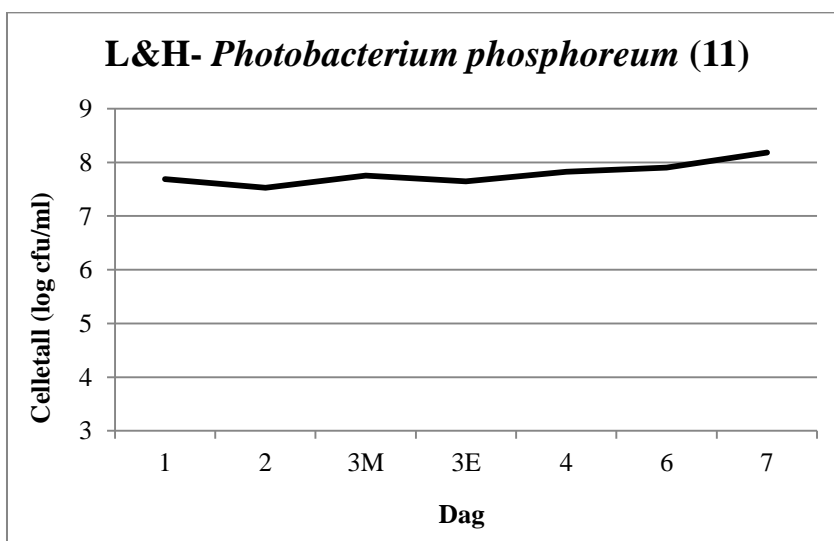
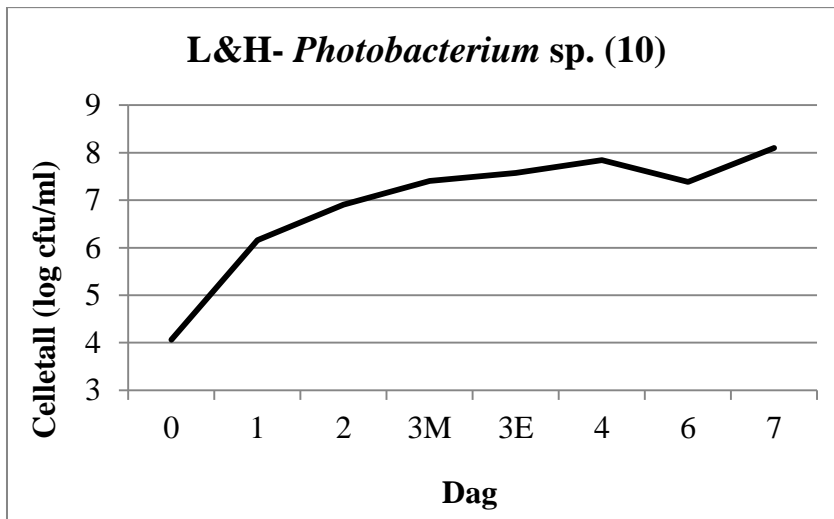
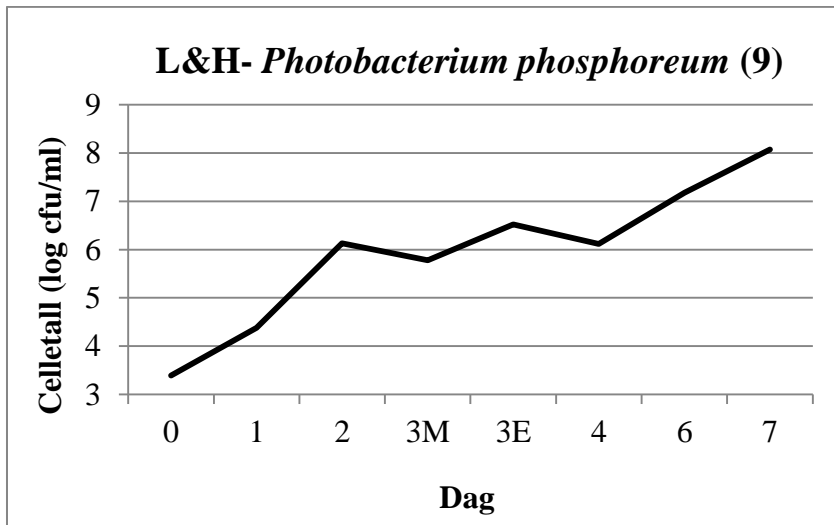
Vekstkurver for de 11 bakteriestammene anvendt i studiet, dyrket frem i Long and Hammer (L&H) buljong og torskbuljong (Torsk) med utplating på L&H- og torskeagar for å bestemme celletall.

