

# AP1. Reduksjon av *Listeria* på laks

Skånsom dekontaminering av laks og ørret og deres produkter



Illustrasjon: Nofima

Nofima er et ledende matforskningsinstitutt som driver med forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien. Vi leverer internasjonal anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

### Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

post@nofima.no

www.nofima.no

NO 989 278 835 MVA



#### Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø



#### Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



#### Sunndalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



#### Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



#### Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

## Rapport

<i>Rapportnummer:</i> 18/2024	<i>ISBN:</i> 978-82-8296-789-1	<i>ISSN:</i> 1890-579X
<i>Dato:</i> 14. juni 2024	<i>Antall sider + sider vedlegg:</i> 22 + 0	<i>Prosjektnummer:</i> 13988
<i>Tittel:</i> <b>AP1. Reduksjon av Listeria på laks; Skånsom dekontaminering av laks og ørret og deres produkter</b>		
<i>Title:</i> Reduction of Listeria on salmon - gentle decontamination of salmon and trout and their products		
<i>Forfatter(e):</i> Trond Løvdal, Torstein Skåra, Leena Prabhu, Mette Risa Vaka, Sherry S. Chan, Tone Mari Rode		
<i>Avdeling:</i> Prosessteknologi		
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)		
<i>Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901823		
<i>Stikkord:</i> Listeria, laks, ørret, dekontaminering		
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Rapporten inkluderer forsøksoppsett og resultater fra forsøk som er gjennomført i prosjektet DeList, AP1 i perioden mars 2023 til juni 2024. Ferskt råstoff i form av hel, sløyd ørret og laksefilet (biter) er benyttet i forsøkene. Dekontamineringsforsøk er gjennomført ved skylling i vann, skylling i pH-justert vann og dypping i løsning/spraying/coating med (a) eddiksyre; (b) Verdad N6; (c) nisin; (d) kitosan; (e) klor; og (f) plasmaaktivert vann (PAW). Disse metodene er blitt testet hver for seg og/eller i kombinasjon med UV-belysning. Skylling med pH-justert vann/fortynnet eddiksyre (~1 %, pH 2,6-2,9) og Verdad N6 ga forventet log-reduksjon av <i>Listeria</i> fra 0,5 til 2,0, og dette kunne forbedres med påfølgende UV-bestråling. Coating med nisin alene og kombinasjon av nisin og kitosan, førte til signifikant veksthemming av <i>Listeria</i> ved lagring ved 4 °C i luft og vakuum, men verken nisin eller kitosan er lovlig å bruke i direkte kontakt med fisk til humant konsum per i dag. Det er derfor behov for å utrede disse nærmere i forhold til 'novel foods'-direktivet og søke om godkjenning før det tas i bruk. Modifisert atmosfære pakking (≥ 33 % CO <sub>2</sub> ) hemmet vekst av <i>Listeria</i> svært effektivt ved lagring ved 4 °C. Skylling med pH-justert vann og organiske syrer, evt. kombinert med UV-belysning, anbefales brukt som generelle tiltak for å redusere smittetrykket i lakseslakterier og prosesseringsbedrifter. Metodene anbefales <i>ikke</i> på nåværende tidspunkt som dekontaminering av laks eller ørret (til humant konsum) som har fått påvist <i>Listeria</i> .		
<i>English summary/recommendation:</i> The report includes experimental setup and results from experiments carried out in the project DeList, AP1 in the period March 2023 to June 2024. Fresh raw material in the form of whole, gutted trout and salmon fillets (pieces) are used in the experiments. Decontamination tests have been carried out by rinsing in water, rinsing in pH-adjusted water and dipping in solution/spraying/coating with (a) acetic acid; (b) Verdad N6; (c) nisin; (d) chitosan; (e) chlorine; and (f) plasma activated water (PAW). These methods have been tested separately and/or in combination with UV irradiation. Rinsing with pH-adjusted water/diluted acetic acid (~1%, pH 2.6-2.9) and Verdad N6 gave the expected log reduction of Listeria from 0.5 to 2.0, and this could be improved with subsequent UV irradiation. Coating with nisin alone and a combination of nisin and chitosan led to significant growth inhibition of Listeria when stored at 4 °C in air and vacuum, but neither nisin nor chitosan is legal to use in direct contact with fish for human consumption at present. There is therefore a need to investigate these in more detail in relation to the 'novel foods' directive and apply for approval before it is put into use. Modified atmosphere packaging (≥33% CO <sub>2</sub> ) effectively inhibited the growth of Listeria when stored at 4 °C. Rinsing with pH-adjusted water and organic acids, eventually combined with UV irradiation, is recommended as a general measure to reduce the infection pressure in salmon slaughterhouses and processing plants. The methods are not currently recommended for the decontamination of salmon or trout (for human consumption) with proven Listeria contamination.		

## Forord

Det produseres store mengder laks i Norge, og verdiene av det som eksporteres er høye, 1,23 millioner tonn til en verdi av 122,5 milliarder NOK i 2022 (nøkkeltall, seafood.no). Frisk fiskemuskel inneholder i utgangspunktet ikke mikroorganismer, men kan bli kontaminert under slakting og i videreforedlingsprosesser. Det finnes flere arter av *Listeria*, og i denne sammenhengen er det den sykdomsframkallende *Listeria monocytogenes* som står i fokus. *L. monocytogenes* (heretter kalt *Listeria*) er en bakterie som i en årrekke har stått i fokus hos sjømatnæringen generelt og hos myndighetene. Funn av *Listeria* i sjømatprodukter har forårsaket en rekke produkt-tilbakekallelser i de senere år. I tillegg til mulig eksponering av forbrukere for *Listeria*, vil også tilbaketrekking av produkter grunnet *Listeria* være en økonomisk belastning for de det gjelder og det vil også kunne medføre økt matsvinn dersom disse produktene må kastes/destrueres.

*Listeria* kan forårsake listeriose og gi alvorlig sykdom hos mennesker, spesielt utsatt er gravide og de med redusert immunforsvar. De fleste tilfeller av listeriose er sporadiske, og forekomsten er relativt lav. Men dødsraten er høy, så konsekvensene kan bli store. I perioden 2013–2017 ble det i Norge årlig rapportert inn cirka 20 bekreftede listeriose tilfeller per 100 000 innbyggere (ECDC, 2020). *Listeria* forekommer naturlig i miljøet og «trives godt» i produksjonsmiljøet i fiskeindustrien (kaldt og vått), hvor den kan etablere seg og være utfordrende å bli kvitt (Klæboe, Lunestad, Borlaug, Paulauskas, & Rosef, 2010). *Listeria* påvises ofte fra lakseslakterier og i videreforedlingsbedrifter i Norge, både fra produkt og produksjonslokaler (Løvdal, Giske, Bjørlykhaug, Eri, & Mork, 2017; Rørvik, Skjerve, Knudsen, & Yndestad, 1997). Den kan dessuten overleve og formere seg ved lave temperaturer, ned mot 0 °C, og ved forholdsvis høye saltkonsentrasjoner. For å få kontroll med *Listeria* i sjømatnæringen er det viktig med systematisk arbeid i hele produksjonskjeden, og god produksjonshygiene må ligge i bunn.

Denne rapporten oppsummerer resultater fra forsøk som er utført i Arbeidspakke 1 (AP1) av prosjektet DeList, som omhandler reduksjon av *Listeria* på laks. Per i dag er det krav om at det skal tas prøver fra minimum 5 fisk og at disse skal analyseres for mulig tilstedeværelse av *Listeria*. Det tar tid før en får et prøvesvar, 1–2 dager avhengig av analysemetode. Dette betyr at et *Listeria*-prøvesvar ikke vil foreligge mens laksen befinner seg på slakteri. Dersom dekontaminering av laks med påvist *Listeria* skal skje på slakteri, er det en forutsetning at det vil foreligge hurtigtester for *Listeria*-påvisning med svar innen kort tid, og gjerne innen 30 minutter, for å kunne gjøre tiltak før laksen forlater slakteriet.

De metodene som skal undersøkes i AP1 kan utføres på:

- All laks som slaktes som generelle tiltak for å dekontaminere/reducere mulig tilstedeværelse av *Listeria* og i tillegg redusere det generelle smittetrykket.
- Laks fra oppdrettsanlegg/båter hvor en tidligere har hatt utfordringer knyttet til positive *Listeria*-prøver.

## Innhold

<b>1</b>	<b>Introduksjon</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Materialer og metoder</b>	<b>3</b>
2.1	Prøvemateriale	3
2.1.1	Hel, sløyd fisk	3
2.1.2	Laksefilet	3
o	Vekst-hemmende tiltak på vakuumpakket og MA-pakket røykelaks	3
2.2	Tilberedning av inokulum - Inokulering	3
2.2.1	Forsøk på hel, sløyd fisk	3
2.2.2	Forsøk på laksefilet	4
2.2.3	Vekst-hemmende tiltak på vakuumpakket og MA-pakket røykelaks	4
2.3	Tilberedning av behandlingsløsninger	4
2.4	Behandlinger	5
2.4.1	Reduksjon av <i>Listeria</i> på hel, sløyd fisk	5
2.4.2	Reduksjon av <i>Listeria</i> på laksefilet	5
2.4.3	Nisin og kitosan tilsatt røykelaks	6
2.4.4	Nisin og kitosan kombinert med Modifisert Atmosfære Pakking (MAP)	7
2.5	Analyser	7
<b>3</b>	<b>Resultater og Diskusjon</b>	<b>8</b>
3.1	Skånsom reduksjon av <i>Listeria</i> på hel, sløyd fisk	8
3.1.1	Forsøk nr. 1; effekt av fritt klor, pH-justert vann, nisin og PAW	8
3.1.2	Forsøk nr. 2; effekt av eddiksyre, Verdad, nisin og kitosan	11
3.1.3	pH	12
3.2	Skånsom reduksjon av <i>Listeria</i> på laksefilet	14
3.2.1	Forsøk nr. 1; Laksefilet, skinnside; Skylling med vann, pH-justert vann alene og kombinert med UV	14
3.2.2	Forsøk nr. 2; Laksefilet, kjøttside; Skylling med vann, pH-justert vann, og dypping i kitosan alene og kombinert med UV	15
3.3	Behandling for å hemme vekst i vakuumpakket røykelaks	16
3.4	Nisin og kitosan kombinert med Modifisert Atmosfære Pakking (MAP) av røykt laks	17
<b>4</b>	<b>Konklusjon</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>Referanser</b>	<b>20</b>

# 1 Introduksjon

*Listeria* påvises svært sjelden fra hel fisk (Hansen, Vogel, & Gram, 2006; Løvdal et al., 2017; Rørvik, Caugant, & Yndestad, 1995). Prosessert laks (sløyd, filet) har ofte større forekomst av *Listeria* enn rund laks, og dette tyder på at laks hovedsakelig kontamineres under prosessering (Autio et al., 1999; Heir, Langsrud, & Hagtvedt, 2015; Vogel, Huss, Ojeniyi, Ahrens, & Gram, 2001; Wulff, Gram, Ahrens, & Vogel, 2006). Det er en økende risiko for kontaminering utover i prosesslinjen, og smitten er i størst grad knyttet til maskiner (spesielt sløyemaskiner), transportbånd eller annet utstyr (Løvdal et al., 2017; Rørvik et al., 1997). I løpet av et skift kan det gå opp til 150 tonn laks gjennom eksempelvis en sløyemaskin. Dersom den er designet slik at den tillater nisjer for *Listeria*, så kan kontaminering med selv svært lave nivåer gi en viss oppkonsentrering fra flere tonn fisk, inne i maskinen. Dette kan føre til kontaminering i buk og derfra til resten av fisken. På hel, sløyd fisk vil det være mange hulrom og vanskelig tilgjengelige overflater som kan by på utfordringer ved dekontaminering. Tiltak som å skylle eller dyppe fisken vil på en enkel måte kunne nå alle overflater i løpet av kort tid. Følgende metoder for dekontaminering vil bli undersøkt; skylling i vann, skylling i pH-justert vann og dypping i løsning med naturlige konserveringsmidler, f.eks. organiske syrer. Laksefilet vil kunne være kontaminert med *Listeria* fra ulike kilder, men dette vil ikke påvirke tiltak for dekontaminering.

Det finnes flere ulike naturlige konserveringsmetoder, som organiske syrer, essensielle oljer, kitosan, planteekstrakter, bakteriosiner, nisin og beskyttende melkesyre kulturer. Noen av disse har potensiale til å øke holdbarheten til sjømat, og effekten mot *Listeria* er også undersøkt for noen av dem i andre FHF-prosjekter (901156 og 901056), hvor en generelt har oppnådd mellom 0,5–2 log-reduksjon/hemming av *Listeria*.

