

OC2017 A-017 - Åpen

Rapport

Kjemisk konservering av restråstoff fra laks og pelagisk fisk

Sammendrag av resultatene fra forsøkene gjennomført i AP1 Referanseverdier og AP2 Kjemisk konservering i prosjektet 901054 Råstoffbehandling og kvalitet i marin ingrediensindustri - hovedprosjekt

Forfattere

Ana Carvajal

Halvor Nygaard



Foto: Nofima

Rapport

Kjemisk konservering av restråstoff fra laks og pelagisk fisk

Sammendrag av resultatene fra forsøkene gjennomført i AP1 Referanseverdier og AP2 Kjemisk konservering i prosjektet 901054 Råstoffbehandling og kvalitet i marin ingrediensindustri - hovedprosjekt

EMNEORD:

Restråstoff

Laks

Makrell

Sild

Kjemisk konservering

Kvalitet

VERSJON

2

FORFATTER(E)

Ana Carvajal og Halvor Nygaard

OPPDRAGSGIVER(E)

Fiskeri og havbruksnæringens forskningsfond - FHF

PROSJEKTNR

FHF 901054/ SFH 6021661

DATO

2017-01-10

OPPDRAGSGIVERS REF.

Lars Lovund

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:

65

SAMMENDRAG

I 2015 ble 889 500 tonn restråstoff generert fra norsk sjømatnæring, hvorav 76 % av råstoffet ble utnyttet. Marin ingrediensindustri har uttrykt behov og ønsker om å kunne øke andel produksjon av produkter til human anvendelse, øke og sikre kvaliteten på restråstoffet til forproduksjon, samt utvide tilgang til råstoff både når det kommer til geografi og spekter. For å oppnå dette er det behov for et betydelig kunnskapsløft innen restråstoffbehandling og hvordan råstoffkvaliteten skal ivaretas på en optimal måte under lagring og transport fram til videre prosessering.

Gjennom prosjektet *Råstoffbehandling og kvalitet for marin ingrediensindustri* (901054) har referanseverdier for restråstoff fra laks, makrell og sild som viser hva som er mulig å oppnå av kvalitet på råstoffet blitt satt. Det har blitt gjennomført lagringsforsøk med restråstoff fra laks og pelagisk fisk for å teste effekt av ulike næringsmiddelgodkjente konserveringsmidler. De mest effektive midlene ble testet ved ulike temperaturer, i ulike konsentrasjoner, enkeltvis og i kombinasjon. Effekt av oppmaling, hard fysisk behandling, frysing/tining og vanntilsetning på konserverte og ukonserverte råstoff ble også testet.

Eddiksyre og natriumsulfitt er effektive konserveringsmidler når det kommer til å hemme bakterievekst, redusere TVN og hemme dannelsen av biogene aminer i laks og pelagisk råstoff. Imidlertid har de minimal eller ingen effekt på å hemme dannelsen av frie fettsyrer. Kun reduksjon i lagringstid og lavere lagring/transporttemperatur reduserer FFA. Natriumsulfitt har god effekt som antioksidant, mens eddiksyre alene ofte fører til økt oksidasjon.

Bruk av en blanding av eddiksyre og sulfitt er en god strategi for å bevare kvaliteten på restråstoffet. Imidlertid er det behov for økt kunnskap om hvordan konserveringsmidlene kan påvirke produksjonsprosessen og ingredienser produsert fra råstoffet.

UTARBEIDET AV

Ana Carvajal og Halvor Nygaard

KONTROLLERT AV

Jannicke Remme

for

GODKJENT AV

Marit Aursand

SIGNATUR



SIGNATUR



SIGNATUR

**RAPPORTNR**

OC2017 A-017

ISBN

978-82-7174-269-0

GRADERING

Åpen

GRADERING DENNE SIDE

Åpen

Historikk

VERSJON	DATO	VERSJONSBESKRIVELSE
2	2017-01-10	Ferdig rapport
1	2016-11-30	Første versjon. Sendt til styringsgruppa for gjennomlesing og kommentarer.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	5
2	Referanseverdier (AP1)	7
2.1	Referanseverdier laks.....	8
2.2	Referanseverdier pelagisk.....	9
3	Kjemisk konservering av restråstoff fra laks (AP2)	10
3.1	Innmat – Sekkingstad AS, august 2011	10
3.1.1	Materialer og metoder	10
3.1.2	Resultater og konklusjon	12
3.2	Innmat – Sekkingstad AS, mars 2015.....	14
3.2.1	Materialer og metoder	14
3.2.2	Resultater og konklusjon	15
3.3	Innmat – Sekkingstad AS, mai 2015	16
3.3.1	Materialer og metoder	16
3.3.2	Resultater og konklusjon	16
3.4	Innmat – Salmar, juli 2015	20
3.4.1	Materialer og metoder	20
3.4.2	Resultater og konklusjon	22
4	Kjemisk konservering av restråstoff fra sild og makrell (AP2)	26
4.1	Samfengt avskjær fra NVG sild, Fosnavåg Pelagic AS, februar 2014	26
4.1.1	Materialer og metoder	26
4.1.2	Resultater og konklusjon	27
4.2	Samfengt avskjær fra NVG sild, Grøntvedt Pelagic, februar 2016.....	29
4.2.1	Materialer og metoder	29
4.2.2	Resultater og konklusjon	30
4.3	Samfengt avskjær fra Nordsjøsild, Pelagia Austevoll AS, juni 2016.....	37
4.3.1	Materialer og metoder	37
4.3.2	Resultater og konklusjon	38
4.4	Hel makrell – Pelagia Austevoll, august 2015	41
4.4.1	Materialer og metoder	41
4.4.2	Resultater og konklusjon	42
4.5	Hel makrell fersk – Pelagia Austevoll, september 2015	44
4.5.1	Materialer og metoder	44
4.5.2	Resultater og konklusjon	45
4.6	Hel makrell fryst – Pelagia Austevoll, september 2016	51

4.6.1	Materialer og metoder	51
4.6.2	Resultater og konklusjon	52
5	Diverse forsøk	61
5.1	Sulfittrester i ferdigprodukter	61
5.1.1	Bakgrunn	61
5.1.2	Resultater og konklusjon	61
5.2	Molekylærbiologiske undersøkelser av bakterieflora	63
5.2.1	Bakgrunn	63
5.2.2	Materialer og metoder	63
5.2.3	Resultater og konklusjon	64

1 Innledning

I 2015 var andel restråstoff fra norsk *sjømatnæring* om lag 26 % av råstoffgrunnlaget og utgjorde 889 500 tonn. Restråstoffet representerer dermed et **stort verdiskapingspotensial for næringen**. Pelagisk- og havbrukssektoren utnytter i dag tilnærmet 100 % av tilgjengelig restråstoff, mens hvitfisksektoren utnytter omlag 48 %. Sjømatnæringen ønsker å øke restråstoffets bidrag til økt lønnsomhet for næringen gjennom:

- utvidet anvendelse og markedsmulighetene for restråstoff de besitter
- egenproduksjon av nye produkt fra eget restråstoff

Restråstoff fra sjømatnæringen går i dag hovedsakelig til norsk *marin ingrediensindustri* for produksjon av proteinprodukter og oljer. Om lag 9 % av restråstoffet selges som konsum- og sjømatprodukter [1]. Marin ingrediensindustri er mangfoldig og omfatter industri som anvender marine råstoffer til produksjon av marine ingredienser til fôr, næringsmidler, helsekost, farmasi eller kosmetikk. De omsetter for ca. 8 mrd. NOK og om lag 1/3 av råstoffet ingrediensindustrien baserer seg på kommer fra restråstoff fra sjømatnæringen [1].

