

Holdbarhet på klippfisk

Vekst av rødmidd i klippfisk lagret ved forhøyede temperaturer (AP2)

Grete Lorentzen, Jørn-Owe Johansen, Mette Wesmajervi Breiland, Reidun Dahl, Elin Sandaker & Elinor Ytterstad (UiT)





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

Nofima har om lag 400 ansatte.

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

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
NO-5141 Fyllingsdalen

Sunnalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
Faks: 64 94 33 14
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

		ISBN: 978-82-8296-355-8 (trykt) ISBN: 978-82-8296-356-5 (pdf) ISSN 1890-579X
Tittel: Holdbarhet på klippfisk Vekst av rødmidd i klippfisk lagret ved forhøyede temperaturer (AP2)		Rapportnr.: 6/2016 Tilgjengelighet: Åpen
Forfatter(e)/Prosjektleder: Grete Lorentzen, Jørn-Owe Johansen, Mette Wesmajervi Breiland, Reidun Dahl, Elin Sandaker & Elinor Ytterstad (Uit)		Dato: 3. februar 2016
Avdeling: Sjømatindustri		Ant. sider og vedlegg: 27+15
Oppdragsgiver: Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)		Oppdragsgivers ref.: 10478-02
Stikkord: Klippfisk, holdbarhet, forhøyet temperatur		Prosjektnr.: FHF 900856
Sammendrag/anbefalinger: <p>I prosjektet «Holdbarhet på klippfisk» er det foretatt studier for å fastsette holdbarhet på klippfisk basert på vekst av rødmidd. Denne rapporten referer til studier hvor klippfisk er lagret ved forhøyede temperaturer. Rød misfarging skyldes vekst av rødmidd som er en ekstrem halofil bakterie og denne blir naturlig tilført fisken gjennom saltet. Emballert loins av klippfisk og flekket klippfisk ble lagret ved 25, 30 og 35 °C ved 60 og 80 % relativ fuktighet. I tillegg ble det undersøkt om vanninnhold (tørkegraden) og startnivå av rødmidd hadde innvirkning på holdbarheten.</p> <p>Resultatene avdekket at lagring ved forhøyede temperaturer fremmer vekst av rødmidd og at holdbarheten dermed forkortes. Dette gjelder både for emballert loins av klippfisk og for flekket klippfisk. Faktorer som har betydning for holdbarheten er lagringstemperatur, luftfuktighet i tillegg til fiskeprøvens vanninnhold (tørkegrad) og startnivå av rødmidd. Avhengig av kombinasjonene mellom disse variablene blir holdbarheten forskjellig.</p> <p>Generelt har emballert loins lagret ved 60 % relativ fuktighet (RH) en lengre holdbarhet sammenlignet med loins lagret ved 80 % RH. I tillegg har loins lagret ved 25 °C en lengre holdbarhet sammenlignet med både 30 og 35 °C. Holdbarhetseffekten synes å være begrenset dersom fisken tørkes til et lavere vanninnhold enn 48 %. Verdiene for holdbarhet er minimumsverdier siden det er tatt utgangspunkt i et startnivå rødmidd på 1000/g klippfisk som er det høyeste nivå naturlig forekommende rødmidd i kommersiell klippfisk. Et lavere startnivå rødmidd vil gi en lengre holdbarhet.</p> <p>Et tilleggsmoment er at holdbarhetene som er avdekket gjelder for loins fordi denne delen på fileten viste seg å gi rød misfarging først. I sum innebærer dette at buk- og halestykker av klippfisk med et lavere startnivå rødmidd har en lengre holdbarhet enn det som er oppgitt i denne studien. Forsøket ga indikasjoner på at holdbarheten for flekket salt og klippfisk er forskjellig fra det som er funnet for emballert loins. Resultatene for flekket fisk baseres på et avgrenset forsøksmateriale, og disse resultatene kan dermed ikke benyttes som anbefalinger på samme måte som resultatene fra forsøk med loins.</p> <p>Avslutningsvis ble det vist at klippfisk produsert av bergsalt får en rød misfarging ved lagring ved forhøyet temperatur. I henhold til litteraturen inneholder bergsalt rødmidd, rød misfarging av fisken var derfor ventet.</p>		
English summary/recommendation: <p>Dried salt-cured cod is a commercially important product that is mainly exported to markets in Latin America and Southern Europe. However, many markets do not have adequate refrigeration facilities. When stored at elevated temperatures, a red discoloration can develop due to growth of extreme halophiles, at which point the product is considered defective and cannot be sold. In this project, the shelf life of packaged loins of dried salt-cured cod have been estimated at 25, 30 and 35 °C. The study revealed that shelf life depends of storage temperature, relative humidity, water content and level of extreme halophiles. Storage at elevated temperatures promotes growth of halophiles and shortens the shelf life. Products stored at 60% relative humidity had a longer shelf life than those stored at 80% relative humidity. Products stored at 25 °C had a longer shelf life than those stored at 35 °C.</p>		

Innhold

1	Innledning	1
2	Mål.....	2
3	Material og metode	3
3.1	Innsamling av rødmidd- og brunmiddisolater	3
3.2	Rødmidd og brunmidd i renkulturforsøk.....	3
3.3	Varmebehandling av salt.....	4
3.4	Produksjon av saltfisk og klippfisk til lagringsforsøk ved forhøyede temperaturer.....	4
3.5	Holdbarhet for emballert loins av klippfisk lagret ved forhøyede temperaturer	7
3.6	Holdbarhet på flekket saltfisk og klippfisk lagret ved forhøyede temperaturer.....	8
3.7	Klippfisk produsert av bergsalt.....	9
3.8	Statistikk	9
4	Resultater og diskusjon	10
4.1	Renkultur rødmidd	10
4.2	Renkultur brunmidd	11
4.3	Holdbarhet på emballert loins av klippfisk.....	14
4.4	Holdbarhet flekket fisk	18
4.5	Klippfisk produsert av bergsalt.....	22
5	Konklusjon.....	26
6	Litteratur	27
	VEDLEGG	i

1 Innledning

Holdbarhet på klippfisk er et tema klippfiskindustrien ønsker mere kunnskap om. Derfor initierte FHF prosjektet «Holdbarhet på klippfisk» i 2013 der hovedmålet er å studere holdbarhet på klippfisk under ulike lagringsbetingelser for deretter å komme frem til en anbefalt holdbarhet for dette produktet. Prosjektet består av fire arbeidspakker; 1) å forbedre prosedyre for prøveuttak, 2) å kartlegge vekst av rød- og brunmidd i klippfisk lagret ved forhøyede temperaturer, 3) å kartlegge sensoriske egenskaper ved kjølelagring, og 4) å studere alternativer til kassering av klippfisk som er uegnet til konsum grunnet synlig misfarging.

Denne rapporten beskriver arbeid som er utført i arbeidspakke 2. Midtveis i prosjektet ble det besluttet å konsentrere det videre arbeidet på rødmidd, derfor viser denne rapporten kun noen få studier med brunmidd. I denne arbeidspakken har vi studert veksthastighet for rødmidd og brunmidd ved forhøyede temperaturer. Veksthastighet ble først studert i renkultur, det vil si rød- og brunmidd ble dyrket i flytende medium som hadde optimale vekstbetingelser. Forsøkene med brunmidd ble avsluttet etter renkulturforsøkene. Etter renkulturforsøkene, ble vekst av rødmidd studert på klippfisk med ulikt vanninnhold. I den første delen av arbeidet ble loins av saltfisk tilsatt rødmidd, tørket til ulike tørkegrader, emballert og deretter lagret ved forhøyede temperaturer. Deretter ble det gjennomført et avgrenset lagringsforsøk med flekket salt- og klippfisk hvor målet var å studere holdbarheten også for disse produktene. Avslutningsvis ble det kjørt et lagringsforsøk med klippfisk produsert av bergsalt hvor målet var å finne ut om rødmidd kan være et potensielt problem for slike produkter.

I alle lagringsforsøkene med klippfisk/saltfisk og rødmidd ble fisken observert jevnlig med hensyn på forekomst av synlig rosa eller rød misfarging. I henhold til Codex Alimentarius (2005) er en slik misfarging definert som et kvalitetsavvik, og fisken er derfor ikke å anse som salgbar vare. Rød misfarging på klippfisken er i hovedsak et visuelt problem, men synlig rødmidd medfører en endret smak og lukt på grunn av proteolytiske enzymer. Det utgjør imidlertid ingen helserisiko å spise slik fisk.

Rødmidd er en fellesbetegnelse på ekstremt halofile bakterier som for eksempel *Halobacteriaceae* og *Halococcus* (Huss & Valdimarsson, 1990). Optimale vekstbetingelser er 20–26 % NaCl ved temperaturer i området 35–41 °C. Under 8 °C skjer det ingen vekst, men rødmidd vil likevel overleve. For å kunne se en rosa eller rød misfarging på fisken må det være minimum log 7 rødmidd/gram klippfisk noe som tilsvarer 10.000.000 rødmidd/g klippfisk. Dette innebærer at klippfisk kan ha høye nivåer rødmidd, og likevel passere som salgbar vare. Brunmidd er en sopp som må ha tilgang på luft for å vokse.

Kommersiell klippfisk inneholder en naturlig forekomst av rødmidd fordi saltet som brukes inneholder denne bakterien. For å studere holdbarhet i klippfisk basert på vekst av rødmidd kunne vi derfor ikke bruke kommersielt tilgjengelig klippfisk eller kommersielt tilgjengelig salt. Klippfisken som ble brukt i holdbarhetsforsøkene ble derfor produsert ved Nofima med salt fritt for rødmidd. Rødmidd i saltet ble drept med varmebehandling.

I august 2014 ble det publisert en rapport fra denne arbeidspakken (Lorentzen, 2014). Rapporten omhandler holdbarhet på emballert loins av klippfiskfilet lagret ved 30 °C og den refererer kun til forsøk med rødmidd. Resultatene som presenteres i det følgende inkluderer og oppsummerer alt arbeide som er utført med lagring av klippfisk ved forhøyede temperaturer.

2 Mål

Målet med arbeidspakke 2 er å fastsette holdbarhet for klippfisk lagret ved forhøyede temperaturer.

For å nå målet ble arbeidet delt opp i delmål. Delmålene har vært:

1. Skaffe tilveie isolater av rød- og brunmidd
2. Studere vekst for rødmidd i renkultur
3. Studere vekst for brunmidd i renkultur
4. Definere betingelser for forsøk med klippfisk (del av fisk som skulle undersøkes, vanninnhold i fisk, metode for å tilføre rødmidd til fisk, emballering)
5. Produsere salt-filet av torsk med varmebehandlet salt
6. Gjennomføre holdbarhetsforsøk med emballert loins
7. Produsere saltet flekket torsk, gjennomføre et mindre holdbarhetsforsøk
8. Gjennomført lagring av saltfisk produsert av bergsalt



Bilde 1 Salt-filet gjøres klar for holdbarhetsforsøk

3 Material og metode

3.1 Innsamling av rødmidd- og brunmiddisolater

Prosjektet startet med å samle inn prøver av naturlig forekommende rødmidd og brunmidd fra et utvalg av klippfisk. Dette ble gjort ved å lagre klippfiskene ved forhøyet temperatur inntil synlig rød eller brun misfarging oppsto. Deretter tok vi ut prøver med synlig misfarging, fortynnet prøven og overførte deretter til plater med vekstmedier tilpasset henholdsvis rød- eller brunmidd (NMKL-metode no 171, Vedlegg 1). Platene ble deretter lagret inntil synlige kolonier av enten rød- eller brunmidd oppsto. Koloniene ble karakterisert i mikroskop, og deretter dyrket opp i et flytende medium (Vedlegg 1; medium uten agar), før prøver ble tatt ut og frosset ned på -80 °C. For å få et representativt utvalg av rødmidd for bruk i prosjektet, plukket vi ut 5 forskjellige prøver (isolater). Det ble i tillegg kjøpt inn en referansestamme av rødmidd, *Halobacterium salinarum* (DSMZ no. 668) som er isolert fra klippfisk. I forkant av alle lagringsforsøkene med rødmidd, ble alle 6 isolatene dyrket opp i separate kolber med flytende rødmiddmedium ved 35 °C i 24–6 timer. Deretter ble like volum fra hver kolbe blandet sammen til en «cocktail» før videre bruk.

For brunmidd fikk vi to isolater fra den kommersielle klippfisk. Vi kjøpte i tillegg inn en referansestamme av brunmidd (*Walleimia sebi*), fra DSMZ i Tyskland (DSMZ no. 5329). Før forsøkene med brunmidd dyrket vi opp egne isolater og referansestammen i et flytende brunmiddmedium.

I motsetning til dyrking av rødmidd, ble løsningen med brunmidd heterogen, det vil si det dannet seg først små beige fnokker i løsningen. Deretter utviklet fnokkene seg til tråder. Med lagringstiden ble trådene brune og etter hvert helt svarte. Siden synlig brun eller sort misfarging er definert som et kvalitetsavvik, ble det da viktig å starte opp forsøkene i det øyeblikket brunmidden var lys beige, og knapt synlig.

3.2 Rødmidd og brunmidd i renkulturforsøk

Målet med renkulturforsøkene var å skaffe kunnskap om veksthastighet for rødmidd og brunmidd ved forhøyede temperaturer og ellers optimale lagringsbetingelser; tilgang på luft og næringstilgang. Resultater fra disse forsøkene skulle danne grunnlaget for de påfølgende forsøkene med klippfisk tilsatt henholdsvis rødmidd og brunmidd.

Rødmidd - vekst i flytende rødmiddmedium

Til sammen 6 isolater av rødmidd ble dyrket opp i separate kolber til cirka Log 8 CFU/ml, blandet sammen, og deretter fortynnet. Prøver fra hver fortykning ble deretter overført til kolber med 20 ml flytende rødmidd medium. Startnivået av rødmidd i disse kolbene varierte fra cirka log 7 cfu/ml (det vil si 10.000.000 rødmidd/ml prøve) ned til cirka log 0 (cirka 0–1 rødmidd/ml prøve). Kolbene ble så plassert ved 20, 25, 30 og 35 °C med røring. Kolber med bølgehakk ble brukt for å sikre god innblanding av luft under røring. Veksthastigheten ble målt ved å kvantifisere antall rødmidd (NMKL-metode nr 171, Vedlegg 1) gjennom lagringsperioden. Lagringsperioden varierte fra 5 til 30 dager for rødmidd lagret på henholdsvis 35 og 20 °C.

