



DET TEKNISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET
MASTEROPPGAVE

Studieprogram/spesialisering:

Biologisk Kjemi / Molekylærbiologi

Vårsemesteret, 2022

Åpen

Forfatter: Frida Bårdsen

.....*Frida Bårdsen*.....
(signatur forfatter)

Fagansvarlig: Cathrine Lillo

Veiledere: Bjørn Roth og Trond Løvdal, Nofima Stavanger

Tittel på masteroppgaven:

Kvalitet og holdbarhet på slaktet oppdrettskveite (*Hippoglossus hippoglossus L.*)

Engelsk tittel:

Quality and shelf-life of slaughtered farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*)

Studiepoeng: 60 stp.

Emneord:

Atlantisk kveite, kvalitet,
holdbarhet, superkjøling

Sidetall: 72

+ vedlegg/annet: 7

Stavanger, juni 2022

Sammendrag

Formålet med dette masterprosjektet var å undersøke kvalitet og holdbarhet i Atlantisk oppdrettskveite, samt sammenligne effekten av islagring og superkjøling med refridgerated sea water (RSW). Fisken ble hentet fra Sterling White Halibut AS (Tøtlandsvik, Hjelmeland, Norge) og fraktet til Nofimas lokaler i Stavanger. Totalt ble 58 oppdrettskveiter slaktet og lagret på kasser med is.

Trenging av fisk *pre mortem* vil skape en stressrespons i fisken. Dersom det tar for lang tid før den aktuelle fisken blir tatt opp ombord i bløggebåt og el-bedøvd, vil en økende stressrespons kunne føre til endring i kvalitet av produktet. Ulike kvalitetsparametere ble derfor brukt for analyse av kvalitet i Atlantisk oppdrettskveite, med hensikt å sammenligne kvalitet på fisk før og etter stresseksposering. pH og *rigor mortis* ble analysert ved 0 - 78 t *post mortem*. Analyser av tekstur, farge, vannbinding, tørketap og filetspalting ble utført dag 10 *post mortem*. Resultater fra analyse av farge, vannbinding, tørketap og filetspalting viser ingen signifikant forskjell mellom gruppene.

Når oppdrettskveite høstes blir den tatt opp i bløggebåt, hvor den bedøves i el-bedøver før den bløgges og oppbevares i RSW tank. Fisken oppbevares så ombord til den ankommer slakteriet, hvor den så blir sløyd og pakket på kasser med is. Ved superkjøling i RSW slurry ved subzero temperatur, vil nedkjølingsprosessen starte tidlig og fisken vil være superkjølt når den ankommer slakteriet. Mikrobiologiske analyser ble utført på Atlantisk kveite med hensikt i å bestemme lengde av holdbarhet og effekten av superkjøling på holdbarheten. De mikrobiologiske analysene ble utført på fisk som ble hentet direkte fra slakteri, og på fisk som ble superkjølt før den ble lagt i kasser med is. Resultatene viser at ved å senke temperaturen ned til frysepunktet ved superkjøling i RSW, vil holdbarhetstiden øke med 5-6 døgn.

Det ble også utført qPCR analyser av et utvalg bakterier på kveiteskinn, analysen ble utført for, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Pseudomonas spp.*, *Lactococcus lactis*, *Shewanella putrefaciens*, *Vibrio ssp.* og *Photobacterium phosphoreum*.

Quality Index Measurement (QIM) analyse ble utført som analyse av den sensoriske holdbarheten. Et dommerpanel fra Nofima utførte analysen ved dag 22 og resultatene viser tydelig positiv effekt av superkjøling på sensorisk holdbarhet.

Forord

Denne masteroppgaven ble skrevet i forbindelse med fullføring av min 2-årige mastergrad i Biologisk kjemi ved det Teknisk-naturvitenskaplige fakultetet ved Universitetet i Stavanger. Masterprosjektet ble utført i samarbeid med Nofima og Sterling White Halibut AS, og arbeidet ble utført ved Nofimas lokaler i Stavanger, i løpet av perioden september 2021 – juni 2022.

Dette prosjektet har vært utfordrende, tidkrevende, spennende og lærerikt. Jeg sitter igjen med mye ny kunnskap og setter pris på muligheten til å være en del av dette prosjektet. Først ønsker jeg å takke hele Nofima avd. Stavanger for at jeg fikk skrive min masteroppgave hos dere, tusen takk for lån av kontorlokaler, laboratoriet i tillegg laboratorieutstyr.

Jeg vil spesielt takke mine veiledere Bjørn Roth og Trond K. Løvdal. Takk for at jeg fikk være en del av dette prosjektet, det har gitt meg god erfaring for arbeidslivet fremover. Takk for at dere lot meg arbeide selvstendig samtidig som dere har fulgt meg tett og gitt meg gode råd på veien. Jeg er utrolig takknemlig for all tid dere har dedikert til å hjelpe meg. I tillegg vil jeg takke laboratorieteknikerne Leena A. Prabhu, Karin S. Tranøy og Laila Budal for god opplæring, hjelp og veiledning på laboratoriet. Jeg vil også si takk til Atle Foss som var med på uttak av blodprøver fra kveite, og som har analysert dem på Akvaplan-niva sitt laboratorium i Bergen.

Jeg vil også gi en stor takk til mine gode studievenninner, Ingvild Gundersen, Hege Dysjaland og Marthe Tofthagen. Tusen takk for fine år sammen, godt samarbeid, god støtte og oppmuntring og ikke minst alle de utallige lunsjpausene vi har hatt sammen for å holde motet oppe. Til slutt vil jeg uttrykke min største takk til min samboer, takk for all støtte og tålmodighet.

Tusen takk skal dere ha.

Frida Bårdsen
Stavanger, Juni 2022

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	II
Forord	III
1. Introduksjon	1
1.1 Bakgrunn	1
1.2 Oppdrett av Atlantisk kveite (<i>Hippoglossus hippoglossus L.</i>)	1
1.3 Superkjøling	3
1.4 Kvalitetsfaktorer	4
1.4.1 Stressrespons i fisk	4
1.4.2 pH	5
1.4.3 <i>Rigor mortis</i>	6
1.4.4 Vannbindingsevne	7
1.4.5 Farge	8
1.4.6 Tekstur	9
1.4.7 Filetspalting	9
1.4.8 Quality index mesasurement (QIM)	10
1.5 Holdbarhet av fersk fisk	11
1.6 Bakterier på fersk fisk	13
1.7 Formålet med studien	15
2. Material og metode	16
2.1 Forsøksdesign	16
2.2 Metode	18
2.2.1 Blodmålinger	18
2.2.2 pH	18
2.2.3 <i>Rigor mortis</i>	19
2.2.4 Vannbinding (WHC) og tørketap	20
2.2.5 Farge	20
2.2.6 Tekstur	21
2.2.7 Filetspalting	21
2.2.8 Mikrobiologisk analyse av holdbarhet.....	22
2.2.9 Filterbasert DNA ekstraksjon av skinnprøver	25
2.2.10 Filterbasert DNA-ekstraksjon av <i>Pseudomonas ssp</i>	26
2.2.11 Real-time PCR analyse	27
2.2.12 Quality Index Measurement (QIM)	29
2.3 Dataanalyse	30
3. Resultat	31
3.1. Blodmålinger	31
3.2 Pilotforsøk – stress og holdbarhet	33
3.2.1 pH i fiskemuskel	33
3.2.2 Rigor indeks (%).....	34
3.2.3 Vannbinding	35
3.2.4 Tørketap	35
3.2.5 Farge	36
3.2.6 Tekstur	36
3.2.7 Filetspalting	37
3.2.8 Pilotforsøk holdbarhet	37

3.3 Hovedforsøk – kjøleteknologi og holdbarhet.....	38
3.3.1 Total aerobt mesofilt kimtall.....	38
3.3.2 Hydrogen Sulfid produserende bakterietall	39
3.3.3 Psykrotroft kimtall ved 15 °C	40
3.3.4 Psykrotroft kimtall ved 8 °C	41
3.4 Real-time PCR analyse av skinnprøver	42
3.4.1 Total antall bakterier på kveiteskinn.....	42
3.4.2 <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	43
3.4.3 <i>Photobacterium phosphoreum</i>	44
3.4.4 <i>Vibrio</i> ssp.	45
3.4.5 <i>Shewanella putrefaciens</i>	45
3.4.6 <i>Lactococcus lactis</i>	46
3.4.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
3.4.6 <i>Pseudomonas</i> ssp.	47
3.5 Sensorisk holdbarhet	49
3.5.1 Quality index measurement (QIM).....	49
3.6 Temperaturmålinger.....	51
4. Diskusjon	55
4.1 Metode evaluering.....	55
4.2 Kvalitetsresultater	56
4.3 Superkjøling.....	59
4.4 Mikrobiologisk holdbarhet.....	60
4.5 qPCR analyse av skinnprøver.....	61
4.6 Sensorisk holdbarhet	64
5. Konklusjon.....	66
6. Referanse	67
Appendix.....	73
Appendix A- Tillaging av medier.....	73
Appendix B – Tilleggsresultater	74

1. Introduksjon

1.1 Bakgrunn

De dype og lange fjordene langs norskekysten gir utmerkede forhold for havbruksnæring og Norge er en av verdens største produsenter av oppdrettsfisk. Eksport av fisk er en stor del av den norske økonomien og den norske havbruksnæringen skaper stadig nye arbeidsplasser. Fisken blir hovedsakelig produsert i åpne merder i sjøen, Atlantisk laks (*Salmo salar*), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) og rensefisk er 99.8 % av artene som blir produsert.

Sjømat er den eksportsektoren som har hatt størst vekst og i løpet av 10 år har verdien mer enn doblet seg fra 47.7 milliarder kroner i 2012 til 120.8 milliarder kroner i 2021 (Norges Sjømatråd, 2022). I 2019 ble det totalt solgt 1.5 millioner tonn matfisk, av dette stod kveite for 1 525 tonn, en andel på 0.1%. Kveite har en høy markedspris, høy vekt og er sett på som en eksklusiv vare. Fra den totale førstehandsverdien av solgt matfisk på 71 735 millioner kroner var førstehandsverdien av kveite 155 millioner kroner (Statistisk sentralbyrå, 2020). I 2021 ble det eksportert hele 3.1 millioner tonn sjømat til en verdi av 120.8 milliarder kroner fra Norge, rekord både i volum og verdi (Norges Sjømatråd, 2022).

Kveite er en lovende art i oppdrettsnæringen (Jensen, Øvreås, Bergh & Torsvik, 2004), dens del av oppdrettsmarkedet er ikke stor, men den er økende. Siden 80-tallet har det blitt drevet oppdrett av kveite. Det har vært en sakte oppbygging da det har vært problemer med tilgang på yngel av høy kvalitet, og det å få til en bærekraftig produksjon (Jensen et al., 2004; Olsen & Rommetveit, 2017). Det er fem firma i Norge som driver med oppdrett av kveite, i tillegg til ulike oppdrettsfirma ved Island, Skottland og Canada.

Forskningen på Atlantisk kveite har i hovedsak vært fokusert på tidlig livsstadium, yngel, fôring og vekst-optimalisering. For å få en mer bærekraftig og vellykket industri for oppdrett av Atlantisk kveite i Norge må det mer kunnskap til og forskning på kveite bør være en prioritet ikke kun for oppdrettene, men også for nasjonale forskningsorganisasjoner (Hagen, 2008).

1.2 Oppdrett av Atlantisk kveite (*Hippoglossus hippoglossus L.*)

Atlantisk kveite er den største strålefinnefisker og tilhører flyndrefiskfamilien. Den Atlantiske kveiten er utbredt på begge sider av Nord-Atlanteren, hvor unge kveiter lever nær kysten i grunt vann, mens store kveiter kan finnes i havdyp ned til 2000 m. Kveiten er en avlang bunnfisk,

med øynene på høyre side, øyesiden. Den er godt kamuflert på havbunnen med sin gråflekkede farge på sin høyre side, og hvit på venstre siden (Berg, 2019).

Kjønnsmodningen av kveite avhenger blant annet av størrelsen og vekt av fisken, vill hanfisk blir kjønnsmoden når de er 66-80 cm, som tilsvarer alder på omtrent 8 år. Den ville hunfisken blir kjønnsmoden når de er 66-80 cm, som tilsvarer en alder på 7-12 år (Cargnelli, Griesbach, & Morse, 1995). Vill hanfisk kan bli 50 kg, mens vill hunfisk kan bli opp mot 300 kg. Tidlig kjønnsmodning hos kveite påvirker fiskens vekst, og hanfisken vokser saktere etter å ha nådd 3 kg. Det er derfor stort sett hunfisk som blir avlet i oppdrettsnæringen. Når fisken er kjønnsmoden vil hanfisken fortsette å vokse sakte resten av dens liv (Norberg, Weltzien, Karlsen, & Holm, 2001) og hanfisken blir sjelden større enn 5 kg i oppdrett (Roth, Jenssen, Jonassen, Foss, & Imsland, 2007). Det er ikke et problem for hunfisk da de slaktes før de blir kjønnsmodne.

Kveite har lang produksjonstid og det tar 3-5 år før kveiten er stor nok til å bli solgt videre. I oppdrett starter kveiteyngel livet i klekkeriet, befruktete egg klekkes etter 10-12 dager i mørket og ut kommer en kveitelarve med plommesekk. Plommesekken er kveitelarvens første kilde til næring og når den er brukt opp trenger kveitelarven levende fôr i form av små zooplankton eller encellede planteplankton. Kveitelarven har øynene på hver sin side frem til metamorfosen starter og det venstre øyet flytter seg over til høyre siden, kveiten blir så flatere og starter å søke mot bunnen. Når kveiten er fem gram blir den flyttet til landbaserte settefiskanlegg, her flyttes kveiten gjennom anlegget for at kveiten skal ha best mulig forhold for optimal vekst og helse. Når størrelsen på kveiten er 350 – 400 gram blir den flyttet til et åpent landbasert anlegg, her blir den til den har oppnådd en vekt på 1200 – 1500 gram. Til slutt flyttes kveiten til et sjøbasert anlegg, dette anlegget har et hengende hyllesystem for å stimulere kveitens ønske om å ligge på havbunnen. Kveiten blir i det åpne sjøanlegget til den har nådd en vekt på 5 – 6 kg, dette tar omtrent to år og nå er den klar for å høstes. Stamfisken som brukes til videre avl, gyter tre eller fire ganger per år og eggene legges til klekking og prosessen starter på ny (Sterling® White Halibut).

1.3 Superkjøling

En av de viktigste konserveringsmetodene for å beholde god kvalitet og holdbarhet i fersk fisk er jevn og kjølig lagringstemperatur. Det er to konvensjonelle kjølemetoder for fisk. Den ene er ved bruk av is, og temperaturen ligger da ved 0 til 4 °C (smeltende is). Denne metoden beholder fiskens høye kvalitet, men begrenser holdbarheten. Den andre metoden er fryselagring ved -18 til -40 °C (Gallart-Jornet, Rustad, Barat, Fito, & Escriche, 2007), da får fisken lang holdbarhetstid, men det går på bekostning av kvaliteten.

Ulike kjøleteknikker brukes for kjøling av ulike produkter og til ulikt behov. Immersjonskjøling er en kjøleteknikk hvor fisken blir lagt i tanker med kaldt vann, man kan legge fisken i tanker med nedkjølt saltlake ($\text{NaCl} < 5\%$) (liquid cooling) eller isvann (Slurry ice cooling). Frysetuneller er en fryseteknikk hvor man ved bruk av kraftige vifter blåser kald luft over produktet, og svært lave temperaturer fører til rask nedkjøling (Margeirsson *et al.*, 2010). Man kan også bruke kryogenisk kjøling, dette er en teknikk hvor man bruker flytende nitrogen eller karbondioksid til nedkjøling av produktet.

Superkjøling er en alternativ teknologi til vanlig islagring eller fryselagring, prinsippet for metoden går ut på å redusere kjernetemperaturen i produktet til 1-2 °C under frysepunktet (Kaale, Eikevik, Rustad, & Kolsaker, 2011). Denne teknologien reduserer vekstraten av spoleringsbakterier sammenlignet med tradisjonelle kjøletemperaturer (Haard, 1993). Når man senker temperaturen til 1-2 °C under frysepunktet blir produktet bare delvis frosset. Da oppstår det iskrystallisering av omtrent 5-30 % av vannet i produktet. De små iskrystallene blir dannet på overflaten, og selv om produktet inneholder iskrystaller oppleves det ikke som frosset (Koutsoumanis *et al.*, 2021). Små iskrystaller bevarer fiskens ferskhet og kvalitet ved at iskrystallene er små nok til å ikke skade cellene og muskelstrukturen. Jo større iskrystaller som dannes under frysing, desto større ødeleggelse av muskelen. Ved ufullstendig nedfrysning dannes større iskrystaller som kan ødelegge cellene og muskelstrukturen, og som dermed resulterer i redusert kvalitet av produktet. En ødelagt muskelstruktur vil resultere i muskel som mister vann ved tining og tilberedning, og som reduserer den sensoriske kvaliteten av produktet (Anderssen, Syed, & Stormo, 2021). Ved dypfrysing av fisk vil det oppstå uønskede endringer som protein denaturering, redusert vannbindingsevne, og økt drypptap ved tining (Kaale *et al.*, 2011). Bruker man lang tid på å kjøle ned produktet vil iskrystallene vokse seg større, rask nedkjøling som ved superkjøling er derfor ønsket (Koutsoumanis *et al.*, 2021; Kaale & Eikevik, 2014). For at iskrystallene ikke skal bli for store i produktet er det også viktig å unngå at produktet utsettes for temperaturendringer (Kaale *et al.*, 2011).

1.4 Kvalitetsfaktorer

Kvalitet og holdbarhet kan måles på flere forskjellige måter, kvalitetsfaktorene kan være fysiske, kjemiske, mikrobiologiske og sensoriske. Tekstur, farge og vannbinding er fysiske faktorer som kan måles, kjemiske faktorer kan måles ved å blant annet måle ioner i blodprøver. Farge, utseende og lukt kan måles med sensoriske undersøkelser.

1.4.1 Stressrespons i fisk

God fiskevelferd er viktig for at fisken skal være ved god helse, tilstrekkelige vekstforhold gjennom hele livssyklusen fører til god helse og velferd samt god kvalitet (Hansen, 2019). God velferd hos fisken vil kunne føre til lav dødelighet og dermed økt fortjeneste. Samtidig som en fisk med god helse vil ha god kvalitet og oppfylle kundens kvalitetskrav. Velferdsbehovet til fisk deles inn i kategorier som omfatter miljø, helse og adferd. Det er strenge regler for drift og produksjon av oppdrettsfisk, det er viktig for å sikre god velferd for fisken samtidig som det sikrer god kvalitet på produktet.

Stress er en fysiologisk respons på truende situasjoner, stress oppstår som en reaksjon på en såkalt stressor. En stressor kan være en oppfatning av fare, som tilstedeværelse av rovdyr. Fysiske stressorer kan være håndtering eller trenging, og kjemiske stressorer kan være lavt oksygenivå, eller endringer i pH-nivå (Barton, 2002). En lettere stressende situasjon kan gi positive effekter, men en alvorlig stressende situasjon kan gi negative konsekvenser, noe som går utover dyrevelferd og kvalitet av produkt.

Stressrespons kan sorteres inn i nivå, en primær stressrespons gir endokrine endringer som økt nivå av katekolaminer (adrenalin og noradrenalin, dopamin) og kortikosteroider (hovedsakelig kortisol). En sekundær stressrespons påvirker blant annet fordelingen av nødvendige ressurser i kroppen i vitale områder som; metabolismen, osmoregulering, respiratoriske system og immunforsvaret. De tertiære stressresponsene er en reaksjon på gjentatt og langvarig eksponering for stress, og vil ha en negativ innvirkning på funksjoner som; vekst, adferd, sykdomsresistens og reproduksjon (Barton, 2002; Schreck & Tort, 2016).

Genetiske forskjeller som tidligere miljøhistorie og nåværende omgivelser, samt fysiologisk tilstand hos individer, bestand og art vil gi en varierende respons på stress. Akutt stress innebærer umiddelbar og vesentlig utskillelse av stresshormoner, etterfulgt av rask gjenoppretting av grunnlinjenivået, og gir ikke alvorlige effekter på fisken. Kroniske og

gjentatte stressresponser kan gi alvorlige endringer i kroppen, som mangel på energiresurser og lengre restitusjonsperioder (Tort, Balasch, & MacKenzie, 2004).

Under slakteprosessen er det viktig at fisken er under gode forhold, fisken må håndteres med omhu slik at det ikke settes i gang stressresponser som kan resultere i lavere kvalitet. Økte kortisolnivå er observert i fisk etter håndtering, i tillegg fører økt muskelaktivitet og akutt stress før slakting til økt melkesyreproduksjon og lavere muskel-pH (Poli, Parisi, Scappini, & Zampacavallo, 2005). Stress i fisk kan føre til endret kvalitet på det ferske fiskeproduktet. Stress assosiert med trengsel, el-bedøving og håndtering har en effekt på fiskens velferd, muskel-pH og rigor tid (Roth *et al.*, 2012). Stress i fisken kan føre til dårligere kvalitet i form av bløtere tekstur, høyere filetspalting, og forkortet lagringsstabilitet (Mørkøre, 2008). Målinger på stress kan bli gjort ved blodmålinger av ulike biokjemiske parametere som kortisol, laktat, glykogen og ioner (Na^+ , Cl^- , Ca^{2+}), pH.

1.4.2 pH

Kvaliteten på kveitefilet er avhengig av endelig pH i muskelen, og for å sikre tilstrekkelig god kvalitet på produktet må faktorer som spiller inn på pH-verdien tas hensyn til. Den endelige pH nådd av muskelvevet kalles den ultimate pH (Hultin, 1984). Kveite har ultimate pH på 5.6 og har bedre holdbarhetsegenskaper enn de fleste andre fisker, som har ultimate pH mellom 6.2 og 6.6 (Reay & Shewan, 1949). Høy *post mortem* pH (> 6.0) får negative konsekvenser for mikrobiologisk holdbarhet, ved å blant annet tillate den pH-sensitive spoleringsbakterien *Shewanella* å vokse (Gram & Huss, 1996). Lavere pH fører til ugunstige vekstforhold for mikroorganismer som dermed fører til lengre holdbarhet.

Fisk som er stresset eller har et økt aktivitetsnivå *pre mortem* har også høyere nivåer av kortisol, glukose og melkesyre, dette påvirker pH nivået i muskelen. Ultimate pH i muskelen er også en viktig faktor for den visuelle kvaliteten for atlantisk kveite, høye nivå av glykogen og melkesyre ved fiskens død vil ha en stor påvirkning for muskel-pH, som igjen vil ha en negativ effekt på filetfarge og kjøttkvalitet (Gismervik, Gåsnes, Nielsen, Tørud, & Mejdell, 2021; Roth, Foss, & Imsland, 2009). Det bør derfor iverksettes tiltak for å unngå høye glykogen og melkesyrenivåer (Roth *et al.*, 2009).

1.4.3 *Rigor mortis*

Rigor mortis (dødsstivhet) er stivhet i musklene *post mortem*. Når fisken er i *rigor mortis* er den stiv og ubøyeleg. *Rigor mortis* inntreer gradvis og starter vanligvis 1-7 timer *post mortem*, slaktet fisk på is har vanligvis maksimum stivhet mellom 5 og 22 timer *post mortem*. Den totale lengden av *rigor mortis* varierer, den kan være mellom 30 og 120 timer (Amlacher, 2012). Mekanismen bak *rigor mortis* er at mengden ATP (adenosintrifosfat) i muskelen faller under en bestemt konsentrasjon og muskelproteinene aktin og myosin danner permanente bånd i et aktomyosin-kompleks (Le, Nguyen, & Pham, 2020; Pate & Brokaw, 1980).

Glykogen blir i fiskemuskel under en rekke prosesser omdannet til sluttproduktene CO₂, H₂O og ATP (Huss, 1995). Den aerobe ATP-produksjonen blokkeres umiddelbart etter død, og anaerob glykolyse blir hovedveien for å generere ATP. Anaerob nedbrytning av muskelglykogen fører også til dannelse av melkesyre som et sluttprodukt (Daskalova, 2019). Genereringen av ATP under anaerobe forhold avsluttes som et resultat av at glykogenreserven i muskelen er brukt opp, og som et resultat av akkumulering av melkesyre i muskulaturen (Hultin, 1984). Anaerob glykolyse produserer 2 mol ATP for hver mol glukose oksidert, mens aerob glykolyse med fullstendig oksidasjon (via glykolyse, krebs syklus og oksidativ fosforylering) av et mol glukose danner 36 mol ATP. Når det intracellulære ATP nivået synker til 1.0 µmol/g i vevet går muskelen inn i *rigor mortis* (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002; Huss, 1995).

Graden av *rigor mortis* blir påvirket av flere faktorer som fiskeart, temperatur og håndtering før slakting, fiskens biologiske status og temperatur på pre-rigor lagring (Le *et al.*, 2020). *Rigor mortis* inntreer raskere dersom muskelaktiviteten har vært sterk og langvarig like før død, eller om fisken har vært stresset. Dette er fordi fisken vil bruke opp ATP reservene raskere når den er i aktivitet og stresset, enn om den er rolig og ikke stresset. Fisken bør derfor bli behandlet skånsomt *pre mortem* for å ha en lengre *pre-rigor* tid samt svakere *rigor mortis*. Når fisken er i *rigor mortis* er den vanskeligere å prosessere, det er derfor ønskelig med en lang *pre-rigor* tid. Filetering kan bli utført både *pre-rigor* og *post rigor*. Dersom man har lang *pre-rigor* tid rekker man å gjennomføre behandling av fisken før *rigor mortis* inntreer, da slipper man å vente med prosesseringen til etter stivheten er borte. Det er lettere og mer fleksibelt å prosessere når fisken ikke er i *rigor mortis*. Når fisken er stiv og ubøyeleg kan muskelen få skader og kraftig spalting, og dermed får man også mindre utbytte. *Post rigor* fileten har ikke like god vannbindingsevne

som pre-rigor fileten, og man kan tape vekt under lagringstid, som også fører til redusert pris. *Pre-rigor* fileten har i tillegg lenger lagringstid enn post-rigor fileten (Rosnes *et al.*, 2003).

1.4.4 Vannbindingsevne

Vannbindingsevne er en kvalitetsindikator for matvarer. Vannbinding i fiskemuskel er et mål på dens evne til å holde på eget eller tilsatt vann. Vannbindingsevne vil påvirke teksturen og dermed kvalitetsopplevelsen av produktet (Olsson, Olsen, & Ofstad, 2003). Kjøttets evne eller manglende evne til å holde på vann som fersk eller bearbeidet produkt, vil vises igjen som saftig eller tørt kjøtt. Vannbinding blir påvirket av en rekke faktorer som pH, protein denaturering og muskellengde (Offer & Knight, 1988). Kvaliteten på fiskemuskel er høyst påvirket av vanninnhold og vannets fordeling inne i muskelen. Endringer i vannbindingsevne målt i torsk og laks er påvirket av mikrostrukturelle endringer og endringer i muskel-pH. Lav pH i fiskemuskel vil resultere i dårligere vannbindingsevne, men er nødvendigvis ikke eneste grunn til en redusert vannbindingsevne (Ofstad *et al.*, 1996; Olsson *et al.*, 2003; Rustad, 1992). Vanntapet kan skje under lagring og bearbeiding av produktet. Mengden vanntap avhenger ettersom hvilken type bearbeiding som utføres på produktet, for eksempel; drypptap, koketap eller tørketap. Vannbindingsevne kan bestemmes ved ulike metoder som pressing, sentrifugering, kapillarsuging, absorbering eller optiske metoder (Barbut, 1996).

Vannbinding blir regnet ut ved bruk av følgende ligninger (Roth *et al.*, 2010):

$$\text{WHC} = \left(\frac{W - \Delta W}{W} \right) * 100 \quad (\text{Ligning 1})$$

$$W = \frac{m_w}{m_w + m_D} \quad (\text{Ligning 2})$$

$$\Delta W = \left(\frac{\Delta m_w}{m_w + m_D} \right) * 100 \quad (\text{Ligning 3})$$

Hvor:

m_w er masse (g) vann i prøven.

m_D er masse (g) tørrstoff i prøven.

Δm_w er masse av væske separert fra prøven.

Tørketap blir regnet ut som endringen i vekt før og etter tørking av prøven (Roth *et al.*, 2010):

$$\text{Tørketap} = \frac{m_0 - m_x}{m_0} * 100\% \quad (\text{Ligning 4})$$

Der:

m_0 er prøvevekt ved start.

m_x er prøvevekt ved slutt.

1.4.5 Farge

Farge er en indikator på kvalitet. Sammen med lukt kan farge gi en indikator på kvalitet før andre analyser er utført. Farge styres av de kjemiske, biokjemiske, mikrobielle og fysiske endringene som skjer under vekst, modning, håndtering og bearbeiding etter høsting. Fargemåling er førstehåndsindikator fordi det er enklere og raskere enn andre kvalitetsegenskaper som for eksempel smak og tekstur (Pathare, Opara, & Al-Said, 2013). Sensorisk opplevelse av farge på et produkt er derfor en viktig faktor for om man ønsker å konsumere produktet.

Farge på fiskeskinn og fiskekjøtt er en god indikator på kvalitet og holdbarhet på mat, samtidig som farge kan være en indikator på velvære hos fisk. Kveitens muskel er hvit, og fargen på kjøttet endres fra blåaktig og kremfarget til en melket og gulaktig farge under lagring (Guillerm-Regost *et al.*, 2006). Dersom fisk utsettes for slag eller stress vil det hvite kjøttet få en rødlig farge, et slag vil kunne gi muskelen «blåmerker». Dersom fisken er stresset, etter for eksempel lengre tid med trenging, vil den bruke både de mørke og de hvite musklene. Da vil blod komme ut i de hvite musklene og farge det rødt, jo lenger fisken må bruke de hvite musklene, desto mer blod og derfor mørkere farge. Nøkkelen til hvit kjøtt er derfor å unngå at fisken stresser for lenge under for eksempel trenging (Boge, 2022).

CIEL*a*b* beskriver farge som sylindriske koordinater og fargeintensiteten blir beskrevet som lyshet, rød-grønn og gul-blå fargeskala. L^* forteller om lyshet, hvor $L^*=100$ er hvit og $L^*=0$ er svart. a^* beskriver fargeintensiteten i den rød-grønne fargeskalaen, hvor $a^* > 0$ er rød og $a^* < 0$ er grønn. b^* beskriver fargen i den gul-blå fargeskalaen, hvor $b^* > 0$ er gul og $b^* < 0$ er blå (Rotabakk, Bleie, Stien, & Roth, 2014). a^* og b^* eksisterer i området mellom -128 og +127, i midten ved $a^*=0$ og $b^*=0$ eksisterer bare grånyanser. CIEL*a*b* er basert på motstands-farge modellen, hvor farger som ligger overfor hverandre på begge sider av aksene, langs L^* og på a^*b^* , ikke kan sees samtidig. Enten så ses fargen som lys eller mørk, og enten som rød eller grønn, eller enten som gul eller blå (Mokrzycki & Tatol, 2011).

1.4.6 Tekstur

Tekstur er viktig for forbrukerens matopplevelse, tekstur som kvalitetsfaktor kan måles både fysisk og sensorisk. Riktig tekstur avhenger av produktet og dens mål. Fersk Atlantisk kveite har fast tekstur, et avvik fra dette vil ikke være ønskelig for forbrukeren. For at fisken skal ha fast tekstur må den behandles skånsomt gjennom hele slakteprosessen.

Det er flere faktorer som kan påvirke muskeltekstur, blant annet alder, størrelse, fettinnhold, bindevev og evne til å tolerere stress. For eksempel vil høyt fettinnhold kunne gi bløt tekstur. Endringer i tekstur og hardhet blir påvirket av individets vekstrate og størrelse, hardhet minsker i perioder med rask vekst, og øker jevnt med størrelse (Haugen *et al.*, 2006). Faktorer som kan påvirke tekstur *post mortem* er redusert pH i fiskemuskel og *rigor mortis*.

Sensorisk opplevelse av tekstur i en matvare kan avgjøre om forbrukeren ønsker å konsumere produktet. Sensorisk analyse av tekstur blir gjort som en del av Quality index measurement (QIM), hvor dommerpanel gir en sensorisk poengsum for tekstur ved å føle på produktet. Tekstur kan også bli målt som mekaniske egenskaper, som er en reproducerbar analyse med mer presise resultater. Måling av tekstur kan bli gjort med en sylindertest hvor en probe penetrerer overflaten av muskel under en gitt avstand, vekt og hastighet. Når proben bryter gjennom overflaten på produktet vil resultatet fortelle om hvor stor kraft (N) som må brukes. (Roth, Slinde, & Arildsen, 2006). Målingene blir gjort på samme sted på hver fileten, med muskelsegmentene i samme retning.

1.4.7 Filetspalting

Fiskemuskel er bygget opp av flere muskelsegmenter som er festet sammen med bindevev. Filetspalting er en tilstand hvor bindevevet mellom muskelsegmentene svikter, og det oppstår spalter mellom muskelsegmentene. Fiskemuskel av god kvalitet har ikke filetspalting, men har intakt bindevev og er fast i tekturen. Filetspalting fører til en bløt tekstur av fiskemuskel. Filetspalting er derfor en viktig kvalitetsparameter da forbruker ønsker en fast tekstur i det ferske fiskeproduktet, filetspalting kan dermed ha en negativ økonomisk konsekvens.