Marin ingrediensindustri har uttrykt behov og ønsker om:

- økt andel produksjon av produkter til human anvendelse
- økt og sikrere kvalitet av restråstoff til fôrproduksjon
- utvidet tilgang til råstoff, både geografisk og kvantumsmessig
- utvidet spekter av råstofftype

Prosjektet *Råstoffbehandling og kvalitet for marin ingrediensindustri – hovedprosjekt* har hatt fokus på økt kunnskap innen restråstoffbehandling og hvordan kvaliteten skal ivaretas på en optimal måte under lagring og transport. Denne rapporten gir et sammendrag av forsøkene som er gjennomført i arbeidspakkene: Referanseverdier for kvalitet og dagens logistikk-løsninger (AP1) og Råstoffhåndtering og kjemisk konservering (AP2).

Riktig kvalitet av restråstoff vil tilsvare en kvalitet som er god nok til at restråstoffet kan anvendes i næringsmidler (human anvendelse) og/eller til fôr. Grunnleggende (minimums) kvalitetskriterier for restråstoff er definert på bakgrunn av kvalitetsregelverk, hygieneregulering og forskrifter for tilsetningsstoffer til næringsmidler. Disse kvalitetskriteriene er beskrevet i forprosjektrapporten¹.

Det er ønskelig å oppnå kjøle- og behandlingsmetoder som gir lavest hastighet av kvalitetsdegraderende prosesser. Fastsetting av referanseverdier for kvalitet er derfor nødvendig og analyser er gjennomført på restråstoff fra laks (innmat eller hoder og rygger), makrell og sild (norsk vårgytende sild og nordsjøsild). Resultatene er presentert i kapittel 3.

¹ FHF prosjekt (nr 900949) *Råstoffbehandling og –kvalitet for marin ingrediensindustri: Forprosjekt*

2 Analysemetoder

Analysemetodene som er benyttet i forsøkene i AP1 og AP2 er gitt under:

Mikrobiologi:

Anaerobe sulfittreduserende bakterier dyrket ved 37 °C og kimtall ved 30 °C er standardmetoder for kvantifisering av hhv anaerob og aerobe bakterier i næringsmidler.

Kimtall på Jern-agar er en metode utviklet spesielt for deteksjon av aerobe bakterier og spesifikke bedervingsbakterier i kjølt og aerobt lagret fisk, f.eks. *Shewanella* spp.

Kimtall på Long & Hammer agar ved 15 °C brukes til bestemmelse av aerobe bakterier i fisk og inkluderer kuldetolerante og varmfølsomme bakterier, spesielt *Photobacterium phosphoreum* som er CO₂ resistent og ofte dominerende i kjølt, CO₂ pakket fisk.

MiSeq er en DNA sekvensieringsteknologi som anvendes på bakterie-DNA ekstrahert fra komplekse prøver som f.eks. næringsmidler. MiSeq skiller ikke mellom levende og døde bakterier eller mellom dyrkbare og ikke-dyrkbare bakterier.

Total flyktig nitrogen (TVN), trimetylamin (TMA) og trimetylaminoksid (TMAO):

TVN, TMA, TMAO er målt etter Conway's mikrodifusjonsmetode (Intern metode ved Nofima)

Biogene aminer:

Putrecin, cadavarin og histamin er analysert på LC-MS ved bruk av en intern metode ved Nofima basert på IFOMA.

Frie fettsyrer (FFA):

FFA er målt enten ved bruk av AOCS-metoden Ca 5A-40 eller mikrometoden til Bernardez et al [2].

Oksidasjonsstatus:

Oksidasjonsstatus til restråstoffet og oljene er analysert ved metodene peroksidverdi (AOCS Cd 8b-90 [3]) og anisidinverdi (AOCS Cd 18-90 [3]). Total oksidasjon (TOTOX) er beregnet ved bruk av formelen $TOTOX = 2PV + AV$.

Hydrolysegrad:

Hydrolysegrad ble analysert ved formoltitrering etter metoden til Taylor et al.[4].

Molekylvektfordeling:

Molekylvektfordeling ble analysert etter metoden beskrevet av Wang-Andersen og Haugsgjerd [5].

3 Referanseverdier (AP1)

Riktig kvalitet av restråstoff vil tilsvare en kvalitet som er god nok til at restråstoffet kan anvendes i næringsmidler (human anvendelse) og/eller til fôr. Grunnleggende (minimums) kvalitetskriterier for restråstoff er definert på bakgrunn av kvalitetsregelverk, hygieneregulering og forskrifter for tilsetningsstoffer til næringsmidler. Disse kvalitetskriteriene er beskrevet i forprosjektrapporten².

Det er ønskelig å oppnå kjøle- og behandlingsmetoder som gir lavest hastighet av kvalitetsdegraderende prosesser. Fastsetting av referanseverdier for kvalitet er derfor nødvendig og analyser er gjennomført på restråstoff fra laks (innmat eller hoder og rygger), makrell og sild (norsk vårgytende sild og nordsjøsil). Analysene viser sammensetning og kvalitet av ferskt restråstoff, rett fra slakteri for oppdrettsfisk og foredlingsanlegg for villfanget fisk. Verdiene gjenspeiler råstoffets beste kvalitet. Målet er å oppnå de samme verdiene gjennom blant annet kjemisk konservering. Analysene skulle også vise variasjonene i sammensetning som funksjon av årstid.

Prøvene ble i de fleste tilfeller malt opp på slakteri eller foredlingsanlegg, vakuumpakket på stedet og frosset inn på tørris. Prøver som kunne bringes til Nofimas laboratorium innen 2 timer etter uttak ble fraktet på is og malt opp, vakuumpakket og frosset inn på laboratoriet.