Brunmidd - vekst på agarplate med brunmiddmedium

Som tidligere beskrevet vokser brunmidd heterogent i et flytende medium. Dette skyldes at brunmidd er en sopp. Dette innebærer at forsøksoppsettet som ble anvendt for rødmidd ikke var direkte

overførbart til vekstforsøk med brunmidd. Som en alternativ tilnærming ble det derfor valgt å studere vekst av brunmidd på agarplate, det vil si en rund plastskål tilsatt en fast vekstmedium for brunmidd. Innledningsvis ble det undersøkt om lagring i lys eller mørke hadde innvirkning på veksten. Parallelle plater tilsatt samme konsentrasjon brunmidd ble plassert lyst og mørkt ved samme temperatur.

Vekst av brunmidd på agarplate ble deretter studert ved 20, 25, 30 og 35 °C. Utvikling av kolonier med beige, brun/svart misfarging ble registrert regelmessig gjennom hele lagringsperioden på 21 dager.

3.3 Varmebehandling av salt

Til produksjon av saltfisk og klippfisk ble det brukt salt fra GC Rieber (Vedlegg 3, produktdatablad). For å unngå at fisken ble tilført rødmidd fra saltet, ble saltet varmebehandlet i 16 timer ved 120 °C for å drepe forekomster av rødmidd (Lamprecht & Riley, 1990). Etter avkjøling ble saltet lagret i tette plastdunker ved 4 °C inntil bruk.

3.4 Produksjon av saltfisk og klippfisk til lagringsforsøk ved forhøyede temperaturer

Som nevnt innledningsvis ble all klippfisk til lagringsforsøkene produsert ved Nofima for å unngå naturlig forekomst av brunmidd. Vi kjøpte inn garnfanget torsk til produksjon av saltfiskfilet, til sammen 50 fisk i størrelsen 4–6 kg i desember 2013 og 80 fisk i samme størrelse i november 2014. For begge leveransene var torsken tatt på garn (stubbegarn). På grunn av mye sild i torsken, ble fisken sløyd umiddelbart for å begrense kvalitetsforringelsen. Etter sløyving ble fisken godt iset før transport til Nofima i Tromsø. Saltfilet til loins ble produsert i 2013, mens flekket fisk ble produsert i 2014.

I desember 2013 ble fisken tilført mere is etter ankomst, og deretter plassert på kjølelager (2 °C). Dagen etter ble torsken filetert, vasket og saltet. Saltingen startet med å legge ett lag med salt på bunnen av et 700 ltr kar, deretter ble filetene lagt med skinnsiden ned, totalt 4–5 fileter per lag, før et nytt lag med salt ble påført. Øverste laget med fisk ble lagt med skinnsiden opp, og deretter tilført ett nytt lag med salt på toppen. Karet med fileter ble deretter dekket med plast og forseglet med gaffatape (Bilde 2). Karet ble lagret på 2 °C i en uke, deretter ble fisken tatt ut av karet og saltet på nytt med nytt salt og lagt over i fiskekasser (Bilde 3). Alt salt som ble brukt var på forhånd varmebehandlet. Kassene ble deretter lagret på 2 °C i ytterligere 3 uker før forsøksoppstart.

I november i 2014 ble det produsert saltfisk av flekket torsk. Etter flekking ble fisken vasket ren, og deretter saltet i to stykk 700 ltr kar. Karene ble fylt til cirka 4/5. Deretter ble det lagt på et lokk med en ytterligere forsegling med strekkplast. Karene ble plassert på 4 °C. På grunn av lekkasje fra det ene karet ble det etterfylt med mett saltlake etter 1 døgn lagring. Lekkasjen ble tettet. Etter en uke ble fisken lagt om i nytt salt på en palle. Fisken ble lagret slik på 4 °C i minimum tre uker før forsøksoppstart.



Bilde 2 Produksjon av saltfilet av torsk i desember 2013. Filetering og salting.



Bilde 3 Omlegging av saltfiskfilet i nytt varmebehandlet salt.

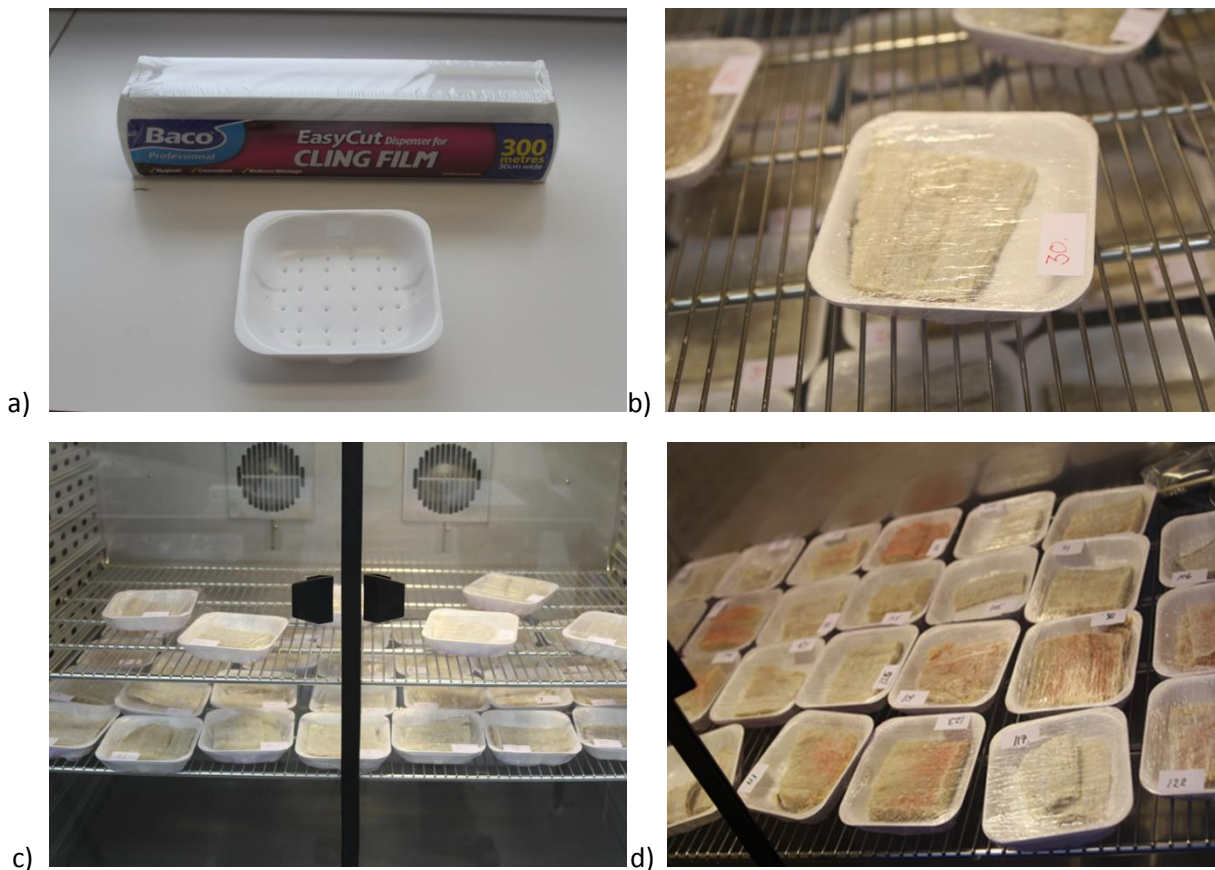
3.5 Holdbarhet for emballert loins av klippfisk lagret ved forhøyede temperaturer

Forsøk med rødmidd i klippfisk ble gjennomført i flere omganger på grunn av mange parallelle prøver og flere variabler. Variablene inkluderte 3 lagringstemperaturer (25, 30 og 35 °C), 2 nivåer luftfuktighet (60 og 80 % relativ fuktighet (RH)) og 5–6 forskjellige nivåer rødmidd i klippfisken (fra log 1.6 til log 6.1 CFU/g). Hvert forsøk startet med å dyrke opp rødmidd i flytende rødmiddmedium. Til sammen 6 ampuller med nedfrosede prøver av rødmiddbakterier ble tint og fordelt på 6 kolber med 25 ml flytende rødmidd medium. Rødmidd fikk optimale vekstbetingelser; 35 °C under konstant røring i 25–26 timer til en konsentrasjon på cirka log 8 rødmidd/ml var oppnådd. Kulturen fra de 6 kolbene ble så blandet til en cocktail, og deretter fortynnet ned til konsentrasjoner som tilsvarte konsentrasjoner i klippfisken fra log 1.6 til log 6.1 CFU/g. Deretter ble rødmidd tilført saltfisken som deretter ble tørket til klippfisk til et definert vanninnhold (tørkegrad). Som positive kontroller ble det brukt saltfisk tilsatt uførtynnet rødmiddkultur, mens negativ kontroll var saltfisk tilsatt vekstmedium uten rødmidd.

I innledende forsøk ble hel saltfilet tilsatt rødmidd, så tørket ved 20 °C, lagret i 2–3 døgn ved 4 °C for deretter å bli lagret ved 30 °C (Lorentzen, 2014). Selv om filetene ble tilført samme konsentrasjon rødmidd, ble ikke hele fileten rød samtidig. Vi observerte at de tykkeste delene av filetene; loinsen fikk en rosa rød misfarging før de tynnere delene av fileten, det vil si buk og haledelen. Siden Codex Alimentarius (2005) kun definerer synlig rødfarge som et kvalitetsavvik, ble det derfor valgt å bruke loins i de videre forsøkene.

I de påfølgende forsøkene ble derfor loinsen av saltfileten skåret ut, tilsatt en definert mengde rødmidd med bruk av pipette og deretter tørket til ulike tørkegrader med et sluttvanninnhold i området 46–55 % tilsvarende vanninnholdet i en godt tørket klippfisk til en saltet filet som ikke er tørket. Etter at ønsket tørkegrad var oppnådd, ble det skåret ut en tynn skive av loinsen til vannanalyse. Deretter ble fisken lagt i lukkede poser og lagret på 4 °C i 2–4 døgn i påvente av at de siste loinsene hadde nådd et vanninnhold på cirka 46 %. Vanninnholdet ble målt på laboratorium (AOAC, 1995). Før lagring ved forhøyet temperatur, ble loinsene emballert enkeltvis i beger. Hvert beger ble deretter overtrukket med en plastfilm, merket og veid. Til forsøkene ble beger av polystyren (silver plastics® GmbH & Co, Troisdorf, Germany) og PVC plastfilm (Global Plastics International, Fécamp, France) brukt, tilsvarende det som anvendes i brasilianske supermarkedskjeder (Bilde 4, a) og i et tidligere lagringsforsøk med klippfisk (Aas *et al.*, 2010). Innledningsvis observerte vi at ett lag med plastfilm ikke ga en tilstrekkelig barriere mot transport av fuktighet, det vil si fisken mistet eller tok opp vann raskt alt avhengig av RH i klimaskapene. For å begrense transporten av fuktighet gjennom emballasjen ble derfor begrene surret inn med 4 lag plast.

Etter emballering ble loinsene fordelt mellom to klimaskap som holdt samme temperatur men forskjellig luftfuktighet; 60 og 80 % (Bilde 4, c). For å sikre en jevn fordeling av fuktighet og temperatur for alle prøvene ble viftehastigheten satt til på 20 %. I begge klimaskapene var det plassert en lyskilde for å simulere lyset i supermarkeder (Typ. PL-460, Luxo Corporation, New York, USA). Begrene med klippfisk ble vurdert jevnlig med hensyn på første antydning til rød eller rosa misfarging. Produkter lagret ved 35 °C ble kontrollert daglig, mens det ved lavere temperaturer var mindre hyppige kontroller. I tillegg ble begrene veid for å følge opptak og avgivelse av fuktighet.



Bilde 4 a) Emballasje brukt til emballering av klippfisk loins, b) ferdig emballert og merket klippfisk loins, c) oppstart lagring i klimaskap, og d) klippfisk loins med rødmidd.

3.6 Holdbarhet på flekket saltfisk og klippfisk lagret ved forhøyede temperaturer

Opparbeidelse av rødmidd ble utført som beskrevet i kapittel 3.5. Deretter ble flekket saltfisk tilsatt rødmidd i 3 konsentrasjoner; som resulterte i cirka log 1, 3 og 4 CFU/g i fisken. Det eksakte nivået rødmidd ble bestemt ved bruk av NMKL-metode no 171 (Vedlegg 1). Etter tilsetning av rødmidd ble fisken deretter tørket til et vanninnhold på omtrent 50 og 46 %. I tillegg brukte vi saltet flekket fisk som ikke ble tørket. Holdbarhet for flekket fisk ble bestemt ut i fra de samme lagringsbetingelsene som for emballert loins. Tabell 1 viser en oversikt over forsøksoppsettet med alle variablene. På grunn av mange variabler i forsøket, var det kun en fisk per variabel. Som kontroller tørket vi to fisker uten rødmidd til cirka 50 % vann, disse ble deretter lagret ved henholdsvis 60 og 80 % RH.

Tabell 1 Forsøksoppsett med flekket fisk lagret ved 25, 30 og 35 °C ved henholdsvis 60 og 80 % relativ fuktighet (RH). Fiskene 1, 7, 13, 3, 9, 15, 5, 11 og 17 ble lagret ved 60 % RH, mens de resterende ble lagret ved 80 % RH.

Vanninnhold (%)	Startnivå rødmidd (Log CFU/g)					
	Log 1		Log 3		Log 4	
Saltfisk (ikke tørket), ca 55 % vann	Fisk 1	Fisk 2	Fisk 3	Fisk 4	Fisk 5	Fisk 6
Ca 50 % vann («7/8»)	Fisk 7	Fisk 8	Fisk 9	Fisk 10	Fisk 11	Fisk 12
Ca 46 % vann	Fisk 13	Fisk 14	Fisk 15	Fisk 16	Fisk 17	Fisk 18

Tørketiden for fisken ble bestemt ut i fra et startvanninnhold på 55,5 %. Vanninnholdet ble målt ved bruk av strimlemetoden (Codex Alimentarius, 2005). Etter tørking ble fiskene lagret i lukkede plastposer i 2–4 døgn ved 4 °C før lagring ved forhøyede temperaturer.

3.7 Klippfisk produsert av bergsalt

Med utgangspunkt i spørsmålet om klippfisk produsert av bergsalt inneholder rødmidd, ble det foretatt et mindre lagringsforsøk for å få et svar på dette. Ulike klippfiskprodukter produsert av bergsalt; porsjonspakninger, skinn og beinfri loins og flekket klippfisk produsert av sei ble sendt til Nofima i juni 2015. Fisken ble lagret i klimaskap som holdt 35 °C og 80 % RH. Gjennom lagringsperioden ble klippfisken vurdert jevnlig med hensyn på forekomst av rød misfarging.