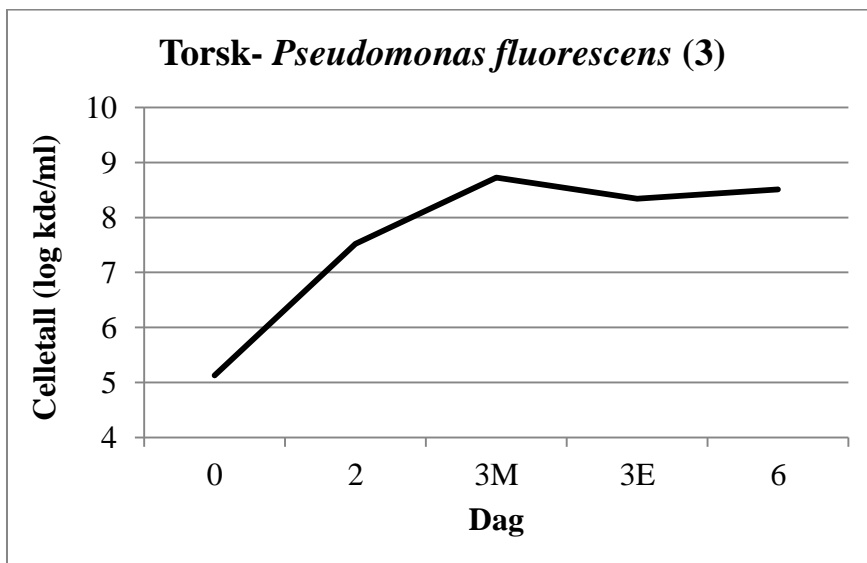
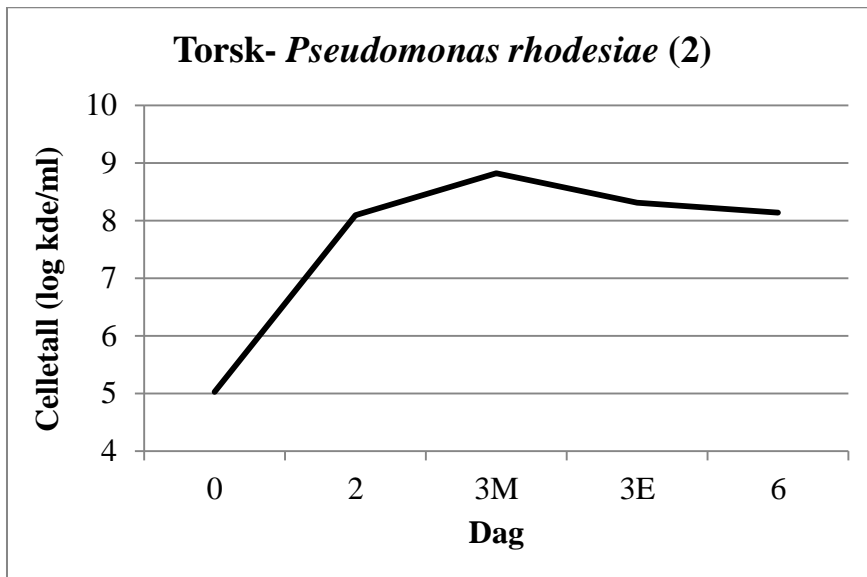
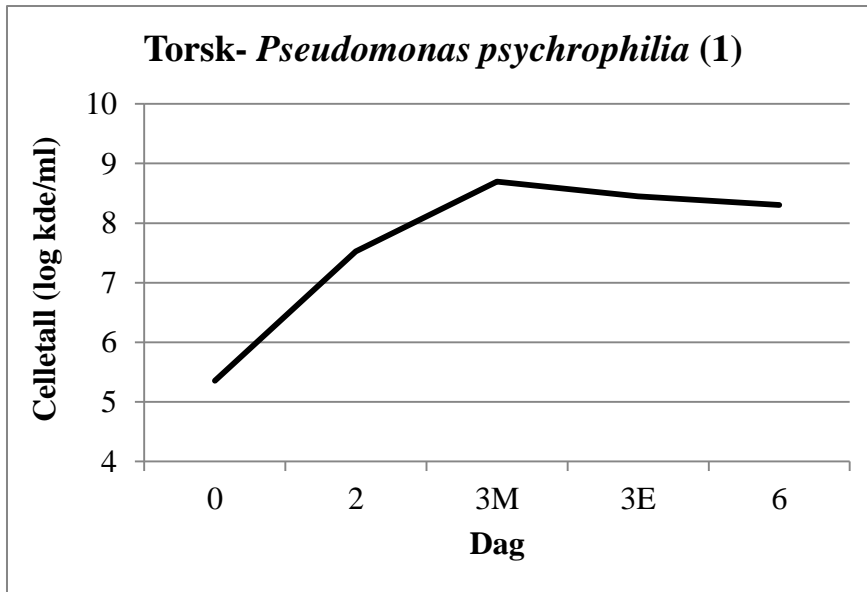