Når det gjelder referanseverdier for NVG-sild er det benyttet verdier fra pilotforsøket gjennomført på helt ferskt restråstoff (< 1 time etter filetering) ved bruk av SINTEF Mobile produksjonsanlegg [6, 7]

² FHF prosjekt (nr 900949) *Råstoffbehandling og –kvalitet for marin ingrediensindustri: Forprosjekt*

3.1 Referanseverdier laks

Tabell 1: Referanseverdier restråstoff fra laks

		Innmat Sekkingstad 16.02.2015	Innmat Sekkingstad 19.03.2015	Innmat Sekkingstad 14.04.2015	Innmat Sekkingstad 06.05.2015	Innmat Bremnes 23.05.2015	Innmat Bremnes 06.10.2016	Hode/rygg Sekkingstad 16.02.2015	Hode/rygg Bremnes 23.05.2015
Totalt tørrstoff	%	52,2	49,1	52,9	57,4	53,0		36,5	39,2
Protein Kjeldahl (N*6,25)	%	10,4	9,4	9,9	8,0	10,9		15,8	14,5
Fett Bligh & Dyer	%	35,8	36,7	41,0	44,4	39,9		17,8	22,7
Aske	%	0,9	0,8	0,8	0,9	0,9		4,9	4,4
TVN	mg N/100 g	6,7	13,0	16,0	7,7	17,0	7,0	6,9	6,0
TMA	mg N/100 g	<1	<1			<1	<1	3,5	<1
TMAO	mg N/100 g	<1	<1			<1	<1	<1	<1
Putrecin	mg/kg						15,8		
Cadaverin	mg/kg						<2		
Histamin	mg/kg						<2		
Hypoxanthin	mg/kg	88				267		226	251
IMP	mg/kg	<10				<10		292	225
Inosin	mg/kg	156				362		355	301
AMP	mg/kg	<10				<10		<10	<10
ADP	mg/kg	<10				77		62	55
ATP	mg/kg	<10				<10		<10	<10
Nukleotider K-verdi		95				95		75	79
Hydrolysegrad (OPA)	%	35,3				35,8		11,8	11,4
Vannløselig råprotein	%	3,6				4,3		3,2	2,8
FFA i utsentrifugert olje	%		1,3		1,1	2,1	1,1		0,4
PV i utsentrifugert olje	meq/kg		<1		0,7	<1	<1		<1
AV i utsentrifugert olje			<1		0,1	<1	1,8		<1
Kimtall (Long & Hammer)	KDE/g	650	-	-	7200	-	-	9100	-
Kimtall (Jern-agar)	KDE/g	230	-	-	5000	-	-	7700	-
Kimtall (3M Petrifilm)	KDE/g	-	-	-		5000	-	-	72000
Melkesyrebakterier (MRS)		-	-	-	<10	-	-	-	-

3.2 Referanseverdier pelagisk

Tabell 2: Referanseverdier restråstoff fra makrell og sild

		Makrell Hel	Makrell H/R/I	Nordsjøsild samfengt	NVG sild samfengt *	
		Pelagia Austevoll, 26.08.15	Pelagia Austevoll, 26.08.15	Pelagia Austevoll, 07.06.2016	Grøntvedt Pelagic November/Desember 2010 ^[6]	Grøntvedt Pelagic Januar 2013 ^[7]
Totalt tørrstoff	%	36,1	31,9	32,7	29,3 ± 0,9	30,0 ± 0,4
Protein (N*6,25)	%	17,3	15,1	14,0	13,5 ± 0,6	15,1 ± 0,6
Fett	%	16,2	12,8	15,0	12,3 ± 0,3	12,2 ± 0,4
Aske	%	2,3	3,5	4,1	3,3 ± 0,2	2,5 ± 0,2
TVN	mg N/100 g	12	13	9		
TMA	mg N/100 g	<1	<1	<1		
TMAO	mg N/100 g	10	10	16		
Putrecin	mg/kg	5	8	18		
Cadaverin	mg/kg	4	11	31		
Histamin	mg/kg	3	5	11		
Hypoxanthin	mg/kg	401	514			
IMP	mg/kg	1209	490			
Inosin	mg/kg	498	418			
AMP	mg/kg	33	40			
ADP	mg/kg	110	77			
ATP	mg/kg	<10	<10			
Nukleotider K-verdi		56	76			
Hydrolysegrad (OPA)	%	17,5	17,0	20,8		
Vannløselig råprotein	%	3,2	3,8	29,4		
FFA	%	0,4		1,3	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,01
PV	meq/kg	<1		3,7	2,5 ± 0,4	2,6 ± 0,3
AV		<1		1,7	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1
Kimtall (Long & Hammer)	KDE/g	4300000	6000000	-		
Kimtall (Jern-agar)	KDE/g	270000	760000	-		
Kimtall (3M Petrifilm)	KDE/g	-	-	-		
Melkesyrebakterier (MRS)		200	1500	-		

* Oljen er produsert fra helt fersk restråstoff i pilot skala ved bruk av SINTEFs mobile produksjonsanlegg

4 Kjemisk konservering av restråstoff fra laks (AP2)

Det ble gjennomført lagringsforsøk med restråstoff fra laks og pelagisk fisk for å teste effekt av ulike næringsmiddelgodkjente konserveringsmidler. De mest effektive midlene ble testet ved ulike temperaturer, i ulike konsentrasjoner, enkeltvis og i kombinasjon. En testet også effekt av oppmaling, hard fysisk behandling, frysing/tining og vanntilsetning på konservert og ukonservert råstoff.

Forskrift om tilsetningsstoffer til næringsmidler (FOR-2011-06-06-668) regulerer både tilsetning av konserveringsmidler i næringsmidler og bruken av tekniske hjelpestoffer i produksjonsprosessen.

Tilsetningsstoffene som benyttes skal stå i en liste (vedlegg II til forskriften) over godkjente stoffer som kan brukes i en mengde som ikke er større enn nødvendig (quantum satis) eller under de grenseverdier som forskriften angir for ulike produktkategorier.

Tekniske hjelpestoffer kan være godkjente tilsetningsstoffer eller ethvert annet stoff som brukes med hensikt å oppfylle bestemte tekniske formål under prosesseringen og der det ikke etterlates restmengder som er helseskadelige eller virker teknisk inn på det ferdige produktet.

Av testede tilsetningsstoffer som kan tilsettes quantum satis er eddiksyre, HCl og CO₂-gass. Vitalox er en syntetisk antioksidant som er godkjent for petfood. Na-metabisulfitt (E223) er et godkjent konserveringsmiddel som er tillatt brukt i visse nærmere angitte produktkategorier. Rå fisk eller restråstoff fra foredling av slikt er imidlertid ikke listet og stoffet kan derfor ikke brukes med mindre det forsvinner under prosessering og kan betraktes som et teknisk hjelpestoff.