3.8 Statistikk

I forsøk med emballert loins, ble det anvendt statistiske metoder for å kunne få oversikt over hvordan holdbarhet påvirkes av lagringstemperatur, RH, vanninnhold og nivå rødmidd. For å studere hvilke faktorer som har størst betydning for holdbarhet for emballert loins, ble det foretatt en «survival analysis» basert på Cox regresjons modell (Cox, 1972). Videre ble denne modellen brukt for å beregne medianverdier for holdbarhet for de ulike kombinasjonene mellom lagringstemperatur, luftfuktighet og vanninnhold. Medianverdier for holdbarhet er antall dager før 50 % av prøvene fikk en synlig rød eller rosa misfarging. Medianverdiene er kun beregnet for prøver som hadde et startnivå rødmidd på 1000/g klippfisk siden dette er det maksimale antall rødmidd som kan forventes i klippfisk (Lorentzen *et al.*, 2015). Medianverdiene kan derfor tolkes som minimum holdbarhet for emballert loins.

I forsøkene med flekket fisk var det imidlertid kun 1 fisk per variabel, og dermed ikke noe behov for statistisk behandling av dataene.

4 Resultater og diskusjon

4.1 Renkultur rødmidd

Prosjektet startet opp med å studere vekst av rødmidd ved forskjellige temperaturer og startnivå. Dette for å bli kjent med hvilke betingelser som påvirker vekst og veksthastighet. I tillegg var det viktig å finne en blanding av flere rødmiddisolater (cocktail) som kunne brukes i videre forsøk med emballert og flekket klippfisk.

Først ble 6 isolater rødmidd dyrket opp separat. Ved cirka Log 8 CFU/ml, ble kulturene blandet til en cocktail. Deretter ble rødmiddene fortynt til cirka log 0 CFU/ml, det vil si cirka 1 rødmidd per ml. Spekteret av prøver fra Log 7 til Log 0 ble overført til merkede kolber med rødmiddmedium, og deretter plassert på 20, 25, 30 eller 35 °C på røring. Rødmiddene er aerob, det vil si at den behøver luft for å vokse. For å sikre en god tilgang på oksygen har prøvene derfor vært satt på røring for alle lagringstemperaturene gjennom hele forsøksperioden. Gjennom vekstforsøkene ble det tatt ut prøver jevnlig for å bestemme veksthastighet.

Vekstkurver for rødmidd inkubert ved 20, 25, 30 og 35 °C er vist i vedlegg 2 (Figur 1, Figur 2, Figur 3 og Figur 4). Som forventet viser vekstkurvene for rødmidd lagret ved 35 °C en raskere vekst sammenlignet med lagring ved 20 °C. Antall dager det tok før kulturene nådde Log 7 er vist i tabell 2.

Tabell 2 Antall dager før startnivået rødmidd har nådd Log 7 CFU/ml ved inkubering på 20, 25, 30 og 35 °C. Startnivå er avrundet til nærmeste hele log enhet.

Temp (°C)	Startnivå rødmidd (Log CFU/ml)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
20	37.7 ^{a)}	33.1 ^{a)}	26.1	19.7	14.0	7.2	2.9	0
25	18.0	16.0	12.0	9.1	6.0	4.0	2.0	0
30	10.9	6.6	5.3	5.2	4.3	3.1	IA	IA
35	4.0	3.5	3.1	3.0	2.3	2.1	IA	IA

a) Antall dager er beregnet ut i fra stigningstaller til kurvene (ekstrapolering).

IA = Ikke analysert.

Det er i tidligere forsøk vist at rødmidd er synlig når konsentrasjonen når Log 7 CFU/g på klippfisk (Lorentzen *et al.*, 2015). I forsøkene med flytende kultur ble det klart at grenseverdien for synlig rød farge er den samme. Resultatene for veksthastighet (Tabell 2) er videre bearbeidet for å finne sammenhengen mellom startnivå rødmidd og tiden det tok før kulturen hadde nådd grensen for synlig rødmidd (Tabell 3).

Tabell 3 Lineære modeller for antall dager (Y) det tar før rødmidd med en startnivå (X) når Log 7 CFU/ml ved dyrking på henholdsvis 20, 25, 30 og 35 °C i flytende kultur. Regresjonskoeffisient (R²) for modellene.

Temperatur (°C)	Lineær modell	R ²
20	Y = - 5.75X* + 38.63	0.97
25	Y = - 2.66X* + 17.68	0.99
30	Y = 1.33X* + 10.00	0.96
35	Y = - 0.45X* + 4.55	0.97

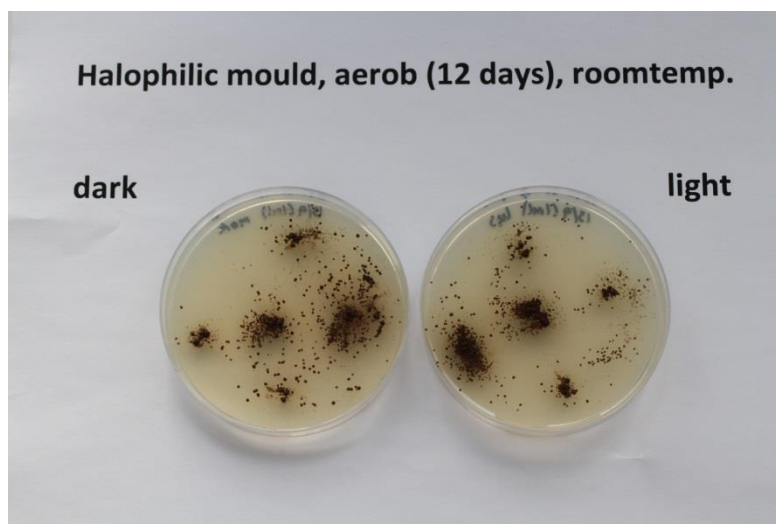
*) X=Log verdi for startnivå rødmidd

Ved alle lagringstemperaturene viste forsøkene gode sammenhenger mellom startnivå rødmidd og tiden det tok før konsentrasjonen ble Log 7 CFU/ml (Tabell 3). En regresjonskoeffisient (R^2) nær 1 indikerer en klar lineær sammenheng mellom startnivå og lagringstemperatur. Oppsummert viser Tabell 2 og Tabell 3 at rødmiddcocktailen som er brukt blir rød ved konsentrasjonen log 7 rødmidd/ml uavhengig av lagringstemperatur og startnivå rødmidd.

Det konkluderes dermed med at rødmiddcocktailen bestående av 6 isolater rødmidd er representativ for det vi tidligere har observert i klippfisk, det vil si at rødfargen blir synlig ved Log 7 CFU/g. Rødmiddcocktailen ble derfor brukt i de videre forsøkene med både emballert loins av klippfisk og flekket klippfisk. Med bakgrunn i tilbakemeldinger fra styringsgruppa i prosjektet ble det besluttet å fastsette holdbarhet ved 25, 30 og 35 °C.

4.2 Renkultur brunmidd

Brunmidd vokser optimalt ved 10–15 % NaCl ved temperaturer i området 20–25 °C. I forsøkene med brunmidd ble to plater med brunmiddmedium tilsatt brunmidd. Deretter ble platene lagret henholdsvis lyst og mørkt ved romtemperatur med tilgang på luft. Målet var å finne ut om tilgang på lys hadde noen effekt på vekst eller utseende.



Bilde 5 Brunmiddplater tilsatt brunmidd. Platene er lagret lyst og mørkt i 12 dager ved romtemperatur.

Resultatene viser at det ikke er noen forskjell i tidspunkt før en brun/svart misfarging inntreffer (Bilde 5) og at lysforhold derfor har mindre betydning for veksthastigheten.

I det påfølgende forsøket ble plater med brunmidd lagret ved 4, 20, 25, 30 og 35 °C for å avdekke veksthastighet (Tabell 4). Startnivået brunmidd var det samme, og samme brunmiddkultur ble benyttet. Det ble observert antall dager det tok før brunmidden ble 1) synlig beige, 2) synlig lys brun og 3) synlig svart.

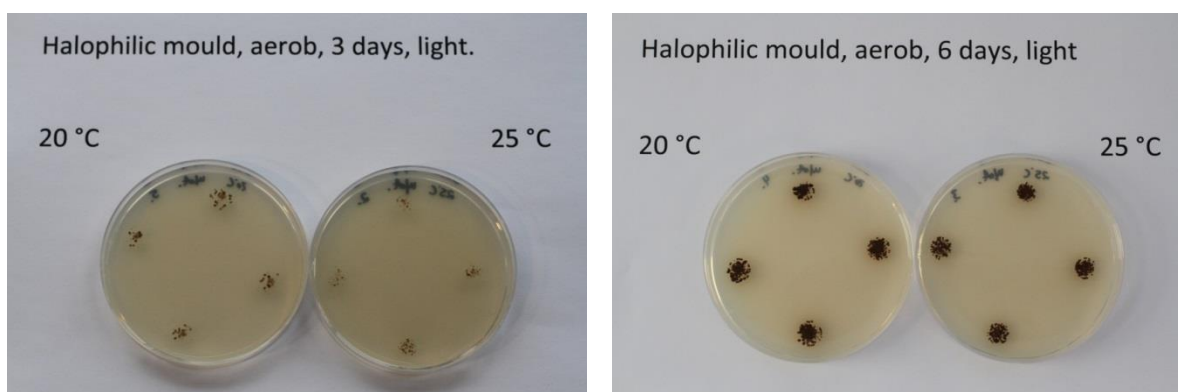
Tabell 4 Antall dager før synlig beige, lys brun og svart misfarging på agarplater med brunmiddmedium. Alle plater ble observert i 21 dager.

	Temp (°C)				
	4	20	25	30	35
Beige	1	1	1	1	1
Lys brun	2		2	3	2
Svart	4	2	2	a)	a)

a) For 30 °C og 35 °C ble det kun observert noen få små brune prikker på platene.

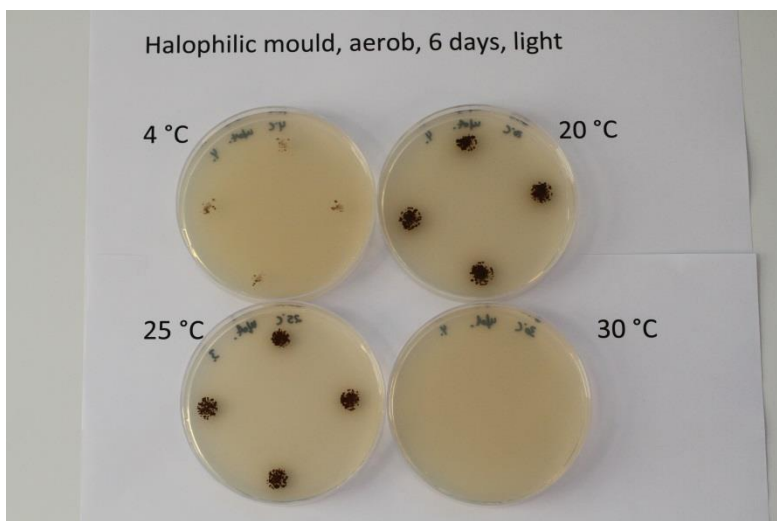
Observasjonene viste at lagring ved 20 °C ga raskest vekst for brunmidd, da det allerede etter 1 dag var mer vekst på disse platene sammenlignet med plater ved de øvrige lagringstemperaturene. Etter 2 dager var koloniene allerede svarte, sammenlignet med 25 °C platene som da fortsatt hadde mange brune kolonier i tillegg til svarte. På platene lagret ved 4 °C ble de beige koloniene mye større, men allerede etter 4 dager var det også her svarte kolonier. Platene ble i starten observert daglig, men etter hvert jevnlig frem mot 21 dagers lagring. Da var flere av platene overgrodd av vekst (primært 20 °C og 25 °C).

Det ble i tillegg tatt bilder på utvalgte dager av plater for å vise forskjeller i vekst mellom de enkelte temperaturene gjennom lagringsforløpet (Bilde 6, Bilde 7, Bilde 8).



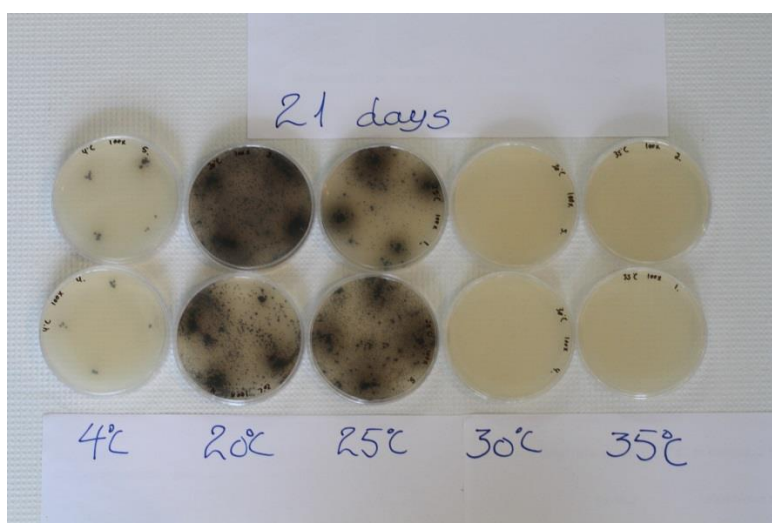
Bilde 6 Brunmidd isolert fra klippfisk overført til plater med brunmiddmedium. Platene er lagret lyst ved henholdsvis 20 og 25 °C med tilgang på luft i 3 og 6 dager.

Bilde 6 viser en forskjell mellom 20 og 25 °C etter 3 døgn lagring, der lagring ved 20 °C ga svart misfarging først. Etter ytterligere 3 dager lagring var imidlertid forskjellene mellom lagringstemperaturene utjevnet. Bilde 7 viser utvikling av brunmidd etter lagring ved 4, 20, 25 og 30 °C i 6 døgn.



Bilde 7 Vekst av brunmidd ved 4, 20, 25 og 30 °C etter 6 døgns lagring.

Bilde 7 viser utvikling av brunmidd ved 4 temperaturer; 4, 20, 25 og 30 °C. Etter 6 dagers lagring vises det synlig brunmidd på 4 °C mens brunmidden fremdeles var svakt synlig på 30 °C. Utvikling etter 21 dagers lagring vises i Bilde 8. Her er også prøver lagret ved 35 °C tatt med.



Bilde 8 Vekst av brunmidd ved 4, 20, 25, 30 og 35 °C i 21 dager.

Bilde 8 viser utvikling av brunmidd på plater som er lagret ved forskjellige temperaturer. Etter 21 dager var det tilnærmet lik vekst mellom 20 og 25 °C. På 4 °C er brunmidden godt synlig, mens på plater lagret ved 30 og 35 °C var brunmidden knapt synlig. Etter 6 dagers lagring var brunmidden svakt synlig på plater lagret ved 30 °C (Bilde 7), og selv etter ytterligere 15 dagers lagring var brunmidden svakt synlig.