Ulike faktorer kan påvirke filetspalting, det er en sammenheng mellom muskelfiber størrelse, tekstur og grad av filetspalting. Sammensetningen av bindevev vil påvirke filetspalting, muskel

med mye bindevev vil ha en fastere tekstur enn muskel med lavt innhold av bindevev mellom muskelsegmentene. Fisk vokser ved hypertrofi (muskelfibre øker i størrelse) og hyperplasi (dannelse av nye muskelfibre). Laks har tynne muskelfibre og er dermed fastere, med en lavere grad av filetspalting. Hos kveite og regnbueørret vil nydannelse av muskelfibre variere gjennom året, og tekstur og filetspalting vil dermed være sesongbasert. Redusert fôring kan gi endringer i muskelstrukturen, det vil kunne gi en økt fasthet og redusert filetspalting. Redusert fôring gir redusert vekstrate, men dermed også en fastere og tettere binding mellom muskelsegmentene (Mørkøre, 2008). Grad av filetspalting bestemmes ut fra gitt tabell og en poengsum blir gitt etter hvor tett muskelsegmentene henger sammen (Andersen, Strømsnes, Steinsholt, & Thomassen, 1994).

1.4.8 Quality index measurement (QIM)

Sensoriske egenskaper i matvarer er med på å bestemme kundens opplevelse av produktet og dermed dens ønske om å konsumere produktet. Den sensoriske opplevelsen av ferskhet er viktig for kunden, kunden vil ikke ha fisk som verken ser eller lukter ferskt. Det hjelper ikke å ha fisk som holder seg under den mikrobielle grensen for konsumering, dersom fisken ikke oppleves fersk. Sensorisk holdbarhet er viktig for kunden og ferske produkter har en høy markedsverdi. Vi ønsker et fersk produkt som oppleves fersk, vi ønsker en fisk som er blank og fast i kjøttet, lukter fersk og er fast i tekturen. Fersk fisk vil være synlig dårlig når den har en dårlig lukt, dårlig smak, når den får innsunkne øyne og er slimete, dette er konsekvenser av høy bakteriell og enzymatisk aktivitet.

QIM er en analyse basert på objektive evalueringer av egenskaper som utseende, lukt og tekstur. De ulike kvalitetsparameterne får utdelt en sensorisk poengsum fra trent personell etter en gitt poengskala fra 0 – 3 (Tabell 1.1). Totalsummen fra analysen, kvalitetsindeksen, forteller om den sensoriske opplevelsen av ferskhet. QIM-analysen beregner dermed fiskens resterende holdbarhet ut fra disse gitte kvalitetsparameterne.

Tabell 1.1 QIM for Piggvar (*Scophthalmus maximus*), brukt på Atlantisk Kveite (QIM-Eurofish, 2001).

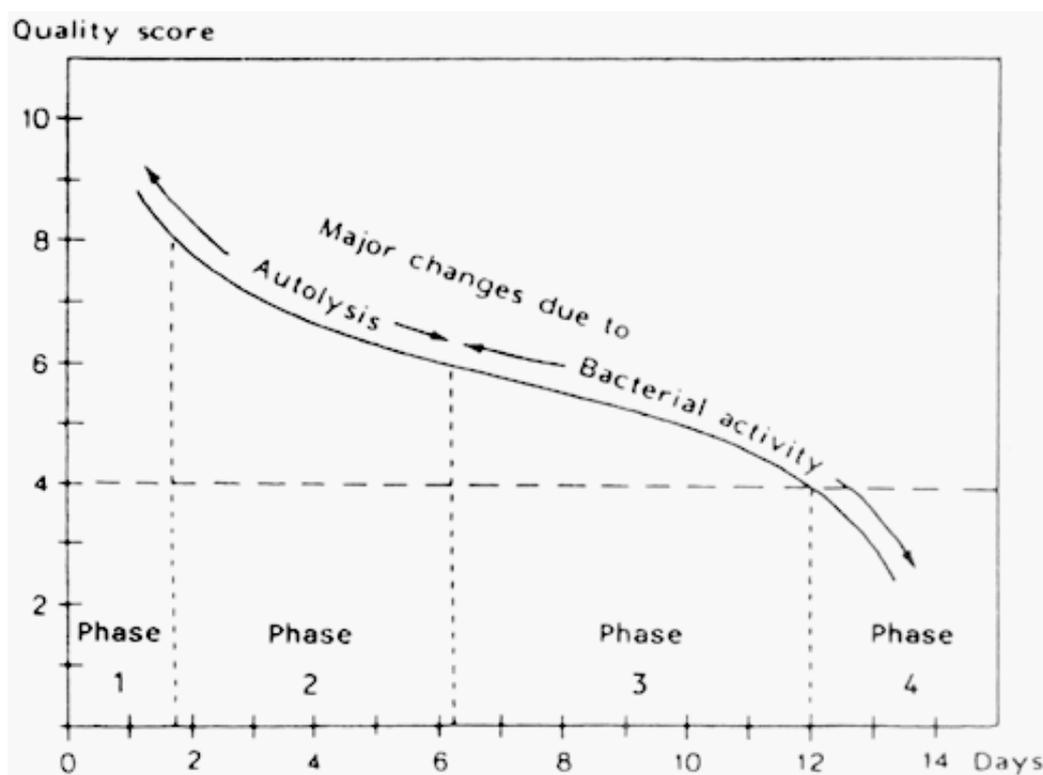
Kvalitetsparametere		beskrivelse av egenskaper	score
utseende	mørk skinnside	frisk, klar ingen misfarging	0
		litt kjedelig/ trist, blek, litt ørkere og sammentrukket skinn	1
		kjedelig/trist, blek, finnene er grønn-aktig og misfarget	2
		kjedelig/trist, grønn og rosa misfarging	3
	slim	klart, ikke sammenklumpet/ levret	0
		litt levret og melkeaktig	1
		levret / sammenklumpet og litt gulaktig	2
		gult, sammenklumpet, levret	3
	tekstur (bakside)	fast, elastisk (i rigor)	0
litt midre fast, elastisk		1	
myk		2	
veldig myk		3	
øyne	form	flate, øyehulen står utover	0
		litt sammensunket, øyehulen er innsunket	1
		sammensunket og/eller oppsvulmet, øyehulen innsunket	2
	klarhet	svarte, klare, gyllen ring /Rand rundt pupillen	0
litt matte, gyllen ring/rand mindre tydelig	1		
matte, rødlike /lilla	2		
gjeller	lukt	frisk, tang/tare -aktig	0
		nøytral , metalisk, gummi	1
		muggen, sur	2
		råtten, sur, svovel	3
	farge	klare, lyserød	0
		litt misfarget	1
		misfarget, lys brun	2
		gulaktig, grønn/blå, brune	3
	slim	ikke slim	0
klart, ikke sammenklumpet/ levret		1	
melkeaktig, litt sammenklumpet /levret		2	
gulaktig, tykt, sammenklumpet /levret		3	

1.5 Holdbarhet av fersk fisk

Holdbarhet kan defineres som tiden hvor produktet forblir trygt å konsumeres, samt beholder sensorisk, kjemisk, fysisk og mikrobiologiske egenskaper. Fersk fisk er sensitiv for spoling, og det er flere faktorer som spiller inn på holdbarheten; spoleringsbakterier, rekontaminering, art, sesong, og prosessering av produkt, men det viktigste av dem alle er lagringstemperaturen. Holdbarheten til fersk fisk avgjøres av bakteriell vekst, enzymatisk -og kjemisk aktivitet (Broekaert, Heyndrickx, Herman, Devlieghere, & Vlaemyneck, 2011; Kaale *et al.*, 2011; Reynisson, Lauzon, Magnusson, Hreggvidsson, & Marteinson, 2008). Spoleringsprosessen skjer fra og med slaktetidspunktet. Et estimat for kvalitet og holdbarhet av fersk fisk kan bli bestemt ut fra antall aerobe bakterier. Fisk med totalt aerobt kintall på under 10^6 colony-forming units/g er anses som ikke spolert. Metoder for påvisning av spesifikke spolerings mikroorganismer skal klare å identifisere så lite som 10^2 bakterier/g produkt for å være nyttige i prediksjon av holdbarhet (Gram & Dalgaard, 2002). Ved 10^7 - 10^8 CFU/g vil spoling bli

sensorisk påviselig (Liston, 1980), da vil den bakterielle veksten være identifiserbar som for eksempel misfarging av muskel, misfarging av slim og gjeller og dårlig lukt. Hovedårsaken til spolering av mat er dannelsen av aminer, sulfider, alkoholer, aldehyder, ketoner og organiske syrer med ubehagelige og uakseptable bismak og lukt (Gram & Dalgaard, 2002).

Spolering av fersk fisk lagret på is er delt inn i fire faser, som vist i Figur 1.1. Fase en er når fisken er fra null til to dager gammel, da er fisken helt fersk, og den har delikat smak og tekstur. Fase to er fra to til seks dager, da skjer det et tap av lukt og smak, men kjøttet forblir nøytralt og har ingen bismak. Teksturen er fortsatt fin i denne fasen. Fase en og to har lite mikrobiell vekst, og forringelsen avhenger av biokjemiske prosesser som enzymatisk nedbrytning. Fra dag seks til tolv er fisken i fase tre, her øker bakteriell vekst og fisken begynner å bli dårlig. I løpet av denne fasen får fisken vond lukt og bismak, teksturen blir enten myk og vannaktig eller seig og tørr. Den siste og fjerde fasen er fra dag tolv og utover, da kan fisken kategoriseres som spolert (Huss, 1995).



Figur 1.1 Graf hentet fra (Huss & Asenjo, 1976). Endring i kvalitet score over fire faser. Kvalitetsskala fra 0 til 10, hvor 10 indikerer absolutt friskhet, 8 er god kvalitet, 6 er nøytral, og ved nivå 4 er den spolert (Huss & Asenjo, 1976).

Mikrobiell vekst er den største faktoren som reduserer holdbarhet og kvalitet av ferske produkter. For å redusere spoling av produktet kan man bruke ulike conserveringsmetoder, og da i hovedsak basert på lave temperaturer (Kaale *et al.*, 2011). Minimumstemperatur for oppbevaring av fersk fisk er ved 0 °C. Is er et godt alternativ for kjøling av fisk, både for å redusere temperatur og for å beholde temperaturen lav. Frossen mat har holdbarhet på flere måneder eller opp til flere år, mens ferske produkter har en holdbarhet på noen dager til noen uker. Holdbarheten til superkjølt mat er kortere enn frossen mat, men lenger enn fersk mat (Duun, 2008). En forutsetning for salg av kjølte fiskeprodukter er evnen til å forutsi holdbarheten til produktet under de lagringsforholdene produktet er utsatt for. Formel 5 gir et estimat på hvordan lagringstemperatur påvirker den relative raten av spoling på fersk fisk, og dermed et estimat på produktets holdbarhet (Storey, 1985).

$$\sqrt{RELATIVE\ RATE\ OF\ SPOILAGE} = 0.1 \times temp\ e(celsius) + 1 \quad (\text{Ligning 5})$$

Når temperaturen reduseres, reduseres også reaksjonshastigheten i biokjemiske reaksjoner og den mikrobielle veksten, det betyr at spoling av fersk fisk går saktere og man får lengre kvalitetstid. Redusert temperatur i fase en av spoling vil derfor bremse hele spoleringsprosessen.

1.6 Bakterier på fersk fisk

Det mikrobiologiske mangfoldet på fersk fisk og sjømat reflekterer det miljøet den kommer fra (Jay, Loessner, & Golden, 2005). Biomassen i havet består av omlag 70 % mikroorganismer, en blanding av mikroorganismer som både er avgjørende for næringscyklusen og for et friskt hav, samtidig som det er potensielt patogene bakterier (Havforskningsinstituttet, 2020). Sjøvann og marine sedimenter har høye nivåer av mikroorganismer, det er rapportert mellom 10^4 og 10^9 celler/mL (Austin, 1988). Det mikrobiologiske mangfoldet speiler også fiskens tarm og mage, gjeller og ytre slim og skinn. Det bakterielle mangfoldet på fersk fisk -og sjømat kan også påvirkes av rekontaminering fra håndtering og prosessering av produktet (Reynisson *et al.*, 2008). Den indre muskelen i fersk fisk er steril.

Normalfloraen hos fisk består av en rekke ulike mikroorganismer, noen er en del av fiskens ytre immunforsvar, samtidig som noen av bakteriene er spesifikke spoleringsorganismer. Normalfloraen beskytter fisk mot sykdommer mens en unormal bakterieflora kan føre til sykdommer. Kolonisering av ikke-patogene bakterier ved et tidlig tidspunkt, er

avgjørende for utvikling av et normal mikrobielt samfunn som beskytter mot patogene bakterier (Gatesoupe, 1999). Ulike bakterier har ulike krav til miljøet og derfor vil ikke en lavere mengde bakterier nødvendigvis bety lavere mengde sykdomsfremkallende bakterier, da de sykdomsfremkallende bakteriene kan dra god nytte av forholdene. Bakterier som er sykdomsfremkallende hos fisk er ikke nødvendigvis patogene for mennesker. *Post mortem* vil immunforsvaret stoppe opp og bakterier kan trenge inn i fisken.

Spoleringsbakterier er tilstede i lave tall og utgjør en liten del av mikrofloraen på nylig høstet sjømat (Gram & Dalgaard, 2002). Normalfloraen på fisk fra kalde områder domineres av Gram negative bakterier fra slektene *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Vibrionaceae*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Photobacterium phosphoreum* og *Aeromonas* (Liston, 1980). Gram positive bakterier fra slektene *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, og *Corynebacterium* kan også bli funnet i ulike mengder (Liston, 1980).

Ulik behandling og lagringstid vil påvirke hvilke bakterier som blir de mest dominerende i produktet. Under lagring vil den mikrobielle floraen endres ut fra hvilke egenskaper mikroorganismen har til å tolerere conserveringsforholdene. Gram negative fermentative bakterier som *Vibrionaceae* ødelegger ukonservert fisk, psykrotolerante Gram negative bakterier som *Pseudomonas ssp.* og *Shewanella ssp.* vokser på kjølt fisk (Gram & Huss, 2000). *Photobacterium phosphoreum* og melkesyrebakterier vokser i produkter pakket med CO₂ (Dalgaard, 2000). Tørring og kraftig tørrsalting av fisk eliminerer bakterievekst og disse produktene kan ødelegges av sopp eller insekter. Mild varmebehandling på usaltet fisk tillater vekst av sporedannende bakterier som *Clostridium* eller *Bacillus* (Ben, 1994).

Det er utført få analyser av normalflora på voksen kveite, men det er utført en del analyser av normalflora på kveitelarver. Bakterier bestemt etter dyrking av homogeniserte larver er arter av *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Flexibacter*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Deleya*, *Marinomonas*, *Halomonas* og *Photobacterium* (Bergh, 1995; Bolinches & Egidius, 1987; Hansen & Olafsen, 1999; Jensen, Bergh, Enger & Hjeltnes, 2002; Verner-Jeffreys, Shields, Bricknell, & Birkbeck, 2003). Fermentative arter av *Vibrio* ble funnet etter start av fôring av fisken. Studienes analyser av kveitens mikrobielle samfunn indikerte at kveitelarver har en distinkt og spesifikk normalflora (Jensen et al., 2004).

1.7 Formålet med studien

Formålet med denne studien var å undersøke om man kan forbedre kvalitet og holdbarhet i oppdrettskveite, ved å ivareta fiskevelferd og kjølekjeden med superkjøling.

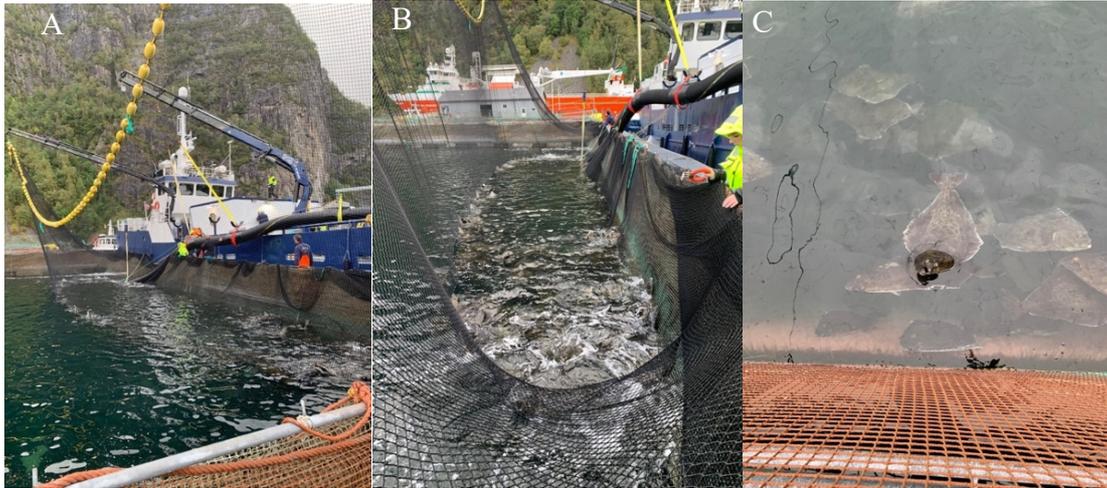
Hypoteser for prosjektet er:

1. Superkjøling vil øke holdbarheten til kveite.
2. Det er forskjell i holdbarheten til superkjølt fisk som ble pakket på is og den som ikke ble pakket på is.
3. Det er mulig å kutte ut is under transport av superkjølt kveite.
4. Stress eksponering vil påvirke kvalitetsfaktorer som farge, tekstur, pH, gaping, tørketap, vannbinding og *rigor mortis*.

2. Material og metode

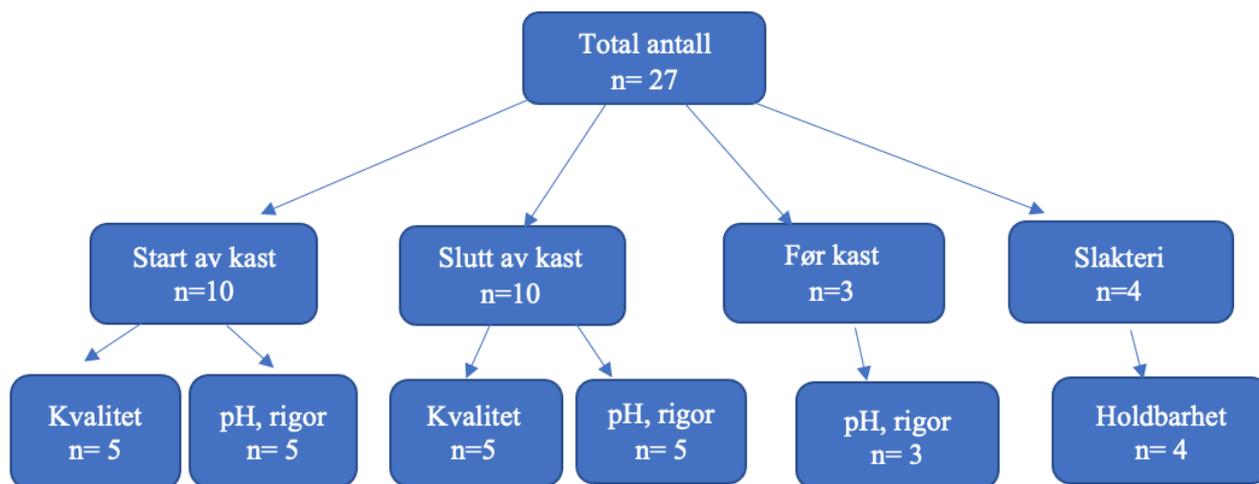
2.1 Forsøksdesign

Dette forsøket bestod av holdbarhet -og kvalitetsanalyser av Atlantisk kveite (*Hippoglossus hippoglossus L.*). Kveiten ble hentet ved oppdrettsanlegget til Sterling White Halibut AS i Tøtlandsvik, Hjelmeland, som er en del av Boknafjorden (Figur 2.1). Kveiten har en størrelse på 4.47 ± 0.74 kg.



Figur 2.1. A,B – henting av oppdrettskveite fra merd. C – Kveiter i merd.

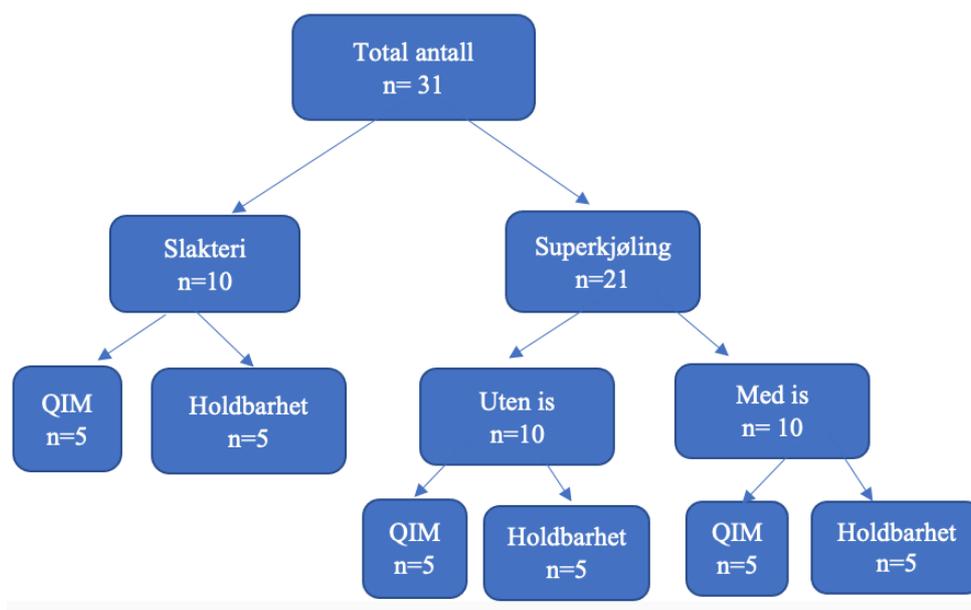
Første uttak av kveite var 21.09.2021, det ble hentet 23 kveiter på lokaliteten. Tre av kveitene ble hentet opp fra merden før trenging. Ti kveiter ble så hentet ut fra starten av trenging (første 10 min), og deretter ble ti kveiter hentet ut fra slutten av trenging (siste 30 – 45 min). Fisken ble drept med slag mot hodet og bløgget i sjøvann før de ble pakket i plastkasser med is. Kveitene ble fraktet til Nofimas lokaler i Stavanger, hvor de ble brukt til diverse kvalitetsanalyser; måling av pH, *rigor mortis*, vannbinding, tørketap, farge og tekstur. Til de mikrobiologiske undersøkelsene ble det hentet fire kveiter direkte fra slakteriet, disse kveitene hadde blitt fraktet med bløggebåt fra lokaliteten til slakteriet. På slakteriet ble de sløyet og pakket i isoporkasser med is. Kveitene ble hentet med bil og fraktet til Nofimas lokaler, hvor de så ble oppbevart på kjølerom ved 0 °C (Figur 2.2).



Figur 2.2. Oversikt over første uttak og de ulike analysene utført på fisken.

Andre uttak av kveite var 2.11.2021, det ble hentet ut 21 fisk på lokaliteten. Disse ble superkjølt ved å legge de i et kar med 3.5 % saltlake og saltvanns-isbiter. Fisken ble nedkjølt i et døgn, til kjernetemperaturen var ved $-1.2 / -1.4$ °C. Fisken ble så delt i to grupper; fisken i den ene gruppen ble pakket i kasser med is (SI) og den andre gruppen ble pakket ned i kasser uten is (S). Kassene med fisk ble satt på kjølerom ved 4 °C i et døgn.

Det ble i tillegg hentet ti kveiter på slakteriet som var sløyd og lå i kasser på is. All fisk ble så satt på kjølerom ved 0 °C for videre oppbevaring. Fem fisk av hver av de tre gruppene ble brukt til mikrobiologiske analyser, og resterende fem fisk fra hver gruppe brukt til QIM analyse (Figur 2.3).



Figur 2.3 Oversikt over andre uttak og de ulike analysene utført på fisken.

Det ble under andre uttak plassert ut temperaturloggere i fisken for å kontrollere kjølekjeden fra bløggébåten og til fisken var ferdig slaktet og lagt på is. Loggeren ble festet til fisken slik at den måler innvendig temperatur og temperatur i omgivelser (Figur 2.4).



Figur 2.4. Temperaturlogger i kveiten.

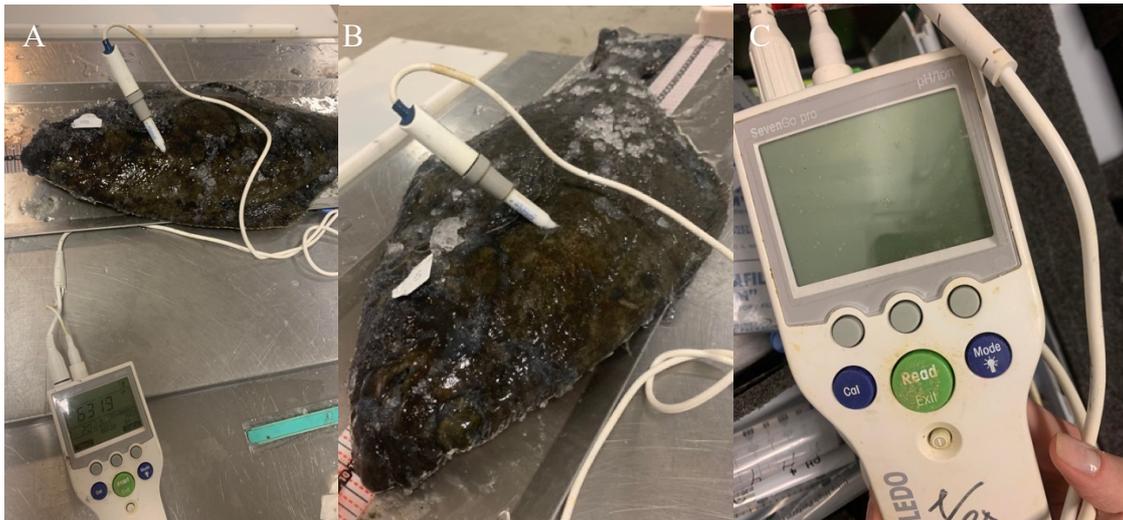
2.2 Metode

2.2.1 Blodmålinger

Blodprøver ble tatt fra kveitens caudal vene (Foss *et al.*, 2009), fra kontrollfisk (n= 10), fisk hentet etter tidlig trenging (n= 14) og sen trenging (n=17). Blodprøvene ble fraktet på is til Akvaplan-niva i Bergen, hvor mengde Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, kortisol og pH ble målt.

2.2.2 pH

pH i fiskemuskelen ble målt ved bruk av Mettler Toledo SevenGo proTM pH/ion meter med stikk elektrode (Mettler Toledo INC, Schwerzenbach, Sveits) (Figur 2.5). Skalpell ble brukt for å lage et snitt i skinnet, og pH-metret ble ført inn i den dorsale muskelen ved den fremre pectorale finnen (Roth *et al.*, 2012), nytt snitt ble lagd på ny plassering for hver gang slik at pH ble målt i fersk muskel. Målingene ble gjort ved tid 0, 6, 12, 24, 36 og 48 timer *post mortem*.



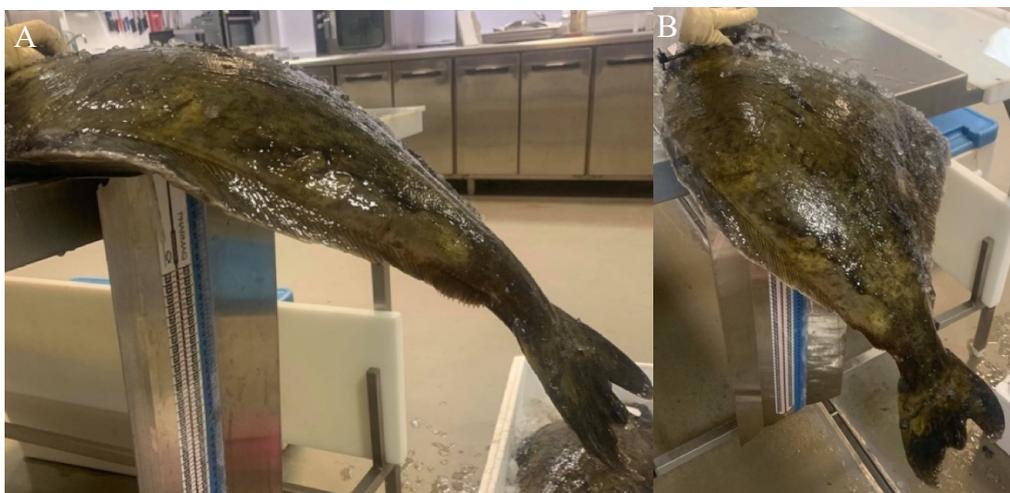
Figur 2.5. Kveite og pH-meter

2.2.3 Rigor mortis

Cuttingers metode (tail drop) ble brukt for måling av *rigor mortis* (Roth *et al.*, 2006). Målingene ble gjort 0, 6, 12, 24, 36, 48 og 78 timer etter *post mortem*. Fiskens lengde måles og halveres, fisken ble så lagt på rigor-bordet med halve lengden og halen hengende ned over kanten på bordet. Ned fra bordet hang en plate med målebånd med oppmålte centimeter (Figur 2.6). Hvor langt halen hang ned ble målt ved bruk av målebåndet og rigor indeks utregnet. Rigor indeks oppgis i 0-100 % og bestemmes ved bruk av følgende ligning:

$$\text{Rigor indeks (\%)} = \left(\frac{X_0 - X}{X_0} \right) \cdot 100 \% \quad (\text{Ligning 6})$$

X_0 er halefallet ved starten av eksperimentet, X er halefall målt under eksperimentet (Roth *et al.*, 2006).

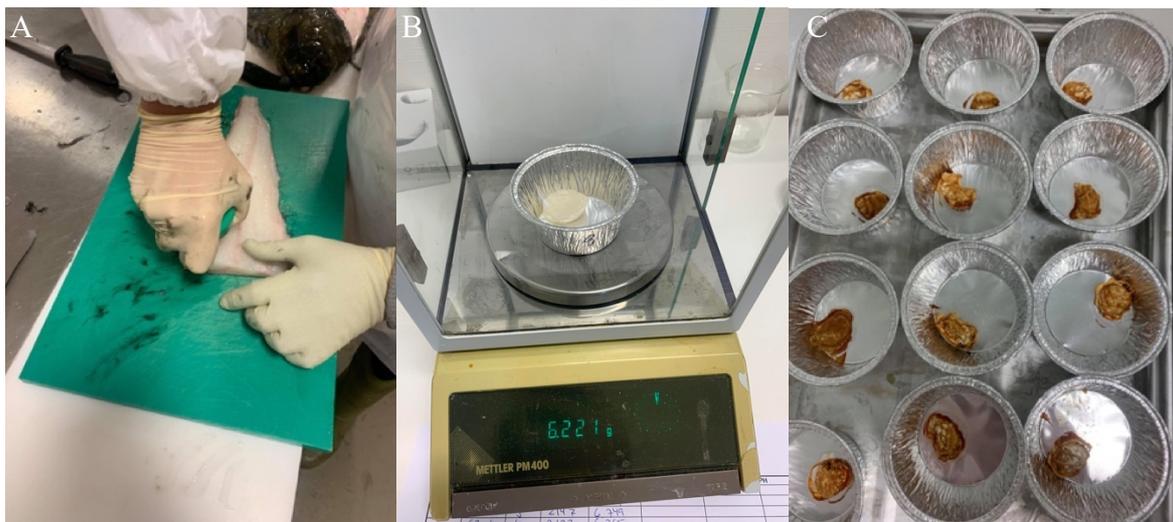


Figur 2.6. Måling av *rigor mortis* ved bruk av cuttingers metode.

2.2.4 Vannbinding (WHC) og tørketap

Analyse av vannbindingsevne og tørketap ble utført 10 dager *post mortem*, analysen ble målt i prøver hentet fra dorsal muskelen. Fisken ble filetert og fra fileten ble det skjært ut runde prøver som ble oppbevart på is. Det ble tatt ut to paralleller av hver fillet, hvor hver prøve igjen ble delt i to. Prøvene (n= 40) var ca. 5 g, og hadde diameter 31 mm og 6 mm høyde. To paralleller fra hver fisk ble sentrifugert og to paralleller ble tørket i varmeskap.

For måling av vannbinding ble prøven (n=20) lagt i en sentrifugekopp med filter og veid, deretter ble den sentrifugert (Rotina 420R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tyskland) ved 4 °C, 1800 rpm i 15 min. Vannet fra sentrifugeringen ble blåst bort / tørket bort før prøven ble veid på ny. Resten av prøvene (n=20) ble brukt til måling av mengde tørrstoff i prøven. For beregning av tørketap ble muskelprøvene veid og deretter tørket i varmeskap ved 105 °C i 70 timer før de ble veid på ny (Figur 2.7). Tørketap og vannbindingsevne ble regnet ut ved bruk av Ligning 1, 2, 3 og 4 (Roth *et al.*, 2010).



Figur 2.7. A – uthenting av prøve. B – veiing av prøve i aluminiumskopp. C – Prøvene etter 70 timer i varmeskap ved 105 °C.