4.1 Innmat – Sekkingstad AS, august 2011

Restråstoff: Laks, innmat direkte fra slaktelinje
Forsøk: Laboratorieforsøk
Forsøksvariable: Eddiksyre, CO₂, Na-metabisulfitt/HCl, komm. maursyrebasert middel, temperatur
Måleparametre: Holdbarhet/kvalitet

Forsøket ble utført som et oppdrag for Biomega AS i august 2011. Biomega hadde en tid benyttet et kommersielt maursyrebasert konserveringsmiddel men hadde behov for å finne et alternativt middel som var forenlige med anvendelse av produktene til næringsmidler. I forbindelse med oppstart av FHF prosjekt 901054 der Biomega var en av initiativtakerne, stilte bedriften resultatene fra oppdraget til disposisjon for prosjektet.

4.1.1 Materialer og metoder

Råstoff

Fersk innmat fra laks ble hentet direkte fra slaktelinjen hos Sekkingstad AS den 18.08 2011. Innmaten ble pakket i plastsekker og fraktet iskjølt til Nofima der råstoffet ble malt opp på kjøttkvern (hullskive 8 mm) innen ca 1 time.

Forsøksoppsett

Porsjoner à 2,1 kg oppmalt innmat ble tilsatt konserveringsmidler som vist i Tabell 3 og delt i tre for inkubering ved hhv 0, 4 og 8 °C. Et kommersielt maursyrebasert middel (KMM) ble brukt som referanse. Lagringen ble stoppet og prøvene analysert etter 4 dager.

Tabell 3: Konservering av oppmalt innmat fra laks. Prøvene ble inkubert ved 0, 4 og 8 °C i 4 dager.

PRØVE	Tid (dg)	Temp. °C	Kons.	Innmat gram	Eddik 30 %	CO ₂ 99,9 %	HCl 10 %	Sulfitt 30 %	Komm. produkt
Start	0			700					
Ukonserverert	4	0, 4, 8		2100					
Eddiksyre	4	0, 4, 8	0,1 %	2100	7,0 ml				
Eddiksyre	4	0, 4, 8	0,2 %	2100	14,0 ml				
Eddiksyre	4	0, 4, 8	0,3 %	2100	21,0 ml				
CO ₂	4	0, 4, 8	Mettet	2100		Mettet			
HCl + Na metabisulfitt	4	0, 4, 8	0,1 %	2100			14,7 ml	7,0 ml	
HCl + Na metabisulfitt	4	0, 4, 8	0,2 %	2100			14,7 ml	14,0 ml	
HCl + Na metabisulfitt	4	0, 4, 8	0,3 %	2100			14,7 ml	21,0 ml	
KMM	4	8	0,3 %	2100					2,1 ml

Det ble tatt ut prøver til bakteriologisk analyse og til utsentrifugering av olje for fettanalyser. Oljeprøvene ble flushet med N₂ gass og fryselagret ved -30 °C før analyse. Separate prøver til analyse av TVN ble vakuumpakket og oppbevart ved -30 °C før analyse.

Analysemetoder

Kimtall 3M Petrifilm, 30 °C (Afnor 3M 1/1-9/89). Anaerobe sulfittreduserende bakterier, 37 °C (ISO 15213, Sulfite reducing bacteria growing under anaerobic conditions), Melkesyrebakterier på MRS Agar, 22,5 °C (ISO 15214, Mesophilic lactic acid bacteria). TVN, TMA, TMAO etter Conway's mikrodifusjonsmetode (Intern metode). FFA (AOAC Ca 5A-40), Peroksid-tall (AOAC Cd 8b-90), Anisidin-tall (AOAC Cd 18-90).

4.1.2 Resultater og konklusjon

Tabell 4: Resultater av kjemiske og bakteriologiske analyser. FFA, AV og PV ble analysert i utsentrifugert olje. Mikrobiologiske verdier er gitt i eksponensiell form (Eksempel $3,9E3 = 3900$)

	Tid (dg)	Temp °C	Kons %	pH start	pH	TVN	Kim	Ana	MS	FFA	AV	PV
0 Start	0				6,5	11	1,1 E6	2,0 E5	3,9 E5	4,3	<0,5	<1,0
1 Ukonservert	4	0		6,5	6,1	26	7,0 E6	2,8 E5	5,7 E6	8,2	1,1	1,7
2	4	4			6,3	60	4,4 E7	4,0 E5	1,9 E7	9,2	1,8	1,5
3	4	8			6,5	182	1,3 E8	4,2 E6	7,0 E7	11,2	2,1	1,7
4 Eddik	4	0	0,1	5,4	5,7	21	7,7 E5	7,5 E4	<1,0 E5	7,6	2,4	1,7
5	4	4	0,1		5,6	29	1,1 E6	1,3 E5	6,0 E5	8,4	2,9	2,1
6	4	8	0,1		5,6	39	5,5 E7	2,3 E5	1,6 E8	9,9	3,1	2,5
7 Eddik	4	0	0,2	5,2	5,3	20	3,1 E5	<1,0 E4	<1,0 E5	6,6	4,8	1,9
8	4	4	0,2		5,3	25	5,1 E5	6,0 E4	<1,0 E5	7,3	5,3	2,1
9	4	8	0,2		5,3	33	7,0 E5	7,0 E4	6,0 E5	8,8	6,4	1,9
10 Eddik	4	0	0,3	4,9	5,1	21	2,7 E5	<1,0 E4	<1,0 E5	6,1	5,5	2,1
11	4	4	0,3		5,1	23	4,2 E5	<1,0 E4	<1,0 E5	6,9	6,6	1,4
12	4	8	0,3		5,1	30	3,0 E5	<1,0 E4	<1,0 E5	8,3	9,2	1,7
13 CO ₂	4	0	Sat.	6,5	6,0	30	3,6 E6	3,2 E5	2,1 E6	7,8	0,6	2,1
14	4	4	Sat.		6,2	51	2,5 E7	2,9 E5	2,4 E6	9,1	0,5	2,0
15	4	8	Sat.		6,4	124	6,7 E7	1,1 E6	5,6 E7	10,0	0,7	1,7
16 HCl+sulfitt	4	0	0,1	5,5	5,5	19	4,4 E5	<1,0 E4	<1,0 E5	4,9	<0,5	1,4
17	4	4	0,1		5,5	24	3,4 E5	1,5 E4	<1,0 E5	5,3	1,0	2,1
18	4	8	0,1		5,5	29	6,4 E5	5,5 E4	2,0 E5	6,0	1,1	2,2
19 HCl+sulfitt	4	0	0,2	5,4	5,5	17	3,3 E5	5,0 E4	<1,0 E5	4,6	<0,5	<1,0
20	4	4	0,2		5,5	22	2,7 E5	2,5 E4	<1,0 E5	4,9	0,6	1,7
21	4	8	0,2		5,5	28	5,2 E5	<1,0 E4	<1,0 E5	5,3	1,2	2,2
22 HCl+sulfitt	4	0	0,3	5,4	5,5	18	3,8 E5	1,0 E4	<1,0 E5	4,4	<0,5	<1,0
23	4	4	0,3		5,5	21	2,7 E5	<1,0 E4	<1,0 E5	4,6	<0,5	1,3
24	4	8	0,3		5,5	26	4,4 E5	<1,0 E4	<1,0 E5	4,8	0,8	3,1
25 KMM	4	8	0,3	4,9	5,3	29	3,6 E5	<1,0 E4	<1,0 E5	7,9	5,4	3,1