Lav pH har generelt en hemmende effekt på vekst og overlevelse av en rekke bakterier og andre mikroorganismer. *Listeria* er rapportert å kunne vokse i pH-området fra 4,4 til 9,4, og har generelt veldig god evne til å overleve og tilpasse seg miljøer med lav pH (U.S. Food and Drug Administration, 1998). Dette er en av årsakene til at den overlever godt i matproduksjonsmiljøer. Organiske syrer, som melkesyre og eddiksyre, er mye brukt i næringsmiddelindustrien for å kontrollere og hemme vekst av bakterier. Verdad N6 er et fermentat som består av salter av organiske syrer med natriumacetat som hovedbestanddel.

Kitosan brukes blant annet i Japan og Sør-Korea som preserveringsmiddel, men er foreløpig ikke godkjent av EFSA eller FDA i direkte kontakt med mat. Dette betyr at kitosan likevel kan brukes som coating på de delene av produkter som normalt ikke konsumeres, f.eks. på skinnsiden av laks. Kitosan som brukes i næringsmiddelindustrien er ofte utvunnet fra skalldyr, men kan også utvinnes fra insekter og sopp. Kitosan brukt i denne studien er fra rekeskall. Kombinasjonen av kitosan og MAP har vist seg å ha en god bakteriehemmende effekt på maki sushi (Sørbø & Lerfall, 2022). Kitosan benyttes blant annet til vannrensing, til heling av sår, i kosmetikkindustrien og i kosttilskudd. Kitosan er i noen tilfeller tillatt benyttet i Norge.

Bakteriosiner er små peptider som produseres av enkelte bakterier, og mange av de har antimikrobielle effekter. Det er begrensninger når det gjelder bruk av bakteriosiner i mat. Når det gjelder nisin, så er dette ansett som trygt, og lovlig tillatt ved modning av ost (maks nivå 12 mg/kg) og i varmebehandlede kjøttprodukter (maks nivå 25 mg/kg) (Younes et al., 2017). Det er per i dag ikke lov å bruke bakteriosiner eller kitosan i direkte kontakt med sjømat i EU. Men i takt med økende kunnskap om tilsetningsstoffene endres regelverket. Nisin var for eksempel ikke tillatt å bruke på all sjømat i Canada fram til 2017, men etter en utredning av Health Canada ble det legalisert for bruk på ready-to-eat (RTE) røykte fiskeprodukter (Health Canada, 2017). Lignende utredninger gjøres i EU, og det åpnes stadig opp for bruk på flere produktkategorier. Bakteriosiner har ofte synergieffekter med annen behandling, og brukes derfor i hurdle-teknologi for å øke mattryggheten (Calo-Mata et al., 2008). Den antimikrobielle effekten

av bakteriosinet nisin på veksten av *Listeria* i røykelaks har blitt demonstrert, og også en positiv effekt av nisin kombinert med MAP (Nilsson, Huss, & Gram, 1997; Szabo & Cahill, 1999).

Klor og klorforbindelser har en rekke bruksområder, blant annet for desinfeksjon. Den antimikrobielle effekten av klor i vann skyldes en kombinasjon av klorid (Cl<sup>-</sup>), hypoklorsyre (HOCl) og hypoklorittion (OCl<sup>-</sup>), men hovedsakelig hypoklorsyre. Effekten øker med temperatur og konsentrasjon. Dissosiering av HOCl påvirkes av pH, og en får redusert antimikrobiell effekt med økende pH. Klor har derfor optimal effekt ved pH mellom 4 og 7, men er mest stabil ved høy pH. Klor har en bredspektret effekt og virker på en rekke mikroorganismer som vegetative bakterier, mykobakterier, sopp og virus (Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhandbok, 2016). Det er effekten av fritt klor, også kalt aktivt klor, mot *Listeria* som er undersøkt.

Plasma refererer til en fjerde tilstand en materie kan innta. Kald plasma er en relativt ny prosess som kan eliminere bakterier. Kald plasma kan også benyttes til å lage plasma-aktivert vann (PAW), som har blitt benyttet i forsøk i dette prosjektet. Forsøk med å dyppe brosme-fileter i PAW gav 50 % økt holdbarhet sammenlignet med kontrollfisk (Chanioti et al., 2022). I forsøk med makrell fikk man reduksjon av melkesyrebakterier og *Pseudomonas*, men her førte kald plasma også til økt harskning (Albertos et al., 2017). Forsøk på å øke holdbarheten på sushi av laks ved bruk av kald plasma viste ingen effekt på total aerobt kimtall (Kulawik & Tiwari, 2019) .

Metoder som gir middels inaktivering av *Listeria* kan være interessante å teste i kombinasjon med andre konserveringsmidler eller teknologier for å teste for eventuelle synergier. Noen av de metodene/ prosessene som er omtalt er på nåværende tidspunkt ikke tillatt brukt på fisk i Norge (nisin, kitosan, kald plasma/PAW), men mye tyder på at for eksempel kitosan, nisin og kald plasma kan bli viktige teknologier i europeisk matindustri.

Milde dekontamineringsprosesser vil kunne drepe/hemme *Listeria*, og gi fra 0,5 til 2 log inaktivering. Men det vil alltid være en risiko knyttet til mulig overlevende *Listeria*. Modifisert atmosfære (MA) pakking vil si at man erstatter den normale atmosfæren med andre konsentrasjoner av CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> og N<sub>2</sub>. Dette påfører mikroorganismene stress som fører til hemming av vekst (Sivertsvik, Jeksrud, & Rosnes, 2002). Som et ekstra tiltak for å hemme vekst av mulig overlevende *Listeria* vil det på et senere tidspunkt i prosjektet gjøres forsøk med superkjøling og MA-pakking i kombinasjon med spraying/coating med utvalgte konserveringsmidler.

## 2 Materialer og metoder

Forebyggende tiltak for å hindre kontaminering og vekst av *Listeria* ble gjort på hel, sløyd ferskvannsrørret, heretter kalt HOG (Head-On Gutted) ørret, og på fileter av laks. I bunn forutsettes det at hygiene-forskrifter følges og at nødvendige tiltak for å minimere kontaminering blir utført rutinemessig på slakteri. Ved forekomst av *Listeria* på fisk kan det likevel under disse forutsetningene forekomme kontaminering av overflater, både til utstyr og til annen fisk. Dersom *Listeria* er til stede, så vil de være i lave nivåer. Målsettingen for disse forsøkene var å komme frem til metoder som kunne gi 0,5 til 2 log-reduksjon av *Listeria* på fisken.

Parallelt med de mikrobiologiske analysene ble det gjennomført flere analyser av kvalitet på fisken, etter behandlingene og under lagringstiden, blant annet pH, farge og tekstur. Av disse er det bare pH som har direkte relevans for mikrobiologisk vekst, og derfor er pH den eneste parameteren som er tatt med i denne rapporten. Analyser av alle kvalitetsparametere blir presentert i en egen rapport fra Arbeidspakke 3.

### 2.1 Prøvemateriale

#### 2.1.1 Hel, sløyd fisk

Ettersom laks av kommersiell størrelse er stor og lite egnet til kontamineringsforsøk med sykdomsframkallende mikroorganismer, ble det til disse forsøkene brukt HOG-ørret. Fisken ble levert av Sirdalsørret (Tonstad) i januar og i mai 2024, og forsøkene ble gjennomført cirka 2–3 døgn etter slaktning.

#### 2.1.2 Laksefilet

Til disse forsøkene ble det brukt HOG-laks som ble filetert (fileter med skinn). Fisken var levert av Domstein, og slaktet 4 dager før forsøkene startet.

- Vekst-hemmende tiltak på vakuumpakket og MA-pakket røykelaks.

Røykelaks (Fiskeriet) ble kuttet i skiver (10 g) og lagt i små sous vide poser.

### 2.2 Tilberedning av inokulum - Inokulering

#### 2.2.1 Forsøk på hel, sløyd fisk

HOG-ørret ble inokulert hel ved å dyppe den i en cocktail bestående av 3 *Listeria*-stammer (Tabell 1) anbefalt av EU's Referanselaboratorium for *Listeria* (EURL) (Bergis, Bonanno, Asséré, & Lombard, 2021).

Tabell 1 Valg av *Listeria*-stammer på bakgrunn av genoserotype, opphav og vekstvilkår.

Stamme	Genoserotype	Opphav	Vekstevner		
			Lav aw (aw =0,95)	Lav pH (pH=5)	Lav temperatur (T=8 °C)
12MOB099LM	II	Fiskeprodukter	NEI	NEI	JA
12MOB101LM	II	Fiskeprodukter	JA	JA	JA
12MOB102LM	IV	Fiskeprodukter	JA	JA	JA

Stammene ble dyrket opp individuelt i Tryptic Soy Broth tilsatt 0,6 % gjærekstrakt (TSBYE; Merck) overnatt ved 37 °C og omrøring (150 rpm). Overnatt kultur ble sentrifugert og pellet ble suspendert i autoklavert destillert vann. Deretter ble stammene blandet likt, og fortynt i autoklavert destillert vann til cirka 10<sup>6</sup> kolonidannende enheter per mL (cfu/mL). HOG-ørret ble dypet i inokuleringsvæsken, og lagt til avrenning ved 4 °C over natt.



### 2.2.2 Forsøk på laksefilet

*Listeria*-stammene ble dyrket opp individuelt i TSBYE ved 37 °C og omrøring (150 rpm). Stammene ble deretter blandet likt, vasket i PBS og fortynnet i destillert vann til cirka 10<sup>4</sup> cfu/mL. *Listeria* cocktailen ble inokulert på henholdsvis skinnside eller kjøttside av fileten til en konsentrasjon på ~ log 5 cfu/g.

### 2.2.3 Vekst-hemmende tiltak på vakuumpakket og MA-pakket røykelaks

En cocktail av 3 *Listeria* stammer; Scott A (CIP103575), EGDe (CIP107776) fra Louis Pasteur Instituttet i Paris, og RO15 isolert fra krydret sild (Ciolacu, Nicolau, Wagner, & Rychli, 2015). *Listeria* cocktailen ble inokulert på tynne skiver (10 g) av røykt laks til en konsentrasjon på ~ log 3 cfu/g.

## 2.3 Tilberedning av behandlingsløsninger

### Fritt Klor

Klorløsning ble tilberedt fra husholdningsklorin (Klorin; Lilleborg), som inneholder 4 % aktivt klor, det vil si 40 000 ppm. Det ble laget en stamløsning på 100 ppm fritt klor ved å blande 2,5 mL Klorin med 997,5 mL destillert vann. For å lage løsninger med henholdsvis 2,5 og 0,6 ppm ble stamløsningen tilsatt 25 og 6 mL per L i sjøvann eller ionebyttet vann. Klorkonsentrasjonen i de endelige løsningene ble analysert ved titrering med sølvnitrat (EasyPlus titrator, Mettler Toledo) for å bekrefte riktig konsentrasjon.

### Eddiksyre

Eddiksyre glisial (Merck) ble fortynnet i destillert vann til pH 2,6. Det ble også brukt andre konsentrasjoner, for eksempel at eddiksyre ble fortynnet i destillert vann til 1 % (vol/vol) tilsvarende pH ~2,9.

### Verdad

Verdad N6 (Arne B. Corneliusen AS) i pulverform ble fortynnet til 20 g/L (tilsv. 2 % (vekt/vol)) i destillert vann.

### Kitosan

Kitosan-pulver (Sigma-Aldrich), med medium molekylvekt og utvunnet fra kitin i rekeskall, ble løst i 1 % eller 2 % eddiksyre under omrøring over natt ved romtemperatur ved å tilsette 10 g pulver til 1 L syre. I forsøk med røykt laks ble kitosan løst i 1 % eddiksyre ytterligere fortynnet i destillert vann til 2 g/L.

### Nisaplin/Nisin

Nisaplin (Danisco), som er en kommersiell nisin-formulering, ble løst i destillert vann til 250–500 mg/L etter produsentens anbefalinger. Nisin A fra *Lactococcus lactis* (Sigma Aldrich) ble først løst i 0,02 M HCl til en konsentrasjon av 50 g/L og deretter fortynnet videre i destillert vann til 320 mg/L (forsøk på vakuumpakket røykelaks).

### Nisaplin/Nisin + Kitosan

For behandling med Nisaplin+kitosan, ble 500 mg Nisaplin-pulver løst i 1 L 1 % kitosan-løsning, eller 320 mg nisin A fra *Lactococcus lactis* (Sigma Aldrich) løst i 1 L 1 % kitosan-løsning (forsøk på vakuumpakket røykelaks).