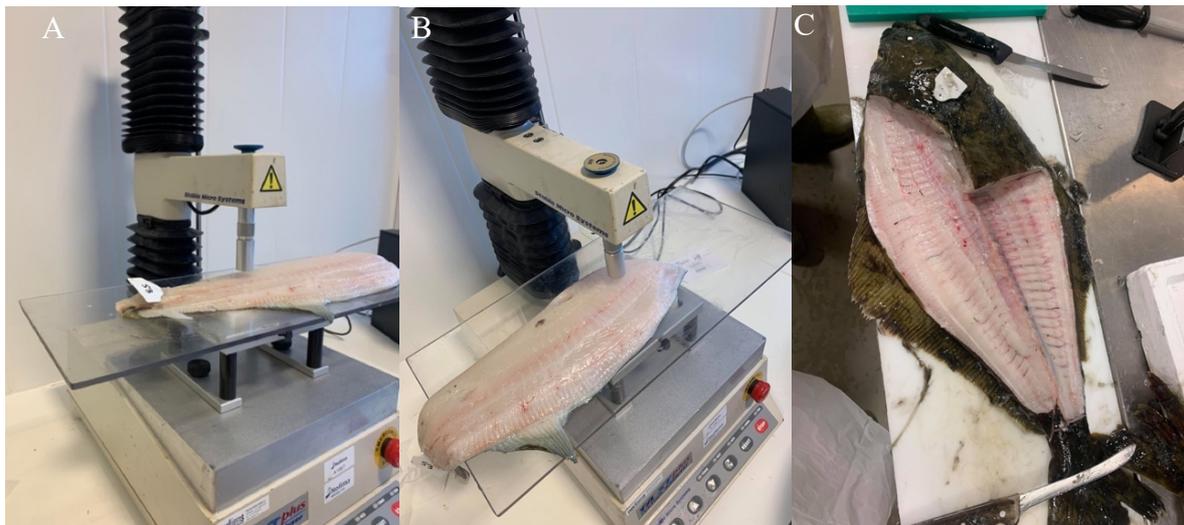
2.2.5 Farge

Fileter av kveite (n=10) ble analysert for fargevariasjoner mellom fisk før og etter stresseksposering. Farge på kveitefileten ble målt som CIEL*a*b* ved bruk av DigiEye™ (VeriVide Ltd., Leicester, U.K.) (Roth *et al.*, 2010). Systemet består av en Daylight box (6400K), Nikon kamera og Nikkor Lense (Nikon D90, AF Nikkor 35mm f/2D, Nikon, Japan). DigiEye systemet ble kalibrert ved bruk av et hvitt og et farget kalibreringsbrett

(DigiTizer Calibration Pack, VeriVide Ltd., Leicester U.K.). Fiskefileten ble lagt inn i daylight box'en og tatt bilde av, dataene ble så analysert av bildebehandlingsprogramvaren DigiPix (VeriVide Ltd., Leicester, UK).

2.2.6 Tekstur

Tekstur i form av hardhet og bruddkraft i kveitefilet (n=10) ble analysert ved bruk av TA.XT plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., UK), med 25 kg last celle og en flat-endet sylinder probe med 20 mm diameter (P/20) (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, U.K.). Penetrasjonsdybden ble satt til 60 % av filet høyde, med en hastighet på 1 mm/s (Haugen *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 2014). Analysen ble utført på to sted på fileten, det ble passet på at proben ikke ble plassert over sidelinjeorganet (lateral line) (Figur 2.8 A,B). Analysen ble utført 10 dager *post mortem*, på kontrollfisk (n=5) og fisk eksponert for stress (n=5). Teksturmålingene ble målt i newton (N) og resultatene ble automatisk overført til programvaren *Exponent connect software* (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, U.K.).



Figur 2.8. A og B – Kveitefilet og TA.XT plus Texture Analyzer. C – kveite med fileter utskåret, den epaksiale fileten ble brukt til tekstur -og fargemåling, den hypaksiale fileten ble brukt til vannbinding og tørketap.

2.2.7 Filetspalting

Undersøkelse av filetspalting ble utført dag 10 *post mortem* på kontrollfisk (n=5) og fisk eksponert for stress i form av trenging (n=5), filetspalting score ble gitt ifølge størrelse og nummer av spalter, i henhold til Tabell 2.1.

Tabell 2.1 Andersen Metoden for bestemmelse av filetspalting (Andersen *et al.*, 1994).

Poeng	Kriterier
0	Ingen spalting
1	< 5 små spalter (< 2 cm)
2	< 10 små spalter
3	> 10 små spalter, eventuelt noen store (> 2 cm)
4	Mange store spalter
5	Ekstrem spalting

2.2.8 Mikrobiologisk analyse av holdbarhet

I pilotforsøket ble 4 fisk hentet fra slakteriet, og i hovedforsøket ble det brukt 15 fisk, 5 hentet på slakteriet i tillegg til 10 superkjølte fisk (Tabell 2.2). Det første prøveuttaket ble utført dag 3 *post mortem*, deretter igjen dag 7, 14, 21 og 28 under pilotforsøket, under hovedforsøket ble det i tillegg utført et prøveuttak ved dag 35 for den superkjølte fisken. Figur 2.9 viser superkjølt fisk og kontrollfisk ved dag 3, før første uttak ble utført.

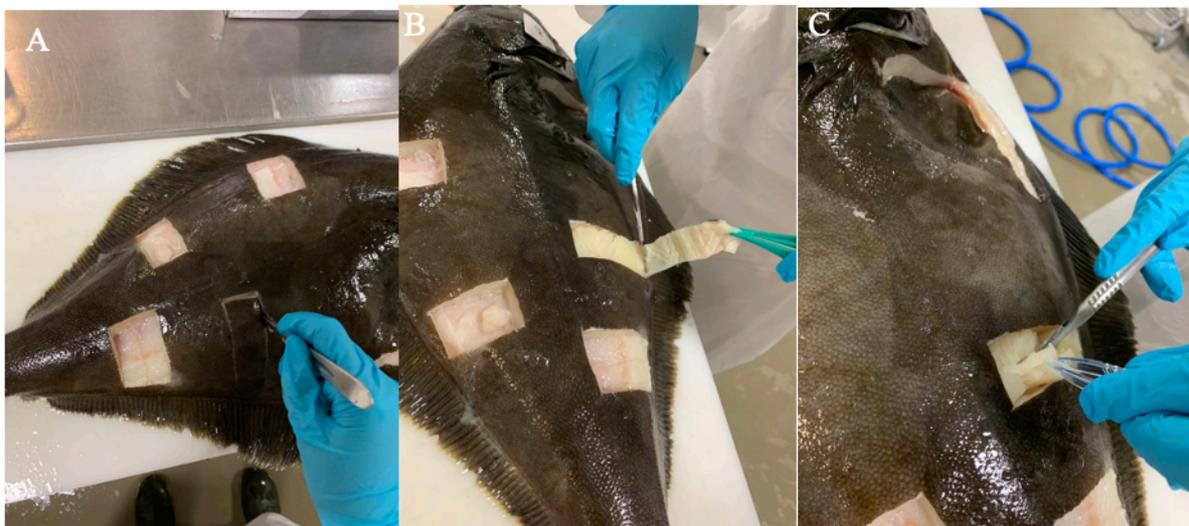
Tabell 2.2. Forsøksdesign av mikrobiologisk analyse

Forsøk	Antall fisk	Gruppe
Pilotforsøk	4	Kontrollfisk fra slakteri
Hovedforsøk	15	5 kontrollfisk (C) 5 superkjølte med is (SI) 5 superkjølte uten is (S)

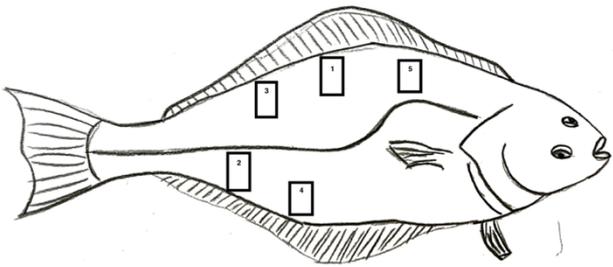


Figur 2.9. Oppdrettskveite ved dag 3 *post mortem*, A,B – superkjølt fisk, C- kontrollfisk

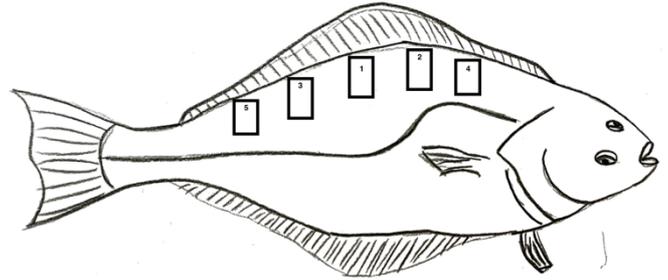
10 ± 1 g fiskemuskel uten skinn ble skjært ut av dorsal muskelen med steril teknikk (Figur 2.10). Plassering av hvor prøveuttak ble utført vises i Figur 2.11 og 2.12. Fiskemuskelen ble lagt i en Stomacher pose med filter og veid, deretter ble det tilsatt 90 g Sterilt bufret peptonvann (Merck, Tyskland). Prøvene ble homogenisert ved bruk av Smasher® Stomacher (AES Laboratorie bioMérieux Industry, USA) i 120 s.



Figur 2.10 A, B og C – Viser hvordan og hvor muskelprøven ble hentet ut med sterilteknikk.



Figur 2.11 viser hvor prøvene ble hentet ut av kveiten under pilotforsøket.



Figur 2.12 viser hvor prøvene ble hentet ut av kveiten under hovedforsøket.

Homogenatet ble deretter flyttet over i sterile sentrifugerør 15 mL (Sarstedt AG & Co, Tyskland) (Figur 2.13 A) og deretter fortynnet til ønsket fortynning ved bruk av sterilt Milli-Q[®] vann (Sigma-Aldrich, USA).

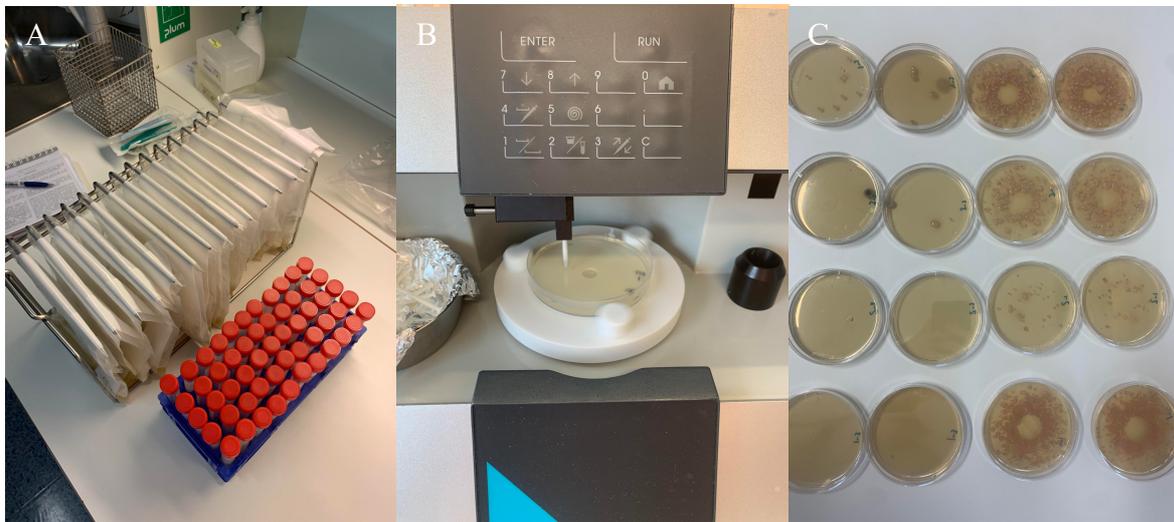
Det ble brukt 3 ulike agar medium for utsåing av prøvene, plate count agar (PCA, Merck, Tyskland), Long and Hammer (L&H) og jernagar (JA). Metoden NMKL 184 ble brukt for tillaging av L&H og JA. Prøvene ble så utsådd på de ulike agarskålene for bestemmelse av kimtall og spesifikke fordervelsesbakterier i fisk.

Eddy Jet 2 W Spiral Plater (IUL micro, Spain) ble brukt til utsåing av 49.2 μ L prøve på skåler med L&H agar og PCA agar, 2 fortynninger ble sådd ut, med 2 paralleller per fortynning (Figur 2.13 B). Skålene ble liggende uten lokk til de var tørket, før de ble pakket inn i plast og lagt i inkubatorskap. L&H skålene ble inkubert ved 15 °C i 5-7 døgn. PCA skålene ble inkubert ved 8 °C i 7 døgn (Figur 2.13 C).

JA (Lyngby, Oxoid Ltd., England) skålene ble tillaget ved å helle 1 mL prøve i petriskålene, så ble JA med tilsatt 0.04 % L-cysteine (Merck, Tyskland) ved temperatur på 45 °C ble helt i petriskålen til den var ½ full. Skålen ble så rotert i sirkel 8 ganger til høyre, og 8 ganger til venstre for å blande prøven inn i agaren. Når agaren hadde stivnet ble det helt et tynt lag med agar over som et lokk, når agaren hadde stivnet ble den også pakket inn i plast og plassert i inkubatorskap. JA skålene ble inkubert i 72 ± 6 timer ved 25 °C.

Etter inkubering i varmeskap ble alle koloniene telt, på JA skålene ble de hvite og de svarte koloniene telt hver for seg. Total aerobt mesofilt kimtall ble estimert fra det totale antall hvite og svarte kolonier, mens kun de svarte koloniene ble brukt for estimering av H₂S-produserende

bakterietall. PCA (Merck, Tyskland) og L&H skålene ble telt. Resultatene fra dyrking ble så notert og CFU/g bestemt.



Figur 2.13 A – Stomacherposer og sterile rør brukt til tillaging av fortynninger. B – Eddy Jet 2 W Spiral Plater med petriskål. C – Resultat etter 7 dagers inkubering av prøven på L&H-agar.

2.2.9 Filterbasert DNA ekstraksjon av skinnprøver

Filterbasert DNA ekstraksjon ble utført ved bruk av repeated bead beating plus column (RBB) metoden (Yu & Morrison, 2004) som modifisert av (Salonen *et al.*, 2010) og ved bruk av DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Tyskland). I sammenheng med uthenting av prøver for mikrobiologisk analyse ble det tatt ut skinnprøver fra første og siste uttak. For gruppe C ble skinnprøve tatt ut ved dag 3 og 28. For den superkjølte fisken, S og SI, ble prøveuttaket utført ved dag 3 og 35. Skinnen ble oppbevart i fryseskap ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i sterile 50 mL rør (Sarstedt AG & Co, Tyskland). Skinnprøvene ($n=30$) ble tint ved romtemperatur og 0.5 g prøve ble skjært ut med steril teknikk. Skinnprøven ble plassert i en Lysing Matrix E tube som inneholdt 1.4 mm keramiske kuler, 0.1 mm silikakuler og en 4 mm glassperle (MP Biomedicals, USA). Det ble tilsatt 1 mL lysis buffer (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM EDTA og 4 % SDS) sammen med prøven. Prøven ble homogenisert ved bruk av FastPrep-24™ Classic (MP Biomedicals, USA) i 3×1 min ved hastighet 6.5 m/s. Prøven ble lagt på is i 1 min mellom hver risting. Prøven ble så inkubert ved $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 15 min, og ristet forsiktig for hånd hvert 5 min. Prøven ble sentrifugert i 5 min på $16\ 000 \times g$ ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, deretter ble supernatanten overført til et 2 mL eppendorfrør. Det ble så tilsatt 300 μL lysis buffer til Lysing Matrix E tuben. Prøven ble homogenisert i nye 3×1 min, deretter inkubert ved $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 15 min, og til slutt sentrifugert i nye 5 min på $16\ 000 \times g$ ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatanten fra prøven ble samlet, 350 μL 7.7 M

ammoniumacetat ble tilsatt og løsningen blandet med vortex. Prøven ble så inkubert på is i 5 min. Etter inkubasjon ble prøven sentrifugert i 10 min ved $16\,000 \times g$ og $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Supernatanten ble fordelt i to 1.5 mL eppendorfrør, det ble så tilsatt 1:1 med iskald isopropanol. Prøvene ble blandet godt og inkubert på is i 30 min. Prøvene ble så sentrifugert i 15 min ved $16\,000 \times g$ ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatanten ble fjernet, og pelleten vasket med 500 μL 70 % etanol før den ble sentrifugert i 15 min, $16\,000 \times g$ ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pelleten ble så lufttørket. Pelleten ble resuspendert i 100 μL TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA), de to parallellene av prøver ble samlet i et eppendorfrør.

Resten av DNA ekstraksjonsprosedyren ble utført med DNeasy Blood & Tissue kit, til prøven ble det tilsatt 25 μL proteinase K og 200 μL Buffer AL, løsningen ble blandet med vortex. Prøven ble så inkubert i 30 min ved $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ og deretter i 5 min ved $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Det ble tilsatt 200 μL 96-100 % etanol til prøven og prøven ble igjen blandet ved bruk av vortex. En DNeasy mini spinn kolonne ble plassert i et 2 mL oppsamlingsrør, prøven med bunnfall ble så overført til mini spinn kolonnen. Prøven ble så sentrifugert ved $6200 \times g$ i 1 min. Gjennomløp og oppsamlingsrøret ble kastet. DNeasy mini spinn kolonnen ble plassert i et nytt 2 mL oppsamlingsrør, og tilsatt 500 μL Buffer AW1. Prøven ble deretter sentrifugert ved $6000 \times g$ i 1 min.

Mini spinn kolonnen ble plassert i et nytt 2 mL oppsamlingsrør og tilsatt 500 μL Buffer AW2, og sentrifugert i 3 min ved $17\,000 \times g$. Gjennomløp og oppsamlingsrør ble kastet. Det ble sørget for at etanol ikke ble overført til neste trinn. DNeasy mini spinn kolonnen ble plassert i et 1.5 mL Eppendorfrør og 100 μL elueringsbuffer ble pipettert direkte på DNeasy membranen. Prøven ble inkubert ved romtemperatur i 1 min, og så sentrifugert ved $6000 \times g$ i 1 min for eluering av DNAet.

Ved bruk av NanoDrop spektrofotometer 1.6.1 (Implen, AH Diagnostics, Danmark) ble prøvens DNA konsentrasjon og kvalitet undersøkt. Ferdig rensset DNA ble oppbevart i frys ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.10 Filterbasert DNA-ekstraksjon av *Pseudomonas ssp*

Pseudomonas putida, *Pseudomonas fluorescens* og *Pseudomonas aruginosa* ble dyrket som rene bakteriekulturer i 50 mL TSBYE Broth (0.6 % gjær), bakteriekulturene ble inkubert ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i en risteinkubator, 150 rpm i et døgn. Det ble tilsatt 500 μL bakteriekultur til et 2 mL eppendorfrør og sentrifugert ved $17\,000 \times g$ i 10 min. Pelleten ble så resuspendert i 100 μL

sterilt vann og plassert i et Lysing Matrix E tube (MP Biomedicals, USA). Videre prosess for DNA ekstrahering av *Pseudomonas ssp.* ble utført på samme måte som ved skinnprøver (kapittel 4.2.9). Det ferdig rensede DNAet ble deretter fortynnet i en 10x fortynningsserie og brukt som standardkurve for videre qPCR analyse.

Den samme blandingen som ble brukt for DNA ekstraksjon, ble fortynnet og platet ut på TSAYE agar (0.6 % gjær), for bestemmelse av konsentrasjon. 49.2 μ L bakteriekultur ble platet ut ved bruk av Eddy Jet V. 1.23 W Spiral Plater (IUL micro, Spain), agarskålene ble inkubert ved 30 °C i et døgn.

2.2.11 Real-time PCR analyse

qPCR analyse ble utført for deteksjon av total antall bakterier, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Pseudomonas ssp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactococcus lactis*, *Shewanella putrefaciens*, *Vibrio ssp.* og *Photobactreium phosphoreum* i skinnprøver fra kveite.

Det ble plukket ut 24 prøver (DNA eluat), fire paralleller fra hver gruppe. DNA prøvene ble fortynnet til 10 ng/ μ L med sterilt vann for å klargjøres til PCR-analyse. PCR-analyse av DNA eluatet ble utført på rent rom beregnet for PCR. Standardkurve, og Master Mix ble klargjort for hver enkelt analyse. DNA prøvene ble tatt ut av frys, tint ved romtemperatur og satt på is. Reaksjonsblandinger ble så tillaget til hver enkelt analyse, nok til to paralleller av negativ kontroll, standardkurve og prøvene. Reaksjonsblanding vises i Tabell 2.3 og 2.4. Spesifikke TaqManTM primere og prober, og SYBR Green primere er designet, syntetisert og ferdigblandet av PrimerDesign Ltd., Southampton, U.K. 15 μ L reaksjonsblanding og 5 μ L prøve ble tilsatt i hver brønn. For total antall bakterier, *C. maltaromaticum*, *L. lactis*, *S. putrefaciens*, *P. aeruginosa* og *P. phosphoreum* ble det brukt TaqManTM Universal PCR Master Mix (Applied BiosystemsTM, USA). For *Vibrio ssp* og *Pseudomonas ssp* ble det brukt SYBRTM Select Master Mix (Applied BiosystemsTM, USA). PCR-brettet ble sentrifugert ved 400 \times g i 2 min.

Tabell 2.3 Reaksjonsblanding ved bruk av TaqManTM Master Mix

Komponent	Volum per reaksjon (μ L)
Master mix	10
Spesifikk Primer/probe mix	1
RNase/DNase fritt vann	4
Totalt volum	15

Tabell 2.4 Reaksjonsblanding for *Pseudomonas ssp.* ved bruk av SYBR Green Master Mix

Komponent	Volum per reaksjon (μL)
MasterMix	10
Fremre primer	0.4
Revers primer	0.4
RNase/DNase fritt vann	4.2
Totalt volum	15

Tabell 2.5 Primer assay for qPCR

Assay	Target (accession no)	Fremre primer (5'-3')	Revers primer (5'-3')	Probe (5'-3')	Referanse
Total antall bakterier	NA	Trade secret	Trade secret	Trade secret	Kommersielt tilgjengelig (PrimerDesign)
<i>C. maltaromaticum</i>	SodA (AM490329)	GTGAGGTTAAAGACGCTATTGAC	GCTAATTTGCCACCATCTAAAACCT	ACCAAGCCCAACCTGAACCAAAACGAGT	(Roth et al., 2014)
<i>L. lactis</i>	16S rDNA (HM241921)	ATACAAAGACGTGAGCATTCAAC	GGCCCCACAATCAAGAATTTG	TTGCTTAGGTTTATGACTAAACCCCTCAAAACT	(Roth et al., 2014)
<i>P. phosphoreum</i>	LuxA (AY345888)	TAGAGATAGYGGTTACAGTGAAGAG	AAACTCACGGCAYACATCTTCAG	AACGTTGATCACAGTATGACCCTCATCTGTT	(Roth et al., 2014)
<i>S. putrefaciens</i>	FerE (AF188713)	CAGGCAATGATTTATCCGATAGTG	AGTGGTAGCGGTAACCTCTG	AGCCGCAAGCAATACTGAAATCACACCA	(Roth et al., 2014)
<i>P. aeruginosa</i>	RegA (NA)	Trade secret	Trade secret	Trade secret	Kommersielt tilgjengelig (PrimerDesign)
<i>Pseudomonas ssp.</i>	CarA	GGCTTTCAGGTARTCGGACAG	CARCARATCGTTACCCTGACTT	GCCAGTTGCTCGC.	(Reynisson et al., 2008)
<i>Vibrio ssp</i>	RNA polymerase α - subunit (AJ842676)	GCTGAAGGCAAGATGAAGTGTT	GTCATGGGTGATGTCACCTGC	NA	(Roth et al., 2014)

Den termale syklusen for PCR amplifikasjonsforhold ved bruk av TaqMan™ Master Mix vises i Tabell 2.6.

Tabell 2.6 Termal syklus PCR amplifikasjonsforhold ved bruk av TaqMan™ Master Mix

	Temp ($^{\circ}\text{C}$)	Tid	# syklus
Hold stage	50	2 min	1x
	95	10 min	
PCR stage	95	15 sek	40 x
	60	1 min	

Den termale syklusen for PCR amplifikasjonsforhold ved bruk av SYBR Green Master Mix vises i Tabell 2.7.

Tabell 2.7 Termal syklus PCR amplifikasjonsforhold SYBR Green Master Mix

	Temp (°C)	Tid	# syklus
Hold stage	50	2 min	1 x
	95	10 min	1 x
PCR stage	95	30 sek	40 x
	57 (59)	1 min	
	72	30 sek	
Melt curve stage	95	15 sek	Kontinuerlig
	60	1 min	
	95	1 sek	

For PCR analyse av *Pseudomonas ssp.* ble annealing temperaturen under PCR stage kjørt ved både 57 og 59 °C.

2.2.12 Quality Index Measurement (QIM)

Kvalitetsindeksmetode ble utført for hel kveite dag 22, fisken (n=16) var fordelt på 3 grupper; kontrollfisk (n=5), superkjølt med is (n=6) og superkjølt uten is (n=5). Fisken hadde siden dag 3 vært oppbevart i kasser med is ved 0 °C. Hver fisk fikk tildelt en tresifret kode og ble tilfeldig utplassert på to bord (Figur 2.14 A), fisken lå slik i 30 min før undersøkelsen startet. Fire trente dommere fra Nofima bedømte fisken etter gitte kriterier (Figur 2.14 B).



Figur 2.14. A – Fisken ble plassert tilfeldig utover to bord. B – Dommerpanelet fra Nofima bedømte fisken ut fra gitte kriterier.

Egenskapene vurdert var mørk skinnside, tekstur, slim, øyeklarhet og øyeform, gjellelukt, gjelleslim og gjellefarge. De ulike parameterne fikk score fra 0-3 for utseende og gjeller, og 0-

2 for øyne. Hver parameter og kriterier er beskrevet i Tabell 1.1. Figur 2.15 viser forskjellen mellom kontrollfisk og en superkjølt fisk uten is ved dag 23. Resultatene gav et tall på den sensoriske totalsummen, fiskens kvalitetsindeks.



Figur 2.15 A – Kontrollfisk dag 23.

B – Superkjølt fisk uten is dag 23.

2.3 Dataanalyse

Resultater ble behandlet i Microsoft Excel (Microsoft inc, USA) og Statistica (Dell inc, USA). Figurer ble lagd og tosidig t-test ble utført i Microsoft Excel. Tosidig T-test ble brukt for å bestemme signifikans i to uavhengige grupper. ANOVA, ANCOVA, GLM og lineære regresjoner ble utført i Statistica. One way- ANOVA ble brukt for analyse av uavhengige og kategoriske data, den brukes for å sammenligne flere enn 2 variabler mot hverandre. ANCOVA ble brukt til analyse ved tilstedeværelse av kontinuerlige variabler (tid, prøvehøyde). GLM grupper ble vurdert som kofaktorer og lagringstid ble ansett som kovariant. og lineære regresjoner ble brukt som statistiske modeller.

LSD post hoc test ble brukt for å bestemme signifikans mellom ulike grupper i den mikrobiologiske analysen. Unequal N HSD post hoc test ble brukt for analyse av signifikans i blodprøveresultater. For analyse av QIM ble det brukt Kruskal-Wallis ANOVA & Median test. Signifikansnivået ble satt til $p < 0.05$. Resultater er oppgitt som gjennomsnitt \pm standardavvik.

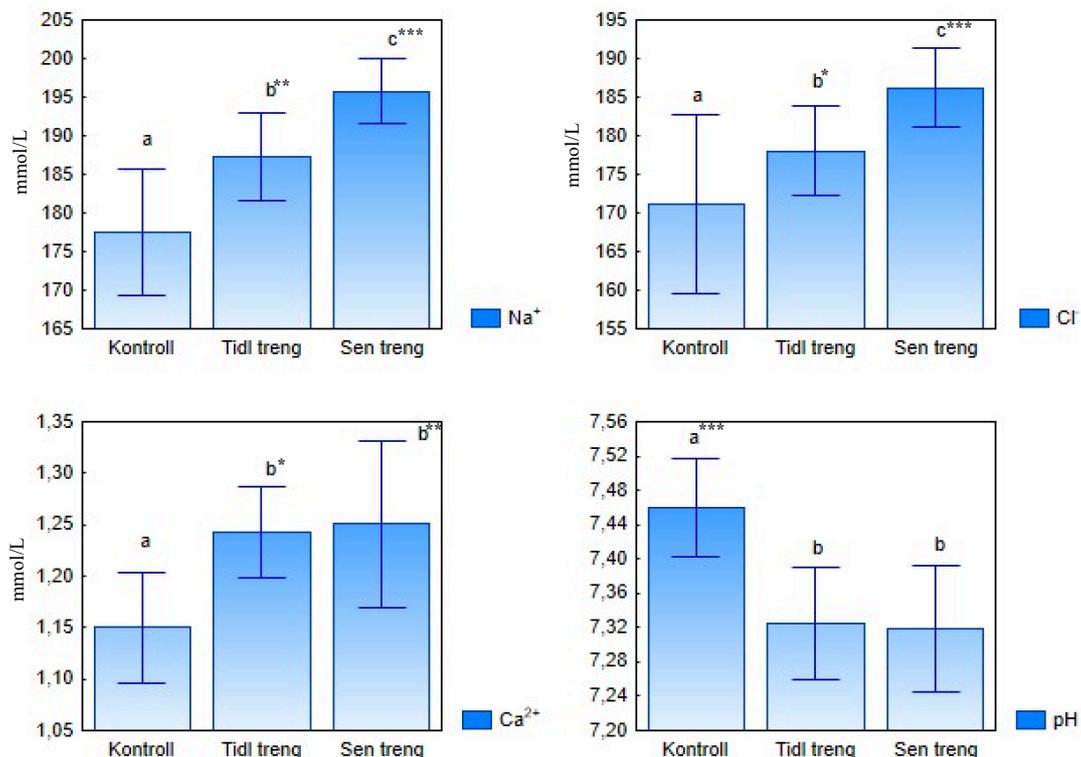
3. Resultat

3.1. Blodmålinger

Resultatene fra blodmålinger (Figur 3.1) viser signifikante forskjeller mellom gruppene for alle parametere; Na^+ ($p < 0.0005$; ANOVA), Cl^- ($p < 0.0005$; ANOVA), Ca^{2+} ($p < 0.005$; ANOVA) og pH ($p < 0.0005$; ANOVA) og kortisol ($p < 0.0005$; ANOVA).

Det er en gradvis økning av osmoregulerende ioner, Na^+ og Cl^- , i blodprøvene etter økende lengde stresseksposering. For mengden Na^+ i prøvene er det signifikante forskjeller mellom alle grupper; kontroll og tidlig trening ($p < 0.005$; post hoc), kontroll og sen trening ($p < 0.0005$; post hoc), mellom tidlig trening og sen trening ($p < 0.005$; post hoc). Jo mer stresseksposering, desto mer signifikant forskjell mellom gruppene.

For Cl^- er det signifikant forskjell mellom kontroll og sen trening ($p < 0.005$; post-hoc) og tidlig trening og sen trening ($p < 0.05$; post hoc), testen viser derimot ingen signifikant forskjell mellom kontroll og tidlig trening ($p > 0.13$; post hoc).



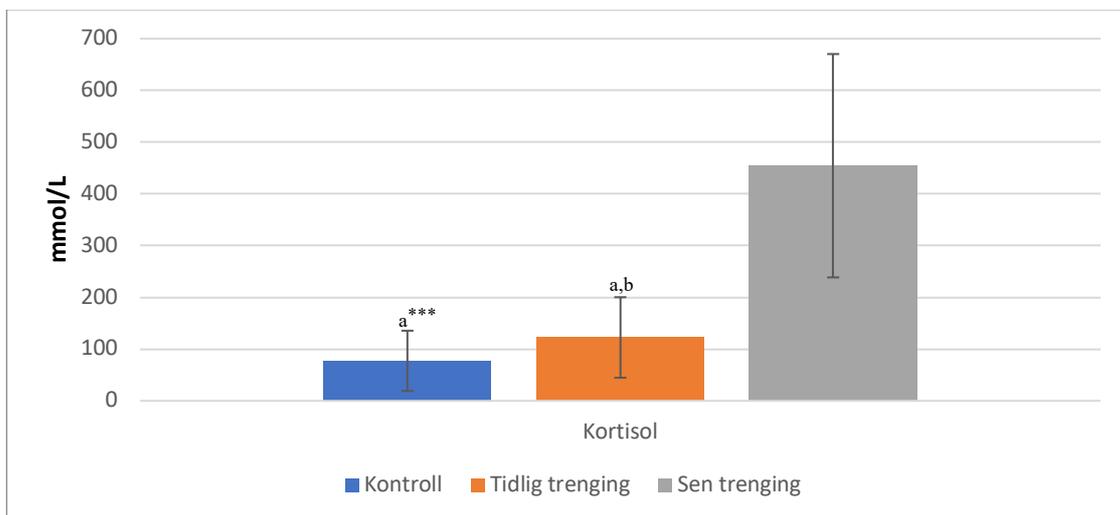
Figur 3.1. Gjennomsnitt \pm SD i mengde Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} og pH i blodprøver hentet fra tre grupper fisk, kontroll, tidlig trening og sen trening. Figuren viser også nivå av signifikans mellom de tre gruppene, forskjell i a,b og c representerer en signifikant forskjell for * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ og *** $p < 0.0005$.

Etter stresseksposering av kveite skjer det en økning i mengde Ca^{2+} i blodprøven, det er signifikant forskjell mellom kontroll og tidlig trenging ($p < 0.05$; post hoc), kontroll og sen trenging ($p < 0.005$; post hoc), men ingen signifikant forskjell mellom tidlig og sen trenging ($p > 0.94$; post hoc).

Stresseksposering fører til fall i blodets pH og resulterer i signifikante forskjeller mellom kontroll og tidlig trenging ($p < 0.0005$; post hoc), kontroll og sen trenging ($p < 0.0005$; post hoc). Det er ikke signifikant forskjell mellom tidlig og sen trenging ($p > 0.96$; post-hoc).