Eddiksyre

Eddiksyre (0,2 og 0,3 %) ga god konserveringseffekt, tilsvarende 0,3 % KMM, som var i rutinemessig bruk på denne tiden. Eddiksyre hadde imidlertid negativ effekt på Totox og ga en mørkfarging av oljen på samme måte som KMM. Dersom eddik skal brukes til konservering av innmat, bør det kombineres med en antioksidant.

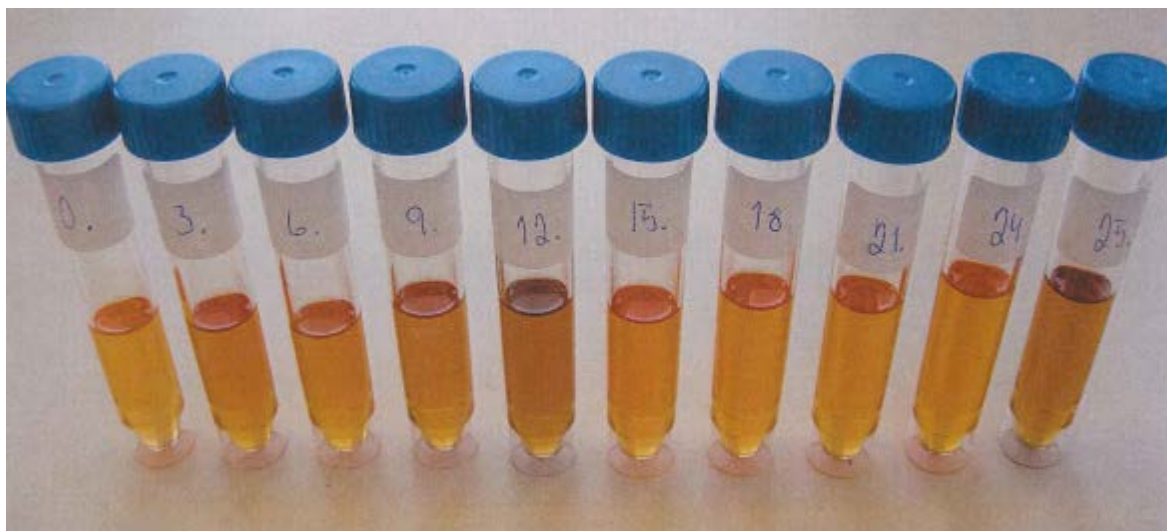
Karbondioksid

Karbondioksid ga ingen konserveringseffekt på innmat men beskyttet oljen mot oksidasjon og misfarging. Det bør prøves om karbondioksid kan brukes som antioksidant i kombinasjon med eddiksyre.

HCl/Na-metabisulfitt

HCl/Na-metabisulfitt ga klart best resultat både med hensyn på konservering og bevaring av oljekvalitet. Dette middelet ga heller ingen mørkfarging av oljen. Na-metabisulfitt er et godkjent tilsetningsstoff i næringsmidler men det stilles krav til bruksmåte og godkjenning dersom det finnes restkonsentrasjon av

stoffet i ferdigproduktene. Det bør prøves om Na-metabisulfit kan brukes i kombinasjon med eddiksyre og om sulfitten drives av ved prosessering av råstoffet.



0. Startprøve
 3. Ukonservert, 8C
 6. Eddik, 0,1%, 8C
 9. Eddik, 0,2%, 8C
 12. Eddik, 0,3%, 8C
 15. CO₂, 8C
 18. Sulfit, 0,1%, 8C
 21. Sulfit, 0,2%, 8C
 24. Sulfit, 0,3%, 8C
 25. KMM, 0,3%, 8C

Figur 1: Utsentrifugert olje fra ukonservert og konservert innmat fra laks etter 4 dager lagring ved 8 °C. Bildet viser at økende eddikdosering gir økende mørkfarging av oljen. 0,3 % eddik gir omtrent samme misfarging som 0,3 % av det kommersielle maursyrebaserte middelet (KMM). Sulfit/HCl gir lys olje.

4.2 Innmat – Sekkingstad AS, mars 2015

Restråstoff: Laks, innmat direkte fra slaktelinje

Forsøk: Laboratorieforsøk

Forsøksvariable: HCl, Na-metabisulfitt

Måleparametre: Holdbarhet/kvalitet

4.2.1 Materialer og metoder

Råstoff

Innmat fra 6 laks ble hentet ut fra slaktelinjen hos Sekkingstad AS på Sotra 19.03 2015. Innmaten var pakket i plastsekk og ble transportert til Nofima i fiskekasse med is. Innmaten ble deretter malt i kjøttkvern (hullskive 8 mm) og blandet med 10 % vann.

Forsøksoppsett

Porsjoner à 600 g ble pH justert til 5,2, 5,7 og 6,1 vha 10 % HCl. Etter blanding ble porsjonene delt i tre og tilsatt 0,1 % og 0,2 % Na-metabisulfitt. Til den tredje porsjonen ble det ikke tilsatt Na-metabisulfitt. Prøvene ble lagret ved 5 °C i 4 døgn. Etter avsluttet lagring ble prøver vakuumpakket og frosset ned til analyse av TVN. Oljeprøver til analyse av FFA, PV og AV ble utvunnet ved oppvarming til 80 °C og sentrifugering 11.000G/20 min.

Tabell 5: Konservering av oppmalt innmat fra laks. Forsøksoppsett. pH ble stilt inn ved forsøksstart og justert etter 1 døgn. Prøvene ble inkubert ved 5 °C i 4 døgn

Råstoff	pH (justert m. 10 % HCl)	(30 %) Na-metabisulfitt
200 g	5,2	-
200 g	5,2	0,67 ml
200 g	5,2	1,33 ml
200 g	5,7	-
200 g	5,7	0,67 ml
200 g	5,7	1,33 ml
200 g	6,1	-
200 g	6,1	0,67 ml
200 g	6,1	1,33 ml

Analysemetoder

TVN, TMA, TMAO etter Conway's mikrodifusjonsmetode (Intern metode), FFA (AOAC Ca 5A-40), Peroksid-tall (AOAC Cd 8b-90), Anisidin-tall (AOAC Cd 18-90).