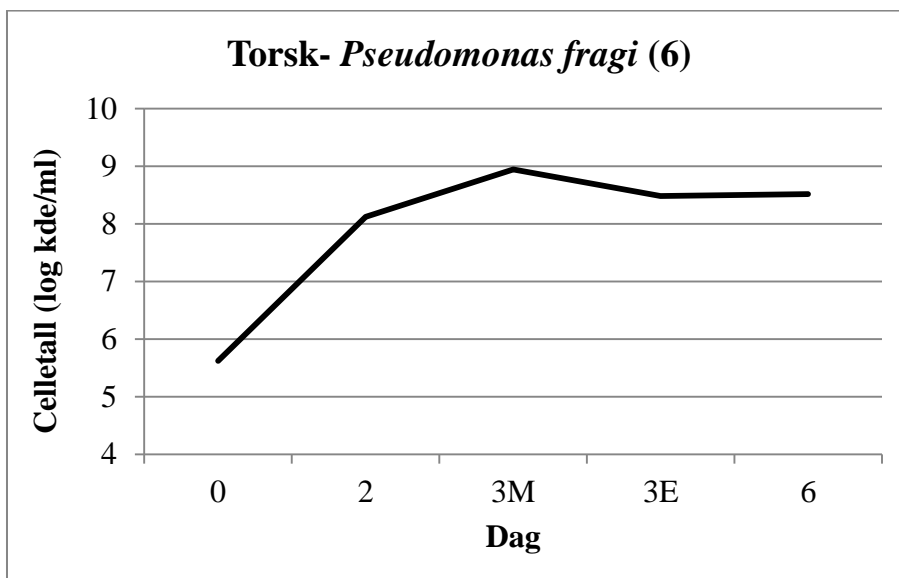
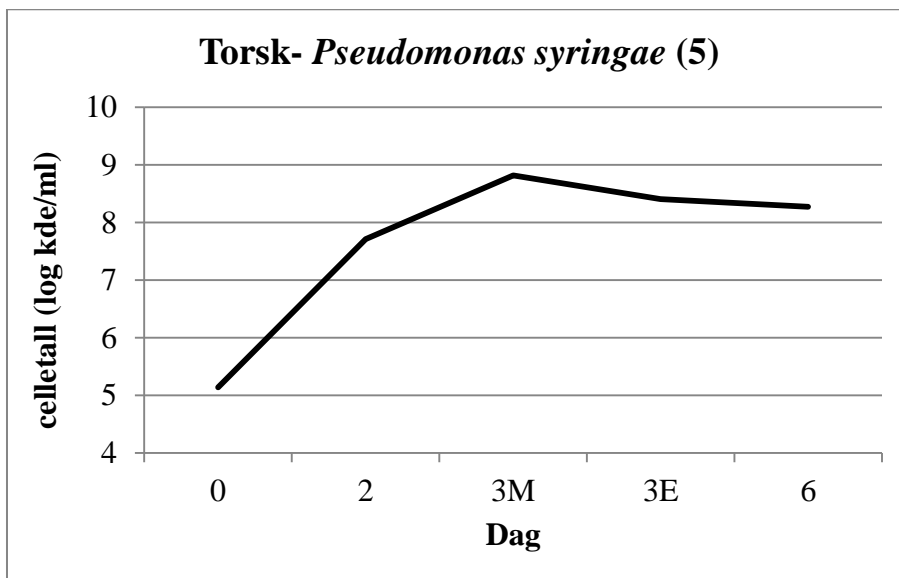
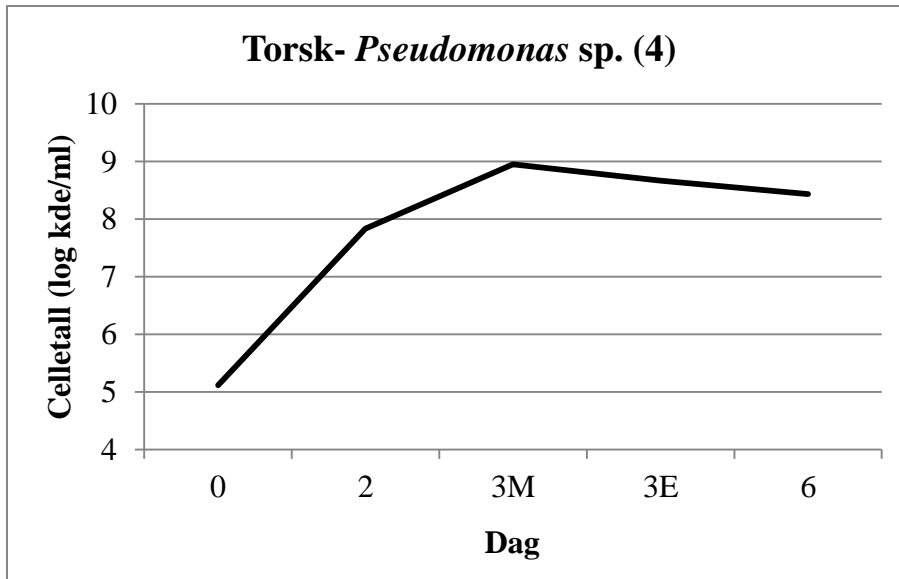