### Plasma aktivert vann

Et kald plasma genereringssystem ble brukt til å produsere plasma aktivert vann (PAW) fra springvann. Dette er et batchsystem (100 ml per behandling), hvor vannet ble utsatt for en frekvens på 17 kHz og med plasmastyrke 36 W i 30 minutter. Målt pH var 2,92. For kontroll-behandling, ble ionebyttet vann pH justert med HCl til pH 2,92 tilsvarende til pH i PAW.

## 2.4 Behandlinger

### 2.4.1 Reduksjon av *Listeria* på hel, sløyd fisk

#### Effekt av fritt klor, pH-justert vann, nisin og PAW

Effekt av fritt klor, pH-justert vann, Nisaplin, kitosan og PAW ble undersøkt. HOG-ørret ble dyppet i ulike løsninger for å undersøke effekten mot *Listeria*. De ulike betingelsene som ble undersøkt er listet opp og sammenlignet med kontroller som vist i Tabell 2.

Tabell 2 Behandlinger for reduksjon av *Listeria* på HOG-ørret

Behandling nr.	Behandling	Konsentrasjon	pH	Tid (min)*
1	Fritt klor i ferskvann	0,6 ppm	6,5	60
2	Fritt klor i sjøvann	0,6 ppm	Ikke målt	60
3	Fritt klor i ferskvann	2,5 ppm	6,4	60
4	Fritt klor i sjøvann	2,5 ppm	Ikke målt	60
5	Ferskvann (kontroll)		~7	60
6	pH-justert vann (eddiksyre)		2,6	2
7	Nisaplin	250 mg/L	Ikke målt	2
8	Destillert vann (Nisaplin kontroll)		7,2	2
9	PAW		2,9	60
10	pH-justert vann (HCl) (PAW kontroll)		2,9	60

\* Behandling 1 til 6 samt kontroll ble skylt i destillert vann etter behandling. Behandling 7 ble ikke skylt.

#### Effekt av eddiksyre, Verdad, nisin og kitosan

Effekt av dypping i organiske syrer (eddiksyre og Verdad), Nisaplin, kitosan og en kombinasjon av Nisaplin og kitosan ble undersøkt og sammenlignet med en ubehandlet kontroll (Tabell 3).

Tabell 3 Behandlinger for reduksjon av *Listeria* på HOG-ørret

Behandling nr.	Behandling	Konsentrasjon	pH i løsning	Tid (min)*
1	Eddiksyre	1%	2,9	4
2	Verdad	2%	5,9	4
3	Nisaplin	500 mg/L	4,7	4
4	Kitosan (løst i 2% eddiksyre)	10 g/L	3,8	4
5	Nisaplin+kitosan (løst i 2% eddiksyre)	Nisaplin: 500 mg/L Kitosan: 10 g/L	3,8	4
6	Kontroll			4

\* Behandling 1 og 2 ble skylt i destillert vann etter behandling. De andre ble ikke skylt.

Det er kun resultatene fra det første forsøket som presenteres her siden resultatene fra gjentaket ikke er ferdigstilt enda.

### 2.4.2 Reduksjon av *Listeria* på laksefilet

#### Forsøk på skinnsiden

Fileter med skinn ble kuttet i små biter (~10 g) og inokulert på skinnsiden med en cocktail av *L. monocytogenes* som forklart over til cirka log 5 cfu/g. Inokulerte prøver ble oppbevart ved 4 °C over natt. Prøvene (n = 3) ble deretter skylt i ulike løsninger ved dypping og noen prøver ble også UV-behandlet som vist i Tabell 4. Destillert vann ble pH-justert ved tilsats av iseddik til ønsket pH 2,6. UV-belysning

ble utført i et Klean UV-kabinett (Torsvik innredning) med 4 UV-C lysstoffrør (Phillips TUV TL-D 25W UV-C) og prøvene ble plassert på aluminiumsfolie cirka 8 cm fra lysstoffrørene. UV-strålingen ved disse betingelsene ble målt til 2600  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  med et UV-meter med en UVX 25 sensor (UVP UVX Radiometer, AnalytikJena).

Tabell 4 Behandlinger for reduksjon av *Listeria* på skinnside av filet

Behandling nr.	Behandling	pH	Tid (min)*	UV-belysning (min)
1	Destillert vann	7,2	2	0
2	pH-justert vann	2,6	2	0
3	Destillert vann	7,2	4	0
4	pH-justert vann	2,6	4	0
5	Destillert vann	7,2	2	60
6	pH-justert vann	2,6	2	60
7	Destillert vann	7,2	4	60
8	pH-justert vann	2,6	4	60
9	Kun UV-behandling			60
10	Kontroll	Ubehandlet		

\* Alle behandlinger med pH-justert vann ble skylt i destillert vann etter behandling (før evt. UV-behandling).

### Forøk på kjøtt siden

Fileter med skinn ble kuttet i små biter (~10 g) og inokulert på kjøtt siden med en cocktail av *Listeria* som forklart over til cirka log 5 cfu/g. Inokulerte prøver ble oppbevart ved 4 °C over natt. Prøvene (n = 3) ble deretter skylt i ulike løsninger ved dypping og noen prøver ble også UV-behandlet som vist i Tabell 5. pH-justering, kitosan og UV-behandling ble gjort som forklart over. Siden 2 minutter behandlingstid hadde begrenset effekt i det første forsøket i, så ble ikke dette gjentatt.

Tabell 5 Behandlinger for reduksjon av *Listeria* på kjøtt side av filet

Behandling nr.	Behandling	pH	Tid (min)*	UV-belysning (min)
1	Destillert vann	7,2	4	0
2	pH-justert vann	2,6	4	0
3	1 % Kitosan	3,8	Dypping	0
4	Destillert vann	7,2	4	60
5	pH-justert vann	2,6	4	60
6	1 % Kitosan	3,8	Dypping	60
7	Kontroll	Ubehandlet		

\* Alle behandlinger med pH-justert vann ble skylt i destillert vann etter behandling (før evt. UV-behandling).

I dette forsøket ble det analysert for *Listeria* som forklart tidligere, og i tillegg for totalt aerobt kimtall på Long and Hammer agar etter NMKL protokoll nr. 184.

### 2.4.3 Nisin og kitosan tilsatt røykelaks

Nisinet som er brukt i dette forsøket er av analytisk grad og inneholder 2,5 % aktivt nisin A, og det er konsentrasjonen av aktivt nisin A som er oppgitt i Tabell 6. Konsentrasjonene av nisin og kitosan er basert på tidligere analysert minimum hemmende konsentrasjon (MIC) for *Listeria*-stammene som ble benyttet i forsøket. MIC ble analysert etter metoden beskrevet av Mota-Meira, La Pointe, Lacroix, and Lavoie (2000). Det ble tilsatt 2x MIC av nisin og kitosan på røykelaks i dette forsøket. Røykelaks ble kuttet i skiver (10 g) og lagt i små sous vide poser. Merk at kitosan ble først løst i 1 % eddiksyre til 10

g/L og deretter fortynnet i destillert vann. Nisin og kitosan ble pipettert på prøvene og distribuert over hele prøven til endelig konsentrasjon som det framgår i Tabell 6 og lagret ved 4 °C over natt. 500 µL av *Listeria*-løsningen, tilsvarende cirka log 3 cfu/g, ble pipettert på prøvene inne i sous vide posene og fordelt over hele prøven. Deretter ble posene forseglest med vakuu og lagret ved 4 °C. Det ble tatt ut prøver til analyse av *Listeria* umiddelbart og ukentlig i 6 uker.

Tabell 6 Behandlinger for å studere effekt av nisin og kitosan på vekst av *Listeria* i røykelaks

Behandling nr	Behandling	pH i løsning	Konsentrasjon (µg/g)
1	Nisin	6,9	8
2	Kitosan	4,8	2
3	Nisin+kitosan	4,6	Nisin: 8 Kitosan: 2
4	Kontroll (sterilt vann)	7,2	

#### 2.4.4 Nisin og kitosan kombinert med Modifisert Atmosfære Pakking (MAP)

Forsøket beskrevet i 2.4.3. ble gjentatt i luft og MAP med target CO<sub>2</sub>: N<sub>2</sub> forhold 100:0, 67:33, 33:67 og 0:100.

## 2.5 Analyser

### *Listeria monocytogenes*

Prøvene ble overført til sterile stomacherposer med filter og fortynnet 10x i peptonvann og homogenisert i en Smasher (AES Laboratorie, BioMerieux Industry). Passende fortynninger av homogenatet ble sådd ut på Brilliance *Listeria* agarplater (Oxoid) som ble inkubert 48 timer ved 37 °C. Kolonier av *Listeria* ble telt og konsentrasjonen uttrykt som log cfu/g.

### pH

pH ble målt ved bruk av pH-meter (Mettler Toledo FiveEasy Plus) tilkoblet en LE438 elektrode (Mettler Toledo, Norge) for homogenat og InLab® Surface elektrode for filet.

### Statistikk

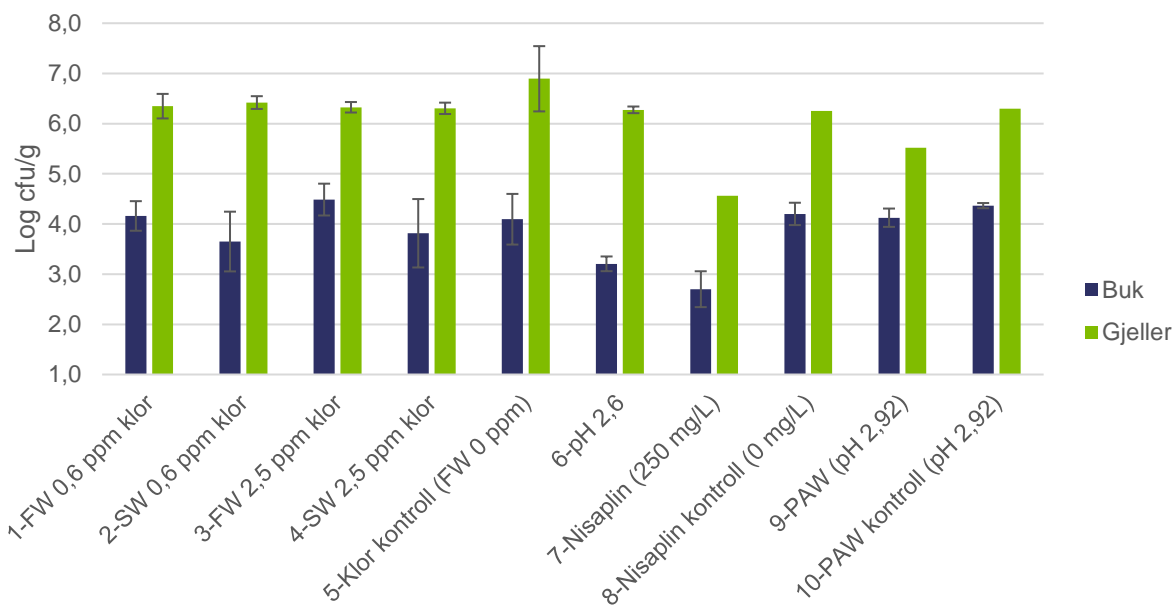
Minitab v19 (MiniTab Inc., USA) ble brukt for å analysere variasjon mellom uttaksdato, behandling, og responsvariabler med general linear model (GLM). Signifikans for forskjell mellom gjennomsnitt ble analysert med Student's T-test i MicroSoft Excel. Signifikansnivået ble satt til  $p < 0,05$  i alle analyser.