4.2.2 Resultater

Innmaten som ble brukt i forsøket hadde i utgangspunktet TVN: 13 mg N/100g, TMA: <1 mg N/100g og TMAO: <1 mg N/100g. FFA: 1,3 %, PV: 0,5 meq peroksid/kg fett, AV: <0,1.

Analysene etter 4 dager lagring ved 5 °C viser at pH senkning alene med HCl til 6,1, 5,7 eller 5,2 har liten effekt på råstoffets ferskhets (TVN) og på oljens FFA, men en klar negativ effekt på oljens oksidasjonsnivå. Det siste skyldes trolig jern- eller hemoglobinmediert oksidasjon som har lavt pH optimum.

Sulfitt-tilsetning har en viss konserverende effekt (TVN), særlig ved lavere pH. Sulfitt har også positiv effekt på FFA utviklingen, særlig ved høyeste sulfittkonsentrasjon. Hele den negative effekten av lav pH på oksidasjonsnivå oppheves av sulfitt, ved begge de brukte konsentrasjonene (0,1 eller 0,2 %).

Tabell 6: Kjemiske analyser etter 4 dager lagring av oppmalt innmat fra laks. TVN ble målt direkte i innmat-prøvene, mens øvrige analyser ble gjort i utsentrifugert olje.

pH	Na metabisulfitt %	TVN mg N/100g	FFA %	PV mEkv/kg	AV	TOTOX
5,2	-	50	5,4	6,4	5,4	17,8
5,2	0,1	31	4,3	1,5	0,6	3,6
5,2	0,2	30	3,2	0,9	0,5	2,3
5,7	-	56	5,3	3,8	2,1	9,7
5,7	0,1	35	3,7	1,9	0,5	4,3
5,7	0,2	35	2,8	1,8	0,4	4,0
6,1	-	41	6,5	0,6	0,2	1,4
6,1	0,1	43	4,0	1,4	0,3	3,1
6,1	0,2	41	2,7	1,3	0,4	3,0

Konklusjon:

Sulfitt alene eller i kombinasjon med HCl gir ikke tilfredsstillende holdbarhetsøkning. Sulfitt gir god oksidasjonsbeskyttelse og opphever den negative effekten av lav pH.

4.3 Innmat – Sekkingstad AS, mai 2015

Restråstoff: Laks, innmat direkte fra slaktelinje
Forsøk: Laboratorieforsøk
Forsøksvariable: Eddiksyre, Na-metabisulfitt, Vitalox, CO₂, temperatur
Måleparametre: Holdbarhet/kvalitet

4.3.1 Materialer og metoder

Råstoff

Innmat fra ca 20 laks (8,5 kg) ble uttatt direkte fra slaktelinjen hos Sekkingstad AS den 6. mai 2015. Innmaten ble pakket i plastsekker og fraktet til Nofima i isoporkasser med is. Innmaten ble malt på kjøttkvern (hullskive 8 mm). Prøve ble tatt ut til analyser av startnivå før resten ble fortynnet med vann (10,3 %).

Forsøksoppsett

Porsjoner på 1,5 kg råstoff ble blandet med konserveringsmidler og deretter fordelt på tre beholdere til inkubering ved tre ulike temperaturer. Vitalox ble først blandet med 150 g råstoff og homogenisert før innblanding med resten av porsjonen. CO₂ ble tilsatt direkte i beholderne. Det ble benyttet tre kjøleinkubatorer stilt inn på 4, 8 og 12 °C.

Tabell 7: Innblanding av konserveringsmidler i råstoff (innmat tilsatt 115 ml vann pr 1000 g innmat). Hver porsjon ble delt på tre og inkubert ved 4, 8 og 12 °C i 5 døgn

Variant	Råstoff	Eddik (30%)	Na ₂ O ₅ S ₂ (30%)	Vitalox NA-B	CO ₂ gass
Ukonservert	1500 g				
Na-disulfitt (0,1 %)	1500 g		5 ml		
Eddik (0,3 %)	1500 g	15 ml			
Eddik (0,3 %) + Na-disulfitt (0,1 %)	1500 g	15 ml	5 ml		
Eddik (0,3 %) + Vitalox (1000 ppm)	1500 g	15 ml		1,5 ml	
Eddik (0,3 %) + CO ₂	1500 g	15 ml			Flushing

Inkuberingen ble stoppet etter 5 døgn. Prøver à ca 100 g ble tatt ut til TVN-analyse og bakteriologiske analyser som ble satt opp direkte. Prøver à ca 320 g til FFA, PV og AV analyser ble inkubert i vannbad ved 65 °C i 20 min og deretter sentrifugert ved 10.000G i 10 min før uttak av ren olje. Oljeprøvene ble flusket med N₂ gass og frosset ned ved -30 °C før analyse.

Analysemetoder

Kimtall på Jern Agar, 22,5 °C (NMKL 184, Aerobic counts and specific spoilage organisms in fish and fish products). Kimtall på Long & Hammer Agar, 15 °C (NMKL 184, Aerobic counts and specific spoilage organisms in fish and fish products). Melkesyrebakterier på MRS Agar, 22,5 °C (ISO 15214, Mesophilic lactic acid bacteria). TVN, TMA, TMAO etter Conway's mikrodifusjonsmetode (Intern metode). FFA (AOAC Ca 5A-40), Peroksid-tall (AOAC Cd 8b-90), Anisidin-tall (AOAC Cd 18-90).

4.3.2 Resultater

Tabell 8: Analyser i oppmalt uforynnet innmat fra laks og i startprøve av råstoff (fortynnet innmat) til konserveringsforsøket

Analyse	Enhet	Innmat	Innmat, fortynnet (Startprøve)
TS	%	57,4	
Protein	%	8,0	
Aske	%	0,9	
Fett (Etylacetat-ekstrakt)	%	44,4	
TVN	mg N/100 g		7
FFA (utsentrifugert olje)	%		1,0
PV (utsentrifugert olje)	meq peroksid/kg		0,6
AV (utsentrifugert olje)			0,1
Totox (2xPV+AV)			1,3
Kimtall Jern-agar	CFU/gram		4.500
Kimtall L&H agar	CFU/gram		6.500
Melkesyrebakterier	CFU/gram		<10

Analyseresultatene i Tabell 8 bekrefter at råstoffet som ble brukt i forsøket var svært ferskt og hadde et lavt bakterieinnhold.