Mengde kortisol målt i blodprøvene (Figur 3.2), viser ingen signifikant forskjell mellom kontroll og tidlig trenging ($p > 0.80$; post hoc). Det er signifikant forskjell mellom kontroll og sen trenging ($p < 0.005$; post hoc) og tidlig trenging og sen trenging ($p < 0.0005$; post hoc). Gjennomsnitt for kontroll var 77.0 ± 58.27 mmol/L, for tidlig trenging 122.0 ± 77.84 mmol/L og for sen trenging 454 ± 215.88 mmol/L. Det skjer en tydelig økning av kortisol i fisk utsatt for stress, en liten økning fra kontroll til tidlig trenging, og en stor økning etter sen trenging. Normalfordeling av mengde Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , pH, og kortisol vises i Figur B6, B7, B8, B9 og B10 i Appendix.

b

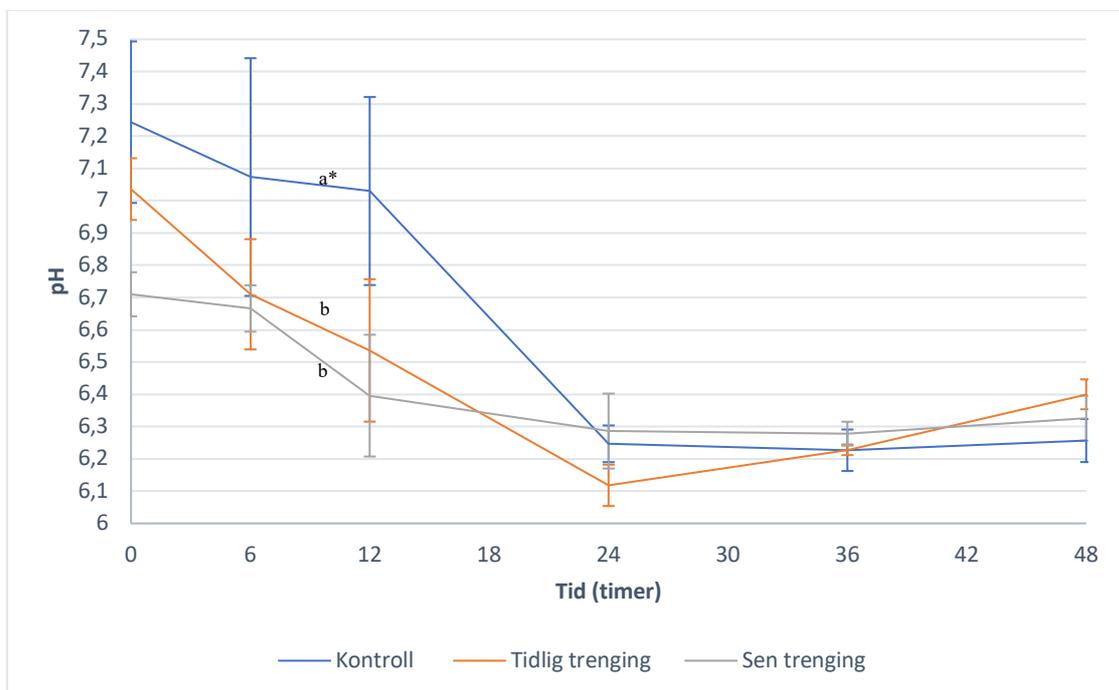


Figur 3.2. Gjennomsnitt \pm SD kortisol nivå målt i blodprøver. Figuren viser nivå av signifikans mellom de tre gruppene, forskjell i a og b representert som en signifikant forskjell på * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ og *** $p < 0.0005$.

3.2 Pilotforsøk – stress og holdbarhet

3.2.1 pH i fiskemuskel

Muskel-pH synker med lagringsperioden ($p < 0.05$; GLM) som vist i Figur 3.3. Kontrollfiskens lavest målte pH-verdi var 6.2 ± 0.06 ved 36 timer. For den stresseksponeerte fisken ble laveste verdi målt ved 24 timer, 6.1 ± 0.06 for tidlig trenging og 6.3 ± 0.12 for sen trenging.

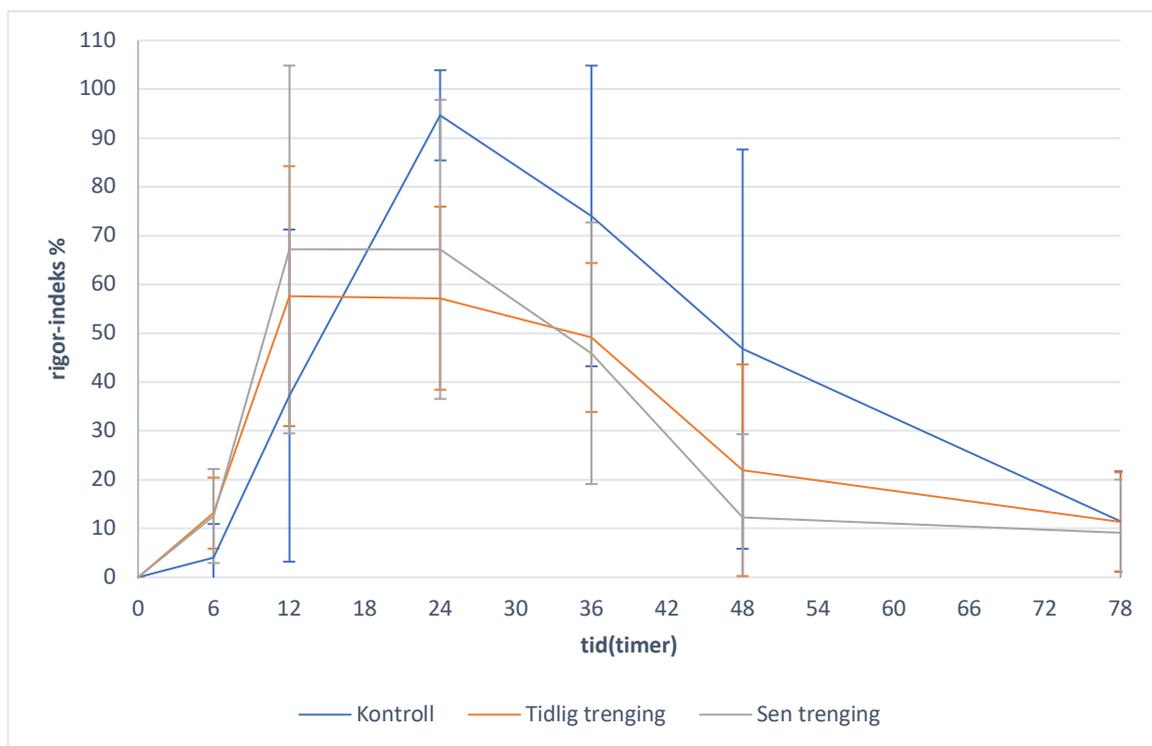


Figur 3.3 Gjennomsnitt \pm SD pH målt i fiskemuskel ved 0 – 48 timer *post mortem*. Figuren viser nivå av signifikans mellom de tre gruppene ved 12 timer, forskjell i a og b representert som $*p < 0.05$ (t-test)

Det er signifikant forskjell i pH mellom kontroll og sen trenging ($p < 0.05$; post hoc), det er derimot ikke signifikant forskjell mellom kontroll og tidlig trenging ($p > 0.08$; post hoc) eller tidlig trenging og sen trenging ($p > 0.59$; post hoc). pH for hver individ kan sees i Figur B1 i Appendix.

3.2.2 Rigor indeks (%)

Resultatene fra måling av *rigor mortis* (Figur 3.4) viser raskere inntredelse av full *rigor mortis* i stresseksponert fisk, og betydelig forsinket inntredelse av *rigor mortis* i kontrollfisk. Kontrollfisken er i maksimum *rigor* ved 24 timer, den stresseksponerte fisken er i maksimum *rigor* ved 12-24 timer *post mortem*. Kontrollfisken har også en høyere maksimum *rigor* indeks (94.7 ± 9.24 %) enn den stresseksponerte fisken, tidlig trenging (67.2 ± 37.7 %) og sen trenging (57.6 ± 26.63 %).

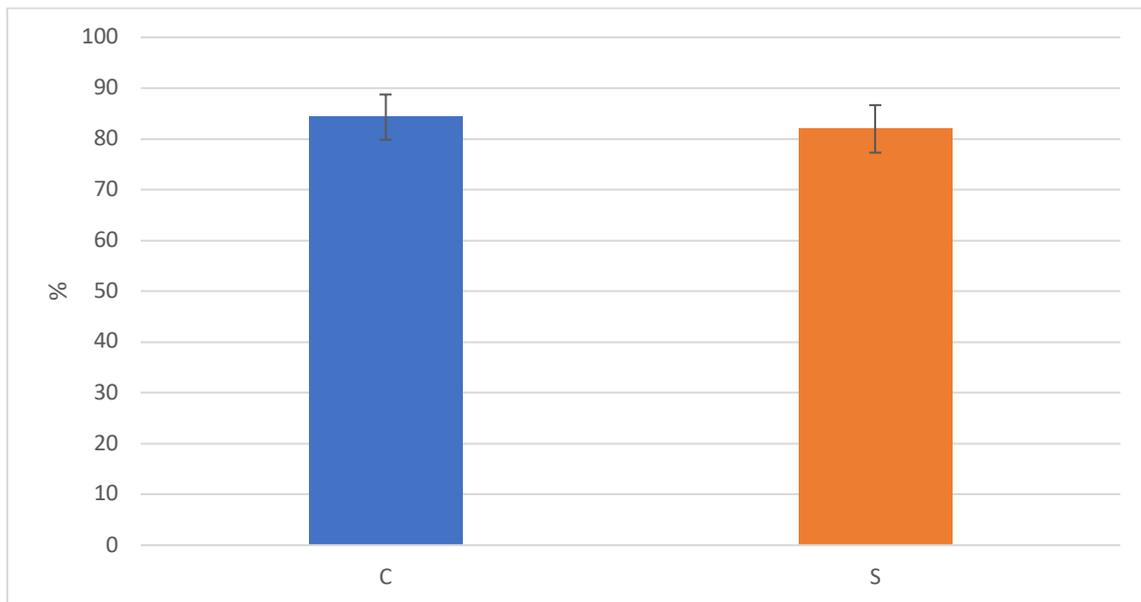


Figur 3.4 Gjennomsnitt \pm SD rigor indeks (%) i kveite målt ved 0 – 78 timer *post mortem*.

Ved 12 timer er det ingen signifikant forskjell mellom gruppene; kontroll mot tidlig trenging ($p > 0.38$; t-test), kontroll mot sen trenging ($p > 0.23$; t-test), tidlig trenging mot sen trenging ($p > 0.91$; t-test). Ved 24 timer er forskjellen signifikant mellom kontroll og tidlig trenging ($p < 0.05$; t-test), det er fortsatt ikke noen signifikante forskjeller mellom kontroll og sen trenging ($p > 0.19$; t-test) eller tidlig trenging og sen trenging ($p > 0.55$; t-test). Rigor indeks for hver individ kan sees i Figur B2 i Appendix.

3.2.3 Vannbinding

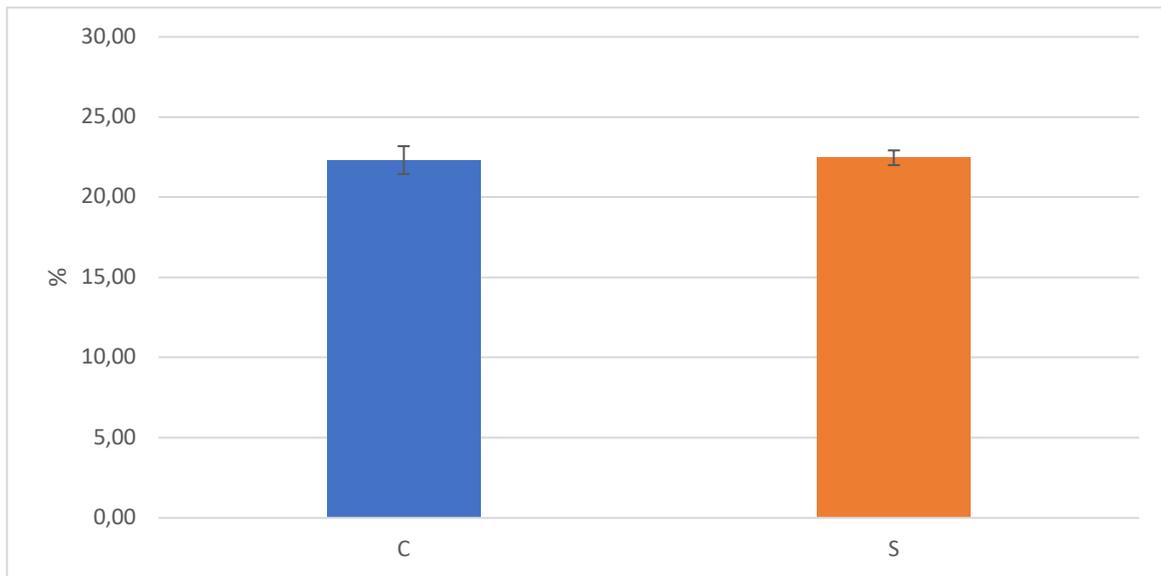
Gjennomsnitt \pm SD verdier av vannbindingsevne (%) hentet etter tidlig trenging (84.3 ± 4.45) og sen trenging (82.0 ± 4.68) viser ikke signifikant forskjell ($p > 0.34$; t-test). Eksponering for stress har lite til ingen påvirkning av vannbindingsevne (Figur 3.5). Vannbindingsevne for hver individ kan sees i Figur B3 i Appendix.



Figur 3.5 Gjennomsnitt \pm SD vannbindingsevne (%) i fiskemuskel hentet etter tidlig trenging og sen trenging.

3.2.4 Tørketap

Resultatene fra tørketap (Figur 3.6) viser gjennomsnitt \pm SD mengde tørrstoff (%) i prøvene målt i fisk hentet etter tidlig trenging (22.3 ± 0.87) og sen trenging (22.5 ± 0.46), det er ingen signifikant forskjell mellom gruppene ($p > 0.41$; t-test).



Figur 3.6 Gjennomsnitt \pm SD tørrstoff (%) i fiskemuskel målt i fisk etter tidlig trenging og sen trenging.

3.2.5 Farge

Det er ingen signifikant forskjell i farge målt som L^* , a^* , b^* og yellowness hos fisk hentet ved tidlig trenging og sen trenging 10 dager *post mortem* (Tabell 3.1).

Tabell 3.1 Gjennomsnitt \pm SD farge målt som L^* , a^* , b^* og yellowness målt ved 10 dager *post mortem* i kveitefilet, med tilhørende p-verdi (t-test).

	L^*	a^*	b^*	yellowness
Tidlig trenging	78.6 \pm 1.23	2.0 \pm 0.68	12.1 \pm 1.51	27.9 \pm 2.01
Sen trenging	78.6 \pm 1.67	3.0 \pm 0.57	11.5 \pm 0.98	27.1 \pm 1.27
p-verdi	0.90	0.13	0.48	0.48

3.2.6 Tekstur

Resultatene (Tabell 3.2) fra brudd analysen viser ingen signifikant forskjell mellom tidlig trenging og sen trenging ($p > 0.42$; ANCOVA), og ingen signifikant effekt av prøvehøyde ($p > 0.11$; ANCOVA). Analysen av 60 % hardhet viser derimot signifikant forskjell mellom tidlig trenging og sen trenging ($p < 0.05$; ANCOVA), men her er det heller ingen signifikant effekt av prøvehøyde ($p > 0.70$; ANCOVA).

Tabell 3.2. Resultat av sylindertest for brudd og 60 % hardhet,

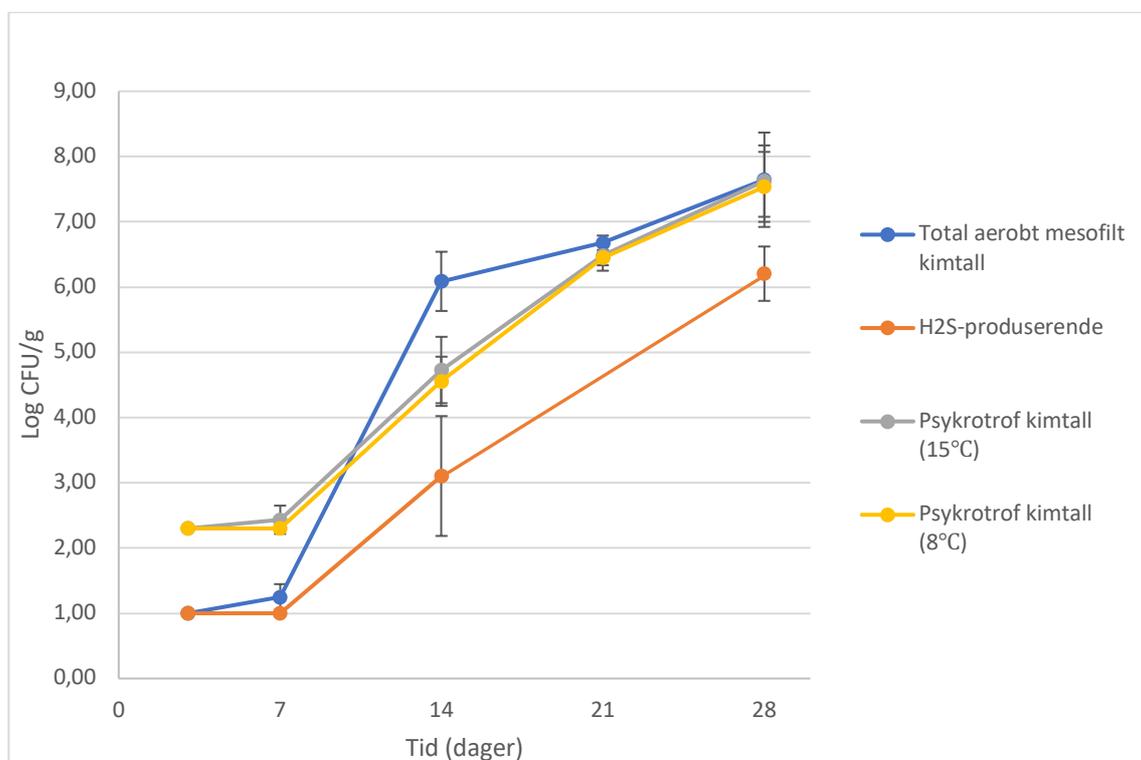
Gruppe	Brudd (N)		60 % hardhet (N)		Prøvehøyde (mm)		
	Gjennomsnitt	SE	Gjennomsnitt	SE	Gjennomsnitt	SD	n
Tidlig trenging	0.3	0.02	0.3	0.02	28.6	1.72	10
Sen trenging	0.3	0.03	0.3	0.01	28.7	1.67	10

3.2.7 Filetspalting

Resultatene viser ingen filetspalting ved dag 10 *post mortem*, verken i kontrollfisk eller stressekspontert fisk.

3.2.8 Pilotforsøk holdbarhet

Pilotforsøket ble utført for å sikre riktig utførelse av metode under hovedforsøket. Utvikling av kimtall under islagring av kontrollfisk (Figur 3.7) viser hvordan økningen i log CFU/g stiger i sammenheng med lagringstid. For det totale aerobe mesofile kimtall på JA ble det en økning fra dag 7 (log 1.3 ± 0.20 CFU/g) til dag 14 (log 6.1 ± 0.45 CFU/g). Det er ingen forskjell i psykrotroft kimtall ved 15 °C og ved 8 °C gjennom lagringsperioden.



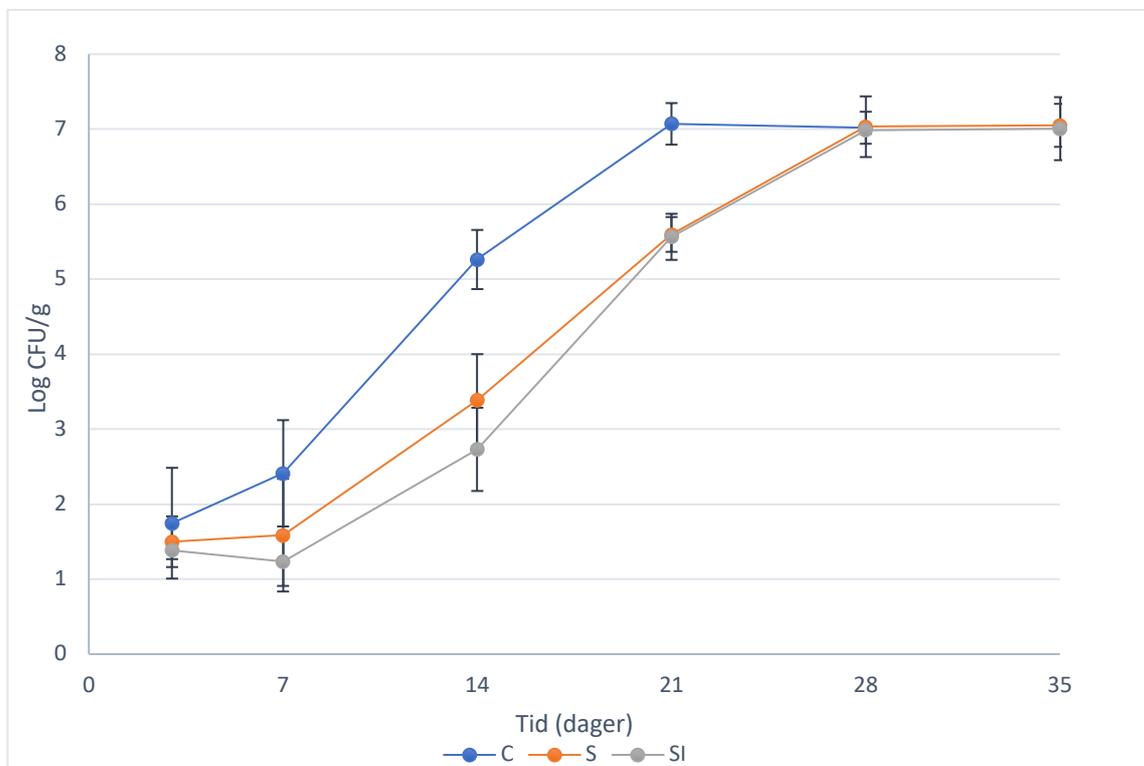
Figur 3.7 Resultat fra bakteriell dyrking over tid, på ulike medium i prosjektets pilotforsøk. Oppgitt som gjennomsnitt \pm SD log CFU/g

De H₂S-produserende bakteriene var ved deteksjonsgrensen (log 1 CFU/g) ved dag 3 og 7 (Figur 3.7). Frem til dag 14 var det en økning av H₂S-produserende bakterier til log 3.1 ± 0.92 CFU/g. Ved dag 21 ble det ikke gjort funn av svarte kolonier, prøven ved dag 21 ble fortynnet for mye. Det ble platet ut feil fortynning slik at det ikke ble gjort funn av H₂S-produserende bakterier ved dette prøveuttaket. Ved dag 28 ble det igjen gjort funn av svarte kolonier (log 6.2 ± 0.42 CFU/g).

3.3 Hovedforsøk – kjøleteknologi og holdbarhet

3.3.1 Total aerobt mesofilt kimtall

Det ble målt totalt aerobt mesofilt kimtall fra dag 3 til dag 35 (dag 28 for kontrollfisk) på JA med L-cysteine (Figur 3.8). Kimtallsutviklingen starter ved slaktetidspunktet og øker i alle gruppene ($p < 0.0005$; GLM) sammen med lagringstid ($p < 0.0005$; GLM). Log CFU/g er for kontrollfisken høyere enn for den superkjølte fisken gjennom lagringsprosessen. Det er signifikante forskjeller mellom C og SI ($p < 0.05$; post hoc), men det er ikke signifikant forskjell mellom C og S ($p > 0.19$; post hoc) eller S og SI ($p > 0.34$; post hoc).

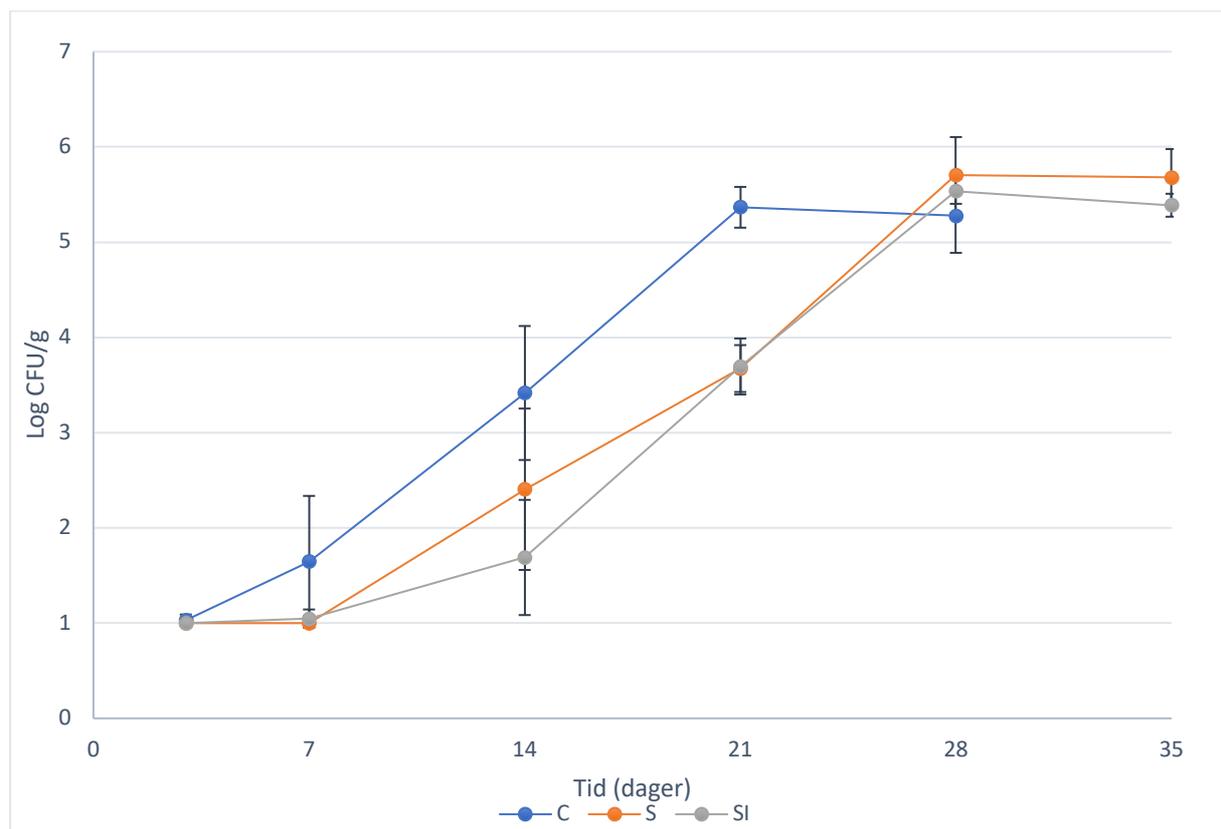


Figur 3.8 Total aerobt mesofilt kimtall over tid, oppgitt som gjennomsnitt ± SD log CFU/g hos oppdrettskveite. C = Kontrollfisk, S = Superkjølt uten is, SI = Superkjølt med is.

Ved dag 14 har gruppe C total aerobt mesofilt kimtall på $\log 5.2 \pm 0.39$ CFU/g, S $\log 3.4 \pm 0.62$ CFU/g og SI $\log 2.7 \pm 0.55$ CFU/g. Frem til dag 21 er log CFU/g lavere for gruppe S enn for SI. Ved dag 21 har det totale aerobe mesofile kimtallet igjen økt for alle gruppene; C ($\log 7.1 \pm 0.28$ CFU/g), S ($\log 5.6 \pm 0.23$ CFU/g) og SI ($\log 5.6 \pm 0.31$ CFU/g).

3.3.2 Hydrogen Sulfid produserende bakterietall

Vekst av H₂S-produserende bakterier på JA med L-cysteine over tid vises i Figur 3.9. Utviklingen av H₂S-produserende bakterier er avhenging av gruppe ($p < 0.0005$; nonlinear model) og lagrindstid ($p < 0.0005$; nonlinear model). Log CFU/g av H₂S-produserende bakterier er lavest for gruppe C under hele lagringsforsøket, men det er ikke signifikant forskjell mellom gruppene; C mot S ($p > 0.59$; post hoc), C mot SI ($p > 0.06$; post hoc) og S mot SI ($p > 0.15$; post hoc).

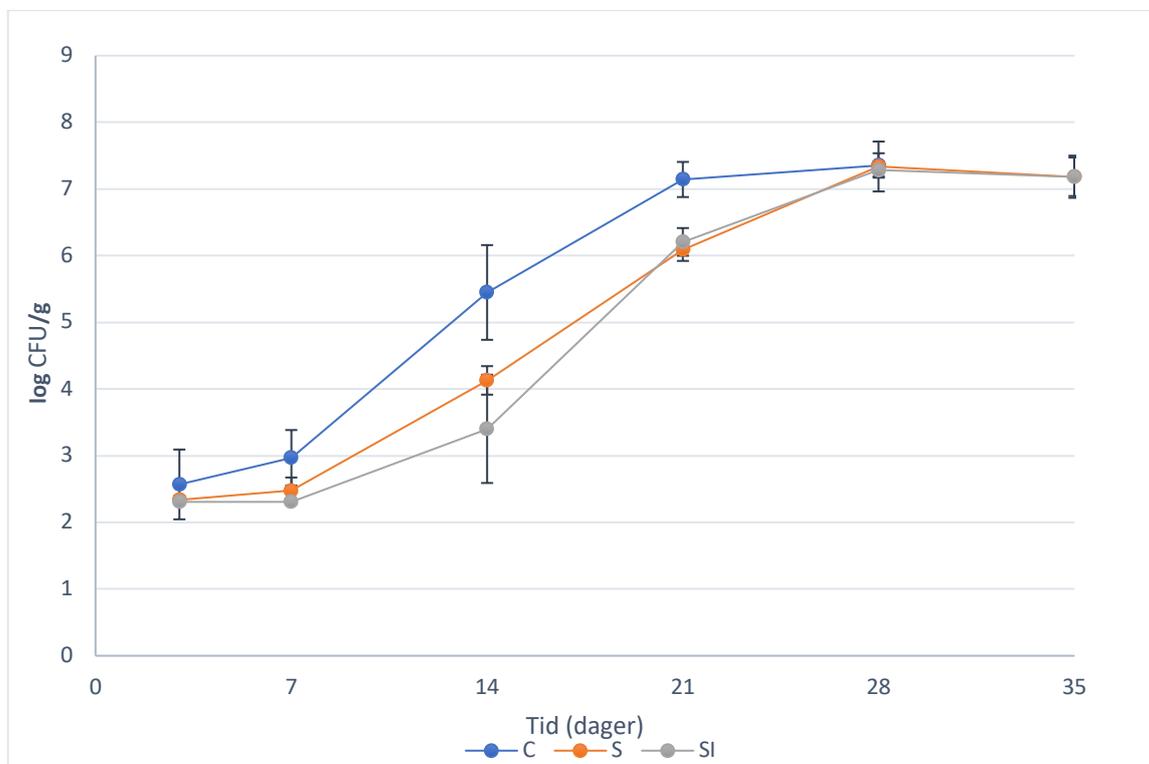


Figur 3.9 Utvikling av H₂S-prduserende bakterier over tid hos oppdrettskveite, oppgitt som gjennomsnitt \pm SD log CFU/g. C = Kontrollfisk, S = Superkjølt uten is, SI = Superkjølt med is.

H₂S-produserende bakterier ved deteksjonsgrensen (log 1 CFU/g) ved dag 3 i alle gruppene. Ved dag 7 *post mortem* var H₂S-produserende bakterier i kontrollfisken ved log 1.7 ± 0.69 CFU/g. Under pilotforsøket var H₂S-produserende bakterier ved deteksjonsgrensen også ved dag 7 (Figur 3.7). Superkjølt fisk med is og superkjølt fisk uten is var ved deteksjonsgrensen ved dag 7. Det ble ved dag 14 *post mortem* målt H₂S-produserende bakterier over deteksjonsgrensen i alle grupper. Ved dag 21 hadde gruppe C høyest verdi (log 5.4 ± 0.21 CFU/g) S hadde nest høyest (log 3.7 ± 0.25 CFU/g), og lavest hadde SI (log 3.7 ± 0.29 CFU/g).

3.3.3 Psykrotroft kimtall ved 15 °C

Vekst av psykrotrofe bakterier på L&H agar over tid vises i Figur 3.10. Endringen i psykrotroft kimtall ved 15 °C er signifikant avhengig av gruppe ($p < 0.005$; GLM) og lagringstid ($p < 0.005$; GLM). Log CFU/g for gruppe C er jevnt høyere enn for den superkjølte fisken, S og SI, men det er ingen signifikant forskjell på gruppene; C og S ($p > 0.22$; post hoc), C og SI ($p > 0.06$; post hoc) og til slutt S og SI ($p > 0.48$; post hoc). T-test viser derimot signifikant forskjell mellom C og S ved dag 14 *post mortem* ($p < 0.05$; t-test), C og SI ($p < 0.05$; t-test). Det er ikke signifikant forskjell mellom S og SI ($p > 0.12$; t-test) ved dag 14 *post mortem*.