### 3 Resultater og Diskusjon

#### 3.1 Skånsom reduksjon av *Listeria* på hel, sløyd fisk

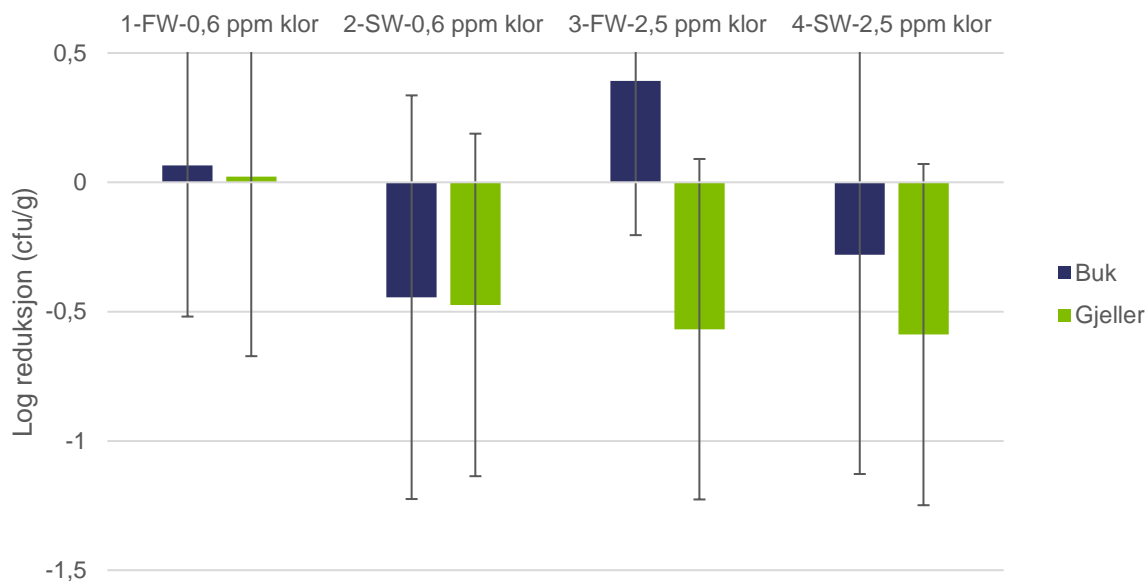
##### 3.1.1 Forsøk nr. 1; effekt av fritt klor, pH-justert vann, nisin og PAW

HOG-ørret ble benyttet for disse forsøkene. Figur 1 oppsummerer vekst av *Listeria* for alle behandlingene samt kontroller samlet. Videre er det i Figur 2 til 6 vist log-reduksjon av de ulike behandlingstypene (klor, pH-justert vann, Nisaplin og PAW) relativt til respektive kontroller, og resultatene forklares og diskuteres mer detaljert i det følgende.

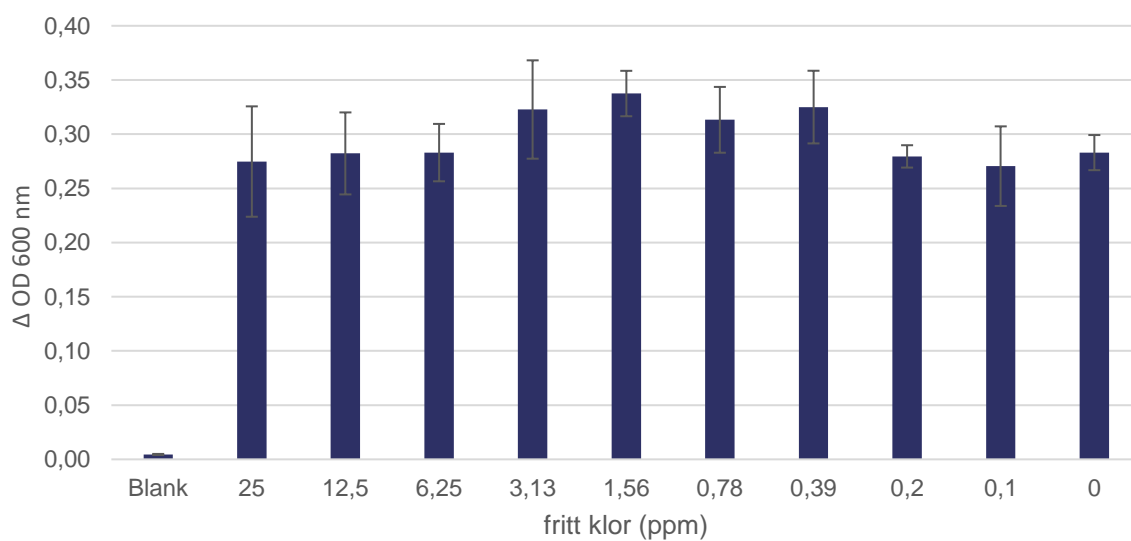


Figur 1 Vekst av *Listeria* i buk og gjeller på HOG-ørret etter ulike behandlinger. Klorbehandlingen ble utført i både ferskvann (FW) og sjøvann (SW). Hver prøve har sin egen kontroll. Tallene foran behandlingene referer til behandling som beskrevet i Tab. 2.

Sammenlignet med de respektive kontrollprøvene, var det ikke signifikant effekt på *Listeria* som følge av behandlinger med klor, uavhengig av konsentrasjon (Figur 2). Det er tidligere vist at *Listeria* kan vokse i opp mot 40 ppm fritt klor uten å hemmes (Brackett, 1987), noe som også ble indikert i screeningsforsøket (Figur 3). Løsninger med 50 ppm fritt klor og pH-justert til pH 6,5 med enten sitronsyre eller natriumsyresulfat gav signifikant reduksjon av *Listeria* på spinatblader ved dypping i 60 og 90 sekunder (Stopforth, Mai, Kottapalli, & Samadpour, 2007), men så høye klorkonsentrasjoner har uheldige sensoriske effekter på fisk, som vi vil komme tilbake til i en egen rapport fra Arbeidspakke 3. Fritt klor ble derfor forkastet i videre forsøk.

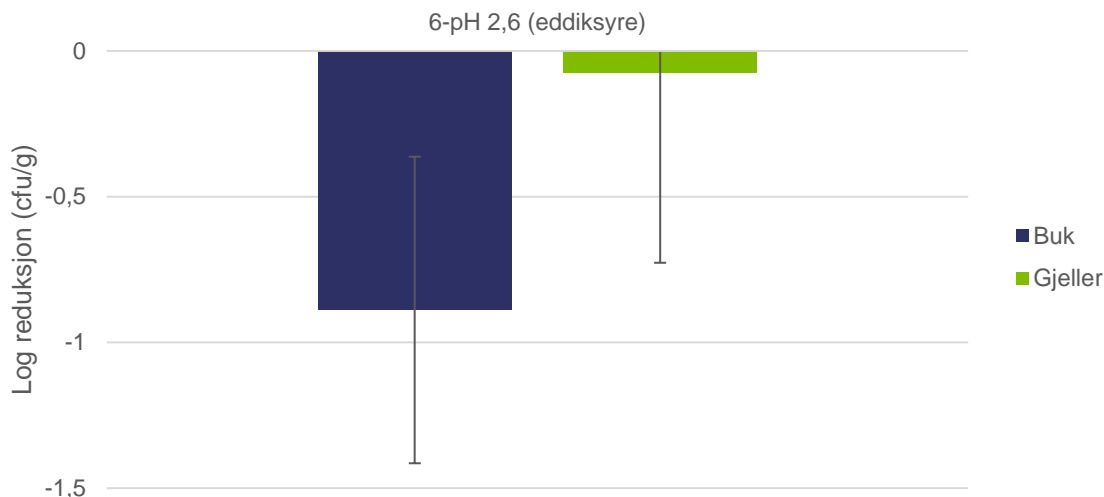


Figur 2 Log-reduksjon av *Listeria* som effekt av fritt klor i ferskvann (FW) og sjøvann (SW) i buk og gjeller på HOG-ørret relativt til kontrollbehandling (FW uten fritt klor)



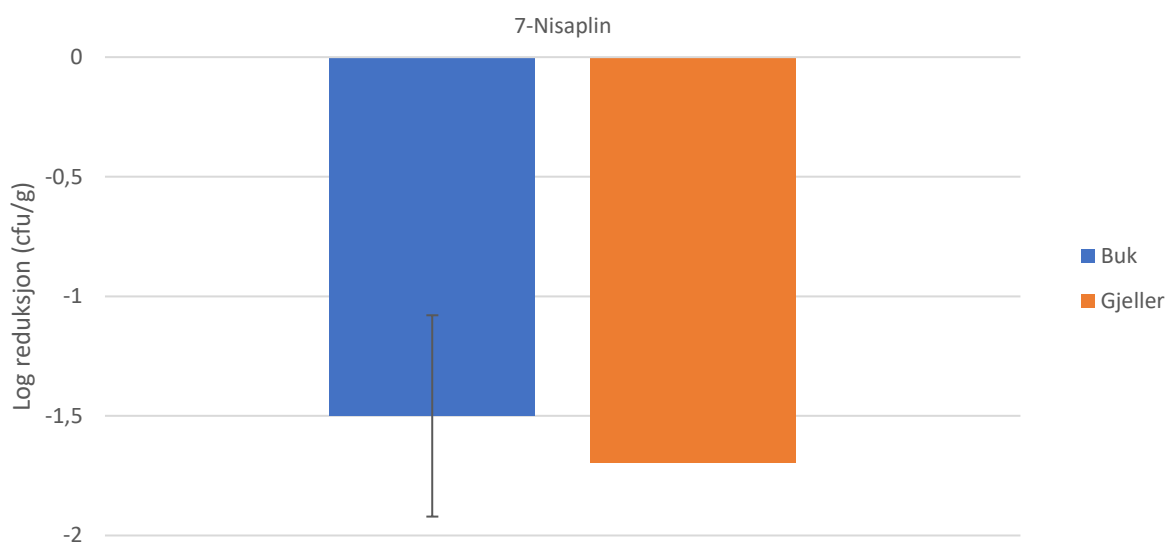
Figur 3 Vekst av *Listeria* (12mob099Im) målt som  $\Delta OD_{600nm}$  etter 24 timer inkubering ved 20 °C med ulike konsentrasjoner av fritt klor

Skylling av sløyd ørret med pH-justert vann gav en log-reduksjon av *Listeria* på 0,9 cfu/g i buk. Dette gav en effekt som var statistisk signifikant ( $p = 0,04$ ) forskjellig fra kontrollen, som var skylt i vanlig springvann. Analyser av gjellene viste ingen signifikant effekt (Figur 4).



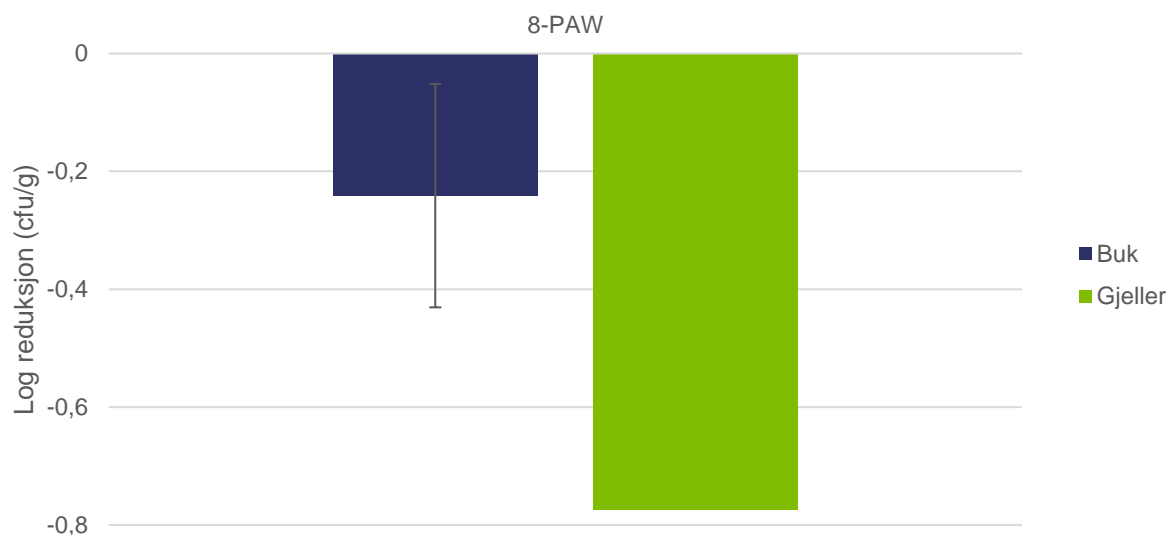
Figur 4 Log-reduksjon av *Listeria* som effekt av pH-justering til pH 2,6 med eddiksyre på buk og gjeller på HOG-ørret relativt til kontrollbehandling (destillert vann med nøytral pH).

Nisaplin (250 mg/L) hadde bedre effekt enn pH-justert vann med en log-reduksjon på 1,5 cfu/g (Figur 5), og dette var også statistisk signifikant sammenlignet med kontrollen ( $p = 0,003$ ). Det var en tilsvarende reduksjon på gjeller, men i dette tilfellet er datagrunnlaget for lite til å avgjøre om det er statistisk signifikant. Den hemmende effekten av nisin på *Listeria* er demonstrert flere ganger (Lebow et al., 2017; Mota-Meira et al., 2000; Nilsson et al., 1997). Danisco anbefaler en dosering på 25–500 mg per kg eller liter produkt. Siden det her var snakk om dypping ble det valgt å gjennomføre forsøkene ved å dyppe i konsentrasjoner med 250 og 500 mg/L. På grunn av lav råvaretilgang ble behandling med 500 mg/L utsatt til Forsøk 2 der det ble oppnådd en log-reduksjon på 1,8 cfu/g.