Ved mikroskopering av brunmidd ble det klart at veksten består av flere stadier. Det var generelt vanskelig å se noen tydelig forskjell på ulike vekststadier i mikroskopet, og i perioden mellom beige og brun farge. Flytende kultur ble benyttet til dette studiet. Uten å konkludere nærmere kunne det se ut som om mengden hyfer økte utover i lagringen, og at fargen på brunmidden ble mørkere med økt lagringstid. Flere og flere mørke brune strukturer med hyfer ble observert utover i lagringsperioden.

Det ble i styringsgruppemøte høsten 2014 besluttet å ikke gå videre med forsøk med brunmidd på klippfisk, men heller konsentrere det videre arbeidet på rødmidd.

4.3 Holdbarhet på emballert loins av klippfisk

Holdbarhet på klippfisk er som beskrevet tidligere, den perioden produktet er fri for synlig rød eller rosa misfarging. Forsøkene med emballert loins av klippfisk tilsatt rødmidd viste at holdbarheten varierte med nivået rødmidd som ble tilsatt fisken, tørkegraden, lagringstemperaturen og fuktigheten i klimaskapet (Tabell 5). Et gjennomgående trekk var at produktene (loins, filet eller flekket klippfisk) lagret ved 60 % RH fikk en mere saltkvit overflate enn tilsvarende lagring ved 80 % RH (Bilde 9).



Bilde 9 Emballert loins lagret ved 60 % Rh (venstre), og 80 % RH (høyre)

Forskjellene har sammenheng med at det ved 60 % RH skjer en vedvarende uttørking av fisken siden likevektsfuktigheten er på 75 % (Claussen, Walde & Magnussen, 2008). Ved fuktigheter lavere enn 75 % migrerer mettet saltlake ut til overflaten og krystalliseres til salt. Det motsatte skjer ved lagring ved 80 % RH. Her tar fisken opp fuktighet fra omgivelsene noe som fører til at saltet på overflaten løses opp. Dette gir fisk lagret ved 80 % luftfuktighet et mørkere utseende enn fisk lagret ved 60 %. Disse forskjellene var tydelige ved 25, 30 og 35 °C.

Tabell 5 Minimum holdbarhet i dager for emballert loins av klippfisk med en startnivå rødmidd på 1000 CFU/g produkt. Holdbarhetene er oppgitt i medianverdier, det vil si antall dager det tar før 50 % av prøvene har fått en synlig rød eller rosa misfarge. Loinsene ble tørket til et vanninnhold fra 44 til 54 %, lagret i 2 døgn ved 4 °C og deretter lagret ved 25, 30 og 35 °C ved henholdsvis 60 og 80 % relativ fuktighet (RH).

Lagrings Temperatur (°C)	RH (%)	Vanninnhold (%)					
		44	46	48	50	52	54
25	60	>39	39	38	29	24	20
	80	21	22	20	21	20	18
30	60	26	25	24	21	19	16
	80	17	18	17	17	15	13
35	60	18	17	16	14	12	10
	80	10	11	11	10	9	8

Tabell 5 viser at holdbarheten er lengst for loins med laveste vanninnhold, 25 °C og 60 % luftfuktighet. Holdbarhetene som er oppgitt forutsetter imidlertid at klippfisken ikke har vært oppbevart ved forhøyede temperaturer tidligere siden dette vil gi en kortere holdbarhet enn det som er vist i Tabell 5.

Verdier for holdbarhet i Tabell 5 viser *minimum* antall dagers holdbarhet. Dette har sammenheng med at holdbarhetene er knyttet opp mot en startnivå på 1000 rødmidd per g produkt. I tidligere forsøk har vi avdekket at de fleste kommersielle klippfiskprøver har 1–10 rødmidd per g produkt (Lorentzen *et al.*, 2015), med unntak av noen få tilfeller der vi påviste et nivå på 1000 rødmidd per g produkt. Dersom klippfisken ikke utsettes for høyere temperaturer før lagring ved forhøyet temperatur, vil det naturlige nivået rødmidd være lavt, mest sannsynlig på 1–10 rødmidd per g produkt. Dette innebærer derfor at holdbarheten mest sannsynlig er lengre enn det som er oppgitt i Tabell 5.

Ved alle lagringstemperaturene er effekten av vanninnholdet (tørkegraden) størst ved 60 % sammenlignet med 80 % luftfuktighet. Dette kan ha sammenheng med at saltet på overflaten på fisk lagret ved 80 % RH løses opp, og rødmidd blir lettere synlig. Fisk lagret ved 60 % RH får etterhvert en kvit salthinne. Salthinnen medfører at rødmidd blir mindre synlig, og det derfor kan ta lengre tid før misfarging blir synlig.

Dette har mest sannsynlig sammenheng med at forskjellene i vanninnhold (tørkegrad) lettere opprettholdes ved 60 % RH gjennom lagringsperioden siden prøvene da tørkes videre. Ved lagring på 80 % RH tar klippfisken opp fuktighet fra omgivelsene, det vil si spennvidden i vanninnhold snevres inn utover lagringsperioden, og rødmidd får dermed likere betingelser for vekst.

Resultatene i Tabell 5 viser kun holdbarhet der startnivå var på Log 3 CFU/g (1000 rødmidd per g produkt). Det ble i tillegg utført holdbarhetsforsøk med startnivåer fra Log 1.6 til Log 6.1 rødmidd per g klippfisk. Disse prøvene ble også lagret ved 60 og 80 % RH og ved 25, 30 og 35 °C (Tabell 6). Tabellen viser de ulike variabelenes betydning for holdbarhet uttrykt som relativ risiko.

Tabell 6 Oversikt over hvordan temperatur, relativ fuktighet (RH), vanninnhold og nivå rødmidd påvirker holdbarhet for emballert loins av klippfisk. Holdbarhet er uttrykt som «relativ risiko», det vil si sannsynligheten for utvikle rød eller rosa misfarging. Relativ risiko = 1 betyr at det ikke er noen forskjell, mens relativ risiko = 1.2 betyr at det er 20 % større risiko for å utvikle misfarging.

Temperatur (°C)	RH (%)	Vanninnhold (%)	Variabel	Relativ risiko
25	60 og 80	44–55	Øke med 1 log enhet rødmidd	1.00
30	60 og 80	44–55	Øke med 1 log enhet rødmidd	1.00
35	60 og 80	44–55	Øke med 1 log enhet rødmidd	2.98*
25–35	60	46	47 % vann sammenlignet med 46 %	1.16*
		48	49 % vann sammenlignet med 48 %	1.27*
		50	51 % vann sammenlignet med 50 %	1.40*
		52	53 % vann sammenlignet med 52 %	1.53*
25–35	80	46	47 % vann sammenlignet med 46 %	1.01
		48	49 % vann sammenlignet med 48 %	1.10*
		50	51 % vann sammenlignet med 50 %	1.21*
		52	53 % vann sammenlignet med 52 %	1.33*

*) Signifikant effekt på holdbarhet

Tabell 6 viser at det er kun ved 35 °C lagring at **startnivå rødmidd** har signifikant betydning for holdbarheten på klippfisk, uavhengig av RH og tørkegrad. En verdi for relativ risiko på 2.98 for klippfisk lagret ved 35 °C betyr at dersom **startnivå rødmidd** økes med en log enhet, er det cirka 3 ganger større sjanse (risiko) for at denne klippfisken blir rød innen det neste døgnet sammenlignet med en tilsvarende fisk lagret ved 25 og 30 °C. En mulig forklaring på dette kan være at 35 °C er nærmere optimumstemperaturen for vekst sammenlignet med de øvrige lagringstemperaturene. Ved 25 og 30 °C er relativ risiko på 1.00, dette betyr at en økning i rødmiddkonsentrasjon med 1 log enhet ikke har signifikant betydning for holdbarheten, uavhengig av RH og vanninnhold.

For emballert klippfiskloins lagret ved 60 % RH, uansett temperaturer og startnivå rødmidd, vil en reduksjon i vanninnholdet fra 47 til 46 % medføre 16 % økt sjanse for at fisken blir rød innen det neste døgnet (Relativ risiko=1.16). Dette gjelder for hele lagringsperioden. Videre har loins som inneholder 49 % vann 27 % høyere sjanse for å bli rød innen det neste døgnet sammenlignet med loins som inneholder 48 % vann (Relativ risiko=1.27). I tilsvarende forsøk med loins lagret ved 80 % RH, ved alle temperaturer og alle startnivå rødmidd, vil ikke en økning i vanninnhold fra 46 til 47 % ha noen signifikant betydning for holdbarheten (Relativ risiko=1.01), mens å øke fra 48 til 49 % vann vil medføre 10 % høyere sjanse for at prøven med 49 % vann har blitt rød i løpet av det neste døgnet (Relativ risiko=1.10).

Samlet sett har prøvens vanninnhold størst effekt for holdbarheten ved lagring på 60 % RH sammenlignet med 80 %. Forklaringen på dette kan være at variasjonsbredden i vanninnhold (tørkegrader) beholdes eller forsterkes ytterligere ved lagring på 60 % RH. Dette skyldes at 60 % RH er lavere sammenlignet med likevektsfuktigheten på 75 % for klippfisk. Veieprøver viste at disse prøvene ble lettere gjennom lagringsperioden, og vekttapet var tilnærmet likt for prøver med høyest og lavest vanninnhold. Ut i fra dette ser det ut til at variasjonsbredden i vanninnhold ble beholdt til tross for vekttapet. For prøver lagret ved 80 % RH derimot skjer det en utjevning av forskjellene i vanninnhold siden klippfisken tar opp fuktighet fra omgivelsene. Vektutjevningen skjedde gjennom hele

lagringsperioden. I det øyeblikket klippfisken ble rødt hadde prøvene derfor en mindre spennvidde i vanninnhold sammenlignet med utgangspunktet (data ikke vist). Til tross for at prøvene var emballert skjedde det en transport av fuktighet gjennom emballasjen. Transport av fuktighet er et uttrykk for emballasjens barriereegenskaper. Det er derfor mulig at en annen type emballasje ville gitt andre resultater for holdbarhet. Det er derfor viktig å bruke resultatene for holdbarheter i Tabell 5 på produkter som har en tilsvarende emballering.

I et oppfølgingsforsøk ble det undersøkt om varierende lagringstid ved 4 °C før lagring ved forhøyet temperatur ville påvirke holdbarheten på klippfisken. Dette ble undersøkt ved å overføre rødmidd til loins av saltfisk tilsvarende startnivå fra log 1.6 til 4.6 rødmidd/g produkt. Alle loinsene ble tørket til et vanninnhold på cirka 49 % vann (tilsvarende tørkegraden «7/8»). Det ene settet med loins ble lagret i to dager ved 4 °C, og deretter plassert på 35 °C ved 60 og 80 % RH. Det andre settet med prøver ble lagret i 4 måneder på 4 °C, deretter lagret ved 35 °C ved 60 og 80 % RH. Holdbarheter for disse prøvene er vist i Tabell 7.

Tabell 7 Holdbarhet oppgitt i døgn/dager for emballert loins av klippfisk tilsatt rødmidd. Fisken er lagret i henholdsvis 2 dager og 4 måneder ved 4 °C før lagring ved 35 °C, 60 og 80 % relativ fuktighet (RH).

Startnivå rødmidd (Log CFU/g)	Lagring i 2 døgn ved 4 °C		Lagring i 4 mnd. ved 4 °C*	
	35 °C, 60 % RH	35 °C, 80 % RH	35 °C, 60 % RH	35 °C, 80 % RH
4.6	7	8	14	10
3.5	13	10	16	12
2.5	20	14	16	12
1.6	16	13	21	IA

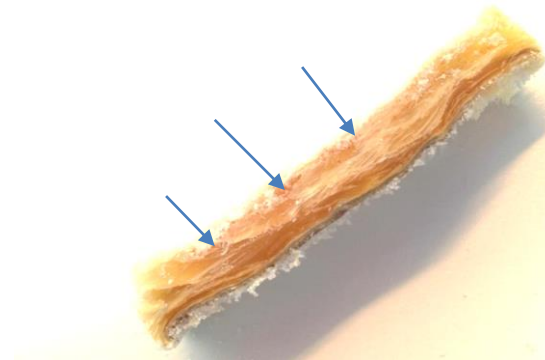
*Vekten på prøvene var uendret etter 4 måneder lagring

IA= Ikke analysert

Tabell 7 viser ikke noen entydige holdbarhetseffekter på kort- og langtidslagring ved 4 °C. For prøver med en høy startnivå av rødmidd viser resultatene at 4 måneder lagring forlenger holdbarheten med noen dager sammenlignet med 2 døgn lagring. Dette gjelder imidlertid kun for prøver lagret ved 60 % RH. Med en startnivå på log 2.5 er imidlertid holdbarheten kortere etter lagring i 4 måneder, mens prøver med den laveste startnivå rødmidd (Log 1.6 CFU/g) oppnådde noen dagers lengre holdbarhet.

I dette forsøket er det kun en klippfiskprøve per variabel, det vil si at det er ingen parallelle prøver å beregne en gjennomsnittlig holdbarhet av. For å kunne konkludere om eventuelle effekter av langtidslagring er det derfor nødvendig å gjøre en repetisjon av forsøket med flere paralleller.

Generelt vil faktorer som ujevnheter i overflaten av fisken og fordeling av saltet påvirke når rødmidden blir synlig. Vekst av rødmidd under hinnen med krystallisert salt ble tydelig ved å studere snittflaten (Bilde 10). Denne prøven hadde ingen synlig rød misfarging på overflaten.



Bilde 10 Tverrsnitt av spordstykke av klippfisk. Fisken er tilført 1000 rødmidd/g, lagret i 45 dager ved 25 °C, 60 % RH. Kolonier av rødmidd (piler).