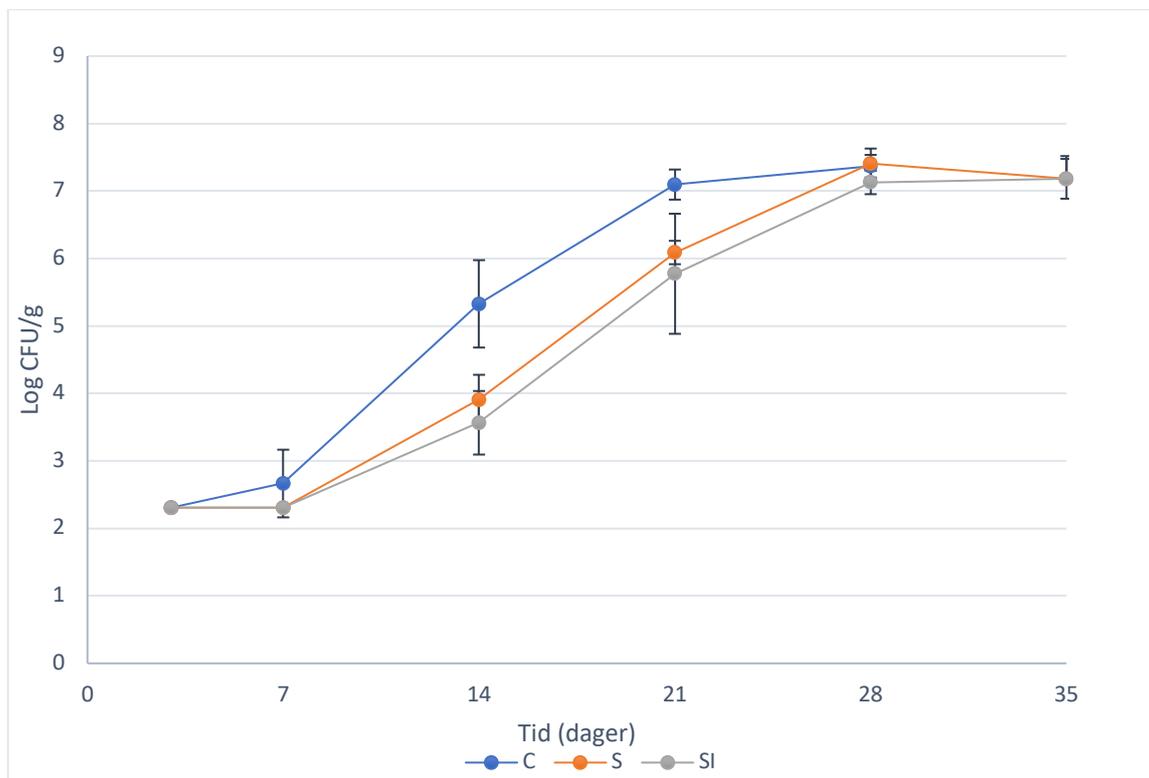


Figur 3.10. Psykrotroft kimtall ved 15 °C over tid, dyrket på L&H agar. Oppgitt som gjennomsnitt ± SD log CFU/g. C = Kontrollfisk, S = Superkjølt uten is, SI = Superkjølt med is.

Gruppe SI var under deteksjonsnivå (log 2.3 CFU/g) ved dag 3 og 7 *post mortem*. S var også under deteksjonsgrensen ved dag 3, men hadde ved dag 7 log 2.5 ± 0.20 CFU/g. C var ved log 3.0 ± 0.41 CFU/g ved dag 7. Ved 21 dager *post mortem* er det psykrotrofe kimtall ved 15 °C for C log 7.1 ± 0.26 CFU/g, for S log 6.1 ± 0.17 CFU/g, og for SI log 6.2 ± 0.21 CFU/g.

3.3.4 Psykrotroft kimtall ved 8 °C

Vekst over tid av psykrotrofe bakterier på PCR agar ved 8 °C vises i Figur 3.11. Endringen er signifikant avhengig av gruppe ($p < 0.005$; GLM) og lagringstid ($p < 0.005$; GLM). Det er ingen signifikant forskjell mellom gruppene; C og S ($p > 0.59$; post hoc), C og SI ($p > 0.17$; post hoc) og S og SI ($p > 0.39$; post hoc). Ved dag 14 er det signifikant forskjell mellom C og S ($p < 0.005$; t-test) og C og SI ($p < 0.005$; t-test), men ikke signifikant forskjell mellom S og SI ($p > 0.32$; t-test).



Figur 3.11. Psykrotroft kimtall ved 15 °C over tid, dyrket på plate count agar (PCA). Oppgitt som gjennomsnitt \pm SD log CFU/g. C = Kontrollfisk, S = Superkjølt uten is, SI = Superkjølt med is.

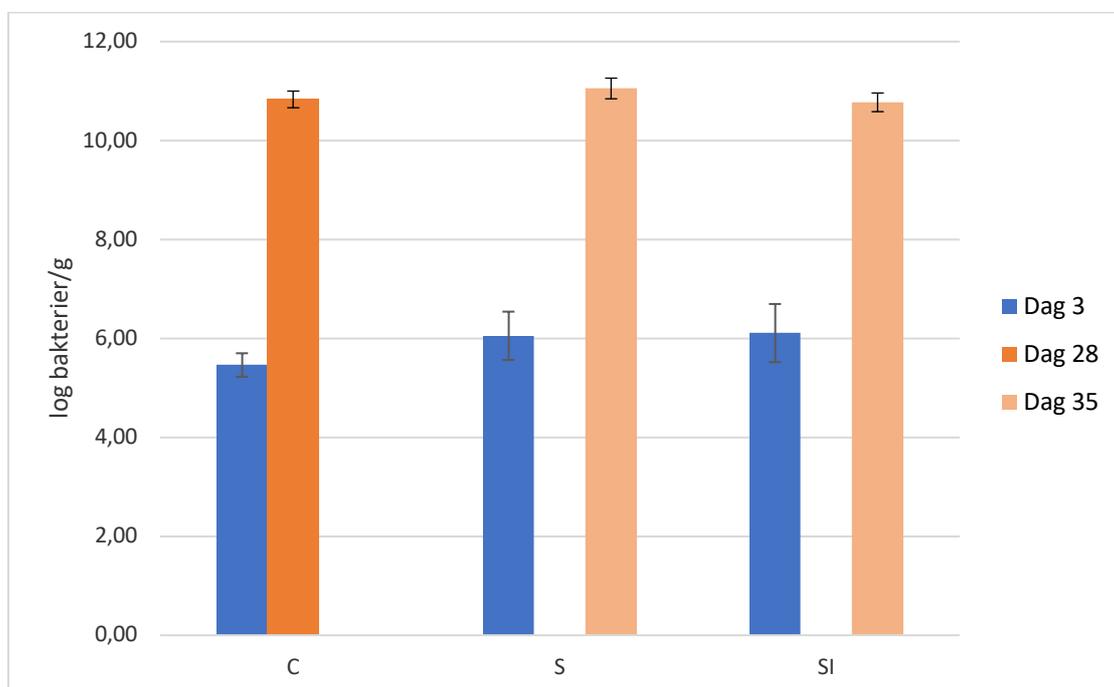
Alle gruppene var under deteksjonsnivå (log 2.3 CFU/g) ved dag 3, S og SI var også under deteksjonsnivå ved dag 7 *post mortem*. Ved dag 7 *post mortem* var C log 2.7 ± 0.50 CFU/g. Ved 21 dager *post mortem* er det psykrotrofe kimtall ved 8 °C for C log 7.1 ± 0.22 CFU/g, for S var det log 6.1 ± 0.17 CFU/g og for SI var det log 5.8 ± 0.89 CFU/g.

3.4 Real-time PCR analyse av skinnprøver

3.4.1 Total antall bakterier på kveiteskinn

qPCR av totalt antall bakterier er en analyse av både levende, skadde, døde, anaerobe og aerobe bakterier. Analysen utført på kveiteskinn vises i Figur 3.12. Vekst av total antall bakterier er avhengig av lagringstid ($p < 0.00005$; Faktuell ANOVA), men ikke gruppe ($p > 0.08$; Faktuell ANOVA), interaksjonen mellom gruppe og tid er ikke signifikant ($p > 0.15$; Faktuell ANOVA).

Som forventet er log bakterier/g høy for denne typen analyse i forhold til kimtall på skål. Dette er fordi ved kimtallsanalyse på skål vil ikke alle bakterier kunne dyrkes, kun de uskadde og levende bakteriene vil kunne dyrkes, og de er alle aerobe. I tillegg vil levende bakterier dyrket på skål ha ulike krav til næringsstoffer, og fysiske faktorer som temperatur, pH og oksygen.

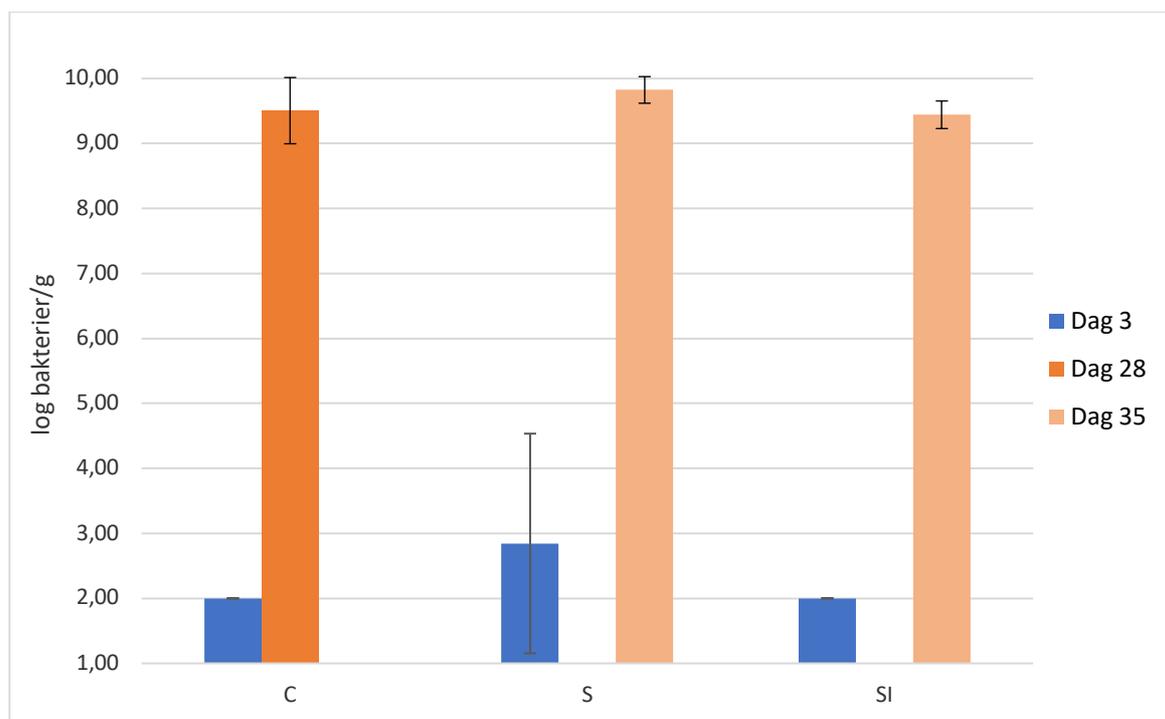


Figur 3.12. Gjennomsnitt \pm SD log bakterier/g av total mengde bakterier målt i skinnprøvene fra kontrollfisk (C), Superkjølt uten is (S) og superkjølt med is (SI). Prøveuttak ble gjort dag 3 *post mortem* for alle grupper, og dag 28 for C og 35 for S og SI.

Ved dag 3 ble total antall bakterier målt til $\log 5.5 \pm 0.24$ bakterier/g for gruppe C, for gruppe S $\log 6.1 \pm 0.49$ bakterier/g og SI $\log 6.1 \pm 0.59$ bakterier/g. Ved dag 28 ble siste uttak av gruppe C utført og \log bakterier/g ble målt til $\log 10.8 \pm 0.17$. Siste uttak av S og SI ble utført dag 35 og de hadde henholdsvis $\log 11.1 \pm 0.20$ bakterier/g og $\log 10.8 \pm 0.19$ bakterier/g. Det gir en $\log 5$ økning på 4 uker for gruppe C og 5 uker for gruppe S og SI.

3.4.2 *Carnobacterium maltaromaticum*

Vekst av *C. maltaromaticum* i skinnprøver vises i Figur 3.13. Utviklingen er avhengig av lagringstid ($p < 0.00005$; Faktuell ANOVA), men ikke gruppe ($p > 0.15$; Faktuell ANOVA). Interaksjonen mellom gruppe og tid er ikke signifikant ($p > 0.79$; Faktuell ANOVA).



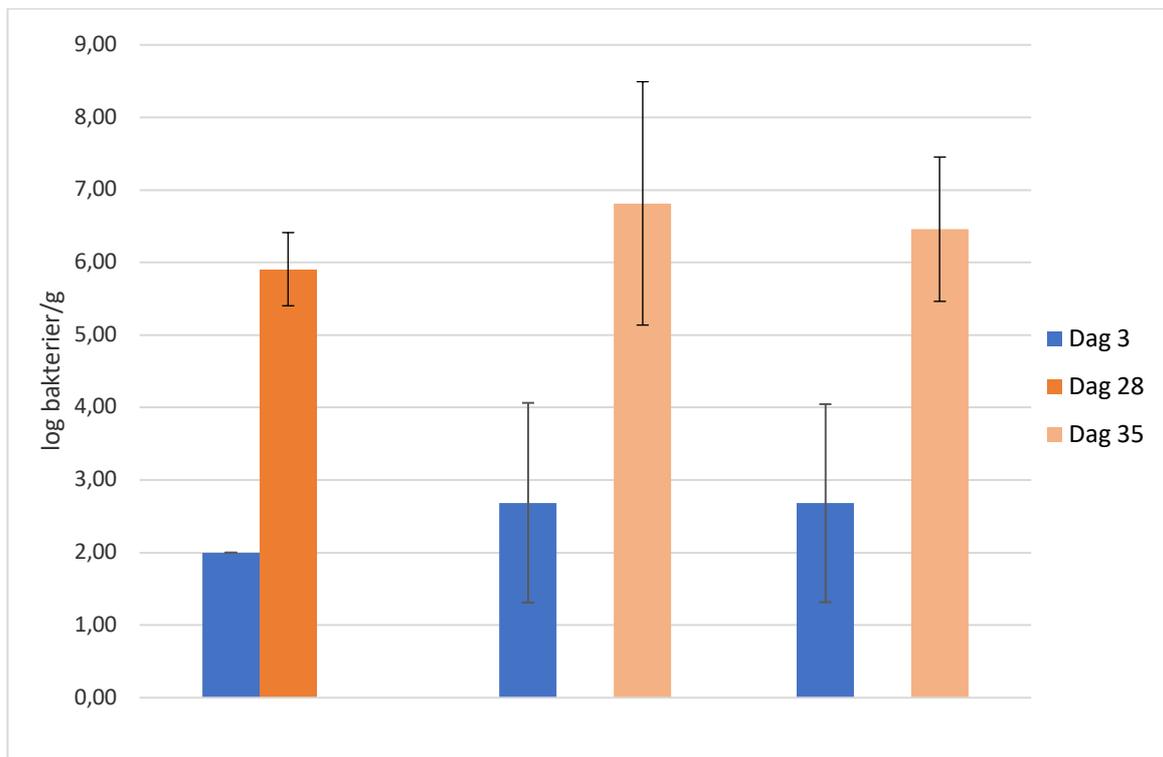
Figur 3.13 Gjennomsnitt \pm SD \log bakterier/g av *C. maltaromaticum* målt i skinnprøvene fra kontrollfisk (C), Superkjølt uten is (S) og superkjølt med is (SI). Prøveuttak ble gjort dag 3 *post mortem* for alle grupper, og dag 28 for C og 35 for S og SI.

Ved dag 3 ble det kun gjort funn i ett individ i gruppe S ($\log 5.38$ bakterier/g), de to andre ble satt til $\log 2$ bakterier/g, som resulterte i et gjennomsnitt på $\log 2.9 \pm 1.69$ bakterier/g for gruppe S. Resterende individer i gruppe C og SI var under deteksjonsnivå ($\log 2$ bakterier/g) ved dag

3. Mengden *C. maltaromaticum* var ved dag 28 i gruppe C $\log 9.5 \pm 0.51$ bakterier/g. Ved dag 35 ble det for S målt $\log 9.8 \pm 0.20$ og SI ble det målt $\log 9.4 \pm 0.21$ bakterier/g.

3.4.3 *Photobacterium phosphoreum*

Vekst av *P. phosphoreum* over tid (Figur 3.14), er ikke signifikant avhengig av gruppe ($p > 0.35$; Faktuell ANOVA), men av lagringstid ($p < 0.0005$; Faktuell ANOVA). Interaksjonen mellom gruppe og tid er ikke signifikant ($p > 0.90$; Faktuell ANOVA).

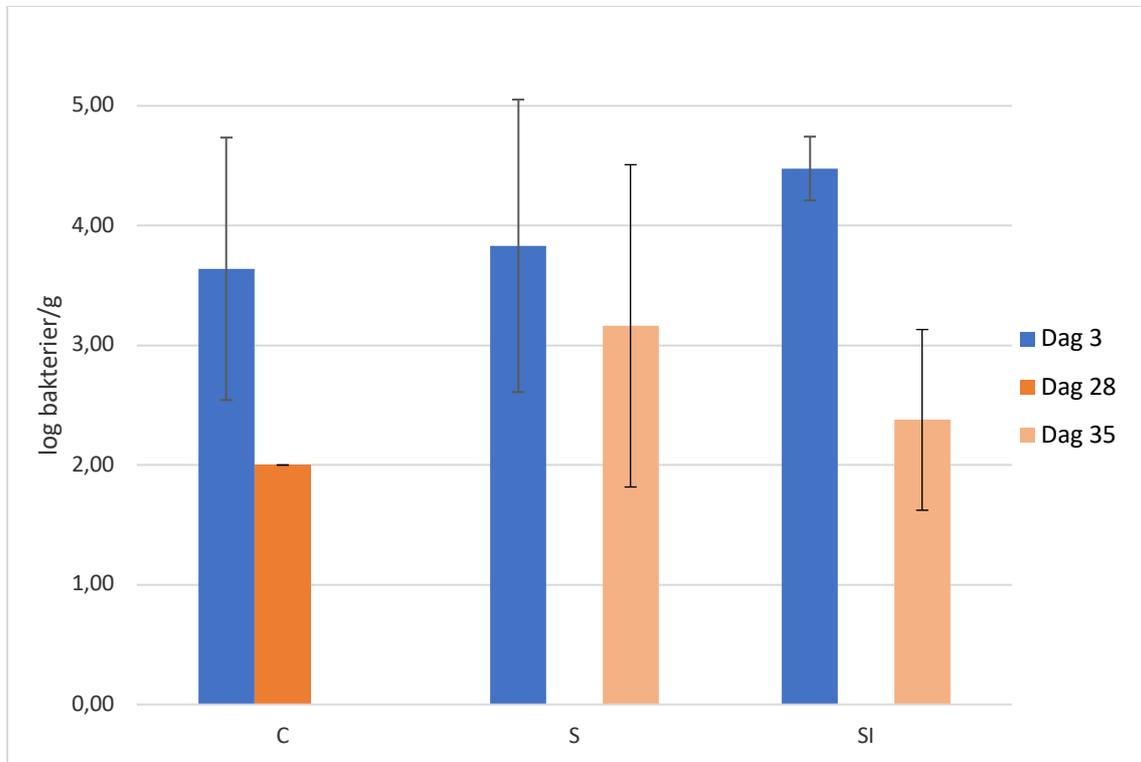


Figur 3.14 Gjennomsnitt \pm SD log bakterier/g av *P. phosphoreum* målt i skinnprøvene fra kontrollfisk (C), Superkjølt uten is (S) og superkjølt med is (SI). Prøveuttak ble gjort dag 3 *post mortem* for alle grupper, og dag 28 for C og 35 for S og SI.

Ved dag 3 ble det ikke gjort funn av *P. phosphoreum* i gruppe C, men det ble gjort funn på ett individ i gruppe S og SI. Ved dag 28 ble det gjort funn i gruppe C ($\log 5.9 \pm 0.50$ bakterier/g). Ved dag 35 ble det gjort funn i gruppe S ($\log 6.8 \pm 1.68$ bakterier/g) og SI ($\log 6.5 \pm 0.99$ bakterier/g).

3.4.4 *Vibrio ssp.*

Vekst av *Vibrio ssp.* på kveiteskinn (Figur 3.15) er avhengig av lagringstid ($p < 0.005$; Faktuell ANOVA), men ikke gruppe ($p > 0.28$; Faktuell ANOVA) og interaksjonen mellom gruppe og tid er ikke signifikant ($p > 0.21$; Faktuell ANOVA).



Figur 3.15 Gjennomsnitt \pm SD log bakterier/g av *Vibrio ssp.* målt i skinnprøvene fra kontrollfisk (C), Superkjølt uten is (S) og superkjølt med is (SI). Prøveuttak ble gjort dag 3 *post mortem* for alle grupper, og dag 28 for C og 35 for S og SI.

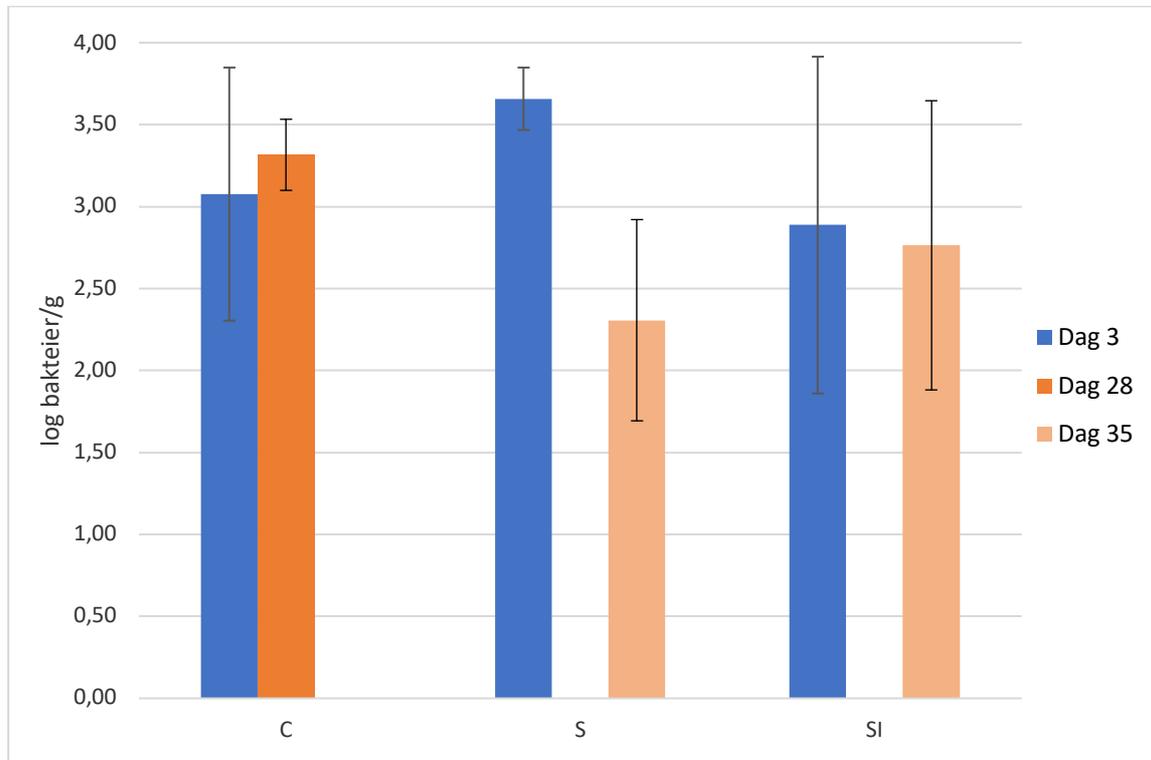
I prøvene hentet fra kveite er det observert en nedgang i mengden *Vibrio ssp.* over tid. I gruppe C var nedgangen fra dag 3, fra log 3.6 ± 1.10 bakterier/g, til under deteksjonsnivå ved dag 28 (log 2 bakterier/g). For gruppe S var nedgangen fra log 3.8 ± 1.22 bakterier/g ved dag 3, til log 2.2 ± 1.35 bakterier/g ved dag 35. Til slutt var nedgangen i gruppe SI fra log 4.5 ± 0.27 bakterier/g ved dag 3 til log 2.4 ± 0.75 bakterier/g dag 35.

3.4.5 *Shewanella putrefaciens*

S. putrefaciens var under deteksjonsgrensen (< 2 log bakterier/g) og ble ikke observert gjennom lagringsperioden.

3.4.6 *Lactococcus lactis*

Endring i bakterier/g av *L. lactis* over tid (Figur 3.16) er ikke signifikant avhengig av verken gruppe ($p > 0.79$; Faktuell ANOVA), lagringstid ($p > 0.10$; Faktuell ANOVA) eller interaksjonen mellom gruppe og tid ($p > 0.15$; Faktuell ANOVA).

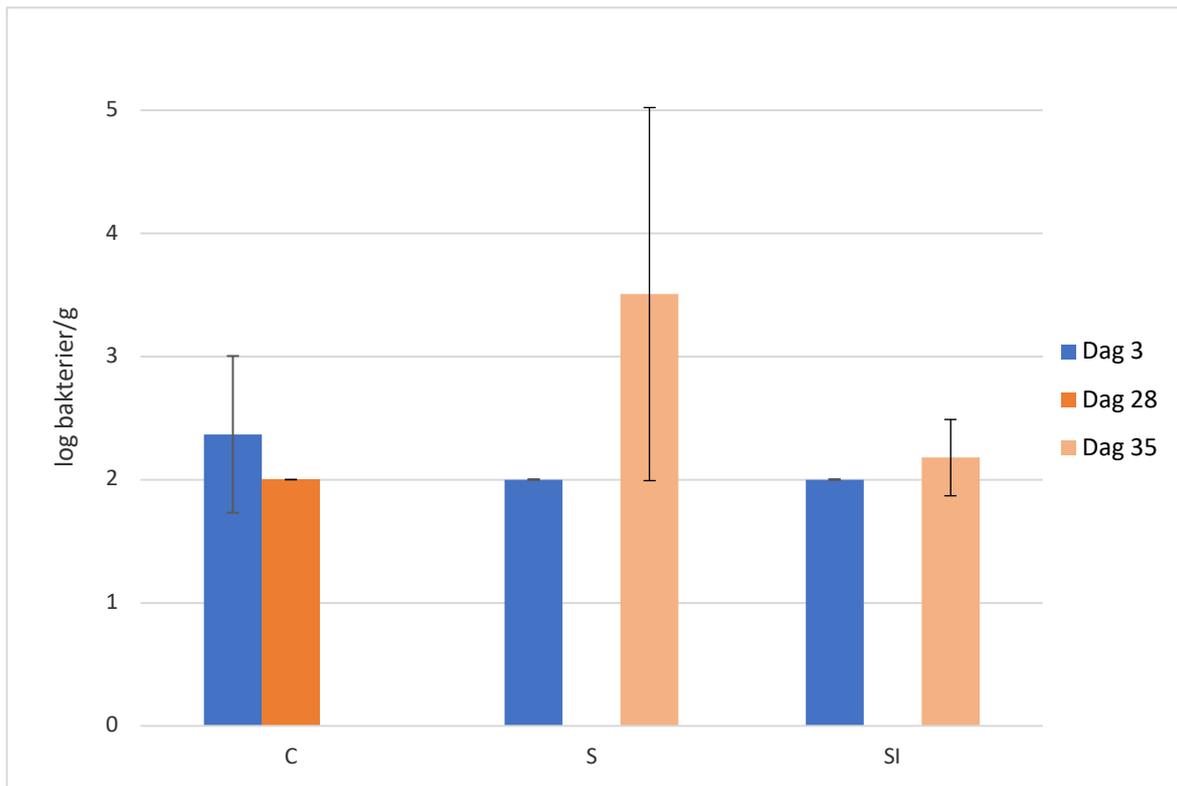


Figur 3.16 Gjennomsnitt \pm SD log bakterier/g av *L. lactis* målt i skinnprøvene fra kontrollfisk (C), Superkjølt uten is (S) og superkjølt med is (SI). Prøveuttak ble gjort dag 3 *post mortem* for alle grupper, og dag 28 for C og 35 for S og SI.

L. lactis er målt til relativt lave nivåer i kveiteskinn, og nivået holdt seg relativt stabil gjennom lagringsperioden for gruppe C og SI. Gruppe C måler log 3.1 ± 0.77 bakterier/g ved dag 3 og ved dag 28 log 3.3 ± 0.22 bakterier/g. I gruppe SI er ble det målt log 2.9 ± 1.03 bakterier/g ved dag 3, og ved dag 28 log 2.8 ± 0.88 bakterier/g.

3.4.7 *Pseudomonas aeruginosa*

Resultater fra qPCR analyse av *P. aeruginosa* (Figur 3.17) viser ingen signifikans mellom grupper ($p > 0.22$; Faktuell ANOVA) eller avhengighet av tid ($p > 0.19$; Faktuell ANOVA). Interaksjonen er ikke signifikant ($p > 0.08$; Faktuell ANOVA).

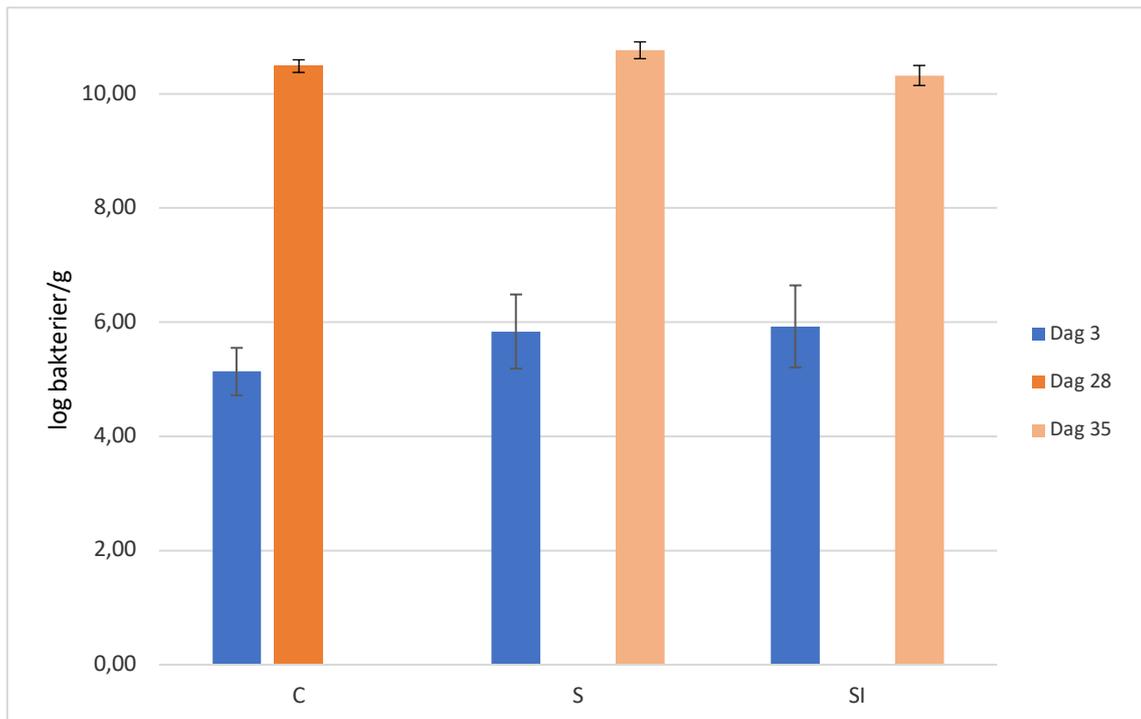


Figur 3.17 Gjennomsnitt \pm SD log bakterier/g av *P. aeruginosa* målt i skinnprøvene fra kontrollfisk (C), Superkjølt uten is (S) og superkjølt med is (SI). Prøveuttak ble gjort dag 3 *post mortem* for alle grupper, og dag 28 for C og 35 for S og SI.

Gruppe C hadde 1 individ med påvist *P. aeruginosa* (log 3.5 bakterier/g) ved dag 3, og gruppe C er dermed eneste gruppe med gjennomsnitt bakterier/g over deteksjonsgrensen (log 2 bakterier/g) ved første prøveuttak. Det ble ikke gjort funn av *P. aeruginosa* ved dag 28 i gruppe C. Ved dag 35 ble det detektert *P. aeruginosa* i 2 individer i gruppe S (log 5.2 og log 2.7 bakterier/g) og ett individ i gruppe SI (log 4.8 bakterier/g).

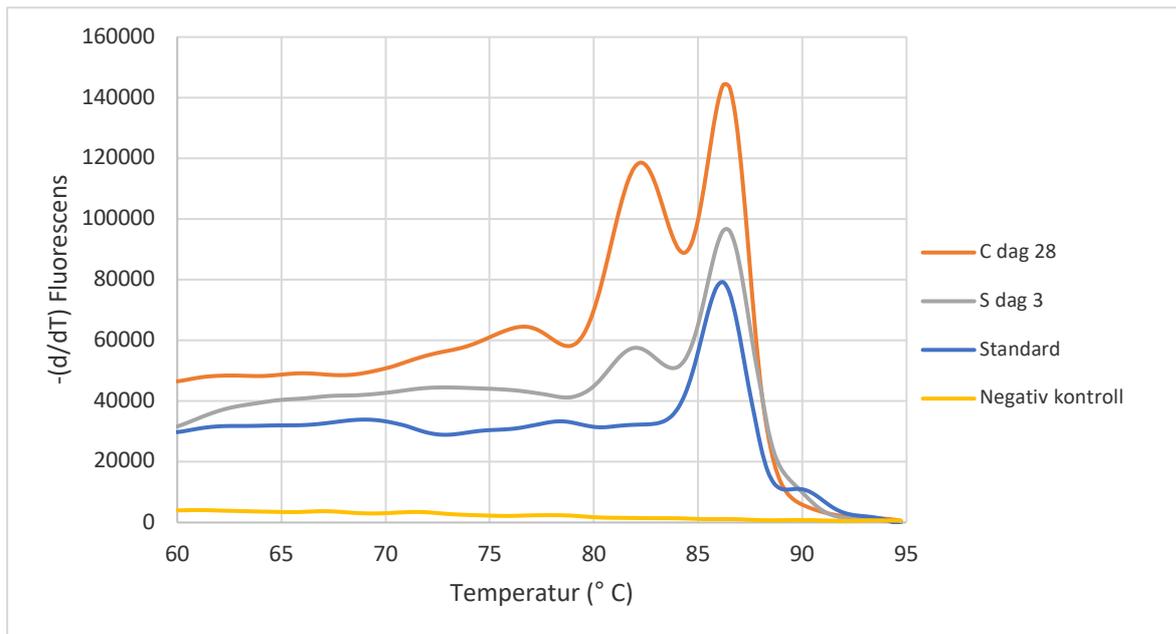
3.4.6 *Pseudomonas ssp.*

Ved dag 3 ble det målt log 5.1 ± 0.42 bakterier/g *Pseudomonas ssp.* i gruppe C, log 5.8 ± 0.65 bakterier/g i gruppe S og i gruppe SI var det log 5.9 ± 0.72 bakterier/g (Figur 3.18). Resultatene innhentet med qPCR for *Pseudomonas ssp.* ble korrigert ved å trekke fra log 1.36 (Reynisson *et al.*, 2008).