Figur 5 Log-reduksjon av *Listeria* som effekt av Nisaplin (250 mg/L) på buk og gjeller på HOG-ørret relativt til kontrollbehandling (destillert vann uten Nisaplin). Merk at på grunn av lav råvaretilgang ble det kun analysert på 3 prøver fra buk, fra samme fisk, og begge gjellene.

Det var ingen statistisk signifikant effekt av PAW på buk, mens på gjeller ble det registrert en reduksjon på log 0,8 cfu/g, men som nevnt kan det ikke utledes hvorvidt dette er signifikant (Figur 6).

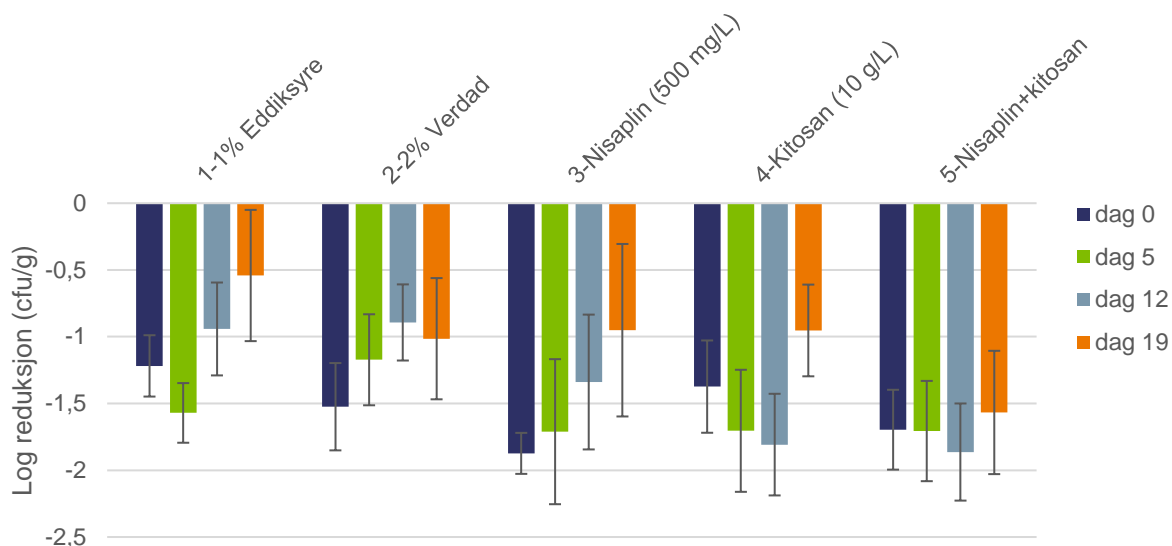


Figur 6 Log-reduksjon av *Listeria* som effekt av PAW på buk og gjeller på HOG-ørret relativt til kontrollbehandling (destillert vann pH-justert til pH 2,92 med HCl). Merk at på grunn av problemer med råvaretilgangen ble det kun analysert på 2 prøver fra buk, fra samme fisk, og 1 gjelle.

### 3.1.2 Forsøk nr. 2; effekt av eddiksyre, Verdad, nisin og kitosan

De mest lovende behandlingene fra Forsøk 1 på hel sløyd fisk ble gjentatt, og i tillegg ble det testet Verdad og kitosan, og nisin kombinert med kitosan. Behandlingstiden ble økt fra 2 til 4 minutter, basert på tidligere resultater. I tillegg ble det gjort lagringsforsøk opp til 19 dager ved 4 °C. Alle behandlingene gir en ønsket log-reduksjon - mellom 0,5 og 2 cfu/g (Figur 7). Effekten av Verdad på *Listeria* i røkt laks har tidligere blitt evaluert av Heir, Liland, Carlehög, and Holck (2019) som konkluderte med at 2 % Verdad ga signifikant reduksjon av *Listeria*, mens høyere konsentrasjoner ga uønskede sensoriske effekter. Behandling med Nisaplin (500 mg/L) gir som i Forsøk 1 den beste effekten umiddelbart etter behandling (-log 1,9 cfu/g), men kombinasjonen med Nisaplin og kitosan ser ut til å ivareta effekten bedre utover lagringsperioden på 19 dager (Figur 7). Tosun, Mol, Alakavuk, Ulusoy, and Dogruyol (2022) rapporterte at kitosan kombinert med nisin effektivt hemmet bakterievekst i laks under lagring, og gav bedre sensorisk score. Guohua, Wei, Hailin, Jian, and Yuanyuan (2016) rapporterte at nisin kombinert med kitosan hemmer bakterievekst på stor gul trommefisk (big yellow croaker), i tillegg til å gi lavere vanntap og bedre farge og lukt, men utover dette er det gjort svært lite forskning på denne kombinasjonsteknologien.



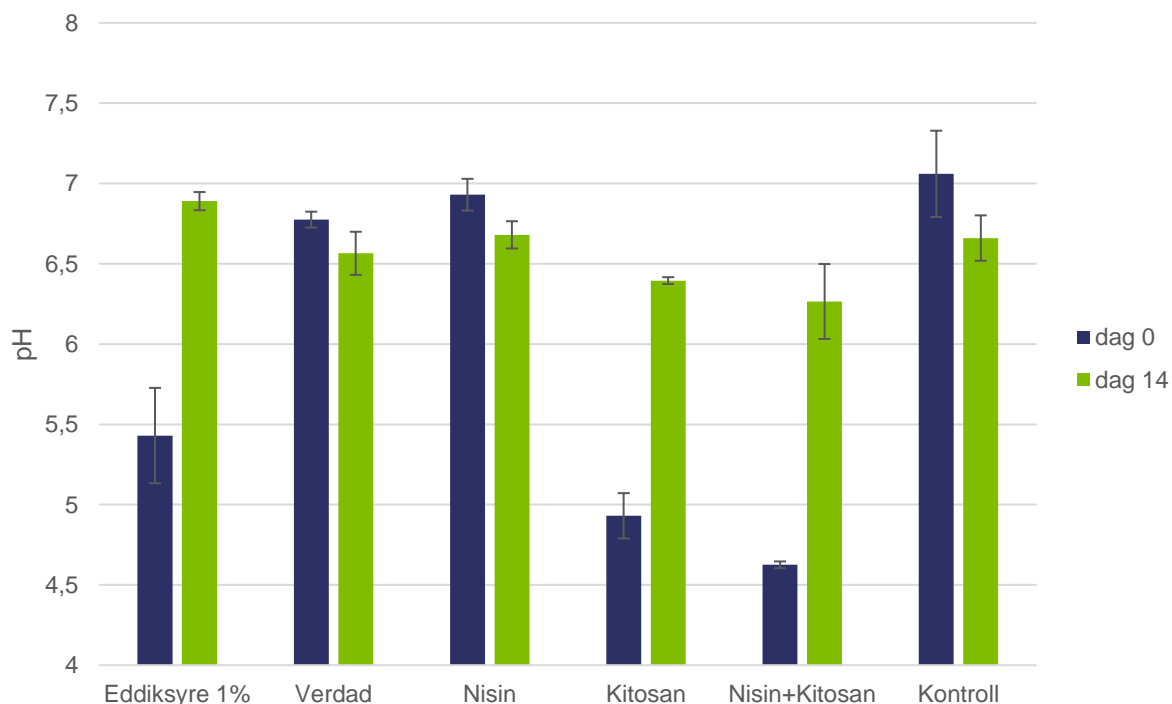


Figur 7 Log-reduksjon av *Listeria* på HOG-ørret som effekt av ulike behandlinger relativt til ubehandlet kontroll etter lagring ved 4 °C i 0, 5, 12, og 19 dager. Tallene foran behandlingene referer til behandling som beskrevet i Tab. 3

### 3.1.3 pH

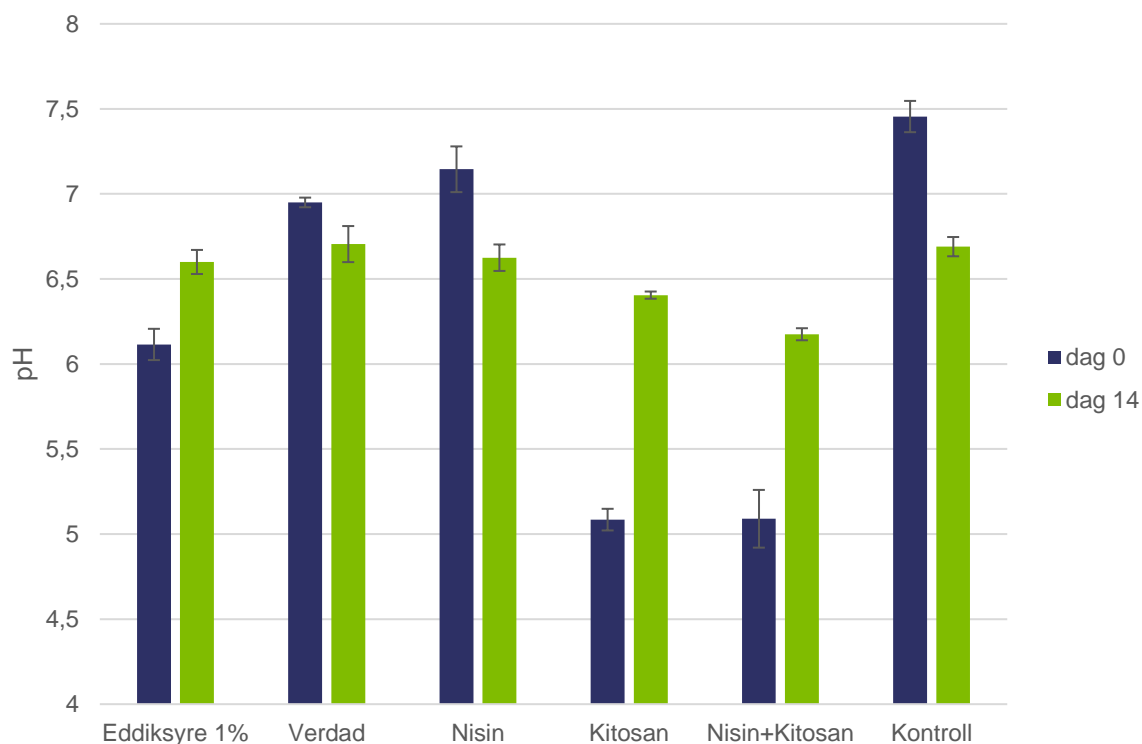
pH i muskel/overflate målt i muskel/overflate er svært relevant, både for initiell pH-reduksjon, og for vekstvilkår under lagring. Ettersom pH også kan forventes å ha effekt på kvalitetsparametere som farge og tekstur, ble disse analysene gjennomført som en del av AP3, og de vil også bli rapportert senere - i en kvalitetskontekst.

Figurene 8 og 9, viser pH-verdiene som ble målt i henholdsvis buk/muskel og på skinnsiden.



Figur 8 pH målt i buken på behandlet HOG-ørret. Målingene er utført samme dag som behandlingen (0), og etter 2 uker (14).

Trendene er sammenfallende mellom pH-målinger utført i buken (Figur 9) og på skinnsiden (Figur 10)



Figur 9 pH målt på skinnsiden av behandlet HOG-ørret. Målingene er utført samme dag som behandlingen (0), og etter 2 uker (14).

Disse målingene viser signifikante forskjeller mellom flere av behandlingene. Spesielt på dag 0 er dette tydelig i de prøvene som inneholder eddiksyre. Men den initielle pH-reduksjonen varer lengst i behandlingene med Kitosan og med Nisin + Kitosan. Med pH justert med HCl, kan *Listeria* vokse ned til pH 4,3 (George, Lund, & Brocklehurst, 1988). Dersom pH justeres med organiske syrer, som i dette tilfellet (eddiksyre) har også mengden udisosiert syre effekt på veksten av *Listeria* (Young & Foegeding, 1993).