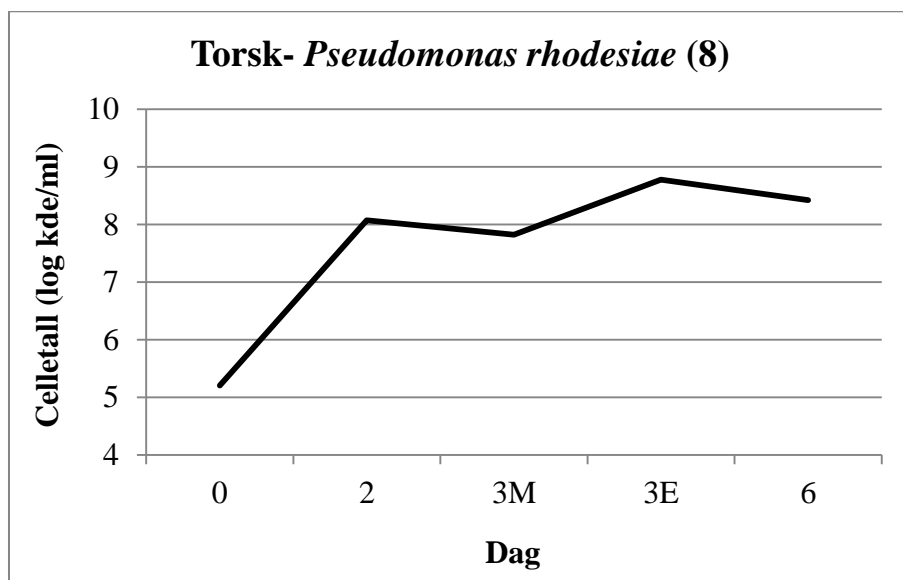
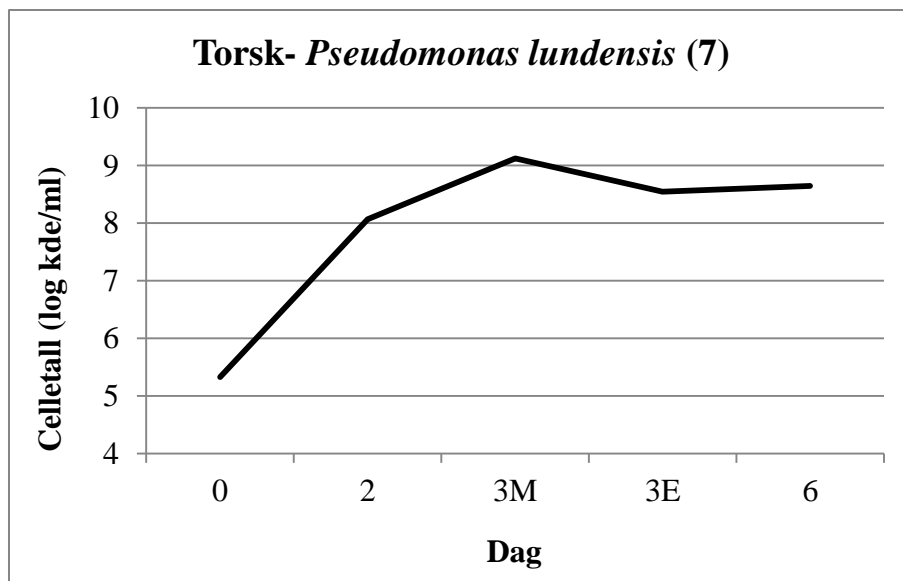