Figur 3.18 Gjennomsnitt \pm SD log bakterier/g av *Pseudomonas ssp.* målt i skinnprøvene fra kontrollfisk (C), Superkjølt uten is (S) og superkjølt med is (SI). Prøveuttak ble gjort dag 3 *post mortem* for alle grupper, og dag 28 for C og 35 for S og SI.

Smeltekurveanalysen (Figur 3.19) for prøver hentet ut ved dag 28 og 35 viser at prøvene har to topper, som betyr at analysen detekterer noe uspesifisert i prøven og vi får et kraftig overestimert resultat for *Pseudomonas ssp.* Det vil si at analysen ikke er spesifikk for *Pseudomonas ssp.* Resultatene fra smeltekurvene til skinnprøvene fra dag 3 tyder på at deteksjonen av *Pseudomonas ssp.* ved denne dagen er riktig.



Figur 3.19. Smeltekurveanalyse av *Pseudomonas ssp.*. Figuren viser grav for negativ kontroll (gul), standard (blå), kontroll ved dag 28 (oransje) og superkjølt uten is dag 3 (grå). Endring i fluorescens intensitet plottet mot funksjon av temperatur.

3.5 Sensorisk holdbarhet

3.5.1 Quality index measurement (QIM)

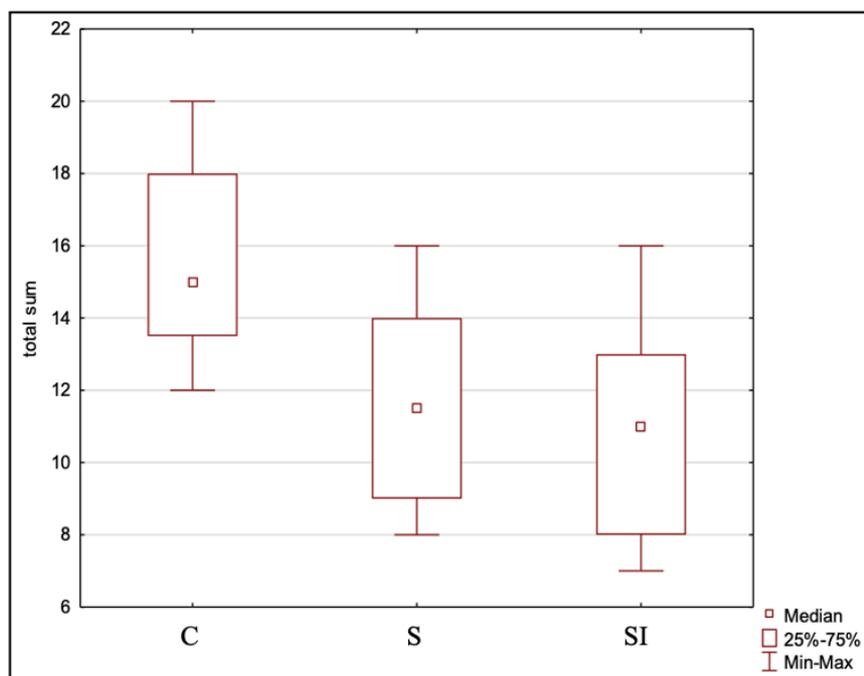
Resultatene av QIM-analysen vises i Tabell 3.3. For kvalitetsparameterne; utseende – mørk skinnside, utseende – slim, øye – form, gjelle – lukt, gjelle – farge og totalsum, er C den gruppen med høyest verdi, og dermed lavest sensorisk kvalitet. De superkjølte fiskene, S og SI, har lik score på de fleste kvalitetsparametere utenom gjelle – lukt og gjelle – farge, hvor S har en høyere verdi enn SI.

Tabell 3.3: QIM-analyse. Medianverdi for hver gruppe og p-verdi, for hver analysert kvalitetsparameter.

	C	S	SI	p-verdi
Utseende – mørk skinnside	2	1	1	< 0.0001
Utseende – Slim	2	1	1	< 0.0001
Utseende – tekstur	1	1	1	0.69
Øye – form	2	1	1	0.02
Øye – klarhet	1	1	1	0.20
Gjelle – farge	2	2	1	0.99
Gjelle – slim	2	2	2	0.78

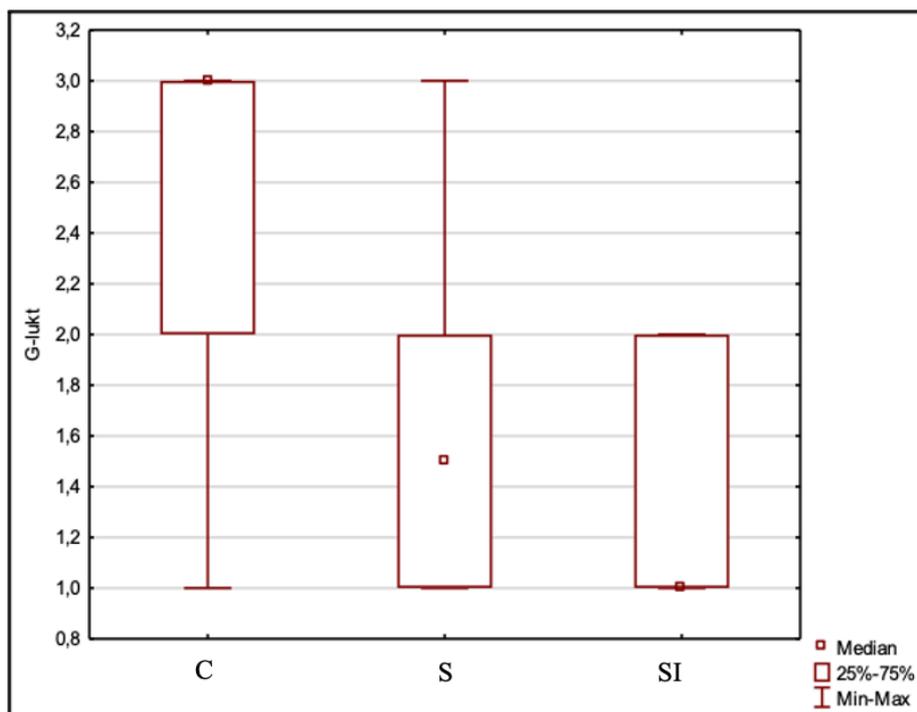
Det er signifikante forskjeller mellom gruppene for kvalitetsparameterne; Utseende - mørk skinnside, Utseende- slim, øye - form, gjelle lukt i tillegg til totalsum (Tabell 3.3). Dette er som nevnt de kvalitetsparameterne som C scorer høyere i enn S og SI.

QIM totalsum er høyere for kontrollfisk enn den superkjølte fisken (Figur 3.20), Gruppe C er signifikant forskjellig fra S ($p < 0.005$; median test) og SI ($p < 0.0005$; median test). S er ikke signifikant forskjellig fra SI ($p > 1.00$; median test).



Figur 3.20 QIM - Totalsum (median) for kontrollfisk(C), Superkjølt fisk uten is (S) og Superkjølt fisk med is (SI) med tilhørende 25 og 75 % kvartil og min-maks verdi.

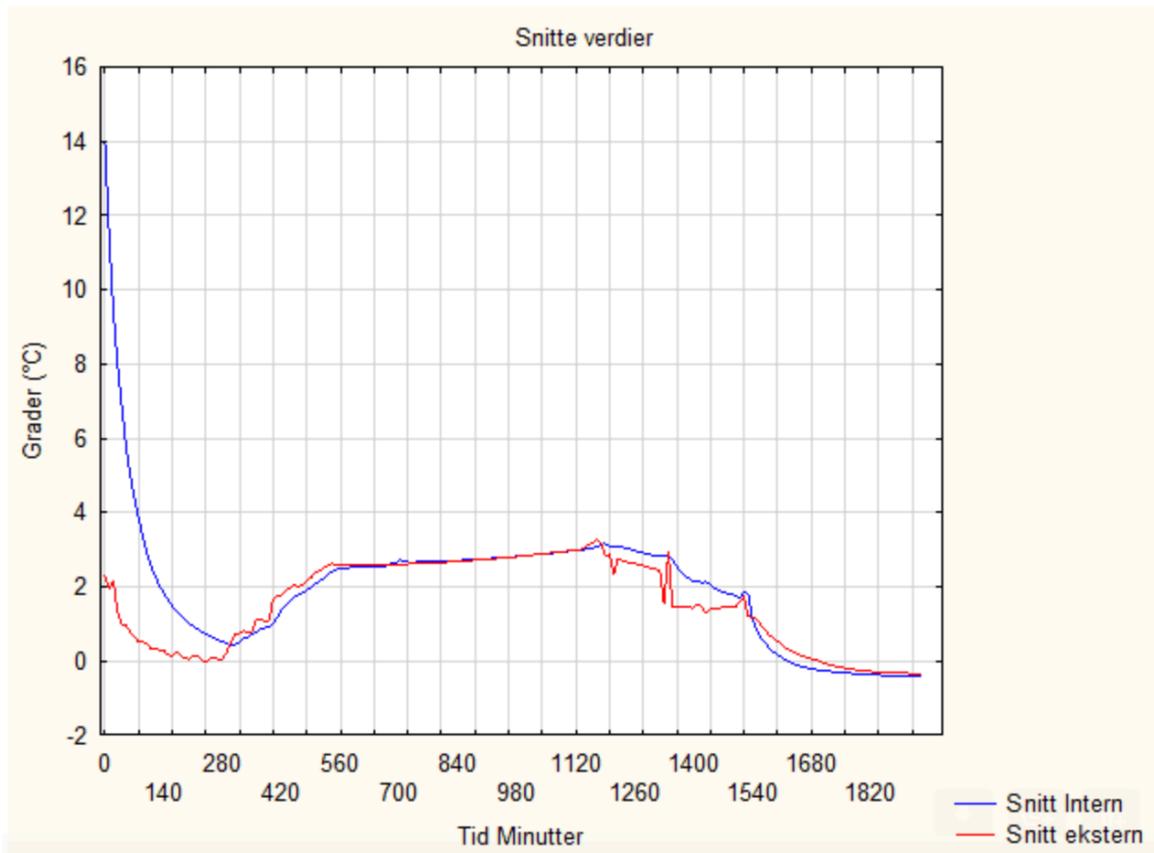
Medianverdier for gjellelukt (Figur 3.21), C er signifikant forskjellig fra S ($p < 0.005$; median test) og SI ($p < 0.00005$; median test), S og SI er ikke signifikant forskjellig fra hverandre ($p > 1.00$; median test).



Figur 3.21. QIM – Median verdier for gjellelukt for kontrollfisk (C), Superkjølt fisk uten is (S) og Superkjølt fisk med is (SI) med tilhørende 25 og 75 % kvartil og min-maks verdi.

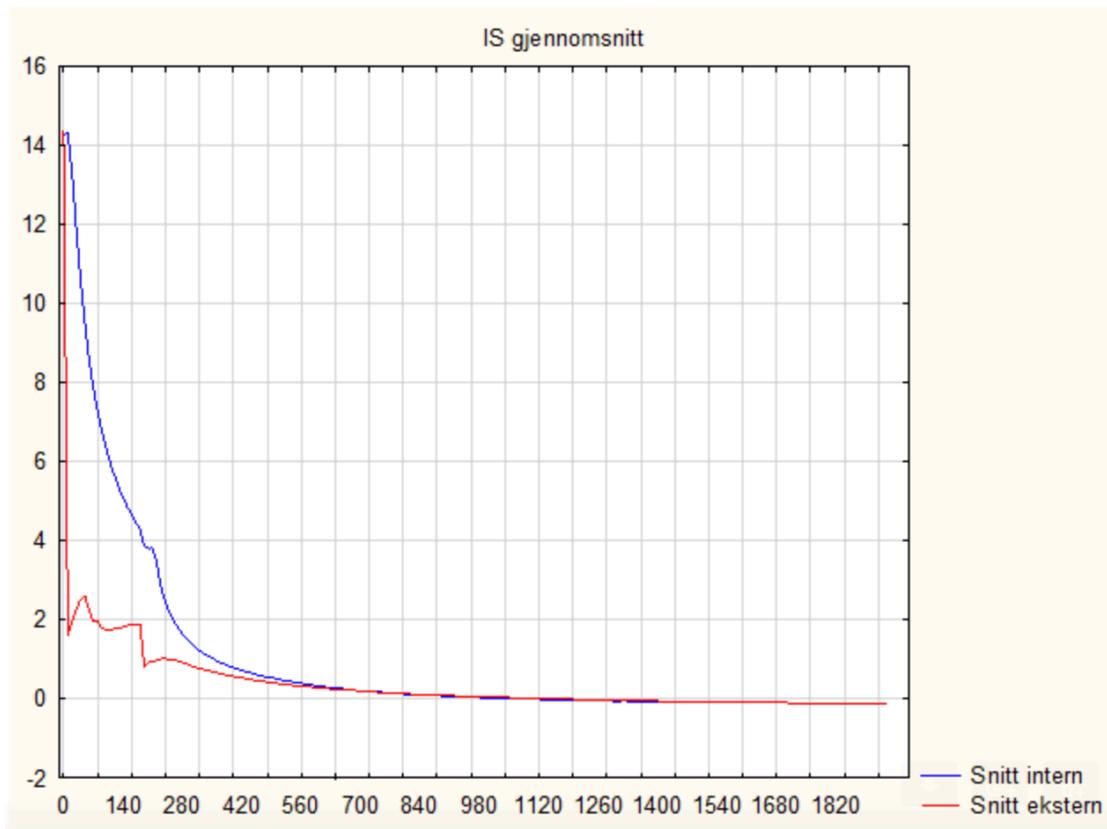
3.6 Temperaturmålinger

Kjølekjeden til kveiten ble målt ved bruk av temperaturloggere plassert inni buken til kveiten, og viser intern og ekstern temperatur over tid. Figur 3.22 viser at den interne temperaturen til kontrollfisken er mellom 0 - 2 °C ved 280 min, den eksterne temperaturen er ved 0 °C ved 280 min. Etter dette øker den interne og eksterne temperaturen, den ligger lenge ved 3 °C, og intern og ekstern temperatur holder seg relativt stabil i forhold til hverandre. Kontrollfisken har ikke en intern temperatur på 0 °C før etter 1610 min.



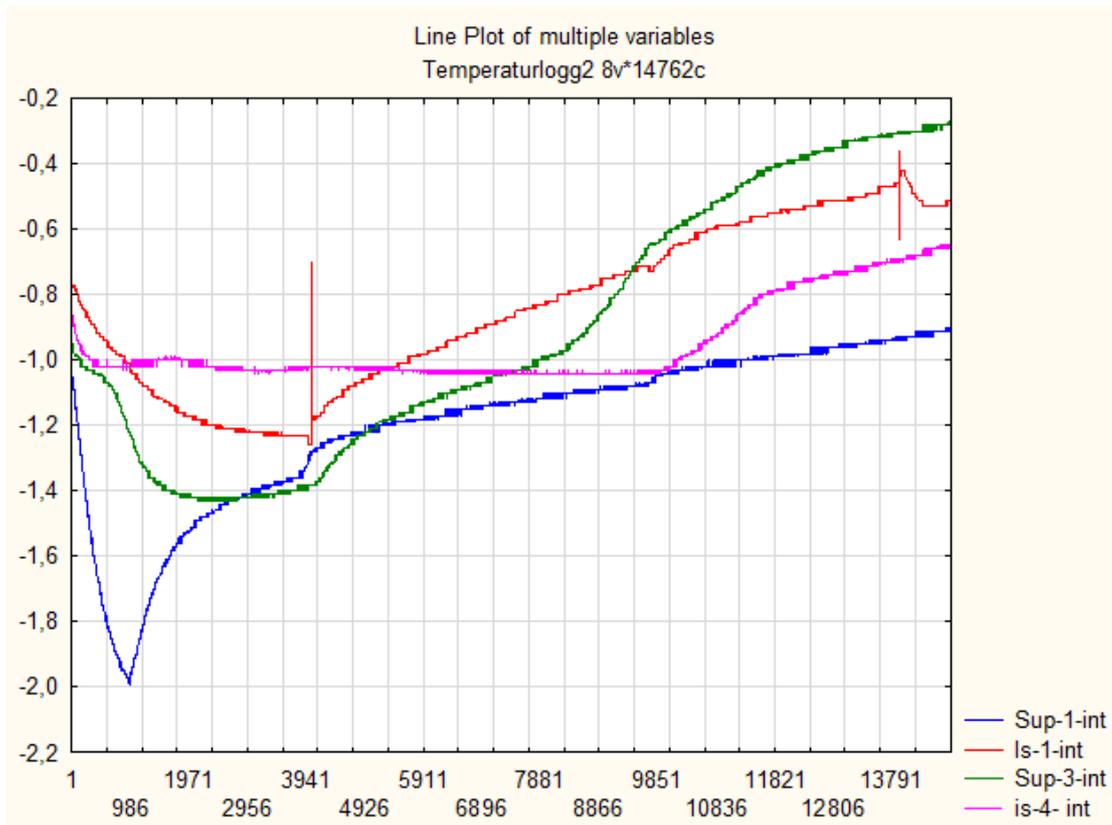
Figur 3.22 Kjølekjede for kontrollfisk, gjennomsnitts temperatur (°C) målt internt (blå) og eksternt (rød) over tid.

Den superkjølte fisken (Figur 3.23) har også en temperatur mellom 0 – 2 °C ved 280 min, men kurven viser en jevnere reduksjon i temperatur frem til den stabiliserer seg på 0 °C rundt 840 min. Fisken som superkjøles får en raskere nedkjøling av interntemperatur i forhold til kontrollfisk. Ekstern og intern temperatur for superkjølt fisk (S og SI) kan sees i Figur B4 og B5 i Appendix.



Figur 3.23 Kjølekjede for superkjøltfisk, gjennomsnitts temperatur (°C) målt internt (blå) og eksternt (rød) over tid (min)

Den interne temperaturendringer over tid i to superkjølte fisk med is og to superkjølte fisk uten is vises i Figur 3.24. Grafene har svingninger, men alle holder seg under 0 °C under lagringsperioden. Den ene superkjølte uten is kjøles helt ned til -2 °C ved 986 min, før det skjer et brudd i kjølekjeden som får temperaturen til å stige over tid. Temperaturen ved siste måling legger seg så rundt -0.5 °C. For den andre superkjølte uten is svinger temperaturen fra -1 °C ved 1 time, til -1,4 °C ved 1971 til 3941 timer og deretter opp til -0.3 °C ved siste måling. Den rosa grafen som hører til en superkjølt fisk med is, viser at den interne temperaturen holder seg ved -1.0 grad fra 1 time til 9851 timer, herfra øker temperaturen opp til ca. -0.6 °C ved siste måling. For den siste superkjølte fisken med is ser vi en jevn temperaturreduksjon frem til 3941 hvor det skjer et brudd i kjølekjeden og temperaturen øker, den endelige temperaturen ligge ved -0.5 °C.



Figur 3.24 Multipel lineplott av interne temperaturendringer i to superkjølte med is og to superkjølte ute is.

4. Diskusjon

4.1 Metode evaluering

Under utførelse av holdbarhet ble det første uttaket av kontrollfisk og superkjølt fisk hentet ved dag 3 *post mortem*. Dette var fordi det ikke var mulig å få hentet ut prøver fra kontrollfisk ved dag 0, da fisken ble sendt til slakteri fra lokaliteten og måtte så hentes. Dag 3 ble for oss den første mulige dag for prøveuttak og det ble derfor også replisert for superkjølt fisk som ble fraktet direkte fra lokaliteten til laboratoriet. Det var også svært viktig at kveiten som skulle bli superkjølt ble nedkjølt til lav nok temperatur, kveiten ble kjølt til $-1.2 / -1.4$ °C. For å simulere frakt fra slakteri for den superkjølte fisken som allerede var på lab, ble den plassert i kjølerom ved 4 °C.

Når fisken ble superkjølt ble temperaturen senket for lavt og innvollene ble frosset. Det ble derfor ikke mulig å sløye den superkjølte fisken ved samme tidspunkt som kontrollfisken ble sløyd. Når fisken ble hentet ut fra RSW tanken var den kjølt ned mot frysepunkt på $-1.2 / -1.4$ °C og siden den ikke kunne sløyes med en gang, ble den plassert direkte i kasser med og uten is. Superkjølingen var derfor for hard med tanke på prosessering, og forstyrret forsøksdesignet. Kjøletemperatur og frysepunkt er faktorer som må vurderes med tanke på kommersialisering. Den superkjølte kveitens temperatur måtte stige før fisken kunne bli sløyet. Den superkjølte fisken ble sløyd dag 14 *post mortem*.

Skinnpøver ble tatt ved første og siste prøveuttak. Kontrollfisken hadde sensorisk og mikrobiologisk holdbarhet som tilsa at fisken var klar for å kastes ved dag 28 *post mortem*, siste uttak ble derfor utført denne dagen. Den superkjølte fisken hadde bedre sensorisk og mikrobiologisk holdbarhet enn kontrollfisken og det siste prøveuttaket for superkjølt fisk tatt 35 dager *post mortem*. Det ble derfor utført qPCR analyse på prøver tatt ved ulike dager. Fra det første uttaket ved dag 3 er det likt for alle grupper, og det siste uttaket er tatt ved en ukes mellomrom, dag 28 (for C) og 35 (for S og SI).

Muskel-pH ble målt fra 0 til 78 timer *post mortem*. pH-verdiene svinget under målingene og ved siste måling var ikke pH-meteret kalibrert riktig. Dataene fra siste måling ble derfor ikke tatt med i resultatene.

For analyse av psykotolerante mikroorganismer i sjømat er det anbefalt å bruke NMKL (Nordisk metodikkomité for næringsmidler) metode nr. 184 (Broekaert *et al.*, 2011). Denne metoden er en konvensjonell dyrkningsbasert metode for bestemmelse av aerobt kimtall og spesifikke spoleringsorganismer i fersk og lettkonserverte fisk og fiskeprodukter (NKML, 2006). JA kan brukes for bestemmelse av total aerobt kimtall og H₂S-produserende bakterier. H₂S-produserende bakterier vises som svarte kolonier i JA, da H₂S-produserende bakterier bryter ned L-cysteine og den svarte fargen kommer som et resultat av utfellingen av jernsulfid (FeS) (Gram, Trolle, & Huss, 1987). Long & Hammer agar er brukt for bestemmelse av kuldetolerante og varmelabile mikroorganismer (NKML, 2006). *Shewanella*, *Vibrio*, *P. phosphoreum*, *Pseudomonas*, og *P. fluorescens* vil ikke vokse på PCA, beregningen av bakteriell vekst vil derfor være underestimert for PCA. Bakterier som ikke krever NaCl vokser bedre på PCA, som *Flavobacterium*, *Pseudomonas ssp.* og *Acinetobacter ssp.* Dette indikerer at mikroorganismer som er viktige for spoling av fersk fisk, er avhengig av medium med tilsatt salt. L&H agar har dermed bedre kvantitativ totalkim og kvalitativ resultat for kvalitetsanalyser av fisk (Broekaert *et al.*, 2011).

Deteksjonsgrenser under real-time PCR ble i dette studiet satt til log 2 bakterier/g. De negative kontrollene var alltid negative. Dette viser at real-time PCR analysen var pålitelig.

Deteksjonsgrensen for total aerobt mesofilt kimtall og H₂S-produserende bakterier var satt til 1 log CFU/g. Deteksjonsgrensen for psykotroft kimtall på PCA og L&H er satt til log 2.3 CFU/g.

4.2 Kvalitetsresultater

Atlantisk Kveite er ansett som en premium kvalitetsfisk som er reflektert i markedsprisen, og med en slik høy markedspris er det også forventet høy kvalitet fra forbruker. Ved å forbedre kvaliteten på produktet kan man også øke lønnsomhet samtidig som man bevarer fiskevelferden. Det er utført få studier på kvalitet av kveite (Guillerm-Regost *et al.*, 2006; Roth, Foss, *et al.*, 2009), og de få analysene er som regel utført på kveite over en gitt lagringsperiode. Det er derfor vanskelig å se dem i sammenheng med dette prosjektet, hvor det er utført analyser på endring i kvalitetsfaktorer som resultat av stresseksposering og ikke som resultat av lagringstid.

Stresseksponering under høsting har en effekt på muskel-pH (Roth *et al.*, 2012). Endringer i muskel-pH målt i kveite påvirkes av stresseksponering *pre mortem* som resulterer i at muskel-pH faller raskere for fisk stresset *pre mortem*. Kombinasjonen av sen trenging og pumping gir en signifikant forskjell mot kontrollfisk. Dette er i samsvar med andre studier utført på atlantisk laks (Lerfall *et al.*, 2015; Roth *et al.*, 2012). pH i blod blir også påvirket av stress, hvor resultatene fra blodmålingene viser signifikant fall i pH for både tidlig og sen trenging sammenlignet med kontrollfisk.

Anaerob dannelse av ATP som følge av stress, fører til opphoping av laktase, som igjen fører til lavere pH. Lavere pH fører så til tidligere inntredning av *rigor mortis*. (Roth *et al.*, 2012). I følge Roth *et al.* (2012) påvirker stresseksponering i form av pumping og trenging *pre mortem* tiden det tar før utbrudd av *rigor mortis* i atlantisk laks, dette ble også påvist i atlantisk kveite under denne studien. Resultatene fra dette forsøket viser en raskere inntreden av full *rigor mortis* i stresset fisk, full rigor målt i stresset fisk var lavere enn hos kontrollfisken. *Rigor mortis* er en kvalitetsfaktor som er avhengig av tid. Etter 12 timer var alle individene i *rigor mortis*, og ved 24 timer er flere av individene fra kontrollgruppen og tidlig trenging på vei ut av *rigor mortis*. Få individer med forskjeller gir dermed høye standardavvik. Tidlig inntredelse av *rigor mortis* som følge av stress rundt slakting, kan skape problemer med kvalitetsfaktorer som økt filetspalting (Roth, Birkeland, & Oyarzun, 2009). *Rigor mortis* blir påvirket av flere faktorer, blant annet temperatur, og for fremtidige undersøkelser på Atlantisk kveite ville det vært spennende å undersøke effekten superkjøling har på *rigor mortis* i Atlantisk kveite.

En vanlig utfordring i matindustrien er å opprettholde lavt drypptap og god vannbindingsevne. Flere ulike metoder kan bli brukt for å måle vannbindingsevne, konvensjonelle metoder som sentrifugeringstap, gravitasjonstap, koketap og tine tap. Ikke-invasive metoder som lavfelt-kjernemagnetisk resonans (LF-NMR), magnetisk resonansavbildning (MRI) og nær-infrarød spektroskopi (NIR). Resultater oppnådd fra ulike målinger bør sammenlignes med studier som inkluderer de samme tekniske detaljene og beregningsmetodene (Chan, Roth, Jessen, Jakobsen, & Lerfall, 2022). Dersom fiskemuskelen mister vann, vil vekten av produktet synke og dermed også påvirke salgspris (Olsson *et al.*, 2003).

Stresset Atlantisk laks har i følge Roth *et al.* (2006) signifikant høyere drypptap, filetspalting og mykere tekstur enn fisk som ikke har vært stresset *pre mortem* (Roth *et al.*, 2006). I dette forsøket ble det ikke observert filetspalting i kveite muskel. Resultatene viser

også ingen signifikant forskjell mellom tidlig trenging og sen trenging i målinger av drypptap, tørrstoff.

Et studie utført av Duun (2008) viste at laksefileter som ble superkjølt ved $-1.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hadde signifikant høyere drypptap (1.6 %) enn de lagret ved $-3.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0.3 %). Drypptap under 2 % er ansett som lavt (Chan *et al.*, 2022). Chan *et al.* (2020) utførte et studie på effekten av superkjøling i RSW på vannbinding i atlantisk laks ved subzero temperaturer. De fant at fisk lagret i RSW og så på is etter filetering har lavest drypptap, men de lagret i RSW og deretter superkjølt i flytende nitrogen gav den lavest vannbindingsevnen (Chan *et al.*, 2022). I fremtidige studier vil det derfor være spennende å undersøke effekten superkjøling har på vannbindingsevne i Atlantisk kveite.

Generelt tilsvarer lav vannbindingsevne at muskelen er preget av en høy grad av fasthet og fibrøs struktur (Olsson *et al.*, 2003). Stress under slakt kan føre til bløt tekstur og høyere grad av filetspalting (Mørkøre, 2008). Endringer i tekstur som resultat av stresseksposering *pre mortem* ble analysert i dette forsøket, hvor det i analyse av 60 % hardhet ble bekreftet signifikant forskjell mellom tidlig og sen trenging. Det ble derimot ikke påvist signifikante forskjeller mellom tidlig og sen trenging i måling av brudd. Her er det naturlig å forvente en større forskjell om vi hadde hatt kontrollfisk mot sen trenging.

Det er vanlig å eksponere fersk fisk for luft under utstilling av fersk sjømat i ferskvaredisken. Fisk inneholder flerumettede fettsyrer og eksponering for luft fører til oksidering av disse flerumettede fettsyrene. Oksidasjonen forårsaker harskning av produktet som også resulterer i forringelse av farge, tekstur og smak (Frigg, Prabucki, & Ruhdel, 1990; Waagbø, Sandnes, Torrissen, Sandvin, & Lie, 1993). Ruff, Fitzgerald, Cross, and Kerry (2002) rapporterer gode resultater angående fargeendring i vill Atlantisk kveite, det rapporteres om små endringer i farge som følge av lipidoksidasjon. Hos hvit fisk er nyansevinkel og kroma nesten utelukkende definert av b^* -verdier, ettersom fileter blir mer gule. Det konkluderes med god holdbarhetskapasitet når det kommer til farge på vill Atlantisk kveite, og funnene er sett i sammenheng med kjent materiale for oppdrettsfisk. Det konsekvente forholdet mellom fargeparameter og lipidoksidasjon for Atlantisk Kveite kan være brukbart i holdbarhets forventinger (Ruff *et al.*, 2002).

Farge i fiskens kjøtt blir i dette prosjektet analysert både som en sensorisk kvalitetsparameter (QIM analyse) og ved bruk av DigiEye (CIEL*a*b*). Det ble ikke målt farge over tid i dette forsøket, men farge etter stresseksposering. Det er kjent at stress

eksponering reduserer pH i kveitemuskel, og økt det er rapportert økt lyshet i fiskefilet med lavere *post mortem* pH (Robb, 2001). Filetfargen i Atlantisk kveite korrelerer også med muskel-pH (Roth, Foss, *et al.*, 2009). Det er i dette forsøket ikke avdekket signifikante forskjeller i L*,a* eller b* mellom tidlig trenging og sen trenging. Ifølge Guillerm-Regost *et al.* (2006) starter L* verdien i kveite lagret på is ved 50-70 og over tid stabiliserer den seg ved 70-80. Resultatene fra dette forsøket gav L* verdi på 78.6 ± 1.23 for tidlig trenging og 78.6 ± 1.67 for sen trenging.

4.3 Superkjøling

Superkjøling er et godt alternativ til å bevare kjølekjeden av ferske fiskeprodukter. Etter prosessering av fisken er neste oppgave å opprettholde temperaturen under lagring og transport. Pakking av produktet spiller stor rolle i å opprettholde kjølekjeden og å unngå temperaturvariasjoner (Kaale *et al.*, 2011). Ved konvensjonell pakking av fisk i kasser med is er 20 % av totalvekten fra tilsatt is, isen holder fisken kald og fersk, men tar mye plass. I 2010 ble det eksportert 922 00 tonn med laks fra Norge, mesteparten av denne fisken var fersk og pakket med is. Det betyr at i tillegg til 922 000 tonn laks ble det eksportert ut 230 millioner liter vann, dette tilsvarer 7500 trailere med is (Sivertsvik & Rotabakk, 2013).

Iskrystallene som dannes under superkjøling, ved overflatelaget, absorberer varme fra miljøet og temperaturen kommer i likevekt i det superkjølte produktet. Superkjøling skaper på denne måten et internt is lager slik at det ikke blir et behov for ekstern lager med is under transport eller lagring ved korte perioder (Kaale *et al.*, 2011). Superkjøling minimerer dermed energi-, arbeids- og transportkostnader og miljøpåvirkning (Kaale & Eikevik, 2014). Transportkostnader blir lavere når all den isen som tidligere er brukt for kjøling blir fjernet, det er nå plass til mer kveite i hver kasse nå som det ikke er is. Det er også miljøbesparende å ikke måtte pakke med is. Kjøling står for omtrent 40 % av det totale energibehovet under distribusjon, dette gjør distribusjon av frossen mat 1.7 ganger så energikrevende som distribusjonen av dagligvarer ved omgivelsestemperatur (McKinnon & Campbell, 1998). I tillegg brukes mindre vann og mindre energi for omgjøring av vann til is.

Dersom fisken tiner og fryser om hverandre, så vil det bli dannet større iskrystaller som igjen fører til høyt tørketap. Om fisken blir superkjølt og deretter lagret på kjølerom så vil temperaturen gradvis stige. Med is vil da isen smelte og holde fisken kald. Uten is vil fiskens temperatur stige over 0 °C grader. Superkjøling utvider muligheten for transport av ferske

produkter av høy kvalitet til nye potensielle områder til fornuftige kostnader (Wang & Sun, 2012). For lengre perioder vil det være behov for ekstra nedkjøling (Kaale *et al.*, 2011).