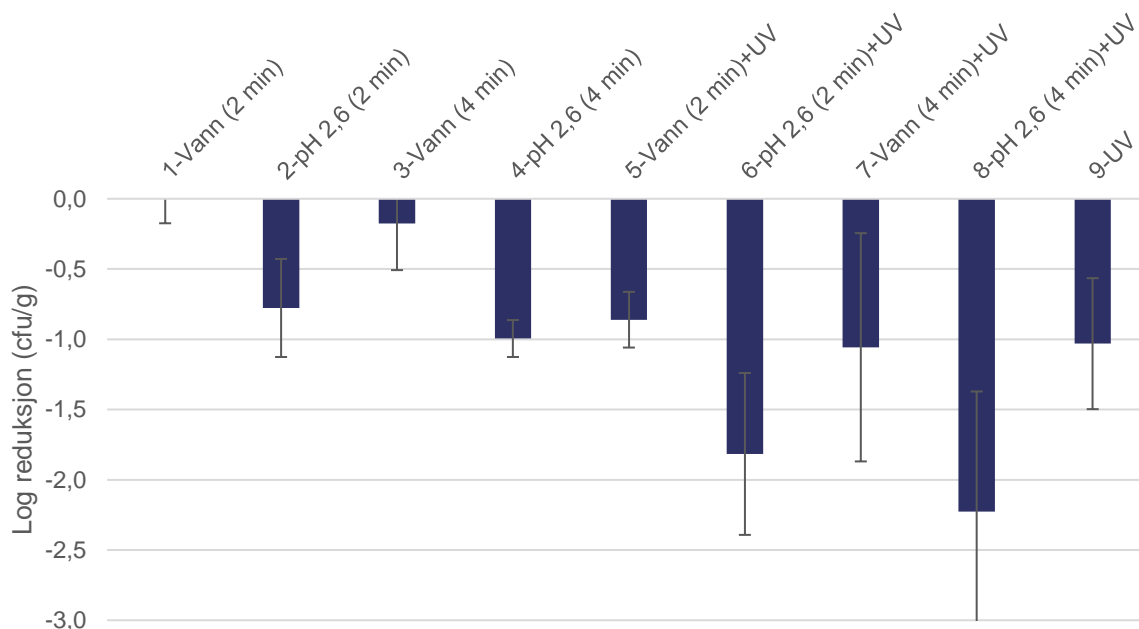
### Oppsummering

Med eddiksyre (1 %, pH 2,6–2,9) og Nisaplin-behandlinger oppnås ønsket log-reduksjon, mellom 0,5 til 2 log. Det samme ble oppnådd ved behandling med 2 % Verdad, kitosan (10g /L) og kombinasjonsbehandling med Nisaplin og kitosan. PAW-behandling ble bare utført en gang, og datagrunnlaget her er for dårlig til å konkludere sikkert, men resultatene så langt tyder på en viss effekt på gjeller, men ikke på buk. Klor i konsentrasjoner som ikke gir uønskede sensoriske effekter gav ingen effekt, og basert på våre resultater anbefales derfor ikke klor for dekontaminering av HOG-fisk. Det må tas et forbehold om manglende statistisk grunnlag for noen av resultatene som er presentert her. Dette gjelder spesielt for data på log-reduksjon i gjeller der manglede råstofftilgang førte til at det ikke kunne analyseres parallellt. Fra buk ble det tatt ut flere analytiske paralleller, men i de fleste tilfeller fra samme fisk. Det er ønskelig å også ha biologiske paralleller (dvs. fra ulike individer). Det statistiske grunnlaget vil bli bedre når alle resultatene fra forsøkene er ferdig analysert. Dette vil vi komme tilbake til i senere rapporter og eventuelt i publikasjoner.

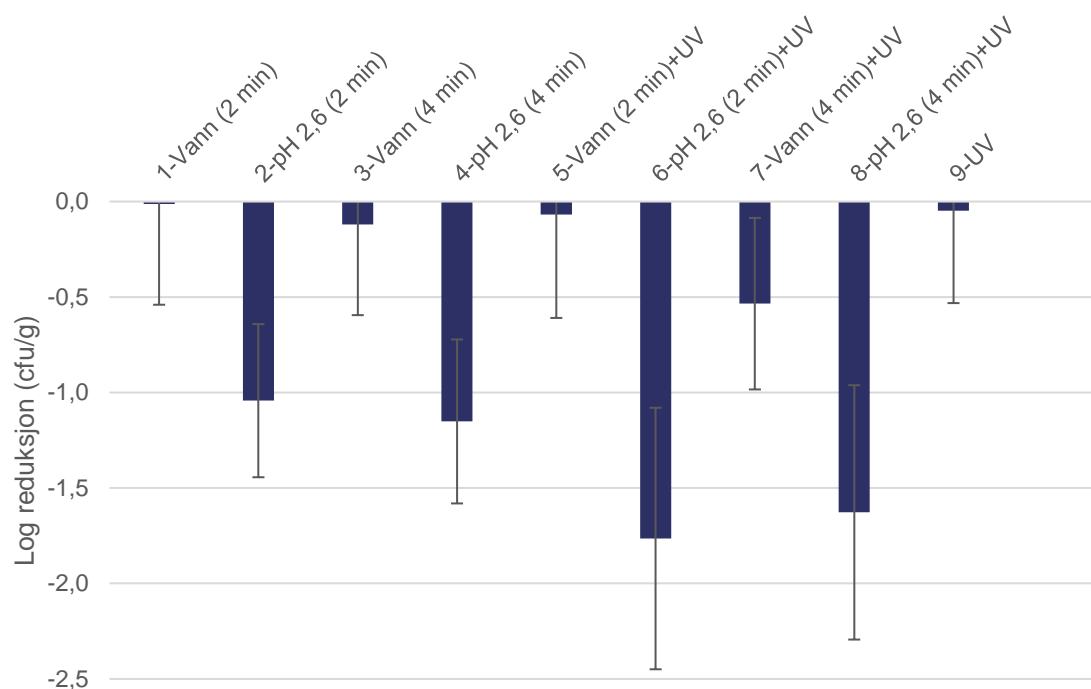
## 3.2 Skånsom reduksjon av *Listeria* på laksefilet

### 3.2.1 Forsøk nr. 1; Laksefilet, skinnside; Skylling med vann, pH-justert vann alene og kombinert med UV

Skylling med vann i 2 eller 4 minutter hadde ingen eller liten effekt på hverken *Listeria* (Figur 10) eller totalt kimtall (Figur 12). Skylling med pH-justert vann ga statistisk signifikant log-reduksjon av *Listeria* på henholdsvis log 0,8 ( $p = 0,018$ ) og log 1,0 cfu/g ( $p = 0,0002$ ), ved henholdsvis 2 og 4 minutter dypping, og også > 1 log-reduksjon av totalkim. UV-behandling alene har omtrent samme effekt som pH-justert vann, og denne har bedre effekt på reduksjon av *Listeria* (Figur 10) enn på den totale bakteriefloraen (Figur 11). Grunnen til dette er sannsynligvis at UV-behandling bare er effektiv på bakterier på overflaten. Kombinasjon av pH-justert vann og UV gir en marginal tilleggseffekt på *Listeria* ( $p = 0,051$ ), men ikke på totalt kimtall. Miks-Krajnik, Feng, Bang, and Yuk (2017) oppnådde ikke signifikant effekt av skylling med vann eller pH-justert elektrolysert vann (pH 2,6) på laksefilet med behandlingstider på 1, 5 og 10 minutter, mens kombinasjoner med UV hadde god effekt. Imidlertid ble det observert uheldige sensoriske effekter ved behandlingstider (i lav pH) på mer enn 5 minutter (Miks-Krajnik et al., 2017). Det ble derfor valgt maksimum 4 minutter i disse forsøkene. Ozer and Demirci (2006) rapporterte at pulserende UV-lys ( $5,6 \text{ J/cm}^2$ ) inaktiverte cirka 1 log *Listeria* på rå laks, som er sammenlignbart med vår studie, Miks-Krajnik et al. (2017) og Holck, Liland, Carlehög, and Heir (2018). UV-kabinettet som ble brukt i våre forsøk gir en relativt lav bestråling på cirka  $2600 \mu\text{W/cm}^2$ . Dette betyr at prøvene må oppbevares i 1 time i UV-kammeret for å oppnå en dose på  $9,3 \text{ J/cm}^2$ , og temperaturen i kammeret økte i løpet av behandlingen til  $33,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Denne temperaturøkningen har ikke effekt på *Listeria*, og liten eller ingen effekt på mikrofloraen generelt. Den lange behandlingstiden anses ikke å være relevant i en industriell setting. Siden UV-behandling likevel virker lovende, spesielt kombinert med andre metoder, anbefales det derfor å teste ut kraftigere UV-utstyr dersom man ønsker å studere denne typen behandling. En begrensning med UV-behandling er at bestrålingen ikke treffer i kroker og kroker, som for eksempel inne i buken på HOG-fisk, og at den ikke penetrerer inn i produktet. Det betyr at den kun egner seg som overflatebehandling på jevne overflater.



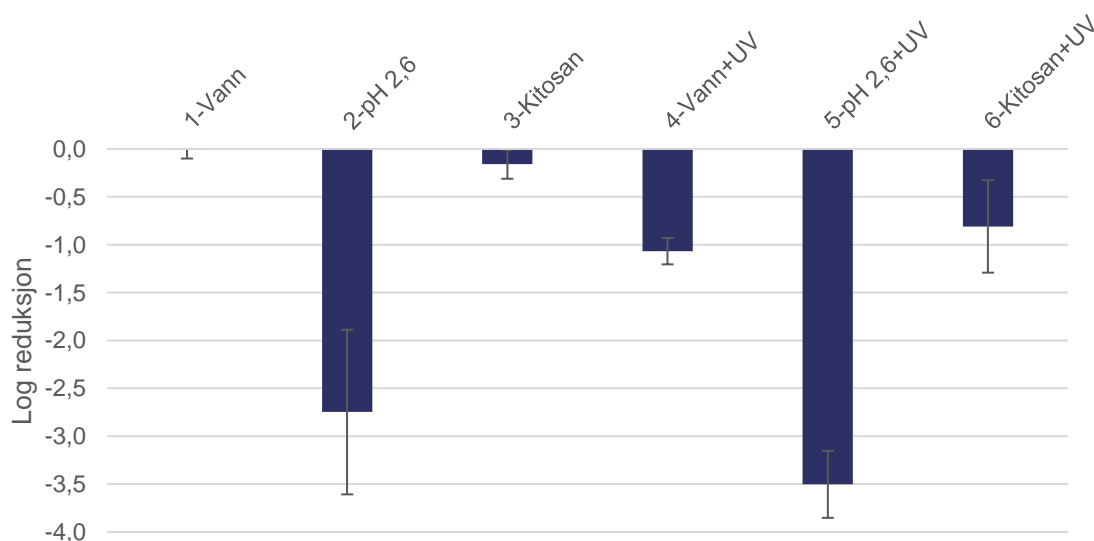
Figur 10 Log-reduksjon av *Listeria* på skinnsiden av laksefilet som effekt av ulike behandlinger relativt til ubehandlet kontroll. Tallene foran behandlingene referer til behandling som beskrevet i Tabell 4.



Figur 11 Log-reduksjon av totalt aerobt kimtall på skinnsiden av laksefilet som effekt av ulike behandlinger relativt til ubehandlet kontroll. Tallene foran behandlingene referer til behandling som beskrevet i Tabell 4.

### 3.2.2 Forsøk nr. 2; Laksefilet, kjøttside; Skylling med vann, pH-justert vann, og dypping i kitosan alene og kombinert med UV

Forsøk på kjøttssiden av fileter viste i stor grad samme trend som på skinnsiden (Figur 12). Det ble ikke observert effekt av skylling med vann, mens skylling med pH-justert vann alene eller kombinert med UV ga log-reduksjon på henholdsvis 2,7 og 3,5 cfu/g. Skylling i vann kombinert med UV ga signifikant effekt ( $p = 0,0002$ ) med 1,1 log-reduksjon, omtrent som på skinnsiden. Behandling med kitosan alene ga ikke signifikant effekt ( $p = 0,14$ ), men kombinert med UV ga det log-reduksjon på 0,8 cfu/g ( $p = 0,008$ ).