Tabell 9: Kjemiske analyser i råstoff etter lagring 5 dager. FFA, PV og AV ble analysert i utsentrifugert olje. TOTOX ble beregnet som 2PV + AV.

Konservering	Temp (°C)	TVN mgN/100g	FFA %	PV meq p/kg	AV	TOTOX	pH
Ukonserverert	4	65	7,4	1,8	0,2	3,8	6,38
	8	103	9,6	1,3	0,6	3,2	6,62
	12	158	10,3	0,9	0,8	2,6	6,67
Sulfitt (0,1 %)	4	30	5,0	<0,1	0,7	0,7	6,30
	8	41	6,1	0,4	<0,1	0,8	6,39
	12	55	7,0	0,5	<0,1	1,0	6,52
Eddik (0,3 %)	4	19	6,5	1,7	3,7	7,1	5,14
	8	24	8,7	1,7	4,7	8,1	5,08
	12	27	10,1	1,1	5,4	7,6	5,12
Eddik (0,3 %) +Sulfitt (0,1 %)	4	17	2,8	0,3	<0,1	0,6	5,06
	8	21	3,6	1,2	0,3	2,7	5,06
	12	26	4,5	1,5	0,4	3,4	5,10
Eddik (0,3 %) +Vitalox (1000 ppm)	4	21	7,9	1,0	4,1	6,1	5,08
	8	25	9,9	0,7	4,6	6,0	5,06
	12	26	11,5	0,6	5,2	6,4	5,09
Eddik (0,3 %) +CO ₂ (flush)	4	19	5,7	1,0	3,1	5,1	5,05
	8	27	7,5	1,3	3,0	5,6	5,13
	12	29	9,0	0,8	2,6	4,2	5,10

Tabell 10: Bakteriologiske analyser i råstoff etter lagring 5 dager. Alle resultater er oppgitt som (CFU/gram)

Konservering	Temp (°C)	Kimtall		Melkesyrebakt MRS-agar/22,5°C
		L&H-agar/15°C	Jern-agar/22,5°C	
Ukonservert	4	190.000.000	2.200.000	1.400
	8	63.000.000	900.000	100.000
	12	4.000.000	500.000	2.400.000
Sulfitt (0,1 %)	4	230.000	10.000	<10
	8	21.000.000	66.000	<10
	12	35.000.000	89.000	<10
Eddik (0,3 %)	4	600	2.500	<10
	8	3.600	2.000	30
	12	4.500	2.000	1.000
Eddik (0,3 %) +Sulfitt (0,1 %)	4	1.000	520	<10
	8	400	490	<10
	12	300	430	<10
Eddik (0,3 %) +Vitalox (1000 ppm)	4	2.600	2.700	<10
	8	1.800	1.500	<10
	12	2.200	2.300	680
Eddik (0,3 %) +CO ₂ (flush)	4	200	2.000	<10
	8	400	1.400	20
	12	600	1.200	20

Effekt av konserveringsmidler på bedervingsgrad

Eddiksyre (0,3 %) hadde svært god effekt på råstoffets ferskhet målt som TVN. TVN utvikling i fisk skyldes i det alt vesentlige bakterievekst. De bakteriologiske analysene viser at eddik hindrer vekst av bakterier bortsett fra melkesyrebakterier ved høyeste temperatur. Nivået etter 5 dager er imidlertid ikke høyt nok til å påvirke TVN. Sulfitt, både alene og i kombinasjon med eddik, hindret vekst av melkesyrebakterier.

Sulfitt (0,1 %) brukt alene uten pH senkende midler hadde begrenset effekt på bedervingsfloraen som detekteres på Jern-agar og L&H agar. Tidligere forsøk har vist at samme sulfittkonsentrasjon gir svært god konserveringseffekt når pH senkes til ca 5,0 med mineralsyre.

CO₂ flushing sammen med eddik ga en viss tilleggseffekt på bakteriefloraen, men ga ikke utslag på TVN siden bakterienivået i alle eddikkonserverte prøver uansett er svært lavt etter 5 dager lagring.

Effekt av konserveringsmidler på FFA

Eddiksyre (0,3 %) hadde ingen effekt på FFA. Sulfitt (0,1 %) hadde en moderat positiv effekt, mens sulfitt sammen med eddik ga mer enn en halvering av FFA utviklingen. En regner med at FFA hovedsakelig dannes ved enzymatiske prosesser (lipaser fra råstoffet selv). Vitalox sammen med eddik hadde negativ effekt på FFA, dette er trolig fordi Vitalox ble innblandet i råstoff vha homogenisator som genererer emulsjoner. CO₂ sammen med eddik ga ingen tilleggseffekt.

Effekt av konserveringsmidler på Totox

Eddik (0,3 %) hadde klar negativ effekt på Totox. Vi har tidligere sett at maursyrebaserte midler har samme effekt. Dette kan skyldes at hemoglobin- og jernmediert oksidasjon har lavt pH optimum. Sulfitt (0,1 %) alene hadde svært god effekt på Totox. Sulfitt sammen med eddik reduserte den negative effekten av eddik.

CO₂ flushing sammen med eddik ga en viss reduksjon av Totox, mens effekten av Vitalox var ubetydelig. Analyseresultatene i Tabell 3 viser at den negative effekten av eddik på totox skyldes økning i AV (sekundære oksidasjonsprodukter) og at det også er denne reaksjonen som motvirkes av sulfitt.

Effekt av konserveringsmidler på oljens farge

Eddik (0,3 %) fører til en misfarging av oljen som øker med økende lagringstemperatur (Figur 2). Vi har tidligere sett samme effekt av maursyrebaserte midler. Det blir antatt at misfargingen er et resultat av astaxanthin degradering fremmet av lav pH. Vitalox sammen med eddik gjør ingen forskjell her, mens CO₂ sammen med eddik har en klar positiv effekt. Sulfitt (0,1 %) har en svært positiv effekt og hindrer misfargingen helt.



Figur 2: Utsentrifugert olje til analyse av FFA, PV og AV. Flaske 1, 2 og 3 er fra ukonservert råstoff inkubert ved hhv 4, 8 og 12 °C. Tilsvarende er flaske 4, 5, 6 konservert med sulfitt, flaske 7, 8, 9 med eddik, flaske 10, 11, 12 med eddik+sulfitt, flaske 13, 14, 15 med eddik+Vitalox og flaske 16, 17, 18 med eddik+CO₂.

Konklusjon

Eddik (0,3 %) alene hadde svært god konserveringseffekt (TVN, mikrobiologi) men negativ effekt på TOTOX, (særlig AV komponenten).

Sulfitt (0,1 %) alene hadde moderat konserveringseffekt (TVN, mikrobiologi) men svært positiv effekt på TOTOX.