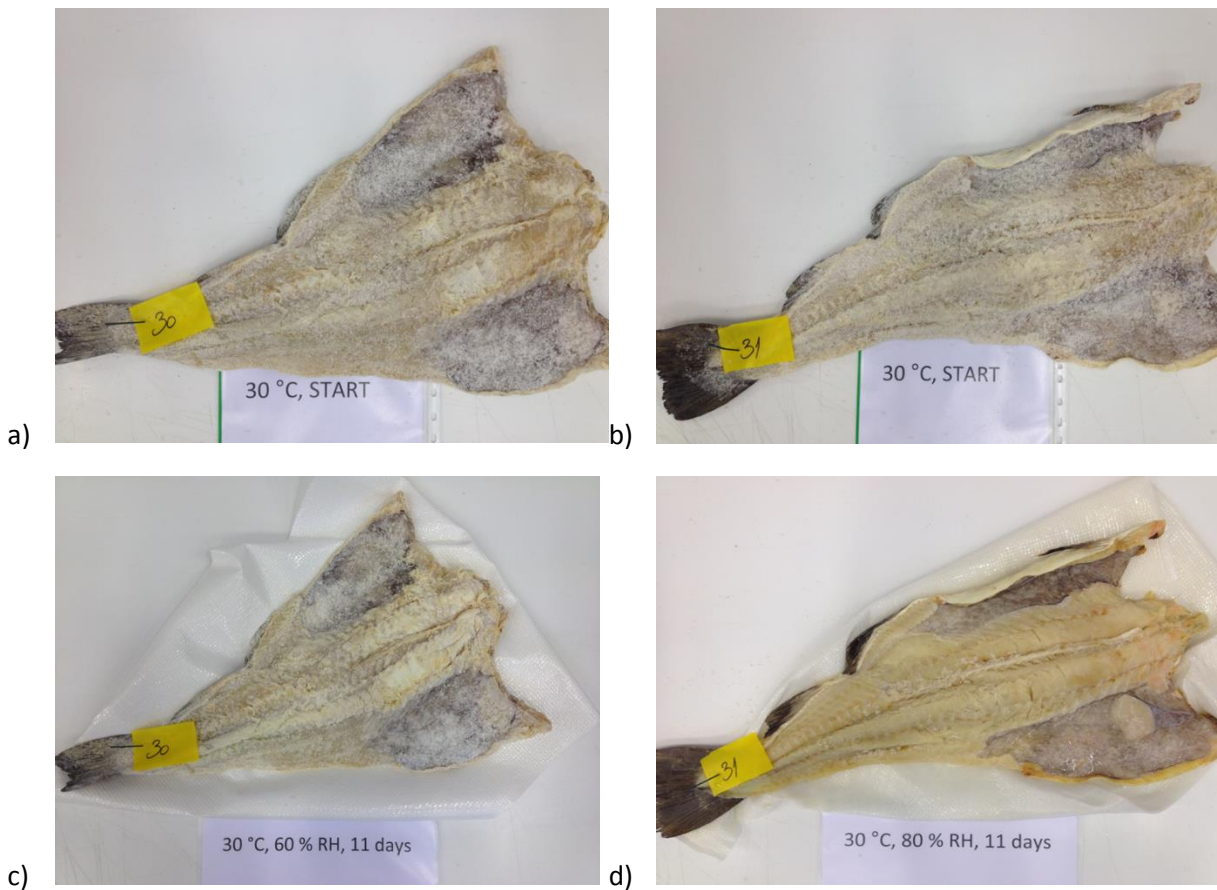
Bilde 10 viser at ujevnheter i overflaten som kan føre til at kolonier av rødmidd enten forsvinner i «lommer» i fiskekjøttet eller forblir usynlige på grunn av at de er lokalisert under den kvite salthinnen. Dette viser noe av utfordringen med å fastsette holdbarhet på bakgrunn i visuelle observasjoner.

4.4 Holdbarhet flekket fisk

Holdbarhetsforsøket for flekket fisk ble gjennomført i tidsrommet januar til juni 2015. Fisken ble lagret ved de samme betingelsene som for loinsene. Den flekkede fisken ble imidlertid ikke lagret i emballasje, den ble kun lagt oppå en rist med et tørkepapir under. Til forskjell fra lagringsforsøk med emballerte prøver observerte vi raskere vektendringer som en følge av et raskere tap eller opptak av fuktighet. Dette indikerer hvilken betydning emballasje har for holdbarheten på klippfisk.

For å ha sammenlignbare resultater med holdbarheten på emballert loins (Tabell 5) ble det i styringsgruppen besluttet å lagre klippfisken ved 25, 30 og 35 °C ved henholdsvis 60 og 80 % RH. Salfisken ble tilsatt rødmidd tilsvarende en konsentrasjon på 1000 rødmidd/g fisk og deretter tørket til et vanninnhold på cirka 46 og 50 %. I tillegg ble salfisk med cirka 54 % tatt med i forsøket. Etter tørking ble den flekkede fisken pakket inn i plast og deretter plassert på 4 °C i 2 døgn før lagring ved forhøyet temperatur.

Vi observerte at fisk lagret ved 80 % RH økte raskt i vekt som en følge av vannopptak. Dette medførte at fisken ble mørkere/gulere, bløt, løs i kjøttet og etter hvert udelikat. Vannopptaket skyldes i hovedsak at 80 % RH er høyere enn likevekts-fuktigheten for klippfisk. Denne er på 75 %. For klippfisk lagret ved 60 % observerte vi et vekttap på grunn av uttørking. Denne fisken var fast, fikk en hvit overflate av krystallisert salt og var utseendemessig mere attraktiv sammenlignet med fisken som var lagret på 80 % RH (Bilde 11).



Bilde 11 Klippfisk før lagring ved 30 °C (a,b) og etter 11 dagers lagring ved henholdsvis 60 % (c) og 80 % (d) relativ fuktighet. Startkonsentrasjon rødmidd var på 10.000/g produkt.

Tabellene 8, 9 og 10 viser resultatene for holdbarhet for flekket fisk lagret ved henholdsvis 25, 30 og 35 °C ved hhv 60 og 80 % RH.

Tabell 8 Holdbarhet i dager for flekket fisk lagret ved 25 °C ved henholdsvis 80 og 60 % relativ fuktighet (RH).

RH (%)	Vanninnhold (%)	Startnivå rødmidd (Log CFU/g)		
		1.9	2.9	4.2
80	55.5	22	18	13
	50.0	20	18	18
	46.0	23	15	11
60	55.5	43	23	20
	50.0	47	29	24
	46.0	>90	>90	>90

Tabell 9 Holdbarhet i dager for flekket fisk lagret ved 30 °C ved henholdsvis 80 og 60 % relativ fuktighet (RH).

RH (%)	Vanninnhold (%)	Startnivå rødmidd (Log CFU/g)		
		1.0	3.0	3.9
80	55.5	14	10	10
	50.0	15	10	10
	46.0	15	10	10
60	55.5	>47	11	11
	50.0	>47	21	17
	46.0	>47	21	21

Tabell 10 Holdbarhet (dager) for flekket fisk lagret ved 35 °C ved 80 og 60 % relativ fuktighet (RH).

RH (%)	Vanninnhold (%)	Startnivå rødmidd (Log CFU/g)		
		1.48	3.48	4.60
80	55.5	12	9	8
	50.0	12	8	8
	46.0	12	9	8
60	55.5	16	15	13
	50.0	24	13	12
	46.0	>37	>37	24

Resultatene i tabellene 8–10 viser at holdbarheten for flekket fisk varierer med hensyn på vanninnhold, nivå rødmidd, lagringstemperatur og RH, tilsvarende det vi observerte for emballert loins. For de fleste fiskene kom den første antydningen til synlig misfarging ved ørebeinet eller langs ryggbeinet. Siden konsentrasjonen med rødmidd var lik over hele overflaten må denne forskjellen tilskrives egenskaper

ved fisken. Dette kan muligens ha sammenheng med at det er et høyere vanninnhold i muskelen inne ved beinet sammenlignet med øvrige deler av fisken.

Overflaten på fisk som hadde vært lagret ved 80 % RH ble mørkere sammenlignet med fisk som var lagret ved 60 % RH. Vi antar at en mørkere overflate er et resultat av vannopptak, og at saltet på fiskens overflate løste seg opp slik at fiskens muskelfarge kom til syne. Flekket fisk lagret ved 60 % RH fikk en lys og salthvit overflate, noe som har sammenheng med at fisken tørket gjennom hele lagringsforløpet og at det ble dannet en membran av salt på fiskens overflate. I noen tilfeller oppdaget vi at membranen med salt etterhvert dekket over den røde misfargingen, det vil si i en periode av lagringsforløpet hadde noen fisk noen røde flekker, og etter en ytterligere lagringsperiode var flekkene dekket over av salt.

Resultatene i tabellene 8, 9 og 10 viser at vanninnhold (tørkegrad) har mindre betydning for holdbarhet for flekket fisk som er lagret ved 80 % RH sammenlignet med fisk som var lagret ved 60 % RH. Dette skyldes mest sannsynlig en utjevning av vanninnholdet for fiskene som var lagret ved 80 % RH, og at veksthastigheten for rødmidd, og dermed holdbarheten, ble tilnærmet lik. Siden fisken ikke var emballert, antar vi at utjevningen har skjedd raskt etter oppstart av lagringsforsøket. Siden fisken som ble lagret ved 60 % RH tørket gjennom hele lagringsperioden, er det grunn til å anta at spennvidden i vanninnholdet vedvarte. Dette er den mest sannsynlige forklaringen på at det er forskjeller i holdbarhet mellom fisk med ulikt vanninnhold.

I Tabell 11, er resultater for holdbarhet for emballert loins og flekket fisk med et startnivå rødmidd på Log 3 vist.

Tabell 11 Sammenstilling av resultater for holdbarhet (dager) for emballert loins/flekket fisk med et startnivå rødmidd på cirka Log 3/g fisk.

Temperatur (°C)	RH (%)	Vanninnhold (%)		
		46.0	50.0	55.5
25	60	>39/>65	29/>65	20/23
	80	22/15	21/18	18/18
30	60	25/21	21/21	16/11
	80	18/10	17/10	13/10
35	60	17/15	14/13	10/15
	80	11/9	10/8	7/9

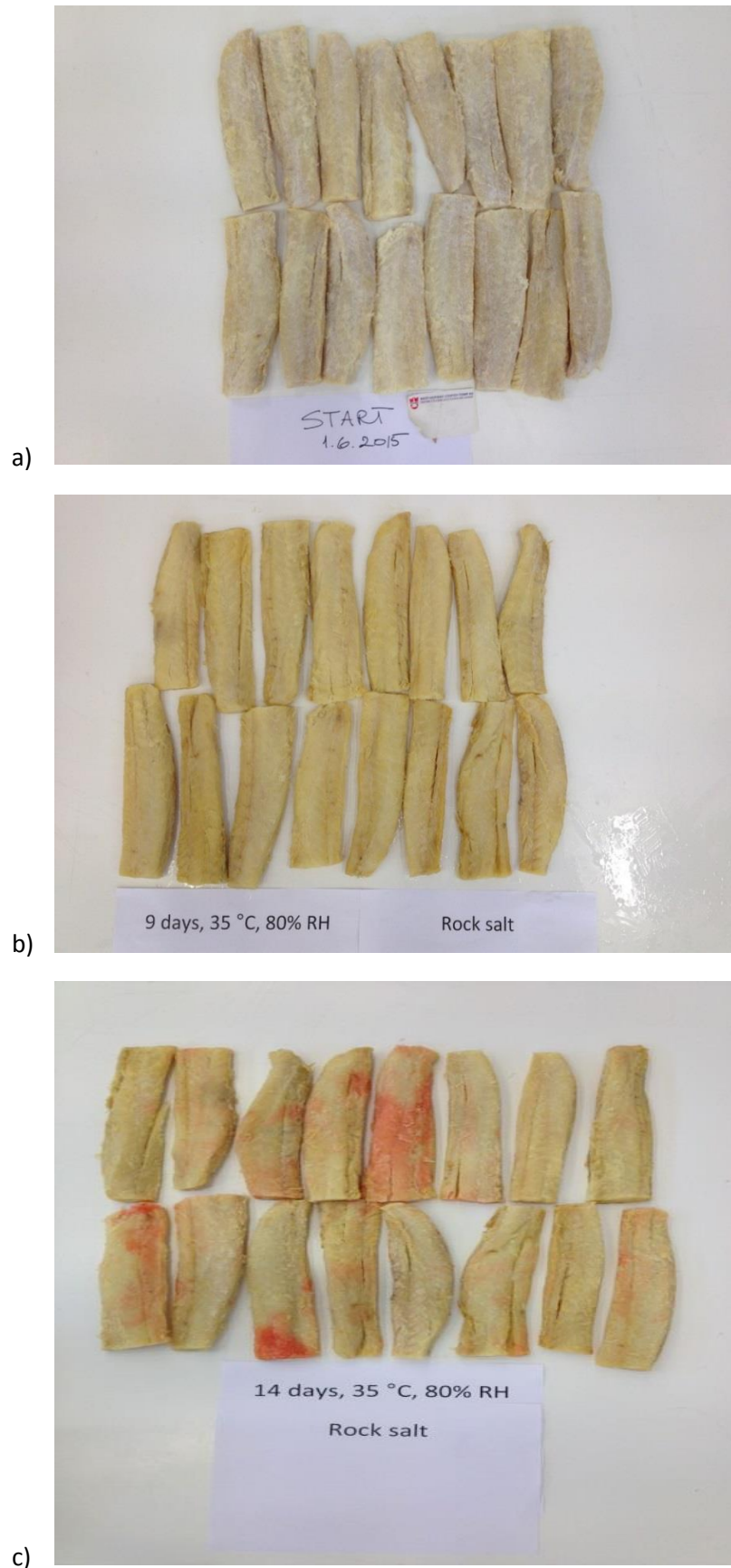
Tabell 11 viser at resultatene for holdbarhet varierer mellom emballert loins og flekket fisk. Dette viser at selv med like betingelser som temperatur, relativ fuktighet, vanninnhold og startnivå rødmidd er det andre betingelser som avgjør holdbarheten. Dette kan være at emballasjen påvirker transporthastigheten av fuktighet til og fra fisken, og det kan være at det er forskjellige produkter av klippfisk som er testet ut; loins av filet og flekket fisk.

Resultatene for holdbarhet for flekket fisk (Tabellene 8–11) baseres kun på en fisk per variabel (det vil si temperatur, RH, vanninnhold og startnivå rødmidd). Derfor er dette resultater som kun gir en indikasjon på holdbarheten. Holdbarheter for emballert loins derimot, baseres på flere parallelle prøver per variabel, og dette er derfor data som vil kunne anvendes direkte ved holdbarhetsmerking på slike produkter. Dette arbeidet er publisert vitenskapelig (Lorentzen *et al.*, 2016).

4.5 Klippfisk produsert av bergsalt

Klippfisken som inngikk i dette forsøket var produsert av bergsalt. Gjennom lagringsperioden på 35 °C og 80 % RH ble klippfiskprøvene vurdert jevnlig med hensyn på rosa eller rød misfarging. I bildeseriene 12–14 vises en utvikling av rødmidd for alle produktkategoriene som inngikk i lagringsforsøket. Forsøket viser at rødmidd finnes i bergsalt, og at bruk av dette saltet således ikke er en garanti for å unngå rød misfarging på produktene dersom de lagres ved en forhøyet temperatur.