Videre kan man gjøre forsøk for å optimalisere superkjølingen, ved å undersøke hvilken metode av superkjøling som gir best resultater, ved å se på ulike faktorer som temperatur, nedkjølingstid, bruk av gass eller RSW for nedkjøling osv.

4.4 Mikrobiologisk holdbarhet

Bakteriell -og sensorisk holdbarhet er svært viktige faktorer for markedsføring av Atlantisk kveite da den som regel selges fersk, uten andre former for konservering som beskytter mot spoleringsprosesser (Ruff *et al.*, 2002). Det er utført få studier om holdbarhetsegenskapene til Atlantisk kveite (Guillerm-Regost *et al.*, 2006) samt analyser av bakterieflora på kveiteskinn. Det er kjent at kveite har lengre holdbarhetstid enn andre fiskearter, årsaken er ukjent, men det spekuleres i om det finnes høye nivået av antimikrobielle peptider i slimet (Birkemo, Mantzilas, Lüders, Nes, & Nissen-Meyer, 2004).

Pilotforsøket av holdbarhet fungerte god i å sikre en riktig utførelse av hovedforsøket. Resultatene fra den mikrobiologiske analysen viser at kontrollgruppen har høyere log CFU/g, gruppe S og SI er relativt like, men S er nest høyest og SI er lavest. Når det totale kimtall for fersk fisk er ved 6 log CFU/g er den ansett som spolert, og produktet er uønsket av kunder (Broekaert *et al.*, 2011). Total aerobt mesofilt kimtall øker med lagringstid, maksimum ble målt til log 7 CFU/g for alle grupper. Kontrollfisken nådde maksimum ved dag 21 og superkjølt ved dag 28, før bakteriell vekst flatet ut for alle grupper. Mengden H₂S-produserende bakterier økte frem til log 5 CFU/g før det flatet ut for alle grupper, for kontrollfisken var maksimum nådd ved dag 21 og for superkjølt fisk ved dag 28.

Guillerm-Regost *et al.* (2006) fant i sitt holdbarhetsforsøk på muskelprøver med skinn fra oppdrettskveite, et total aerobt mesofilt kimtall som falt fra 3 log CFU/g til 2 log CFU/g fra dag 1 til dag 4. Guillerm-Regost *et al.* (2006) og Hovda, Sivertsvik, Lunestad, Lorentzen, and Rosnes (2007) fant i likhet med denne studien at kimtallet økte frem til dag 20 og 23, hvor det nådde et maksimum på 7 log CFU/g før det jevnet seg ut.

For H₂S-produserende bakterier fant Guillerm-Regost *et al.* (2006) i sitt studie at bakterienivået holdt seg konstant frem til dag 8, i denne studien holdt verdiene for H₂S-produserende bakterier seg konstant for superkjølt fisk, men ikke for kontrollfisk. I likhet med Guillerm-Regost *et al.* (2006) ble maksimum for H₂S-produserende bakterier målt til 5 log CFU/g.

Det totale aerobe mesofile kimtall målt på kveitemuskel i dette prosjektet var målt til log 6 CFU/g ved dag 17 for kontrollfisken og for den superkjølte fisken ved dag 23 *post mortem*. Det betyr en økning i holdbarhet på 6 dager ved å superkjøle kveite i RSW. Holdbarheten regnes kun ut fra totalkim. Analyse av psykrotrofe bakterier ved 15 °C og 8 °C viser også at det er en redusert bakteriell vekst på superkjølt fisk, som kan tilsi en økning av holdbarhet på 5-6 dager. Psykrotroft kimtall ved 15 °C var målt til log 6 CFU/g etter 16 dager, superkjøltfisk har log 6 CFU/g etter 21-22 dager. Psykrotroft kimtall ved 8 °C på kontrollfisken ble målt til 6 log CFU/g etter 16-17 dager, superkjølt uten is var ved log 6 CFU/g etter 21 dager, og superkjølt med is har 6 log CFU/g etter 22 dager.

Selv om konsentrasjonen av aerobt kimtall kan brukes som en generell indikator på mikrobiologisk kvalitet, indikerer ikke konsentrasjonen av total aerobt kimtall tilstedeværelsen av spesifikke spolerings organismer, for det spesifikke produktet under de spesifikke emballasjebetingelsene (Fogarty *et al.*, 2019). Det ble ikke gjort funn av H₂S-produserende bakterier før dag 14 i superkjølt fisk. Log CFU/g for H₂S-produserende bakterier er lavere enn for totalkim. Kontrollgruppen når log 4 CFU/g ved dag 16, mens superkjølt når log 4 CFU/g 22 dager *post mortem*, det er en redusert bakteriell vekst på 6 dager.

Den superkjølte fisken har ikke en bakteriell vekst av betydning før dag 14, mens kontrollfisken har bakterievekst allerede ved dag 7. Ved å ikke superkjøle fisken taper man derfor en hel uke i holdbarhet. Det skjer en bakteriell vekst i produktet helt fra start som man ikke har stoppet og den logaritmiske veksten ødelegger resten av holdbarheten. Ved dårlig behandling fra start vil man tape det man har investert på veien, og et så bra produkt som hel atlantisk kveite er blir spolert lenge før nødvendig. Tidligere studier av superkjølt laks viser i likhet med denne studien at superkjøling reduserer vekstraten av all bakteriell vekst, og øker dens holdbarhet (Duun, 2008; Kaale *et al.*, 2011)

4.5 qPCR analyse av skinnprøver

Mengden av en bestemt bakterie reflekterer ikke nødvendigvis spoleringsstatus for enhver fisk da spolering av fisk er artsspesifikk og avhengig av fiskens opprinnelse, prosesserings- og lagringsforhold (Reynisson *et al.*, 2008). I tillegg avhenger spoleringen av hvilke bakterier som er tilstede. Fisk fra tempererte vann lagret på is under aerobe forhold er normalt dominert av

S. putrefaciens, *Photobacterium* ssp., *Pseudomonas* ssp., og *Vibrionaceae* (Huss, 1995). Det ble derimot ikke gjort funn av *S. putrefaciens* eller *P. aeruginosa* på kveiteskinn under lagringsperioden. Hovda *et al.* (2007) gjorde ikke funn av *S. putrefaciens* i kveite ved bruk av PCR-DGGE, men den ble funnet sporadisk og i lave konsentrasjoner basert på mikrobielle metoder (Hovda *et al.*, 2007). Roth *et al.* (2014) fant ikke *S. putrefaciens* eller *P. aeruginosa* på skinnprøver fra piggvar (*Scophthalmus maximus*) over tid (Roth *et al.*, 2014).

I en studie utført av Himelbloom, Brown, and Lee (1991) ble det funnet at mikrofloraen til hel stillehavskveite (*Hippoglossus stenolepsis*) er dominert av *Moraxella*-arter, etterfulgt av *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, og *Anthrobacter/Corynebacterium*. Den mikrobielle floraen i sløyd kveite var dominert av *Anthrobacter/Corynebacterium* og *Moraxella* (Himelbloom *et al.*, 1991).

I likhet med Roth *et al.* (2014) var *P. phosphoreum* under deteksjonsgrensen frem til siste prøveuttak, og både *Vibrio* ssp. og *Lactococcus lactis* ssp. var stabile under lagringsperioden for piggvar og kveite. Det er derfor naturlig å tenke at *Vibrio* ssp. og *L. lactis* ssp. er en del av normalfloraen på skinn og slim (Roth *et al.*, 2014). Hovda *et al.* (2007) konkluderte med at *P. phosphoreum*, *Pseudomonas* ssp. og *B. thermosphacta* er en del av den naturlige floraen på modifisert atmosfære pakket oppdrettskveite (Hovda *et al.*, 2007).

C. maltaromaticum er en veldig kundetolerant bakterie, den finnes i sjømat og er i stand til å vokse konsentrasjoner i forskjellige ferske og lett konserverte produkter. Etter frossen lagring (−20 til −30 °C i 5–8 uker) ser *C. maltaromaticum* ut til å være spesielt fremtredende i kjølt MAP-fisk (Leisner, Laursen, Prévost, Drider, & Dalgaard, 2007). I en studie utført av Paludan-Müller, Dalgaard, Huss, and Gram (1998) på vakuumpakket og modifisert atmosfærepakket kaldrøkt laks lagret ved 5°C, ble det funnet at selv når *C. maltaromaticum* er tilstede i høyt antall (10^7 - 10^8 CFU/g) i flere uker, akselerer ikke veksten spoleringsprosessen til pakket kaldrøkt laks. De konkluderte derfor med at *C. maltaromaticum* sannsynligvis ikke er ansvarlig for spoling av kaldrøkt laks (Paludan-Müller *et al.*, 1998). Det er rapportert at *C. maltaromaticum* kan produsere bacteriocin under spesifikke miljøbetingelser (Gursky *et al.*, 2006; Martin-Visscher *et al.*, 2008) som kan hemme vekst av andre bakterier (Roth *et al.*, 2014). På piggvar skinn var det *C. maltaromaticum* som var den dominerende bakterien (Roth *et al.*, 2014), og slik var også tilfellet for Atlantisk kveite. Resultatene fra dette studiet viser at konsentrasjonen av *C. maltaromaticum* er lav ved dag 3, og vokser bra ved 4 grader, og dermed utkonkurrerer de andre.

Pseudomonas ssp.

Standardkurve for qPCR analyse av *Pseudomonas ssp.* er ikke kommersielt tilgjengelig og måtte tillages. Metoden til Reynisson *et al.* (2008) for qPCR analyse av *Pseudomonas ssp.* i skinnprøver ble utført med både TaqManTM og SYBR Green Master Mix. TaqManTM Master Mix fungerte ikke under qPCR analyse av *Pseudomonas ssp.*, i motsetning til slik som Reynisson *et al.* (2008) rapporterer. I likhet med Reynisson *et al.* (2008) ble det gjort funn av *Pseudomonas ssp.* ved bruk av SYBR Green Master Mix. Analysen med SYBR Green Master Mix gav positivt utslag, men mengden *Pseudomonas ssp.* er kraftig overestimert ved siste uttak for både kontroll -og superkjøltfisk.

Ved slutten av en PCR-analyse tillater inkludering av dissosiasjonskjøring en generering av smeltekurver, i en smeltekurve er endringen i fluorescensintensitet plottet i funksjon av temperatur. Smeltekurvene reflekterer dissosiasjonen av PCR-produktene og kan brukes til vurdering av spesifisiteten til PCR-reaksjonen. En spesifikk PCR-reaksjon er karakterisert ved en enkel skarp topp, mens flere topper indikerer uspesifikke reaksjoner (D'haene, Vandesomele, & Hellemans, 2010). Studien til Reynisson *et al.* (2008) bestemte smeltepunkt for produktet til 85.7 °C, det stemmer overens med smeltekurvene (Figur 3.19) fra denne studien. Det vi også ser ut ifra smeltekurvene hentet fra analysen av *Pseudomonas ssp.* er at det er noe annet enn *P. putida*, *P. fluorescens* og *P. aeruginosa* i prøvene som blir detektert. Smeltekurvene fra skinnprøver hentet ut ved dag 28 (for C) og 35 (S og SI) har to topper, som indikerer en uspesifikk analyse og som kan forklare de kraftig overestimerte resultatene for *Pseudomonas ssp.* Smeltekurven fra det tillagde DNA eluatet fra renkulturene er lik smeltekurven fra prøvene ved dag 3. I prøver hentet ut dag 3 får vi smeltekurver med kun en topp og vi går derfor ut fra at analysen er riktig ved dag 3. Log bakterier/g er høy for *Pseudomonas ssp.* ved dag 3 og vi kan tenke oss til at *Pseudomonas ssp.* er en dominerende bakterie ved dag 3.

Reynisson *et al.* (2008) hadde utfordringer med falske positive prøver, de optimaliserte derfor qPCR analysen for å redusere støy ved å øke annealing temperatur fra 55 °C til 57 °C. Vi startet qPCR analysen av *Pseudomonas ssp.* ved å bruke 57 °C, vi prøvde deretter 59 °C i neste kjøring uten positiv effekt på støy.

Det Reynisson *et al.* (2008) har gjort i sine resultater av *Pseudomonas ssp.* med SYBR Greener å trekke fra log 1.36 og argumenterer for dette med at ved en sammenligning mellom

kvantifisering ved qPCR og standard dyrkningsmetode er det observert gjennomsnittlig forskjell på 1.36 log enheter. Da dette ble gjort på denne studiens resultater gav det lite utslag, det fortsatt er et kraftig overestimert resultat av *Pseudomonas* ssp. ved dag 28 og 35. Smeltekurvene fra analysen kan bekrefte at det er overestimert ved dag 28 og 35. Det blir ikke oppgitt smeltekurver for analysen utført med SYBR Green Master Mix av Reynisson *et al.* (2008). SYBR Green primere er ikke sensitiv nok for deteksjon av kun *Pseudomonas* ssp., og Reynisson *et al.* (2008) metode for identifisering av *Pseudomonas* ssp virket ikke på kveiteprøvene. En alternativ løsning er å bruke *P. aeruginosa* som indikatororganisme under PCR analyse av *Pseudomonas* ssp. *P. aeruginosa* kit ble brukt for qPCR analyse, men ble kun detektert i noen få individer ved bruk av TaqMan Master Mix under qPCR-analysen. qPCR analyse utført på Piggvar gjort av Roth *et al.* (2014) fant heller ikke *P. aeruginosa* i prøvene (Roth *et al.*, 2014). Det kan derfor tenkes at det er andre *Pseudomonas* ssp. som er mer dominerende i skinnprøvene.

4.6 Sensorisk holdbarhet

QIM-analysen viser tydelige forskjeller i kvaliteten og den positive effekten superkjøling har på den sensoriske holdbarheten. Superkjøling bevarer ferskheten i kveiten og kveiten oppfattes som et mer luksuriøst produkt etter superkjøling enn ved tradisjonell kjøling. I følge QIM-analyse utført av Guillerm-Regost *et al.* (2006) er kveiteskinn godt bevart med islagring fra dag 1 til 14, og etter dag 16 øker QIM scoren raskt. I dette forsøket var det tydelig at kontrollfisken var begynt å bli spolert ved dag 14, mens den superkjølte fisken var fortsatt fersk.

QIM analyse av laks viser at når laksen har en kvalitetsindeks mellom 0-7 så har laksen en sjølukt, søt smak og en smak av fersk fiskeolje. Med en kvalitetsindeks mellom 8-15 har laksen en nøytral lukt og smak, og når kvalitetsindeksen er mellom 16-20 blir den sur og harsk. Når kvalitetsindeksen er over 20 er den ikke lenger egnet til konsumering (Sveinsdottir, Hyldig, Martinsdottir, Jørgensen, & Kristbergsson, 2002; 2003). Mulig maksimum QIM score for dette forsøket var 22 poeng, verken kontrollfisk eller superkjølt fisk nådde maksverdi ved dag 22. I forsøk på kvalitet av islagret Atlantisk kveite av Guillerm-Regost *et al.* (2006) og Akse and Midling (2001), ble heller ikke maksimum QIM score nådd ved måling dag 26, som viser at oppdrettskveite har lang lagringsevne (Guillerm-Regost *et al.*, 2006). Rodrigues, Barros-Velázquez, Pineiro, Gallardo, and Aubourg (2006) viser også positive resultater for sensorisk kvalitet analysert på piggvar ved 22 d *post mortem* når den er lagret i slurry ice.

Kveite er en fisk med svært stor slimproduksjon, det er mye slim på skinnen og i gjellene, og produksjonen av slimet fortsetter en kort tid *post mortem*. Superkjøling av kveite viste seg derimot til å hjelpe på slimproblemet. Da kveitene ble hentet opp fra RSW slurry karet hvor kveiten ble superkjølt ble slimet som hadde delvis frosset til liggende igjen i saltvannskaret, resterende frossetslim ble liggende igjen sammen med isen i isoporkassene som fisken ble pakket. Dette ført til en «tørrere» fisk i moteting til kontrollfisken som hadde mye slim på seg. Denne positive sideeffekten gjorde utslag på QIM-analysen av slim på skinn, utført ved dag 22. Da hadde kontrollfisken mye misfarget slim, mens den superkjølte fisken (begge grupper) ikke hadde særlig slim. Alle grupper hadde lik score på gjelleslim ved dag 22. Kveite er som nevnt kjent for høy slimproduksjon, og kan dermed oppfattes som mindre appetittlig enn andre typer fisk. Lite slim som resultat av superkjøling vil derfor være en positiv effekt for forbruker som kan kjøpe fersk kveite som ser mer appetittvekkende ut der den ligger på is i ferskvaredisken.

Sensorisk analyse sammen med den mikrobielle analysen av kveite, kan bekrefte en positiv effekt av superkjøling på kveite, en lengre holdbarhetstid vil føre til lenger salgstid og dermed positiv økonomisk resultat.

Et mulig problem med en forlenget holdbarhet på 5-6 d kan være forbrukers forventninger til holdbarhetstid, kunden kan reagere negativt dersom holdbarheten er unormalt lang. De kan også tenkes seg at de kan reagere negativt dersom de får oppgitt superkjøling som behandlingsmetode, i tro om at da er ikke fisken like fersk som de ønsker.

5. Konklusjon

Dette studiet viser at superkjøling av hel Atlantisk kveite ned til frysepunkt ved hjelp av RSW, har en gunstig effekt og gir ifølge mikrobiologisk analyse 5-6 dager lenger holdbarhet sammenlignet med kontrollfisk. Samtidig viser sensorisk analyse at det superkjølte produktet holder en ypperlig kvalitet gjennom lagringsperioden. Denne studien bekrefter at temperatur er en svært viktig faktor for forlengelse av holdbarhet, og ved å opprettholde kjølekjeden kan man skape et luksuriøst produkt. Superkjøling i RSW er høyst effektivt på den sensoriske og mikrobiologiske holdbarheten, samtidig som den er miljøsparende. Superkjøling kan derfor gi en økonomisk lønnsomhet. Resultatene i dette prosjektet gir derfor grunnlag for å fortsette med superkjøling av kveite.

6. Referanse

- Akse, L., & Midling, K. Ø. (2001). Slaughtering of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) effects on quality and storage capacity. *Farmed fish quality*, 381.
- Amlacher, E. (2012). Rigor mortis in fish. *Fish as food*, 1, 385-409.
- Andersen, U. B., Strømsnes, A. N., Steinsholt, K., & Thomassen, M. S. (1994). Fillet gaping in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, 8, 165-179.
- Anderssen, K. E., Syed, S., & Stormo, S. K. (2021). Quantification and mapping of tissue damage from freezing in cod by magnetic resonance imaging. *Food Control*, 123, 107734. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107734>
- Austin, B. (1988). *Quantification of marine microbial populations*. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press.
- Barbut, S. (1996). Determining water and fat holding. *Methods of testing protein functionality* 186-225.
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Int Comp Biol*, 42(3), 517-525. doi:<https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Ben, E. K. (1994). *Microbiological safety and spoilage of sous vide fish products*. (Doctoral thesis), Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg, Denmark.
- Berg, E. (2019). Tema : Atlantisk kveite. Hentet fra <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/atlantisk-kveite>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). The regulation of cellular respiration is governed primarily by the need for ATP. *Biochemistry*, 5.
- Bergh, Ø. (1995). Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp. *Fish disease*, 18, 31-40.
- Birkemo, G. A., Mantzilas, D., Lüders, T., Nes, I. F., & Nissen-Meyer, J. (2004). Identification and structural analysis of the antimicrobial domain in hipposin, a 51-mer antimicrobial peptide isolated from Atlantic halibut. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1699(1), 221-227. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.03.001>
- Boge, L. M. (2022). Sjekkliste for fiskere. Hentet fra <https://nofima.no/fakta/sjekkliste-for-fiskere/>
- Bolinches, J., & Egidius, E. (1987). Heterotrophic bacterial communities associated with the rearing of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) with special reference to *Vibrio* spp. *Applied Ichthyology*, 3, 165-173.
- Broekaert, K., Heyndrickx, M., Herman, L., Devlieghere, F., & Vlaemynck, G. (2011). Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after ice storage on several general growth media. *Food Microbiology* 28(6), 1162-1169. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.009>
- Cargnelli, L. M., Griesbach, S. J., & Morse, W. W. (1995). Atlantic Halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*), Life History and Habitat Characteristics. *NOAA Technical Memorandum NMFS-NE-125*. U. S. Department of Commerce. NOAA. (125), 26.
- Chan, S. S., Roth, B., Jessen, F., Jakobsen, A. N., & Lerfall, J. (2022). Water holding properties of Atlantic salmon. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 477-498. doi:<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12871>
- Chan, S. S., Roth, B., Skare, M., Hernar, M., Jessen, F., Løvdal, T., . . . Lerfall, J. (2020). Effect of chilling technologies on water holding properties and other quality parameters throughout the whole value chain: From whole fish to cold-smoked fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 526, 735381. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735381>
- D'haene, B., Vandesompele, J., & Hellemans, J. (2010). Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods*, 50(4), 262-270. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.12.007>
- Dalgaard, P. (2000). Fresh and lightly preserved seafood. *Shelf-life Evaluation of Foods*, 2, 110-139.
- Daskalova, A. (2019). Farmed fish welfare: stress, post-mortem muscle metabolism, and stress-related meat quality changes. *International Aquatic Research*, 11(2), 113-124. doi:10.1007/s40071-019-0230-0

- Duun, A. S. (2008). *Superchilling of muscle food storage stability and quality aspects of salmon (Salmo salar), cod (Gadus morhua) and pork*. (Doctoral thesis), NTNU, Trondheim.,
- Fogarty, C., Whyte, P., Brunton, N., Lyng, J., Smyth, C., Fagan, J., & Bolton, D. (2019). Spoilage indicator bacteria in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored on ice for 10 days. *Food Microbiology*, 77, 38-42.
- Foss, A., Imsland, A. K., Vikingstad, E., Stefansson, S. O., Norberg, B., Pedersen, S., . . . Roth, B. (2009). Compensatory growth in Atlantic halibut: Effect of starvation and subsequent feeding on growth, maturation, feed utilization and flesh quality. *Aquaculture*, 290(3), 304-310. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.02.021>
- Frigg, M., Prabucki, A. L., & Ruhdel, E. U. (1990). Effect of dietary vitamin E levels on oxidative stability of trout fillets. *Aquaculture*, 84, 145-158.
- Gallart-Jornet, L., Rustad, T., Barat, J. M., Fito, P., & Escriche, I. (2007). Effect of superchilled storage on the freshness and salting behavior of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Food Chemistry*, 103(4), 1268-1281.
- Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180, 147-165.
- Gismervik, K., Gåsnes, S. K., Nielsen, K. V., Tørud, B., & Mejdell, C. M. (2021). *Fiskehelsesrapporten 2020*. Retrieved from https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2021/fiskehelsesrapporten-2020/_attachment/download/79e31f1d-cc8a-4d5a-ab70-e795bad3bd99:f46132d8d0951994365894aa3d7e0a0163e3b095/Fiskehelsesrapporten%20210521.pdf
- Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 262-266. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00309-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00309-9)
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International journal of food microbiology*, 33(1), 121–137. doi:[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01134-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01134-8)
- Gram, L., & Huss, H. H. (2000). Fresh and processed fish and shellfish. *The Microbiological Safety and Quality of Foods*, 1, 472-506.
- 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. *Food Microbiology*, 4, 65-72.
- Guillerm-Regost, C., Haugen, T., Nortvedt, R., Carlehög, M., Lunestad, B. T., Kiessling, A., & Rørå, A. M. B. (2006). Quality Characterization of Farmed Atlantic Halibut During Ice Storage. *Journal of Food Science*, 71(2), S83-S90. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08926.x>
- Gursky, L. J., Martin, N. I., Derksen, D. J., van Belkum, M. J., Kaur, K., Vederas, J. C., . . . McMullen, L. M. (2006). Production of piscicolin 126 by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL26 is controlled by temperature and induction peptide concentration. *Arch Microbiol*, 186(4), 317-325. doi:10.1007/s00203-006-0147-z
- Hagen, Ø. (2008). *Muscle growth and flesh quality of farmed Atlantic Halibut (Hippoglossus Hippoglossus) in relation to season of harvest*. (Phd), University of St. Andrews, Retrieved from <http://hdl.handle.net/10023/642>
- Hansen, G. H., & Olafsen, J. A. (1999). Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology* 38, 1-26.
- Hansen, T. (2019). Tema: Laks i oppdrett. Hentet fra <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/laks/laks-i-oppdrett>
- Haugen, T., Kiessling, A., Olsen, R. E., Rørå, M. B., Slinde, E., & Nortvedt, R. (2006). Seasonal variations in muscle growth dynamics and selected quality attributes in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) fed dietary lipids containing soybean and/or herring oil under different rearing conditions. *Aquaculture*, 261, 565-779.
- Havforskningsinstituttet. (2020). Tema: Mikroorganismer i havet og i sjømat. Hentet fra <https://www.hi.no/hi/temasider/sjomat/overvakning-av-sjomat/mikroorganismer-i-havet-og-i-sjomat>
- Himmelbloom, B. H., Brown, E. K., & Lee, J. S. (1991). Microorganisms on Commercially Processed Alaskan Finfish. *Food Science*, 56(5), 1279-1281. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb04752.x>

- Hovda, M. B., Sivertsvik, M., Lunestad, B. T., Lorentzen, G., & Rosnes, J. T. (2007). Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE. *Food Microbiology*, 24(4), 362-371. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.018>
- Hultin, H. O. (1984). Postmortem biochemistry of meat and fish. *Journal of Chemical Education*, 61(4), 289. doi:10.1021/ed061p289
- Huss, H. H. (1995). *Quality and quality changes in fresh fish* (Vol. 348): FAO Rome.
- Huss, H. H., & Asenjo, I. (1976). Storage life of gutted and ungutted white fish. *Årsberetning, Fiskeriministeriets Forsørgslaboratorium, Lyngby, Denmark*, 32-48.
- Haard, N. F. (1993). Technological Aspects of Extending Prime Quality of Seafood. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1(3-4), 9-27. doi:10.1300/J030v01n03_03
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology* (7th ed.). USA: Springer Science + Business Media, Inc.
- Jensen, S., Bergh, Ø., Enger, Ø., & Hjeltnes, B. (2002). Use of PCR- RFLP for genotyping 16S rRNA and characterizing bacteria cultured from halibut fry. *Canadian Journal of Microbiology* 48(5), 379–386.
- Jensen, S., Øvreås, L., Bergh, Ø., & Torsvik, V. (2004). Phylogenetic Analysis of Bacterial Communities Associated with Larvae of the Atlantic Halibut Propose Succession from a Uniform Normal Flora. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(6), 728-736. doi:<https://doi.org/10.1078/0723202042369929>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., . . . Bover-Cid, S. (2021). The use of the so-called 'superchilling' technique for the transport of fresh fishery products. *EFSA journal. European Food Safety Authority*, 19(1), e06378-e06378. doi:10.2903/j.efsa.2021.6378
- Kaale, L. D., & Eikevik, T. M. (2014). The development of ice crystals in food products during the superchilling process and following storage, a review. *Trends in Food Science & Technology*, 39(2), 91-103. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.004>
- Kaale, L. D., Eikevik, T. M., Rustad, T., & Kolsaker, K. (2011). Superchilling of food: A review *Food Engineering* 107(2), 141-146 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.06.004>
- Le, T. T., Nguyen, H. T., & Pham, M. A. (2020). Rigor mortis development and effects of filleting conditions on the quality of Tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*) fillets. *Journal of food science and technology*, 57(4), 1320-1330. doi:10.1007/s13197-019-04166-x
- Leisner, J. J., Laursen, B. G., Prévost, H., Drider, D., & Dalgaard, P. (2007). Carnobacterium: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS microbiology reviews*, 31(5), 592-613. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00080.x
- Lerfall, J., Roth, B., Skare, E. F., Henriksen, A., Betten, T., Dziatkowiak-Stefaniak, M. A., & Rotabakk, B. T. (2015). Pre-mortem stress and the subsequent effect on flesh quality of pre-rigor filleted Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during ice storage. *Food Chemistry*, 175, 157-165. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.111>
- Liston, J. (1980). Microbiology in fishery science. *Advances in Fish Science and Technology*, 138-157.
- Margeirsson, B., Magnússon, H., Sveinsdóttir, K., Valtýsdóttir, L., Reynisson, E., & Arason, S. (2010). *The effect of different precooling media during processing and cooling techniques during packaging of cod (Gadus morhua) fillets*.
- Martin-Visscher, L. A., van Belkum, M. J., Garneau-Tsodikova, S., Whittal, R. M., Zheng, J., McMullen, L. M., & Vederas, J. C. (2008). Isolation and characterization of carnocyclin a, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Applied and environmental microbiology*, 74(15), 4756-4763. doi:10.1128/aem.00817-08
- McKinnon, A. C., & Campbell, J. (1998). Quick-response in the frozen food supply chain: the manufacturers' perspective. In: Heriot-Watt University, School of Management.
- Mokrzycki, W., & Tatol, M. (2011). Color difference Delta E - A survey. *Machine Graphics and Vision*, 20, 383-411.
- Mørkøre, T. (2008). *Tekstur i oppdrettslaks Kunnskapsstatus og forhold som bidrar til fastere filet*. Retrieved from <https://nofima.brage.unit.no/nofima-xmlui/bitstream/handle/11250/2576859/Rapport%2B32-2008.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

- NKML. (2006). Kimtal og spesifikke fordervelsbakterier i fisk og fiskevarer. *nr. 184: Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler (NMKL)*.
- Norberg, B., Weltzien, F. A., Karlsen, O., & Holm, J. C. (2001). Effects of photoperiod on sexual maturation and somatic growth in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology B - Biochemistry and Molecular Biology*, 129, 357-365.
- Norges-Sjømatråd. (2022, 5.01.2022). Sjømateksporten passerte 120 milliarder kroner i fjor. Hentet fra <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksporten-passerte-120-milliarder-kroner-i-fjor/>
- Offer, G., & Knight, P. (1988). The structural basis of water-holding in meat. *Developments in meat science*, 4, 63-243.
- Ofstad, R., Egelanddal, B., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R. L., & Hermansson, A.-M. (1996). Liquid loss as affected by post-mortem ultrastructural changes in fish muscle; cod (*Gadus morhua* L.) and salmon (*Salmo salar*). *The Science of Food and Agriculture*(71), 301-312.
- Olsen, A. N., & Rommetveit, M. (2017). I denne tanken kan dei ha knekt koden for å drive oppdrett på kveite. Hentet fra <https://www.nrk.no/vestland/unik-teknologi-kan-ha-knekt-koden-for-kveiteoppdrett-1.13518551>
- Olsson, G. B., Olsen, R. L., & Ofstad, R. (2003). Post-mortem structural characteristics and water-holding capacity in Atlantic halibut muscle. *LWT - Food Science and Technology*, 36(1), 125-133. doi:[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00205-0](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00205-0)
- Paludan-Müller, C., Dalgaard, P., Huss, H. H., & Gram, L. (1998). Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5°C. *International journal of food microbiology*, 39(3), 155-166. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00133-5)
- Pate, E. F., & Brokaw, C. J. (1980). Cross-bridge behavior in rigor muscle. *Biophysics of Structure and Mechanism*, 7(1), 51-63.
- Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A.-J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36-60. doi:10.1007/s11947-012-0867-9
- Poli, B. M., Parisi, G., Scappini, F., & Zampacavallo, G. (2005). Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture* 13(1), 29-49. doi:<https://doi.org/10.1007/s10499-004-9035-1>
- QIM-Eurofish. (2001). QIM-ditt ideelle verktøy for å måle fiskens ferskhets. Hentet fra (qim-eurofish.com) NB! Link no longer in use.
- Reay, G. A., & Shewan, J. M. (1949). The spoilage of fish and its preservation by chilling. *Food Res.*(2), 343-398.
- Reynisson, E., Lauzon, H. L., Magnusson, H., Hreggvidsson, u. Ó., & Marteinson, V. T. (2008). Rapid quantitative monitoring method for the fish spoilage bacteria *Pseudomonas*. *Environmental Monitoring*(10), 1357-1362. doi:10.1039/b806603e
- Robb, D. H. F. (2001). The relationship between killing methods and quality. *Farmed fish quality*, 220-233.
- Rodríguez, Ó., Barros-Velázquez, J., Pineiro, C., Gallardo, J. M., & Aubourg, S. P. (2006). Effects of storage in slurry ice on the microbial, chemical and sensory quality and on the shelf life of farmed turbot (*Psetta maxima*). *Food Chemistry*, 95(2), 270-278. doi:10.1016/j.foodchem.2004.11.054
- Rosnes, J. T., Vorre, A., Folkvord, L., Hovda, M., Fjæra, S. O., & Skjervold, P. O. (2003). Effects of Pre-, In-, and Post-Rigor Filleted Atlantic Salmon (*Salmo salar*) on Microbial Spoilage and Quality Characteristics During Chilled Storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 12(2), 17-31. doi:10.1300/J030v12n02_03
- Rotabakk, B. T., Bleie, H., Stien, L. H., & Roth, B. (2014). Effect of Blood Removal Protocol and Superchilling on Quality Parameters of Prerigor Filleted Farmed Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Journal of Food Science*, 79(5), E881-E886. doi:<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12437>
- Roth, B., Birkeland, S., & Oyarzun, F. (2009). Stunning, pre slaughter and filleting conditions of Atlantic salmon and subsequent effect on flesh quality on fresh and smoked fillets. *Aquaculture*, 289, 350-356.