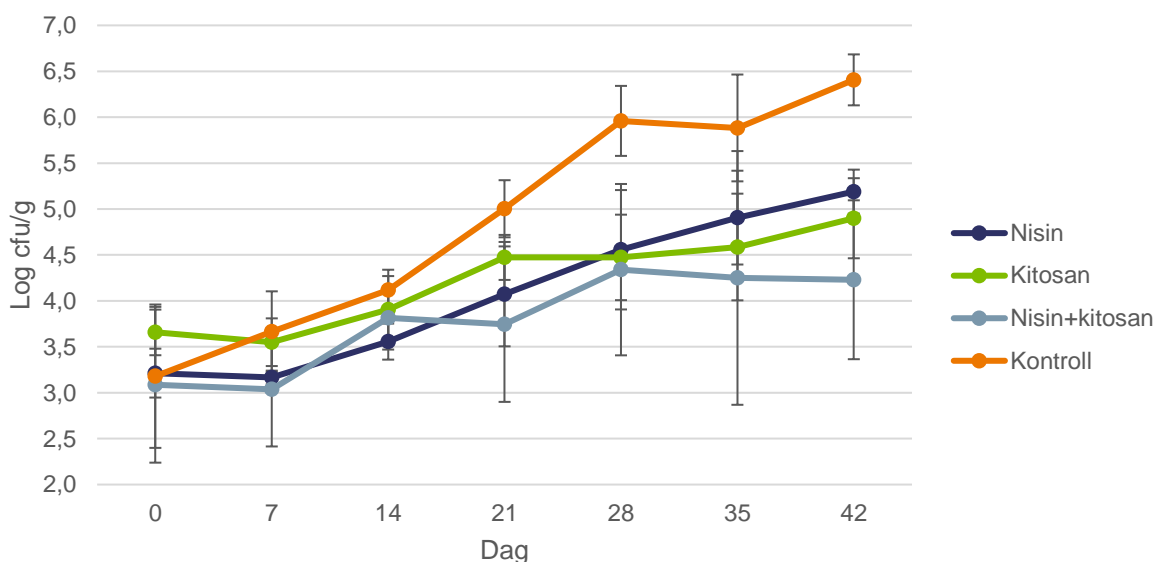
Figur 12 Log-reduksjon av Listeria på kjøttssiden av laksefilet som effekt av ulike behandlinger relativt til ubehandlet kontroll. Tallene foran behandlingene referer til behandling som beskrevet i Tabell 5.

### Oppsummering:

Skylling med pH-justert vann (eddiksyre; pH 2,6), ga ønsket effekt både på skinn og kjøttside, og denne økes når det kombineres med UV. Skylling i vann opp til 4 minutter og kitosan alene ga ikke ønsket effekt.

### 3.3 Behandling for å hemme vekst i vakuumpakket røykelaks

Mens metoder som involverer skylling med eksempelvis vann eller syrer, samt UV-bestråling fører til umiddelbar fjerning eller avdreping av deler av *Listeria*-populasjonen, anser vi behandling med nisin og kitosan som veksthemmende behandling. For å undersøke den hemmede effekten ble det derfor utført kontrollerte lagringsforsøk på røykelaks inokulert med *Listeria* med kjent konsentrasjon nisin A og kitosan på produktet. Etter behandling ble røykelaksen vakuumpakket, og lagret ved 4 °C. Som det kommer frem av Figur 13 har alle behandlingene *Listeria*-hemmende effekt sammenlignet med kontrollen. Etter 6 ukers lagring er *Listeria*-konsentrasjonen log 1 til log 2 cfu/g lavere i behandlede prøver.



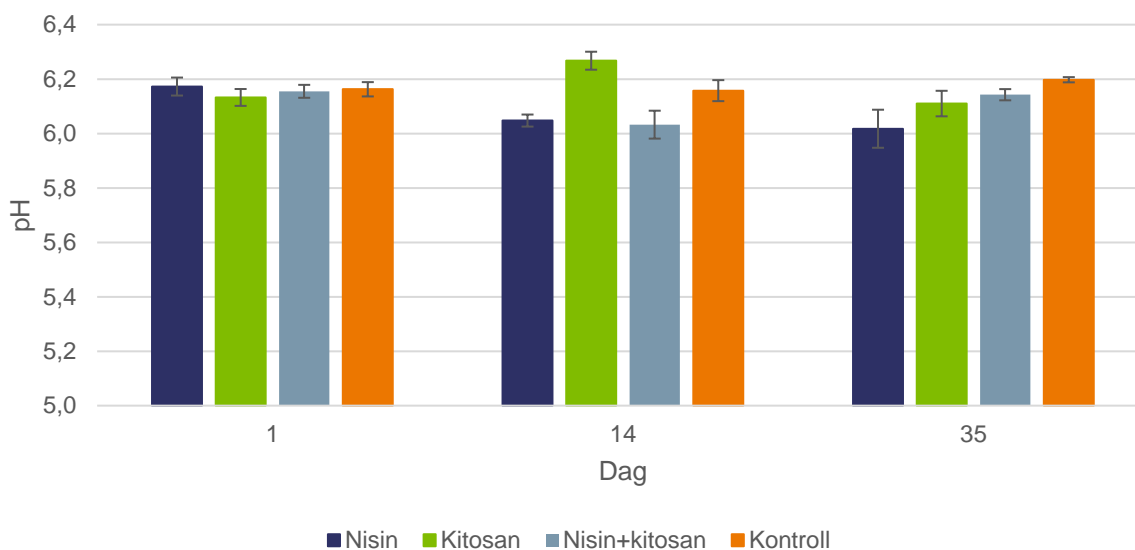
Figur 13 Effekt av behandling på vekst av *Listeria* i vakuumpakket røykelaks lagret ved 4 °C

Nisin A er per i dag ikke lovlig å bruke på fisk i EU, mens Health Canada (2017) foreslår en grense på 25 mg/kg nisin på en rekke RTE-produkter inkludert røykt fisk. Nisin er imidlertid lovlig i en rekke andre produkter, og ifølge Annex II i EC Regulering Nr. 1333/2008 er maksimum lovlig nivå av nisin A (E 234) som følger; 10 mg/kg i krem og umodnet ost, 12,5 mg/kg i modnet ost, prosessert ost og andre osteprodukter, 6,25 mg/kg i prosesserte egg og eggprodukter, og 3 mg/kg i desserter, ekskludert produkter dekket i andre kategorier (EC, 2008). I 2017 foreslo EFSA å øke grensene for umodnet ost til 12 mg/kg, og innføre en grense for varmebehandlede kjøttprodukter på 25 mg/kg (Younes et al., 2017). I lys av nye toksikologiske data (jf. Younes et al., 2017), utredes stadig bruken av nisin slik at det ikke er usannsynlig at det i fremtiden vil bli lovlig å bruke også på fiskeprodukter, men med begrensninger på konsentrasjon. I forsøket beskrevet her ble det brukt 8 mg nisin A per kg røykt laks. Sammenlignet med grenseverdiene for andre produkter, og foreslått grenseverdi fra Health Canada, kan dette anses som en relevant eller lav konsentrasjon.

The US Food and Drug Administration (FDA) og blant annet Japan har godkjent kitosan som konserveringsmiddel i kontakt med mat, men ikke EFSA (Restuccia et al., 2010). Kitosan løses vanligvis i eddiksyre som i seg selv har en antibakteriell effekt, men kitosan forbedrer denne effekten og muliggjør

hemming av bakterier ved en høyere pH sammenlignet med eddiksyre (Agullo, Rodriguez, Ramos, & Albertengo, 2003). Dette er en fordel siden lav pH ofte gir en astringent smak (Agullo et al., 2003). I pølser har kitosan i konsentrasjoner på 2,5 og 5,0 mg/kg god effekt på hemming av mikrofloraen, og påvirker ikke smaken (Ozaki et al., 2020). I forsøket presentert her ble det brukt 2,0 mg/kg, som viste seg å effektivt hemme veksten av *Listeria* (Figur 13).

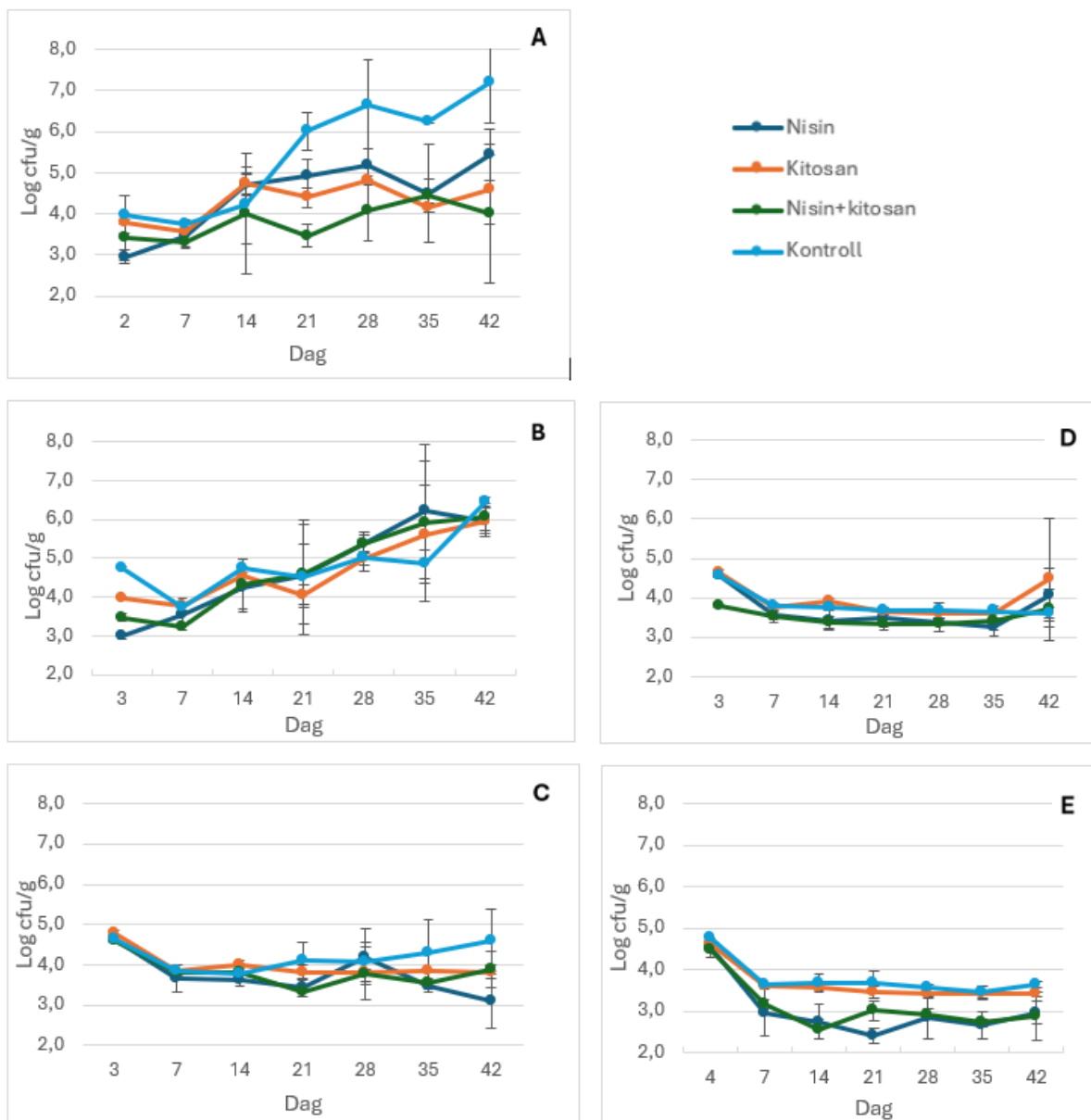
Som nevnt er det publisert lite forskning på kombinasjonen mellom nisin og kitosan utover Guohua et al. (2016) og Tosun et al. (2022). I likhet med disse observerte vi ikke negative effekter av nisin og kitosan på sensoriske egenskaper tekstur og farge, dette rapporteres senere. Når det gjelder pH, hadde de nisin-behandlede prøvene statistisk lavere pH ( $p = 0,002$ ), men forskjellen er marginal (Figur 14).



Figur 14 pH på overflaten av røykt laks som effekt av behandling

### 3.4 Nisin og kitosan kombinert med Modifisert Atmosfære Pakking (MAP) av røykt laks

Effekten av nisin og kitosan var også til stede ved pakking i luft (Figur 15a), mens det ikke var noen effekt ved pakking i 100 % N<sub>2</sub> (Fig. 15b). Ved pakking i 33 %–100 % CO<sub>2</sub> (Figur 15c-e) ble det observert svært lite vekst, også i kontrollprøvene, noe som demonstrerer CO<sub>2</sub>'s hemmende effekt. Andre forsøk utført i vårt laboratorium viser imidlertid statistisk signifikante synergieffekter mellom MAP og kitosan/nisin når det gjelder vekst av *Listeria* i TSBYE (Arif, In prep.). Spraying med kitosan-løsning (10 g/L) kombinert med MAP (40 % CO<sub>2</sub>) hemmer mikrobiell vekst og preserverer farge på maki sushi lagret ved 8 °C (Sørbø & Lerfall, 2022). Kombinasjonsteknologier med MAP og nisin/kitosan kan derfor være et sikkerhetstiltak mot temperaturmisbruk i kjølekjeden.