Funn av rødmidd i produkter produsert av bergsalt er helt i tråd med litteraturen. Det er blant annet beskrevet at rødmidd er påvist i bergsalt utvunnet i Europa (Fendriham *et al.*, 2006; Norton, McGenity & Grant, 1993). Dette til tross for at bergsalt kan være opptil 195–250 millioner år (Fendriham *et al.*, 2006).



Bilde 12 Loins av klippfisk produsert av bergsalt (a). Utvikling av rød misfarging etter 9 (b) og 14 (c) dager ved lagring uten emballasje i 35 °C ved 80 % relativ fuktighet (RH).



a)



b)



c)

Bilde 13 Klippfisk av sei produsert av bergsalt (a). Utvikling av rød misfarging ved lagring i 35 °C ved 80% relativ fuktighet (RH) uten emballasje i opptil 9 dager i kartong (b) og uten kartong (c).



a)



b)



c)

Bilde 14 Forbrukerforpakninger av klippfisk produsert av bergsalt. Pakningene er lagret emballert ved 35 °C ved 80 % relativ fuktighet (RH) i opptil 16 dager. Etter 18 dagers lagring var alle klippfiskprøvene blitt røde.

5 Konklusjon

Gjennom prosjektet «Holdbarhet på klippfisk» er det vist at lagring ved forhøyede temperaturer fremmer vekst av rødmidd og at holdbarheten dermed forkortes på grunn av rød eller rosa misfarging. Dette gjelder både for emballert loins av klippfisk og for flekket salt- og klippfisk. Faktorer som har betydning for holdbarheten er lagringstemperatur, luftfuktighet i tillegg til fiskeprøvens vanninnhold (tørkegrad) og startnivå rødmidd. Alt avhengig av kombinasjonene mellom temperatur, luftfuktighet, vanninnhold og startnivå rødmidd blir holdbarheten på produktet forskjellig.

Generelt har emballert loins lagret ved 60 % relativ fuktighet (RH) en lengre holdbarhet sammenlignet med loins lagret ved 80 % RH. I tillegg har loins lagret ved 25 °C en lengre holdbarhet sammenlignet med både 30 og 35 °C. Holdbarhetseffekten synes å være begrenset dersom fisken tørkes til et lavere vanninnhold enn 48 %.

Verdiene for holdbarhet er minimumsverdier siden det er tatt utgangspunkt i et startnivå rødmidd på 1000/g klippfisk som er det høyeste nivå naturlig forekommende rødmidd i kommersiell klippfisk. Et lavere startnivå rødmidd vil gi en lengre holdbarhet. Et tilleggsmoment er at holdbarhetene som er avdekket gjelder for loins fordi denne delen på fileten viste seg å gi rød misfarging først. I sum innebærer dette at buk- og halestykker av klippfisk med et lavere startnivå rødmidd har en lengre holdbarhet enn det som er oppgitt i denne studien.

Det er indikasjoner på at holdbarheten for flekket salt- og klippfisk er forskjellig fra det som er funnet for emballert loins. Resultatene for flekket fisk baseres på et avgrenset forsøksmateriale, og det er derfor ikke å anbefale at resultatene tas i bruk før det er bekreftet i mer omfattende forsøk.

Klippfisk produsert av bergsalt får en rød misfarging ved lagring ved forhøyet temperatur. Dette betyr at bergsalt inneholder rødmidd.

6 Litteratur

- Aas, G.H., O.T. Skjerdal, I. Stoknes & I. Bjørkevoll (2010). Effects of Packaging Method on Salt-Cured Cod Yield and Quality During Storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **19**, pp. 149–161.
- AOAC, (1995). *Rapid microwave drying method. Official methods for analysis*. Gaithersburg, MD, USA: Association of Official Analytical Chemists (985.14.).
- Claussen, I.C., P.M. Walde & O.M. Magnussen (2008). Optimal lagring av klippfisk. Rapport no TR A6764, SINTEF Energiforskning AS.
- Codex Alimentarius (2005). Codex standard for salted fish and dried salted fish of the gadidae family of fishes. Codex Stan 167–1989.
- Cox, D.R. (1972). Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, **34**:2, 187–220.
- Huss, H.H. & G. Valdimarsson (1990). Microbiology of Salted Fish. *Fish Tech News, FAO/DANIDA training project on fish technology and quality control*, **10**:1, pp. 3–5.
- Lamprecht, E. & F.R. Riley (1990). Sterilisation of marine salt infected with red halophilic bacteria. *S. Afr. J. Food Sci. & Nutrit.*, **3**, pp. 29–33.
- Lorentzen, G., M.S.W Breiland, J. Østli, J. Wang-Andersen & R.L. Olsen (2015). Growth of red halophilic microorganisms and histamine content in dried salt-cured cod (*Gadus morhua* L.) stored at elevated temperature. *LWT – Food Science and Technology*, **60**:1, pp. 598–602.
- Lorentzen, G., F.-A. Egeness, I.E. Pleym & E. Ytterstad (2016). Shelf life of packaged loins of dried salt-cured cod (*Gadus morhua* L.) stored at elevated temperatures. *Food Control*, **64**, pp. 65–69.
- Lorentzen, G. (2014). Shelf life of salt-cured fillets of cod stored at 30 °C. Confidential report, Nofima.

VEDLEGG

Vedlegg 1: NMKL metode no 171

Vedlegg 2: Vekstkurver rødmidd

Vedlegg 3: Datablad salt

Vedlegg 4: Datablad polystyren beger

Vedlegg 5: Datablad PVC plast

Nr. 171 3. utg. 2015	NORDISK METODIKKOMITÉ FOR NÆRINGSMIDLER NORDIC COMMITTEE ON FOOD ANALYSIS	No. 171 3rd. Ed. 2015
---	--	---

Halofile og osmofile mikrober (rødmidd og brunmidd). Bestemmelse i fullsaltede fiskeprodukter.

Halophilic and osmophilic microbes ('Pink' and 'Dun'). Determination in salt-cured fish products.

1. FORMÅL OG ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden kan anvendes for å påvise rødmidd og brunmidd i fullsaltede fiskeprodukter.

Nedre grense for deteksjon er 100 kim av aktuell mikrobe per gram prøve. Bemerk at det kan være store variasjoner i mikrobeinnhold på ulike deler av fisken.

2. ENDRINGER

I denne utgaven av NMKL 171 er det gjort endringer i den delen av metoden som omhandler brunmidd. Endringene er:

- Justering i beskrivelsen (3.2)
- Modifisert Vaisey medium er tatt ut (6.4)
- En fremgangsmåte for å fange opp vekst av andre brunpigmenterte mikroorganismer enn *Wallemia sebi* er inkludert (9.2.2)
- Mikroskopi for konfirmasjon er inkludert (10.2)

3. DEFINISJONER OG EPIDEMIOLOGISKE ASPEKTER

3.1 Rødmidd

Rødmidd er en tradisjonell bransjebetegnelse på synlig vekst av ekstremt halofile bakterier i fullsaltede fiskeprodukter. Bakteriene tilhører familien *Halobacteriaceae* som omfatter kokker (*Halococcus*) og staver eller skiveformede (engelsk: disc-shaped) bakterier (*Halobacterium*). *Halobacteriaceae* tilhører klassen *Archaeobacteria*, og er strikt halofile. De har en annen oppbygging av celleveggen enn de fleste andre bakterier, men gir Gram-negativ reaksjon ved

1. SCOPE AND FIELD OF APPLICATION

The method can be applied to demonstrate the presence of Pink and Dun in salt-cured fish.

The lower limit of detection is 100 colony-forming units of the microbe in question per gram of fish. Note that the microbe content may vary greatly on different parts of the fish.

2. ADDITIONS

To this edition of NMKL 171 the following changes, in the dun part of the method, have been introduced:

- Some adjustments in the description (3.2)
- Modified Vaisey medium has been omitted (6.4)
- A procedure to cover other pigmented microbes than *Wallemia sebi* is introduced (9.2.2)
- Microcopy for confirmation is introduced (10.2)

3. DEFINITIONS AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS

3.1 Pink

Pink is a traditional term used in the fishing industry for visible growth of extremely halophilic bacteria in salt-cured fish products. The bacteria belong to the family *Halobacteriaceae*, which includes the cocci (*Halococcus*) and rods or disc-shaped bacteria (*Halobacterium*). *Halobacteriaceae* belong to the class *Archaeobacteria*, and are true halophiles. Their cell wall structure differs from that of most other bacteria, but they give a Gram-negative reaction with the Gram-test

modifisert Gram-test med KOH. De fleste arter av rodmidd er ubevegelige og strikt aerobe. Noen krever bare 8% NaCl for å vokse, men i de fleste tilfellene behøves 17 - 23% NaCl for god vekst. Koloniene har ulike fargenyanser av rødt, rosa, oransje/rød, skarlagensrød eller rød fiolett mens andre kan være fargeløse. *Halococcus* og *Halobacterium* påvises ofte i samme materiale.

3.1.1 *Halobacterium*

Halobacterium er stav- eller skiveformede bakterier. De fleste isolerte stammene behøver minst 15% NaCl for å vokse, og de vokser best ved 20 - 26% NaCl. De kan også vokse i mettede saltløsninger (29% NaCl). Optimumstemperaturen for vekst er 40 - 50 °C. Disse organismene forårsaker blant annet rød misfarging på saltfisk.

Organismene har et komplekst næringskrav; de trenger flere aminosyrer for å vokse. De kan også utnytte aminosyrer som energikilde. *Halobacterium* vokser relativt sakte; en generasjonstid på 3 - 6 timer er det raskeste som er oppnådd i laboratorieforsøk.

Slekten *Halobacterium* omfatter 16 ulike arter.

3.1.2 *Halococcus* er kokker som opptrer enten parvis, i tetraeder, sarcinapakker eller i irregulære klaser. *Halococcus* krever minst 15% NaCl for å vokse, og den vokser optimalt ved 20 - 26% NaCl. Den kan vokse fra 8 til 55 °C, temperaturoptimum er 30 - 37 °C. Bakterien vokser sakte (generasjonstid på 14 timer), selv under optimale vekstvilkår. Vekst av *Halococcus* indikeres ved synlige røde kolonier.

Slekten *Halococcus* omfatter 9 ulike arter.

3.2 Brunmidd

Brunmidd (engelsk "Dun") er en tradisjonell betegnelse på forekomst av brune kolonier (1 - 2 mm i diameter) på saltfisk. Brunmidd er en sopp (*Wallemia sebi*, tidligere *Sporendonema epizoum*). Brunmiddden er strikt aerob. Den er osmofil/xerofil, og kan vokse på substrat som inneholder 5 - 26% NaCl eller på substrat med 20% sukrose eller 20% glyserol. Den vokser ved 5 - 37 °C, og ved pH 4 - 8. De optimale vekstvilkår er ved vannaktivitet tilsvarende 10 - 15% NaCl, 75% relativ fuktighet og 25 °C. Veksten stimuleres av lys. Soppcellene er kubiske til sylindrerformede. Fargen på pigmentet endres med saltinnholdet; lavt saltinnhold gir sjokoladebrune kolonier, medium saltinnhold gir lysebrune kolonier og et høyt saltinnhold gir grønnbrune kolonier.

modified with KOH. Most species causing Pink are non-motile and obligate aerobes. Some require only 8% NaCl for growth, but in most cases 17 - 23% NaCl is required for good growth. Colonies can show different shades of red, pink, orange-red, scarlet or red-violet, while others may be colourless. *Halococcus* and *Halobacterium* are often detected in the same material.

3.1.1 *Halobacterium*

Halobacterium are rod- or disc-shaped bacteria. Most isolated strains require at least 15% NaCl for growth, and grow best at 20 - 26% NaCl. They can also grow in saturated salt solutions (29% NaCl). The optimal temperature for growth is 40 - 50 °C. These organisms cause amongst other a red discoloration in salted fish.

The organisms have complex nutritional requirements; they need several amino acids for growth. They can also exploit amino acids as an energy source. *Halobacterium* grows relatively slowly; a generation time of 3-6 hours is the highest achieved in the laboratory.

The genus *Halobacterium* includes 16 different species.

3.1.2 *Halococcus* are cocci, which occur in pairs, tetrads, sarcina-packets or in irregular clusters. *Halococcus* requires at least 15% NaCl for growth, and grows optimally at 20 - 26% NaCl. While it can grow from 8 to 55 °C, the optimum temperature is 30 - 37 °C. The bacterium grows slowly (generation time 14 hours), even under optimal conditions for growth. The growth of *Halococcus* is indicated by visible red colonies.

The genus *Halococcus* comprises 9 different species.

3.2 Dun

Dun is the traditional term for the occurrence of brown colonies (1 - 2 mm in diameter) in salted fish. Dun is a fungus (*Wallemia sebi*, previously *Sporendonema epizoum*). Dun is an obligate aerobe. It is osmophile/xerophile, and is able to grow on a substrate containing 5 - 26% NaCl or on a substrate containing 20% sucrose or 20% glycerol. It grows at 5 - 37 °C, and at pH 4 - 8. Optimal conditions are water activity equivalent to 10 - 15% NaCl, 75% relative humidity and temperature 25 °C. Growth is stimulated by light. The fungal cells are cubic or cylindrical-shaped. Their pigment colour changes with salt content, a low salt content giving chocolate brown colonies, medium salt content giving light brown colonies and high salt content giving green-brown colonies.

4. REFERANSER

4.1 NMKL-prosedyre nr. 23, 2008: Handledning i kvalitetssikring for mikrobiologiske laboratorier.

4.2 NMKL-metode nr. 91, 6. udg., 2010: Proveudtagning og forbehandling av levnedsmidler og foderstoffer til kvantitativ mikrobiologisk undersøgelse.

4.3 Larsen H and Grant, W. D. (2001). Genus I. *Halobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed., Vol. 1, pp. 301–305.

4.4 Grant, W. D. (2001). Genus IV. *Halococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed., Vol. 1, pp. 311–314.

4.5 NMKL-protokoll nr. 2, 2006: Harmonisering af mikrobiologiske metoder.

5. PRINSIPP

Rød- og brunmidd kan påvises ved utsæd på egnede agarmedier. Prøver for rødmidd inkuberes ved 37 °C i 2 - 3 uker, mens prøver for brunmidd inkuberes ved 20 °C (romtemperatur 18 – 24 °C) i inntil 2 uker. De fleste arter danner synlige kolonier innen 4 dager. Både rød- og brunmidd kjennetegnes ved at de gir pigmenterte kolonier.

6. FORTYNNINGSVÆSKE, SUBSTRATER

6.1 Fortynningsmedium for rødmidd

Natriumklorid (NaCl)	250 g
Pepton	1,0 g
Destillert vann	til 1000 ml

Fortynningsmediet autoklaveres ved 121 ± 2 °C i 20 minutter. Etter sterilisering skal pH i bruksferdig løsning være $7,4 \pm 0,2$ målt ved 20 – 25 °C.