- Roth, B., Foss, A., & Imsland, A. K. (2009). Relationship between Muscle pH and Flesh Color of Atlantic Halibut. *Journal of Food Science*, 74(3), 123-S125. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01089.x>
- Roth, B., Grimsbø, E., Slinde, E., Foss, A., Stien, L. H., & Nortvedt, R. (2012). Crowding, pumping and stunning of Atlantic salmon, the subsequent effect on pH and rigor mortis. *Aquaculture*, 326-329, 178-180. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.005>
- Roth, B., Jenssen, M. D., Jonassen, T. M., Foss, A., & Imsland, A. (2007). Change in flesh quality associated with early maturation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). . *Aquaculture Research*, 38(7), 757-763. doi:<https://doi.org/10.1111/J.1365-2109.2007.01729.X>
- Roth, B., Kramer, L., Skuland, A. V., Løvdal, T., Øines, S., Foss, A., & Imsland, A. K. (2014). The Shelf Life of Farmed Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Food Science*, 79(8), S1568-S1574. doi:<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12541>
- Roth, B., Nortvedt, R., Slinde, E., Foss, A., Grimsbø, E., & Stien, L. H. (2010). Electrical stimulation of Atlantic salmon muscle and the effect on flesh quality. *Aquaculture*, 301(1), 85-90. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.01.008>
- Roth, B., Slinde, E., & Arildsen, J. (2006). Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh. *Aquaculture*, 257(1), 504-510. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.021>
- Ruff, N., Fitzgerald, R. D., Cross, T. F., & Kerry, J. P. (2002). Comparative composition and shelf-life of fillets of wild and cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture International*, 10(3), 241-256. doi:10.1023/A:1022175200191
- Rustad, T. (1992). Muscle chemistry and the quality of wild and farmed cod. *Quality assurance in the fish industry* 19-27.
- Salonen, A., Nikkilä, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilić-Stojanović, M., Kekkonen, R. A., . . . de Vos, W. M. (2010). Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 127-134. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.007>
- Schreck, C. B., & Tort, L. (2016). 1 - The Concept of Stress in Fish. In Carl B. Schreck, Lluís Tort, Anthony P. Farrell, & Colin J. Brauner (Eds.), *Fish Physiology* (Vol. 35, pp. 1-34): Academic Press.
- Sivertsvik, M., & Rotabakk, B. T. (2013). Den siste istid. Hentet fra https://www.glacio.no/NorskSjmat_3_2013.pdf
- Statistisk sentralbyrå. (2020). Akvakultur. Hentet fra <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett>
- Sterling® White Halibut. Norsk Sterling Kveite. Hentet fra <https://sterlingwhitehalibut.com/brosjyre>
- Storey, R. M. (1985). Time temperature function integration, its realisation and application to chilled fish. *IIR Conference of Storage Life of Chilled and Frozen Fish and Fish Products, Aberdeen, Sci. Tech. Froid*(4), 293-297.
- Sveinsdottir, K., Hyldig, G., Martinsdottir, E., Jørgensen, B., & Kristbergsson, K. (2003). Quality Index Method (QIM) scheme developed for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Quality and Preference*, 14(3), 237-245. doi:[https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(02\)00081-2](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(02)00081-2)
- Sveinsdottir, K., Martinsdottir, E., Hyldig, G., Jørgensen, B., & Kristbergsson, K. (2002). Application of Quality Index Method (QIM) Scheme in Shelf-life Study of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Science*, 67(4), 1570-1579. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10324.x>
- Tort, L., Balasch, J. C., & MacKenzie, S. (2004). Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence. *Contributions to Science*, 2(4), 443-454.
- Verner-Jeffreys, D. W., Shields, R. J., Bricknell, I. R., & Birkbeck, T. H. (2003). Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae in three British hatcheries. *Aquaculture*, 219, 21-42.
- Wang, S., & Sun, D. (2012). Antifreeze proteins; chapter V: emerging technologies in food freezing. In *Handbook of frozen food processing and packaging*: Taylor and Francis Group, LLC United States of America.

- Waagbø, R., Sandnes, K., Torrissen, O. J., Sandvin, A., & Lie, Ø. (1993). Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three different levels of N-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E. . *Food Chemistry*, *46*, 361–366.
- Yu, Z., & Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*, *36*(5), 808-812. doi:10.2144/04365st04

Appendix

Appendix A- Tillaging av medier

Tryptone soya agar (TSAYE, 0.6 % gjær)

20 g TSA (oxoid, UK)

3 g gjær (Merck)

500 mL destillert vann

Autoklavert ved 121 °C i 15 min.

Tryptone soya broth (TSBYE, 0.6 % gjær)

15 g TSB

3 g gjær

500 mL destillert vann

Autoklavert ved 121 °C i 15 min.

Plate count agar (PCA)

22.5 g plate count agar ble tilsatt i 1000 mL destillert vann. Autoklavert ved 121 °C i 15 min.

Long & Hammer agar (L&H)

Tillagd etter oppskrift fra NMKL 184.

Jernagar med L-cysteine (JA)

43.6 JA (Lyngby, Oxoid Ltd, U.K.) ble løst i 1000 mL destillert vann. Autoklavert ved 121 °C i 15 min. Agaren ble oppbevart i flasker på kjølerom (4 °C), agaren ble smeltet i vannbad og når temperaturen var 45 °C ble 0.04 % L-cysteine tilsatt.

L-cysteine (Merck, Tyskland) ble tillagd ved å løste 5.0 L-cysteine i 100 mL destillert vann.

Buffret peptonvann

25.5 g bufret peptonvann (Merck, Tyskland) tilsatt i 500 mL destillert vann. Autoklavert ved 121 °C i 15 min.

Stock solutions

Tabell A1. Stock solutions lagd

Stock solution	Fremgangsmåte
5 M NaCl	29.22NaCl til 100 mL destillert vann
1 M Tris- HCl	12.11Tris til 80 mL destillert vann. Tilsett HCl til pH = 8.0. Fyll opp til 100 mL
0.5 M EDTA	14.612Na ₂ EDTA x 2H ₂ O løses i 80 mL H ₂ O. pH justeres til 8 med NaOH. Fyll opp til 100 mL
7.7 M Ammonium acetate	59.35 g Ammonium acetate, fyll opp til 100 mL
70 % EtOH	7:3 etanol:vann

TE-Buffer

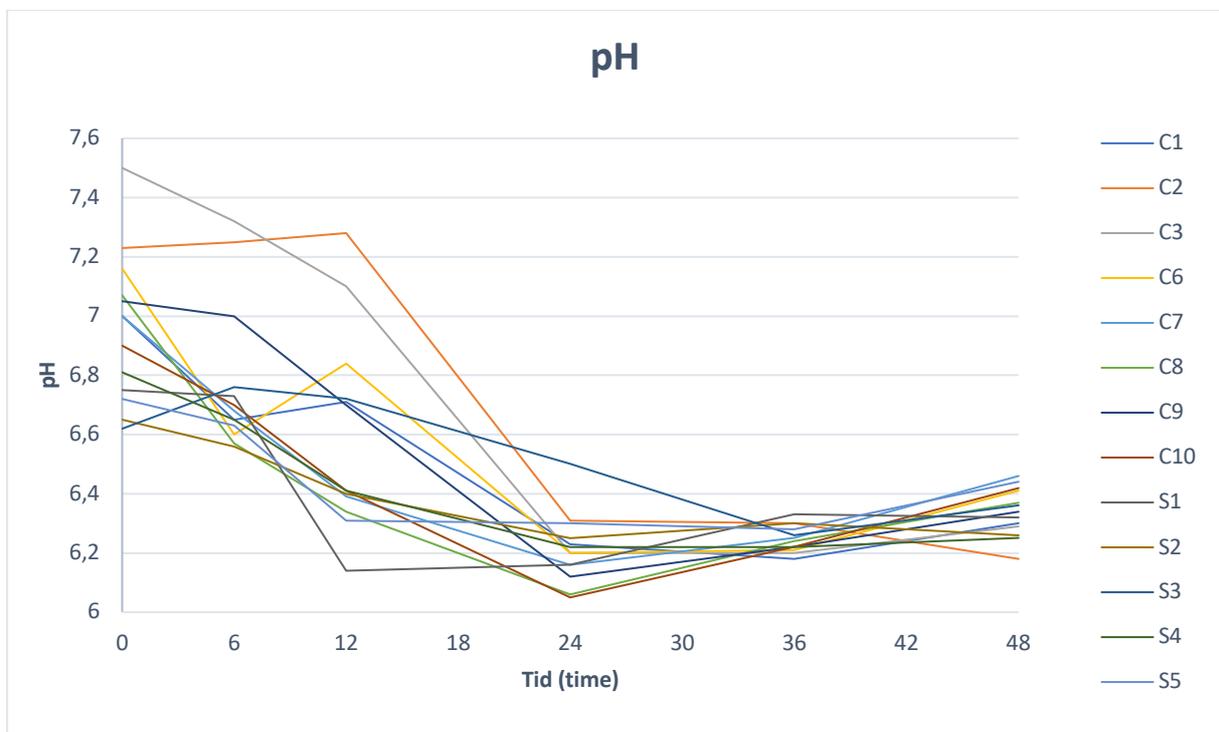
10 mL 1 M Tris-HCl → 10 mM
2 mL 0.5 M EDTA → 1 mM
Juster volum til 1000 med H₂O

Lysis buffer

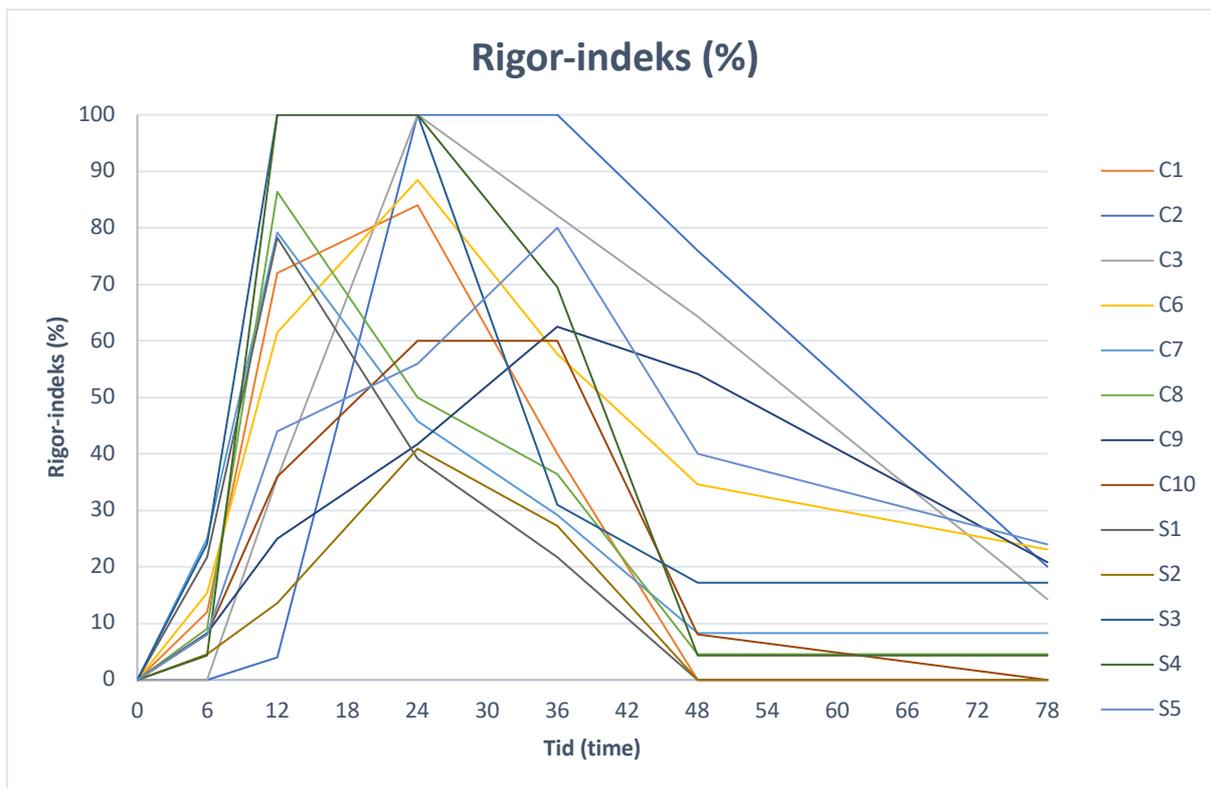
50 mL 5 M NaCl → 500 mM
25 mL 1 M Tris-HCl → 50 mM
50 mL 0.5 M EDTA → 50 mM
Fortynnes til 500 mL med H₂O.
Autoklaveres.
20 g SDS → 4%

Appendix B – Tilleggsresultater

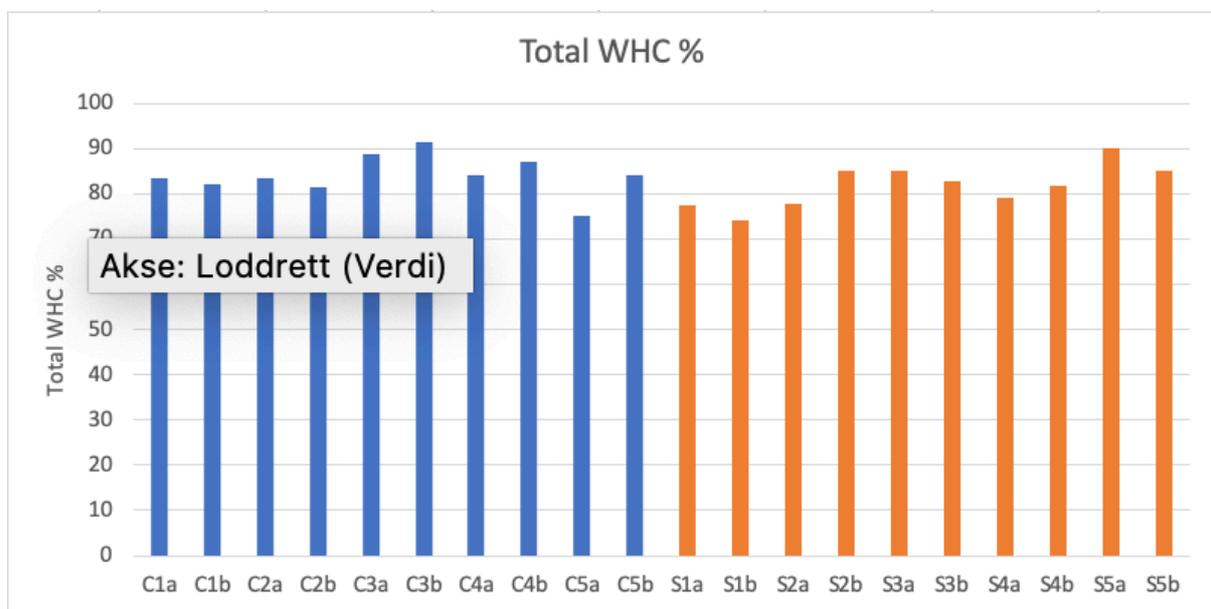
B1 – kvalitetsresultater



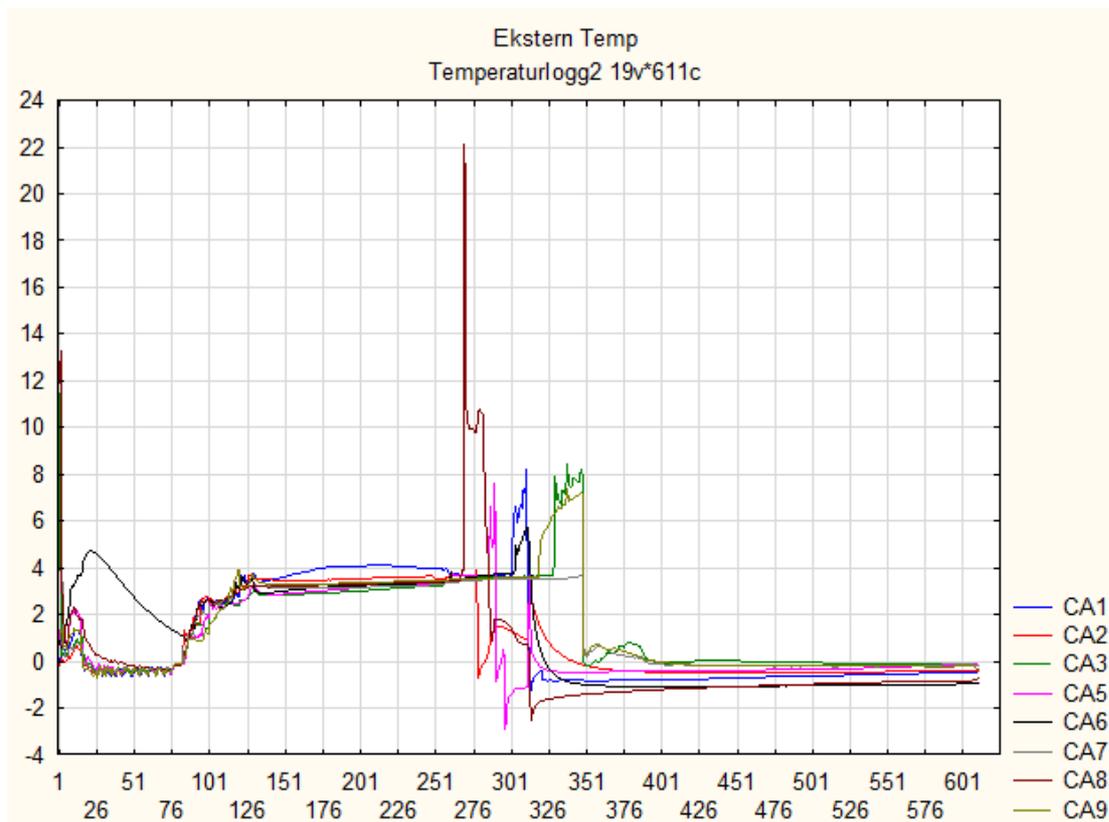
Figur B1: pH mål i fiskemuskel plottet mot antall timer *post mortem* for hver enkelt fisk (n=13)



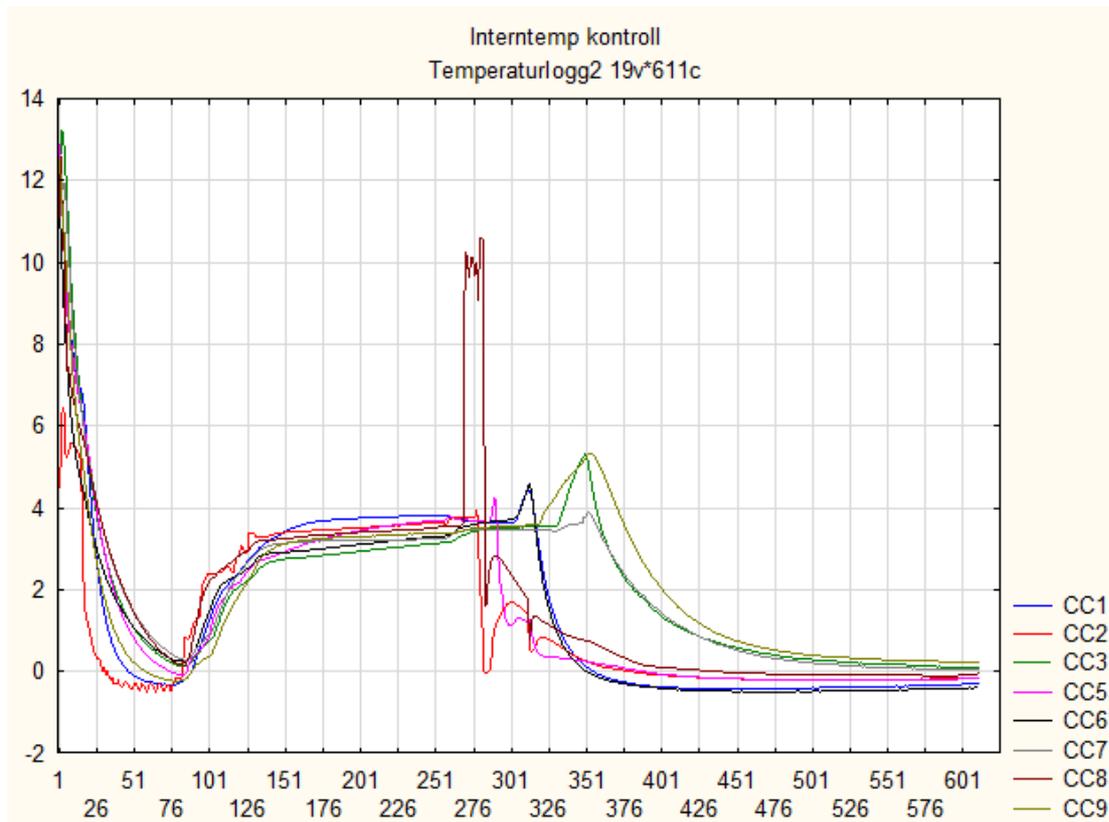
Figur B2: Rigor-indeks (%) plottet mot antall timer *post mortem*, for hver enkelt fisk (n=13)



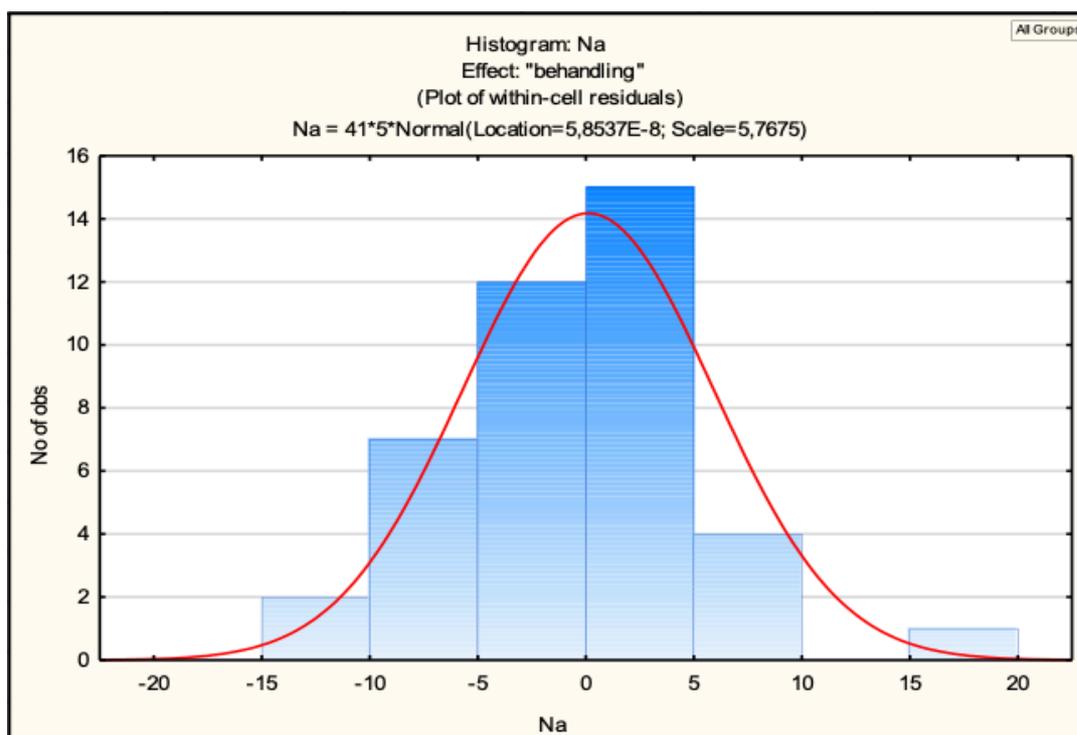
Figur B3: Vannbindingsevne (%) for hver enkelt prøve i gruppe C og S.



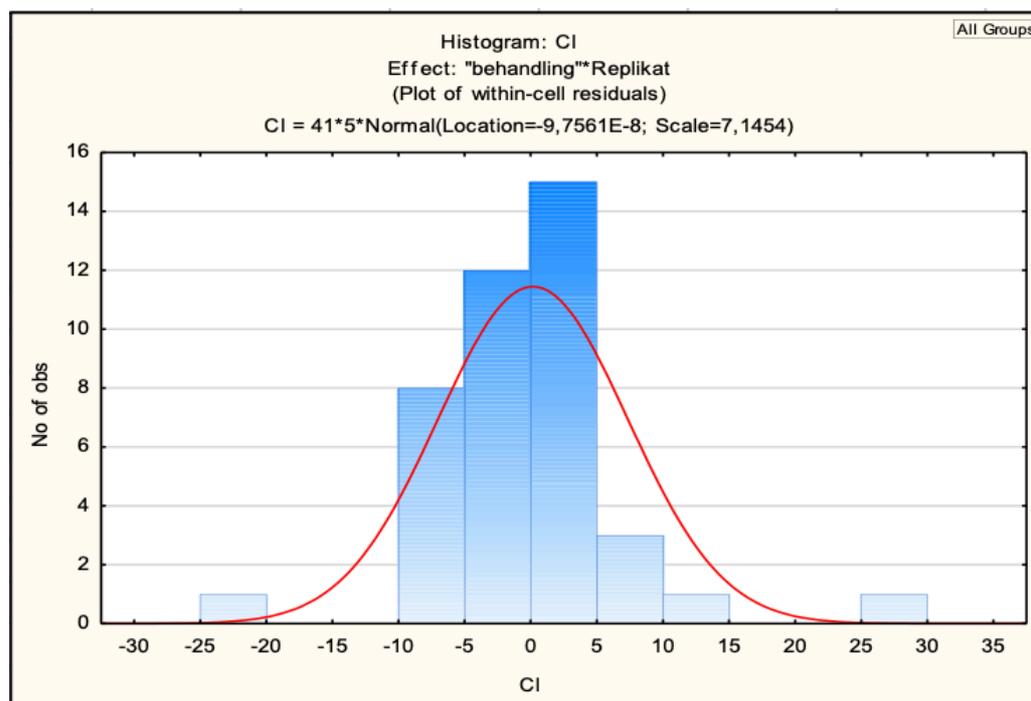
Figur B4. Ekstern temperatur målt i superkjølt fisk, begge grupper S og SI er representert her.



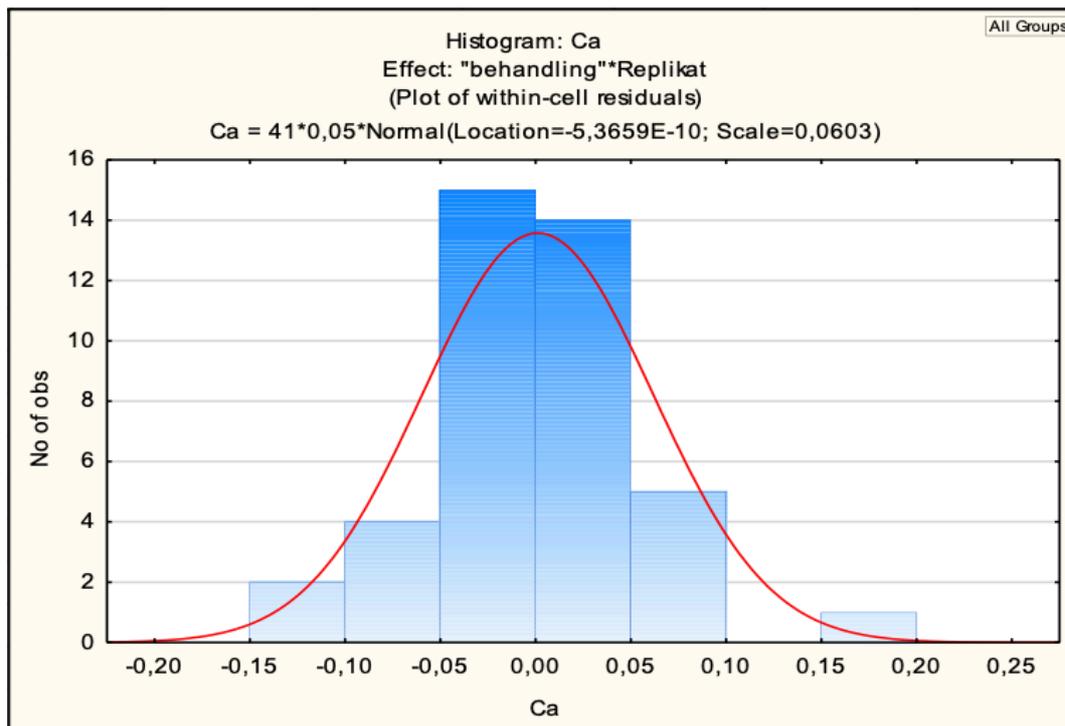
Figur B5. Intern temperatur målt i superkjølt fisk, gruppe S og SI, over tid.



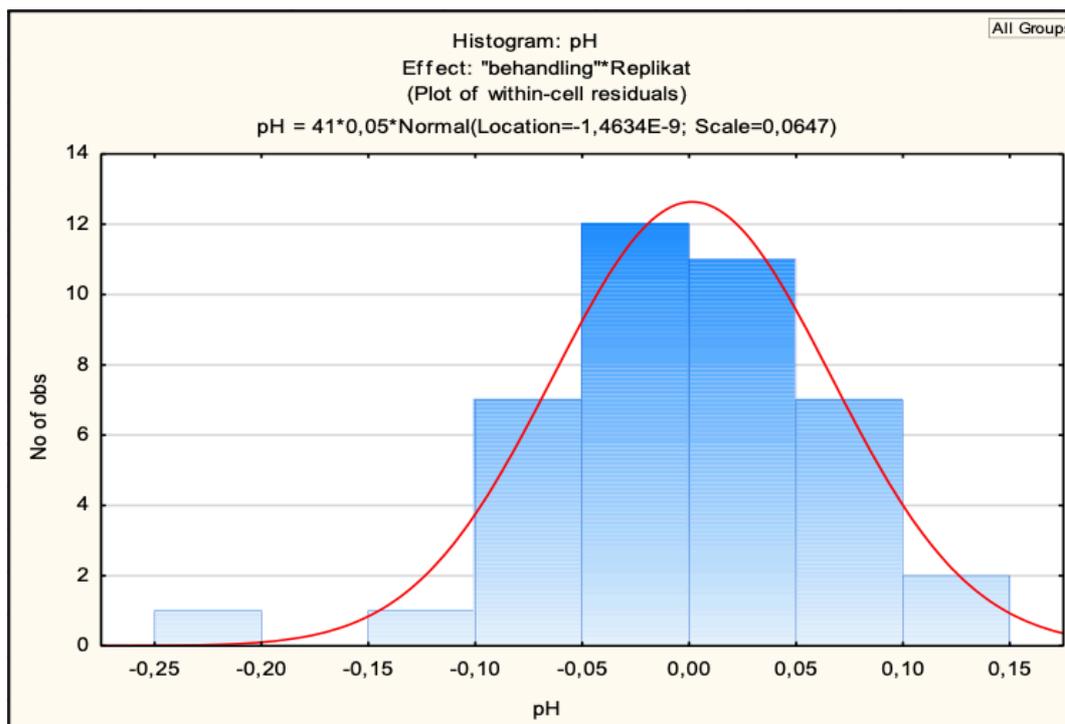
Figur B6. Histogram viser normalfordeling av mengde Na^+ målt i blodprøver fra fisk
Tilhørende levenes test gav $p > 0.660$



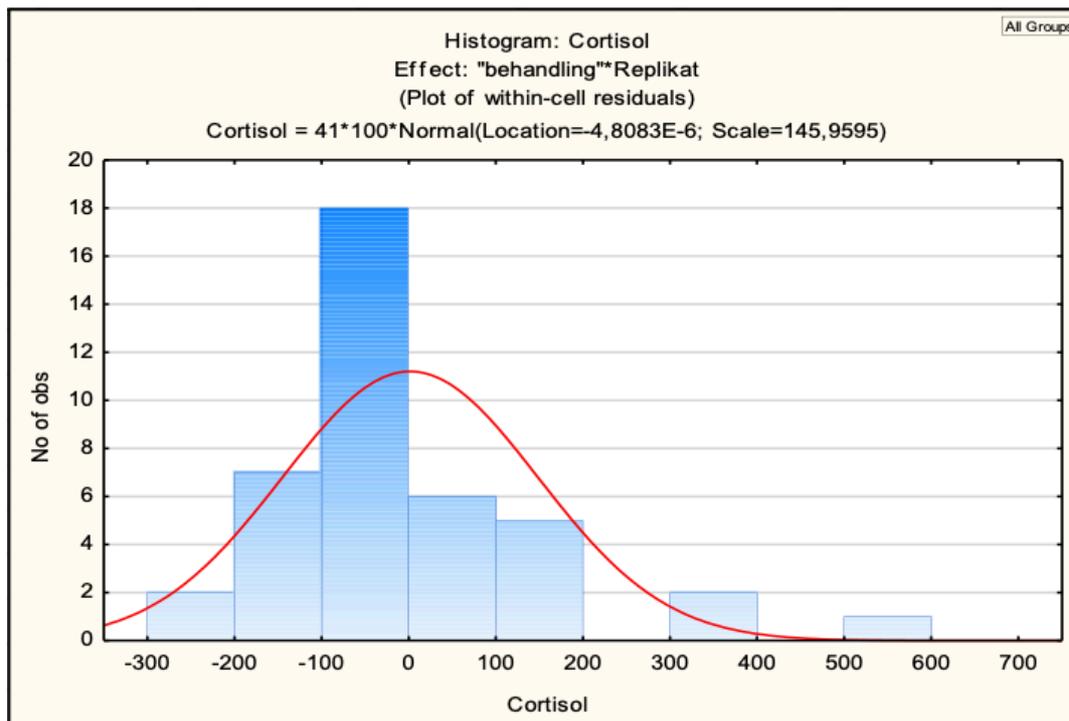
Figur B7. Histogram viser normalfordeling av mengde Cl^- målt i blodprøver tatt fra fisk.
Tilhørende levenes test gav $p > 0.107$



Figur B8. Histogram viser normalfordeling av mengde Ca^{2+} målt i blodprøver tatt fra fisk. Tilhørende Levenes test gav $p > 0.662$



Figur B9. Histogram viser normalfordeling av pH-verdi målt i blodprøver tatt fra fisk. Tilhørende Levenes test gav $p > 0.34$



Figur B10. Histogram viser normalfordeling av kortisol nivå målt i blodprøver tatt fra fisk. Tilhørende Levenes test gav $p > 0.01$