Figur 15 Vekst av *Listeria* i røykelaks pakket i A) luft, B) 100 % N<sub>2</sub>, C) 33 % CO<sub>2</sub>, D) 67 % CO<sub>2</sub>, og E) 100 % CO<sub>2</sub> ved 4 °C

### Oppsummering

Behandling med nisin og kitosan, både alene og i kombinasjon, har en hemmende effekt på vekst av *Listeria* i vakuumpakket og luftpakket røykelaks ved lagring på 4 °C. Pakking i CO<sub>2</sub> fra 33–100% hemmer veksten effektivt. Flere studier er nødvendig for å avdekke synergieffekter mellom MAP og nisin/kitosan.

## 4 Konklusjon

Resultatene viste at nisin og organiske syrer (Verdad) ga mellom 0,5 til 2 log-reduksjon av *Listeria*, og denne effekten kunne økes med kombinasjon av UV. Dette stemmer godt overens med resultatene fra FHF-prosjekt 901166. I tillegg ser vi at skylning i pH-justert vann (justert med eddiksyre til pH 2,6–2,9) fører til log-reduksjon i samme størrelsesorden på HOG-ørret og skinnsiden av laks, men er mer effektivt på kjøtt siden av laksefilet (- log 2,7). Koating med 1 % kitosan oppnår også ønsket effekt på HOG-ørret, og kan gi en tilleggseffekt ved kombinasjon med nisin. Nisin og kitosan har også en veksthemmende effekt på *Listeria* i røyst laks ved lagring på 4 °C, både i luft og vakuum. Pakking i modifisert atmosfære med CO<sub>2</sub> konsentrasjoner fra 33 % og oppover har også en svært god hemmende effekt. Metodene som er beskrevet i denne rapporten er å anse som metoder for å redusere det generelle smittetrykket i slakterier, prosesseringsanlegg og brønnbåter, og *ikke* som metoder for å dekontaminere laks som har fått påvist *Listeria*-smitte. Enkelte av metodene (eks. nisin og kitosan) er ikke lovlig å bruke i EU på nåværende tidspunkt. Det er derfor behov for å utrede disse nærmere i forhold til 'novel foods'-direktivet og søke om godkjenning før det tas i bruk. Det kan også stilles spørsmål omkring negative effekter i forhold til farge, tekstur og smak. Dette vil beskrives i senere rapporter.

I dagens regelverk, i EU og en rekke andre land, gjelder 'Listeria100'-regelen, det vil si at det må være færre enn 100 cfu *Listeria* per gram ved holdbarhetstidens utløp, eller ikke påvist mens produktet fortsatt er under kontroll hos den driftsansvarlige (for spiseklare produkter der *Listeria* kan vokse). Dette er basert på risikoanalyse, og det anses som at risikoen for å få listeriose er lav ved denne konsentrasjonen dersom man konsumerer moderate eller 'normale' kvantum av infisert mat, ikke spiser produktet etter siste holdbarhetsdato, og at produktet er lagret riktig. Denne lovgivingen er imidlertid vanskelig å håndheve. Delvis på grunn av at både 'ikke påvist' og 100 cfu/g impliserer en lav deteksjonsgrense, som kan være vanskelig å oppnå eller bestemmes nøyaktig med tilgjengelige metoder. Før en eventuell hurtigmetode for påvisning av *Listeria* er utviklet, og før vi vet mer om deteksjonsgrense og nøyaktighet for denne, er det derfor ikke mulig å anbefale noen av disse metodene til dekontaminering av laks med påvist *Listeria*. Metodene som gir signifikant reduksjon, kan imidlertid anbefales som generelle tiltak for å holde smittetrykket i produksjonslokaler nede. Andre lovmessige og etiske spørsmål ved å dekontaminere laks til humant konsum bør diskuteres dersom dette blir aktuelt, og før eventuelle hurtigmetoder kan tas i bruk.

I denne studien har vi forholdt oss til skånsomme metoder for ikke å påvirke sensoriske egenskaper i negativ grad siden produktene er ment til humant konsum. Alternativt kan laks som er kontaminert med *Listeria* prosesseres hardere og gå til for eksempel dyrefor eller andre produkter. Problemstillinger knyttet til dekontaminering av laks ved positive *Listeria* funn vil omtales i senere rapporter i prosjektet.



## 5 Referanser

- Agullo, E., Rodriguez, M.S., Ramos, V. & Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience*, **3**, 521–530.
- Albertos, I., Martin-Diana, A.B., Cullen, P.J., Tiwari, B.K., Ojha, S.K., Bourke, P., . . . Rico, D. (2017). Effects of dielectric barrier discharge (DBD) generated plasma on microbial reduction and quality parameters of fresh mackerel (*Scomber scombrus*) fillets. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **44**, 117-122. doi:10.1016/j.ifset.2017.07.006
- Arif, A. (In prep.). *Effect of nisin, chitosan, and modified atmosphere packaging (MAP) in hurdle technology for the preservation of cold smoked salmon*. (MSc Thesis).
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjöberg, A.M., Aarnisalo, K., Björkroth, J., . . . Korkeala, H. (1999). Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:1, 150–155.
- Bergis, H., Bonanno, L., Asséré, A., & Lombard, B. (2021). EURL *Lm* technical guidance document on challenge tests and durability studies for assessing shelf-life of ready-to-eat foods related to *Listeria monocytogenes*. *EU Reference Laboratory for Listeria monocytogenes Anses -Food Safety Laboratory, Maisons-Alfort, France*.
- Brackett, R.E. (1987). Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **50**:12, 999–1003.
- Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., de Miguel, T., Pascoal, A. & Barros-Velazquez, J. (2008). Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food and Bioprocess Technology*, **1**:1, 43–63.
- Chanioti, S., Giannoglou, M., Stegiou, P., Passaras, D., Kokkori, G., & Gpgolidis, E. (2022). *Application of semidirect and indirect cold atmospheric plasma treatment on gilthead sea bream fillets*. Paper presented at the EFFoST, Dublin, Ireland.
- EC. (2008). *Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives*. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32008R1333>
- ECDC. (2020). *Listeriosis; Annual Epidemiological Report for 2017*. Retrieved from Stockholm, Sweden: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/listeriosis-annual-epidemiological-report-2017.pdf>.
- Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhandbok. (2016). L1.9.1.6 Klor. In *Legemiddelhandboka*.
- George, S.M., Lund, B.M., & Brocklehurst, T.F. (1988). The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes* *Letters in Applied Microbiology*, **6**:6, 153–156. doi:<http://10.1111/j.1472-765X.1988.tb01237.x>
- Guohua, H., Wei, L., Hailin, F., Jian, L. & Yuanyuan, G. (2016). Effects of chitosan combined with nisin treatment on storage quality of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Food Chemistry*, **203**, 276–282. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.122>
- Hansen, C.H., Vogel, B.F. & Gram, L. (2006). Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in Danish aquatic and fish-processing environments. *Journal of Food Protection*, **69**:9, 2113–2122.
- Health Canada. (2017). *Health Canada's Proposal to Enable the Use of a New Food Additive, Nisin, as an Antimicrobial Preservative in or on Various Foods*. Retrieved from <https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/services/food-nutrition/public-involvement-partnerships/proposal-nisin-antimicrobial-preservative-eng.pdf>
- Heir, E., & Langsrud, S. (2014). Tiltak for økt kontroll med listeria i laksenæringen – Sluttrapport. Rapport 47/2014, Nofima, Ås.
- Heir, E., Liland, K.H., Carlehög, M. & Holck, A.L. (2019). Reduction and inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by Verdad N6, a buffered vinegar fermentate, and UV-C treatments. *International Journal of Food Microbiology*, **291**, 48–58. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.026>
- Holck, A., Liland, K.H., Carlehög, M. & Heir, E. (2018). Reductions of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked and raw salmon fillets by UV-C and pulsed UV light. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **50**, 1–10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.10.007>
- Klæboe, H., Lunestad, B.T., Borlaug, K., Paulauskas, A., & Rosef, O. (2010). Persistence and diversity of *Listeria monocytogenes* isolates in Norwegian processing plants. *Veterinarija Ir Zootechnika (Vet Med Zoot.)*, **50**:72, 42–47.
- Kulawik, P., & Tiwari, B.K. (2019). Recent advancements in the application of non-thermal plasma technology for the seafood industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **59**:19, 3199-3210. doi:<http://10.1080/10408398.2018.1510827>

- Lebow, N.K., DesRocher, L.D., Younce, F.L., Zhu, M.-J., Ross, C.F., & Smith, D.M. (2017). Influence of high-pressure processing at low temperature and nisin on *Listeria innocua* survival and sensory preference of dry-cured cold-smoked salmon. *Journal of Food Science*, doi:10.1111/1750-3841.13957
- Løvdal, T., Giske, L.A.L., Bjørlykhaug, E., Eri, I.B. & Mork, O.J. (2017). Hygienic standards and practices in Norwegian salmon processing plants. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, **20**, 3–11.
- Miks-Krajnik, M., Feng, L.X.J., Bang, W.S. & Yuk, H.G. (2017). Inactivation of *Listeria monocytogenes* and natural microbiota on raw salmon fillets using acidic electrolyzed water, ultraviolet light or/and ultrasounds. *Food Control*, **74**, 54–60. doi:10.1016/j.foodcont.2016.11.033
- Mota-Meira, M., La Pointe, G., Lacroix, C. & Lavoie, M.C. (2000). MICs of mutasin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**:1, 24–29.
- Nilsson, L., Huss, H.H. & Gram, L. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *International Journal of Food Microbiology*, **38**:2–3, 217–227.
- Ozaki, M.M., Munekata, P.E.S., Lopez, A., do Nascimento, M., Pateiro, M., Lorenzo, J.M. & Pollonio, M.A.R. (2020). Using chitosan and radish powder to improve stability of fermented cooked sausages. *Meat Science*, **167**:108165. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108165>
- Ozer, N.P., & Demirci, A. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment. *International Journal of Food Science and Technology*, **41**, 354–360. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01071.x>
- Restuccia, D., Spizzirri, U.G., Parisi, O.I., Cirillo, G., Curcio, M., Iemma, F., . . . Picci, N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*, **21**, 1425-1435. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.028>
- Rørvik, L.M., Caugant, D.A. & Yndestad, M. (1995). Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *International Journal of Food Microbiology*, **25**:1, 19–27. doi:10.1016/0168-1605(94)00080-p
- Rørvik, L.M., Skjerve, E., Knudsen, B.R. & Yndestad, M. (1997). Risk factors for contamination of smoked salmon with *Listeria monocytogenes* during processing. *International Journal of Food Microbiology*, **37**:2–3, 215–219. doi:10.1016/s0168-1605(97)00057-3
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K., & Rosnes, J.T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products - significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*, **37**:2, 107–127.
- Stopforth, J.D., Mai, T., Kottapalli, B. & Samadpour, M. (2007). Effect of acidified sodium chlorite, chlorine, and acidic electrolyzed water on *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* inoculated onto leafy greens. *Journal of Food Protection*, **71**:3, 625–628.
- Szabo, E.A., & Cahill, M.E. (1999). Nisin and ALTA (TM) 2341 inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon packaged under vacuum or 100 % CO<sub>2</sub>. *Letters in Applied Microbiology*, **28**:5, 373–377. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00547.x
- Sørnbø, S., & Lerfall, J. (2022). Effect of edible coating and modified atmosphere packaging on the microbiological and physicochemical stability of retail maki sushi. *Journal of Food Science*, **87**, 1211–1229. doi:<https://doi.org/10.1111/1750-3841.16065>
- Tosun, S.Y., Mol, S., Alakavuk, D.U., Ulusoy, S. & Dogruyol, H. (2022). Increasing the quality of cold-stored Atlantic Salmon (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) via single and combined use of natural preservatives: chitosan, nisin and garlic essential oil. *Journal of Food Safety and Food Quality-Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, **73**:3, 86–92. doi:10.2376/0003-925x-73-86
- U.S. Food and Drug Administration (1998). *Bacteriological analytical manual*, Association of Official Analytical Chemists. Retrieved from Washington D.C., USA: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>
- Vogel, B.F., Huss, H.H., Ojeniyi, B., Ahrens, P. & Gram, L. (2001). Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**:6, 2586–2595.
- Wulff, G., Gram, L., Ahrens, P. & Vogel, B.F. (2006). One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter- and smokehouses. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**:6, 4313–4322. doi:10.1128/aem.02288-05
- Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Filipic, M., . . . Nu. (2017). Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use. *EFSA Journal*, **15**:12. doi:10.2903/j.efsa.2017.5063

Young, K.M. & Foegeding, P.M. (1993). Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH. *Journal of Applied Bacteriology*, **74**:5, 515–520.