6.2 Fortynningsmedium for brunmidd

Natriumklorid (NaCl)	75 g
Pepton	1,0 g
Destillert vann	til 1000 ml

4. REFERENCES

4.1 NMKL procedure No. 23, 2008; Guide on quality assurance for microbiological laboratories.

4.2 NMKL method No 91, 6th Ed., 2010: Preparation of the test sample and initial suspension of food and animal feeding stuffs for quantitative microbiological examination.

4.3 Larsen H and Grant, W. D. (2001). Genus I. *Halobacterium*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed., vol. 1, pp. 301–305.

4.4 Grant, W. D. (2001). Genus IV. *Halococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed., Vol. 1, pp. 311–314.

4.5 NMKL Protocol No. 2, 2006: Harmonization of microbiological methods. (Available in Danish only).

5. PRINCIPLE

Pink and Dun can be demonstrated by inoculating on the appropriate agar media. Samples for Pink are incubated at 37 °C for 2 - 3 weeks, while samples for Dun are incubated at 20 °C (room temperature: 18–24 °C) for up to 2 weeks. Most species will form visible colonies within 4 days. Both Pink and Dun are characterised by their pigmented colonies.

6. DILUTION MEDIA, SUBSTRATES

6.1 Dilution medium for Pink

Sodium chloride (NaCl)	250 g
Peptone	1.0 g
Distilled water	up to 1000 ml

The dilution medium is autoclaved at 121 ± 2 °C for 20 minutes. After sterilisation and before use, the pH of the medium should be 7.4 ± 0.2 measured at 20 – 25 °C.

6.2 Dilution medium for Dun

Sodium chloride (NaCl)	75 g
Peptone	1.0 g
Distilled water	up to 1000 ml

Autoklaver fortynningsmediet ved 121 ± 2 °C i 20 minutter etter at ingrediensene er løst. Etter sterilisering skal den bruksferdige løsningen ha pH 5,6 \pm 0,2 målt ved 20 - 25 °C.

6.3 Rødmidd – medium

Kasaminyr	7,5 g
Gjærekstrakt	10 g
Natriumklorid (NaCl)	250 g
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	20 g
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	3,0 g
Kaliumklorid (KCl)	2,0 g
Ferrosulfat (FeSO ₄ , 7H ₂ O)	0,05 g
Mangansulfat (MnSO ₄ , H ₂ O)	0,20 mg
Agar	20 g
Destillert vann	til 1000 ml

Løs opp stoffene under omrøring og juster pH. Autoklaver ved 121 ± 2 °C i 20 minutter. I det bruksferdige mediet skal pH være $7,4 \pm 0,2$ målt ved 20 - 25 °C.

6.4 Brunmidd – medium

6.4.1 Modifisert dichloran – glyserol (DG 18) Agar

Bemerk at mediet er noe forskjellig fra DG 18 – mediet som er beskrevet i NMKL metode nr. 98, 4. utg. 2005.

Pepton	5,0 g
Glukose	10 g
Kaliumdihydrogenfosfat	1,0 g
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	0,5 g
2,6-Diklor-4-nitroanilin (Dichloran)	0,002 g
Agar	15 g
Glyserol (p.a.)	220 g
Kloramfenikol	0,10 g
Destillert vann	til 1000 ml

Løs opp alle ingrediensene, unntatt glyserol og kloramfenikol i destillert vann ved oppvarming. Bruk maksimalt 500 ml basismedium (målt før tilsetning av glyserol) i hver kolbe. Når agaren er helt oppløst, tilsettes glyserol (110 gram til 500 ml basismedium). Mediet steriliseres ved autoklaving, 121 ± 2 °C i 20 minutter. Kjøøl ned til ca 50 °C og tilsett steril kloramfenikolløsning (for eksempel 1 ml av en sterilfiltrert 50 mg/ml oppløsning pr. 500 ml basismedium). Hell mediet over i sterile Petriskåler. Etter sterilisering skal pH i det bruksferdige medium være $5,6 \pm 0,2$ målt ved 20 - 25 °C.

Dehydrert basismedium og steril kloramfenikol supplement finnes kommersielt tilgjengelig.

The ingredients are dissolved, and the medium is autoclaved at 121 ± 2 °C for 20 minutes. After sterilisation and before use, the pH of the medium should be 5.6 ± 0.2 measured at 20 - 25 °C.

6.3 Pink – medium

Casamino acids	7.5 g
Yeast extract	10 g
Sodium chloride (NaCl)	250 g
Magnesium sulphate (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	20 g
Sodium citrate (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	3.0 g
Potassium chloride (KCl)	2.0 g
Ferrous sulphate (FeSO ₄ , 7H ₂ O)	0.05 g
Manganese sulphate (MnSO ₄ , H ₂ O)	0.20 mg
Agar	20 g
Distilled water	up to 1000 ml

Dissolve the ingredients while stirring, and adjust the pH. Autoclave at 121 ± 2 °C for 20 minutes. The pH of the medium should be 7.4 ± 0.2 measured at 20 - 25 °C.

6.4 Dun – medium

6.4.1 Modified dichloran – glycerol (DG 18) Agar

Note that this medium differs somewhat from DG 18 – the medium described in NMKL method no. 98, 4. ed. 2005.

Peptone	5.0 g
Glucose	10 g
Potassium dihydrogen phosphate	1.0 g
Magnesium sulphate (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	0.5 g
2,6-Dichlor-4-nitroaniline (Dichlorane)	0.002 g
Agar	15 g
Glycerol (p.a.)	220 g
Chloramphenicol	0.10 g
Distilled water	up to 1000 ml

Dissolve all the ingredients, except glycerol and chloramphenicol in distilled water by heating. Use max. 500 ml base medium (measured prior to adding the glycerol) in each flask. When the agar is fully dissolved, 110 gram of glycerol is added to 500 ml base medium. The medium is sterilised by autoclaving at 121 ± 2 °C for 20 minutes. Cool the medium to approx. 50 °C and add the sterile chloramphenicol solution (for instance 1 ml of a filter sterilised 50 mg/ml solution per 500 ml of base medium). Pour the medium into sterile Petri dishes. The pH of the medium should be 5.6 ± 0.2 measured at 20 - 25 °C.

Dehydrated base medium and sterile chloramphenicol supplement are commercially available.

7. APPARATUR OG GLASSUTSTYR

Normal utrustning for et mikrobiologisk laboratorium.

8. PROVEUTTAK

Foreta prøveuttak med steril skalpell på overflaten av saltfisk etter vanlige bakteriologiske prinsipper slik at prøven blir mest mulig representativ. Prøven kan transporteres for analyse. Påse at prøven er godt innpakket.

9. FREMGANGSMÅTE

9.1 Forbehandling

Utfør forbehandling og fortynning av prøvene i samsvar med NMKL metode nr. 91. Bemerk at fortynningsvæsken i denne metoden er forskjellig fra den som er beskrevet i nr. 91.

9.2 Utsæd, inkubasjon og avlesing

9.2.1 Rødmidd

Overfør 0,1 ml av homogenisatet til en Petriskål med ferdigstøpt rødmidd-medium, og fordel prøvematerialet med en L-stav eller tilsvarende. Dersom det ikke er synlig rødskjær eller kolonier av rødmidd på fisken er det ikke nødvendig å lage fortynningsrekke. Petriskålene pakkes inn i plastikkposer og inkuberes ved $37,0 \pm 1,0$ °C. Vekst indikeres ved utvikling av røde kolonier. Rødmiddkolonier kan være synlige allerede etter 4 - 7 døgn. Dersom det ikke er synlige kolonier etter 2 - 3 uker regnes prøven som negativ.

9.2.2 Brunmidd

Overfør 0,1 ml av homogenisatet til en Petriskål med ferdigstøpt medium, og fordel prøvematerialet med en L-stav eller tilsvarende. Dersom det ikke er brune prikker på fisken er det ikke nødvendig å lage fortynningsrekke. Petriskålene pakkes inn i plastikkposer og inkuberes mørkt ved 20 °C (romtemperatur: 18 - 24 °C). Vekst indikeres ved utvikling av lysbrune/beige kolonier. Brunmiddkolonier kan være synlige allerede etter 3 - 4 døgn. Dersom det ikke er synlige kolonier etter 1 - 2 uker regnes prøven som negativ.

Legg i tillegg noen biter av fiskens overflate i lukket og plastinnpakket petriskål ved 20 °C (romtemperatur: 18 - 24 °C). Om det er aktuelle mikrober til stede vil

7. APPARATUS AND GLASSWARE

Standard equipment for a microbiological laboratory.

8. SAMPLING

When sampling, use a sterile scalpel on the surface of the salted fish, according to the usual bacteriological principles, such that the sample is as representative as possible. The sample may be transported prior to analysis. Ensure that the sample is carefully packaged.

9. PROCEDURE

9.1 Pre-treatment

Carry out pre-treatment and dilution of the samples in accordance with NMKL method no. 91. Note that the dilution medium in this method differs from that described in method No. 91.

9.2 Inoculation, incubation and reading

9.2.1 Pink

Transfer 0.1 ml of the homogenate to a Petri dish containing Pink-medium, and spread the inoculum using a bent glass rod or similar. It is not necessary to make a serial dilution if there is neither visible red colouration nor visible colonies of Pink on the fish. The Petri dishes are packed in plastic bags and incubated at 37.0 ± 1.0 °C. Growth is indicated by the formation of red colonies. Pink colonies may be visible already after 4 - 7 days. If no colonies are visible after 2 - 3 weeks, the sample is considered negative.

9.2.2 Dun

Transfer 0.1 ml of the homogenate to a Petri dish containing medium, and spread the inoculum using a bent glass rod or equivalent. It is not necessary to make a serial dilution if there are no brown spots on the fish. The Petri dishes are packed in plastic bags and incubated in the dark at 20 °C (room temperature: 18 - 24 °C). Growth is indicated by the formation of light brown/beige colonies. Dun colonies may be visible already after 3 - 4 days. If no colonies are visible after 1 - 2 weeks, the sample is considered to be negative.

Put some pieces of the fish sample in a petri dish packed in plastic bag and incubate at 20 °C (room temperature: 18 - 24 °C). If relevant microbes are present, brown spots

disse danne brune flekker på fisken. Dersom det dannes brune flekker på fisken, men ikke på DG18, er det et tegn på at det er andre mikroorganismer enn *Wallemia sebi* som gir brune flekker.

will be formed on the fish. Brown spots formed on the fish and not on DG 18, indicate that other microbes than *Wallemia sebi* are the causative agent of brown spots.

10. KONFIRMERING

Ved behov for konfirmasjon, kan følgende metoder benyttes:

10.1 Rødmidd

Vekst på rødmidd-mediet, men ikke på generelle vekstmedier med saltkonsentrasjon under 8% NaCl.

10.2 Brunmidd

Påvisning av karakteristiske sporer ved direkte mikroskopi.

10. CONFIRMATION

If confirmation is needed, the following methods can be used:

10.1 Pink

Growth on Pink-medium, but not on general growth media with salt content below 8% NaCl.

10.2 Dun

Presence of characteristic spores by direct microscopy.

11. RESULTAT

Tell antall pigmenterte kolonier, hhv røde og brune, og regn ut antall kolonier og angi resultatets kolonitall per gram prøve eller per cm² overflate. Upigmenterte kolonier regnes ikke med.

11. RESULTS

The red and brown colonies, respectively, are counted, and the number of colonies calculated. The result is given as cfu per gram sample or per cm² of surface. Non-pigmented colonies are not included.

12. LITTERATUR

Referanser for mediene i denne oppskriften har vært følgende:

Rødmiddmedium

DSMZ nr. 97 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

Brunmiddmedium med Dichloran-glycerol (DG18) agar base

1. Hocking A. D. and Pitt J. I. 1980. J. Appl. & Env. Microbiol. 39. 488 – 492.
2. Beckers H. J., Boer E., van Eikelenboom C., Hartog B. J., Kuik D., Mol N., Nooitgedagt A. J., Northolt M. O. & Samson, R. A. 1982. Intern. Stand. Org. Document ISO/TC34/SC9/N151.

12. LITERATURE

The following references were used for the media in this method:

Pink-medium

DSMZ No. 97 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

Dun-medium with Dichlorane-glycerol (DG18) agar base

1. Hocking A. D. and Pitt J. I. 1980. J. Appl. & Env. Microbiol. 39. 488 – 492.
2. Beckers H. J., Boer E., van Eikelenboom C., Hartog B. J., Kuik D., Mol N., Nooitgedagt A. J., Northolt M. O. & Samson, R. A. 1982. Intern. Stand. Org. Document ISO/TC34/SC9/N151.

13. METODENS PÅLITELIGHET

Denne metoden er ikke validert i et kollaborativt avprøving.

14. REFERENTER FOR METODEN

Denne NMKL-metoden ble utarbeidet i 2002 av Taran Skjerdal, Veterinærinstituttet, og igjen revidert av Skjerdal i 2008. Denne siste revisjonen er utført av Ida Skaar og Torkjel Bruheim, Veterinærinstituttet, Norge.

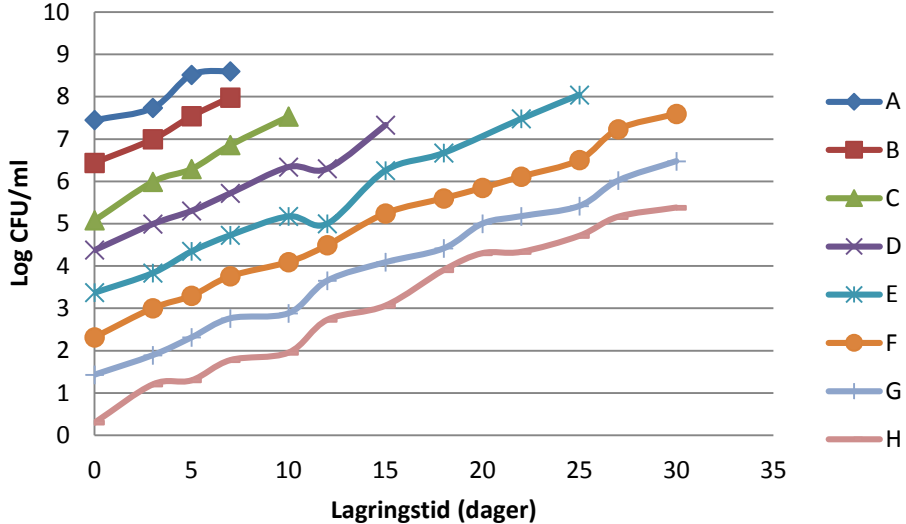
13. THE RELIABILITY OF THE METHOD

This method has not been validated in a collaborative study.