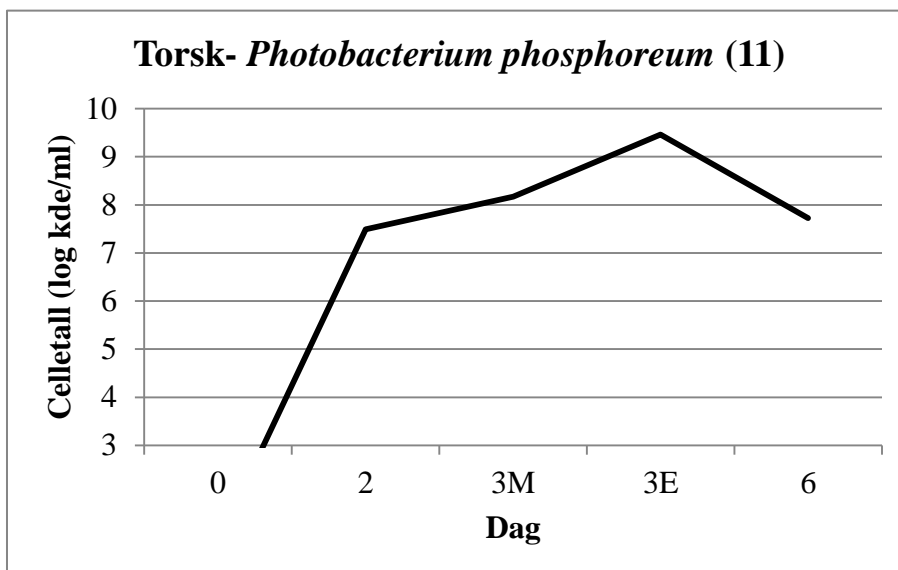
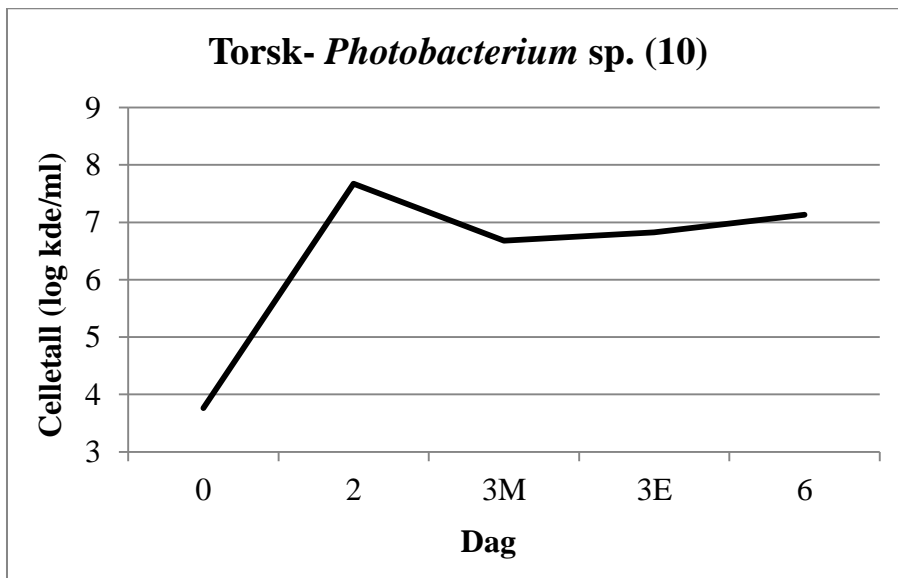
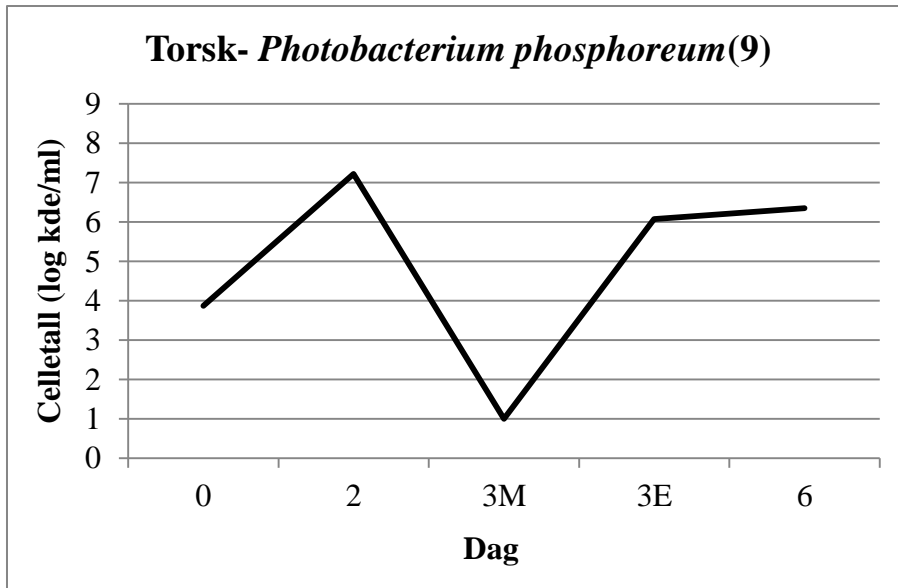














Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

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