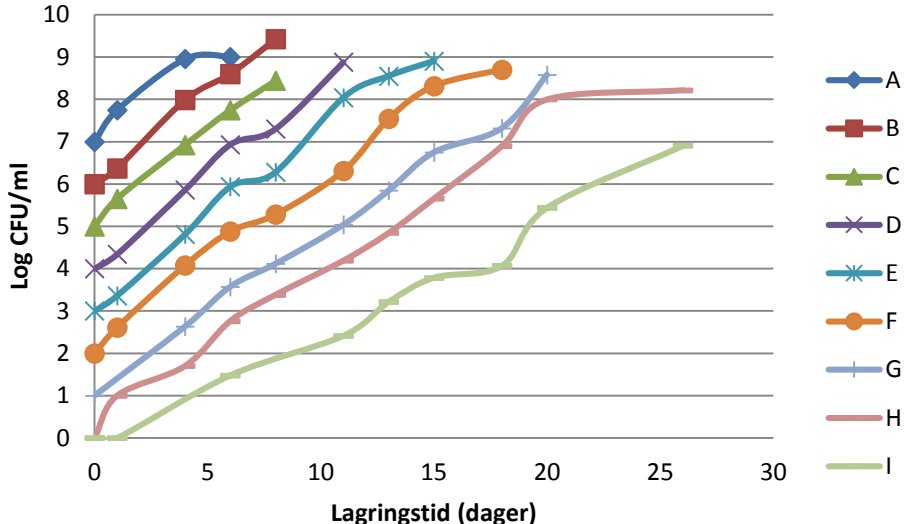
14. REFEREES OF THE METHOD

This NMKL method was originally elaborated in 2002 by Taran Skjerdal, Norwegian Veterinary Institute, and again revised in 2008 by Skjerdal. The current revision is carried out by Ida Skaar and Torkjel Bruheim, Norwegian Veterinary Institute.

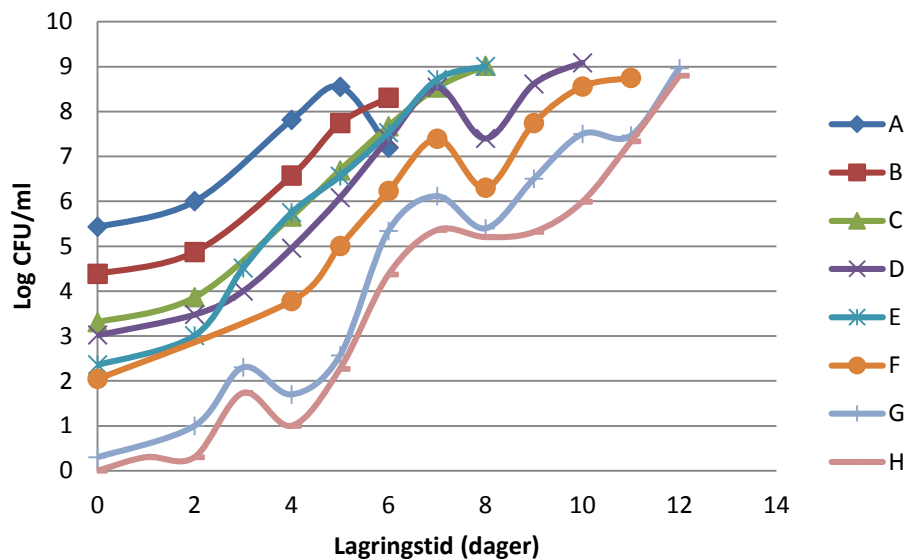
© NMKL, c/o Norwegian Veterinary Institute, Norway
<http://www.nmkl.org>



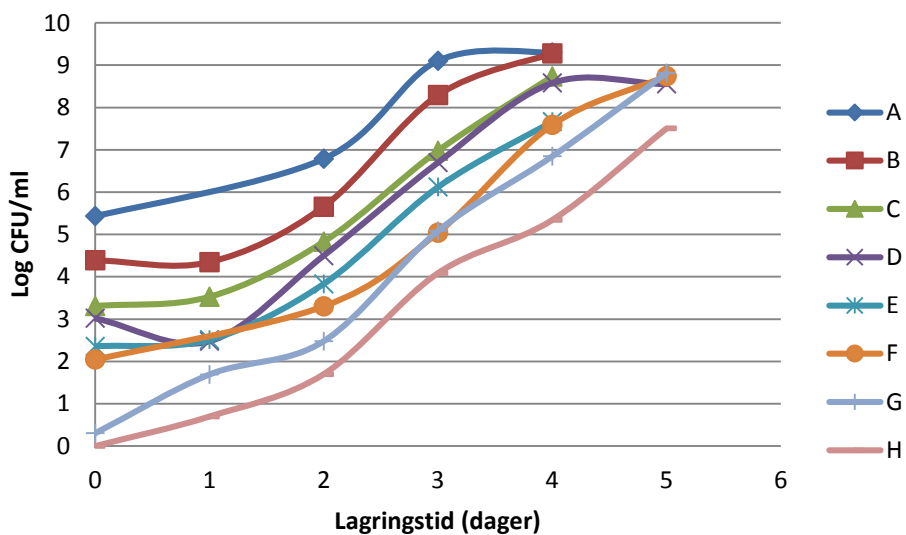
Figur 1 Vekst av rødmidd i renkultur i cocktail inkubert ved 20 °C ved røring. Prøvene A-H har forskjellige startnivå rødmidd, se y-aksen.



Figur 2 Vekst av rødmidd i renkultur i cocktail inkubert ved 25 °C ved røring. Prøvene A-H har forskjellige startnivå rødmidd, se y-aksen.



Figur 3 Vekst av rødmidd i renkultur i cocktail inkubert ved 30 °C ved røring. Prøvene A-H har forskjellige startnivå rødmidd, se y-aksen.



Figur 4 Vekst av rødmidd i renkultur i cocktail inkubert ved 35 °C ved røring.

PRODUKTDATABLAD
Version Havsalt Fiskeri, bulk 060111



Havsalt Fiskeri, bulk

Utarbeidet:	11. januar 2009 RSH			
Produkt:	Havsalt			
Kvalitet:	Natriumklorid			
Anvendelse:	Saltning av fisk. Konservering. Kan også brukes til mat og dyrefôr.			
Produkttegenskaper:	Gir det man salter en rund og fyldig smak. Saltet fremhever produktets egen smak, uten å virke for salt. Havsalt er et naturprodukt som høstes fra saliner og kan derfor inneholde naturlige elementer.			
Kjemiske normalverdier:	NaCl (Tørre substans)	> 98,0 %	Uløselig i vann	≤ 0,015 %
	Ca	0,05-0,15 %	E535	5 mg/kg
	Mg	0,02-0,10 %		
	SO ₄	≤ 0,35 %		
	Fe	5 mg/kg		
	Mn (Mangan)	<2 mg/kg		
	Cu	<0,1 mg/kg		
	H ₂ O	≤ 4 %		
Siktofraksjon:	8 mm	< 1 %	0,315 mm	≤ 5 %
	6,3 mm	≤ 5 %		
Fysiske data:	Egenvækt	1,15 - 1,2 g/cm ³	Farge	Hvit
	Kokopunkt	1413 °C	pH i løsning	7,0
	Smeltepunkt	802 °C		
Koder / Varenummer:	EAN 1:			
	EC-NH:	291-598-3		
	CAS-NH:	7647-14-5		
	EPD (RK)			
	NKL:			
Emballasje:	Enhet	Bulk		
Referanse:	Marine Salt Trading Company SA, Version 2 - dms 145/07/09 par MSLT			
Lagring:	Lagres tørt og temperert.			

Ved spørsmål, kontakt: GC Rieber Salt AS, TE: 23 03 50 90, Fax: 22 19 77 07, e-Mail: salt.oslo@gcriber.no

Tilhørende HMS Datablad: HMS datablad Havsalt N° 4F5 Fishery Quality



silver plastics® GmbH & Co. KG
 Godesberger Strasse 9
 D-53842 Troisdorf

Declaration of Compliance

We are supplying you with the following material / product:

PS-trays: Vampirella
material: polystyrene, open-cell

This product complies with the following legal requirements:

1. Generally

- EU-Framework Regulation on materials and articles intended for food contact: (EC) No 1935/2004
- (the german) Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch: LFGB §§ 30 and 31
- Regulation (EC) No 2023/2006 of Dec., 22nd 2006 on good manufacturing practice (GMP)

2. Raw Materials / Composition

- Regulation (EC) No 10/2011 and following amendments
- (the german) Bedarfsgegenständeverordnung dated from April, 10th 1992 and following amendments

3. Conditions of use / Compliance with threshold values

a) Specification of the intended use:

The above mentioned product fulfils the requirements for:

- dry food (acc. 85/572/EC)
- aqueous food (solvent: 10% Ethanol)
- acid food (solvent: 3% acetic acid)
- fatty food (solvent: Isooctane)

that means for filling goods like fresh meat, poultry or fish for long term storage with temperatures up to 20°C.

b) The analysis of the total migration was carried out in consideration of the „Methoden zur Untersuchung von Bedarfsgegenständen“ according to the requirements B 80.30, 1 and 3 (EC) and the „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren“ according § 64 LFGB and the requirements of the norm-series EN 1186, EN 13130 and prCEN/TS 14234 „Werkstoffe und Gegenstände in Kontakt mit Lebensmitteln – Kunststoffe“.

substitute solvent:	contact-time / -temperature:
10 % ethanol/water	10 days / 20°C
3 % acetic acid	10 days / 20°C
Isooctane	24 hrs/ 20°C

The critical value for the total migration measures 10mg/dm² per object resp. 60mg/kg foodstuff (substitute solvent) according to Regulation (EC) No 10/2011.

The observance of the global migration values according to the requirements of Directives 82/711/EEC and 85/572/EEC and amendments produces values below the admitted threshold values (for the abovementioned conditions of use).

The ratio of the area of the food contact material to the volume used to determine the compliance of the plastic food contact material or article measured approx. 310cm²/200cm³ resp. 410cm²/550cm³ resp. 440cm²/950cm³.

c) Information about restricted substances and / or specifications

Above mentioned products may contain substances with an SML-restriction defined in Regulation (EC) No 10/2011.

stearic acid: ref.no 24550; CAS 0000057-11-4 SML: 25mg/kg
octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-...)propionate.: ref. no 68320; CAS 0002082-79-3 SML: 6mg/kg
alkyl(C8-C22)sulphonic acids: ref.no. 34230 SML: 6mg/kg
butadiene: ref. no 13630; CAS 0000106-99-0 SML: (NN)

The compliance of the limits is confirmed for the stated types of food and conditions of application.

d) silver plastics does not add Dual Use Additives to its formulations, which have acc. Regulation (EC) No 10/2011 a restriction in foodstuff.

4. Further Declarations of Conformity

The requirements of the European (packaging-) Directive 94/62/EC (dated from December 20th, 1994; including further amendments) regarding heavy metals are fulfilled.

5. Conclusion

In terms of EU-framework Directive (EC) No 1935/2004 and §§ 30 and 31 LFGB, published in the Bundesgesetzblatt (Federal Law Gazette) No 55 of 6.09.2005 there are no objections against the use of the product for the manufacture of articles intended for food contact.

This declaration is valid for the product delivered by us as specified above. The Regulation (EU) No. 10/2011 or the Directives 82/711/EEC and 85/572/EEC provide guidelines for the selection of test conditions to be used for various food products. According to that and under consideration of the food contact conditions stated, the product complies with the stipulations of these Regulations regarding the packaging of food products to be packed. The user shall verify himself that the product is suitable for the intended food to be packed beyond the stipulations of the Directives.

6. Further Information

All previous Declarations of Compliance with relation to the above mentioned products are hereby invalid.

In case of relevant changes in the characteristics of the product or in case of new relevant scientific findings silver plastics will renew this declaration.

This declaration is valid until 31st of December 2015.

Troisdorf, Aug. 12th 2013
silver plastics® GmbH & Co. KG
Godesberger Str. 9 • D-53842 Troisdorf

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'i.A. Storck', is written over the printed name.

i.A. C. Storck
- QW/AS -



Global Plastics International
Boulevard Suzanne Clément
B.P. 92 - 76402 Fécamp Cédex
Commercial Tel: 33(0)2 35 10 48 50
Fax: 33(0)2 35 28 67 88
Standard Tel: 33(0)2 35 10 33 66
Fax: 33(0)2 35 27 68 84

ELITE SPM G

Description :

The ELITE SPM film is PVC extruded multi-layer, high performance stretch film. This quality film is developed for the almost all-automatic stretch wrapping packaging machines.

The ELITE SPM G films are especially adapted for the « super- and hypermarkets packaging machines » and the linear stretch wrapping machines for « difficult large products ».

All the components used in this film are food contact approved and conform to the requirements of EU directive 2002/72/CE Directive plus all subsequent amendments. This product is suitable for direct food contact with the following food categories as listed in EU directive 85/572/ CEE :

- 02.01 – 02.02 – 02.03 – 02.04 – 02.05 – 02.06A : cereals products, pastry, biscuits, cake and other bakers' wares
- 03.01 – 03.02A – 03.03A : Chocolate, sugar and products thereof confectionery products
- 04.01 – 04.02A – 04.03 – 04.04 – 04.05A : fruit, vegetable and products thereof
- 06.03 – 06.04 : meats of all zoological species
- 08.02 – 08.08 - 08.10 – 08.11 – 08.16 - 08.17 - : miscellaneous products

It is not permitted for contact with pure fats and oils.

Property		Unit	Method	Value
Roll length		m	Internal method	1500
Core size		mm	Internal method	113/76
Tensile Strength	Machine Dir.	Mpa	38-42	45-50
	Transversal dir.	Mpa	34-38	35-40
Extension	Machine Dir.	%	300-350	280-330
	Transversal dir.	%	350-400	370-420
Modulus 100%	Machine Dir.	Mpa	20-22	22-24
	Transversal Dir.	Mpa	13-14	12-13
Slippery properties	Static COF	-	0.45-0.55	0.35-0.45
	Cinetic COF	-	0.20-0.25	0.18-0.25
Optical properties	Gloss	-	125-135	125-135
	Haze	%	0.7-1.3	0.7-1.3
Oxygen transmission		$l/m^2/24h/1atm$	Lissy GPM 500	12
Carbon dioxide transmission		$l/m^2/24h/1atm$	Lissy GPM 500	70
Water vapour transmission rate		$g/m^2/24h$	NF H 00-044 to 38°C – 90% of humidity	665

Figures are typical values derived from tests conducted upon actual film samples in accordance with Global Plastics International Tests methods. Results may vary, thus this data MUST NOT form the basis of limitation specification

Date : 03/11/06