Av kombinasjonene eddik/sulfitt, eddik/Vitalox og eddik/CO₂ hadde eddik/sulfitt best effekt på alle kvalitetsindikatorerne. Konsentrasjonen av eddik og sulfitt bør optimaliseres. Resultatene tyder på at redusert eddik-konsentrasjon fortsatt kan gi tilstrekkelig konservering og samtidig gi redusert TOTOX, korrosjon og kjemikaliekostnader.

4.4 Innmat – Salmar, juli 2015

Restråstoff: Innmat fra hel laks fra Salmar filetert ved SINTEF Fiskeri og havbruk
 Type forsøk: Laboratorieforsøk
 Forsøksvariable: Eddiksyre, Natriumsulfitt
 Måleparametere: Kvalitet på olje og protein, viskositet limvann

Mål: Undersøke hvordan konserveringsmidlene eddiksyre og natriumsulfitt påvirker produksjonsprosessen og kvaliteten på sluttproduktene olje og limvann. Se på hvordan ferskhetsgraden og bruk av konserveringsmidler påvirker viskositeten til limvannet og om det er mulig å redusere viskositeten ved bruk av kommersielle proteaser.

4.4.1 Materialer og metoder

Råstoff og forsøksoppsett:

Hel slaktet laks med innmat fra Salmar (Hitra) ble transportert til SINTEF Fiskeri og havbruk sine lokaler i isoporkasser med is. Laksen ble filetert og innmat tatt ut til de ulike forsøkskombinasjonene beskrevet under. Forsøksdesignet ble satt opp basert på tidligere resultater på lagring av innmat og er gitt i tabellen under.

Tabell 11: Forsøksdesign for konserveringsforsøk på innmat fra laks. Effekt av kverning, natriumsulfitt og eddiksyre på kvalitet av olje og limvann ble undersøkt. Et forsøk med tilsetning av enzym til limvannet ble også gjennomført.

	Forsøk	Lagringstid (timer)	Lagret intakt/kvernet	pH	Eddiksyre	Na ₂ SO ₅	Enzym
1	Fersk (F)	0		6,5			
2	Fersk + Enzym	0		6,5			X
3	Lagret (L) intakt	24	Intakt	6,5			
4	Lagret (L) kvernet	24	Kvernet	6,5			
5	L kvernet + 0.1 % Na ₂ SO ₅	24	Kvernet	6,5		X	
6	L kvernet + 0.1 % Na ₂ SO ₅ , pH 5.5	24	Kvernet	5,5		X	
7	L kvernet + 0.1 % Na ₂ SO ₅ + eddiksyre, pH 5.5	24	Kvernet	5,5	X	X	
8	L kvernet + eddiksyre, pH 5.5	24	Kvernet	5,5	X		

Innmaten ble kvernet ved bruk av kjøttkvern med 10 mm hulsleve. Porsjoner på 1 kg ble blandet med ønsket konserveringsmiddel, pH regulert og lagret ved 4 °C i 24 timer. Råstoffet ble da varmet opp og kokt ved T > 90 °C i 15 min. For å få en rask temperaturøkning ble råstoffet først oppvarmet til T < 85 °C i mikrobølgeovn. Etter oppvarming ble råstoffet sentrifugert (5500 g) og separert i tre fraksjoner – olje, limvann og grakse. I forsøk nr 2 ble limvann produsert fra fersk innmat tilsatt 0,1 % Protamex for å bryte ned proteinkjedene og redusere viskositeten.

Analysemetoder:

Kvalitet på oljen ble analysert ved å måle frie fettsyrer etter metoden til Bernardez et al.³, mens hydrolysegrad ble analysert ved formoltitrering etter metoden til Taylor et al.⁴.

³ Bernárdez, M., L. Pastoriza, G. Sampedro, J. J. R. Herrera and M. L. Cabo (2005). "Modified method for the analysis of free fatty acids in fish." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(6): 1903-1906.

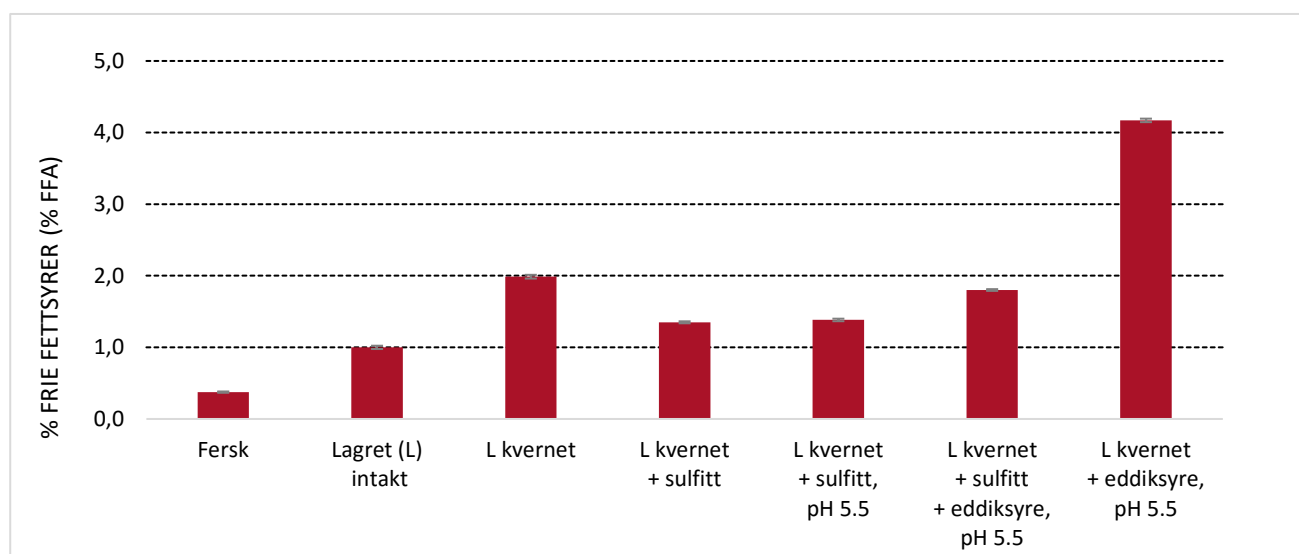
⁴ Taylor, W. H. (1957). "Formol titration: An evaluation of its various modifications." *The Analyst*: 488-498.

4.4.2 Resultater

Oljekvalitet

Frie fettsyrer ble målt i oljene produsert fra de ulike kombinasjonene og er vist i Figur 3.

Oljen produsert fra fersk innmat hadde en FFA på 0,4 %, noe som tyder på at kvaliteten på råstoffet var god. Kverning av råstoffet før lagring i 24 timer førte til høyere FFA nivå (2,0 %) sammenlignet med olje produsert fra råstoff som ble lagret intakt (1,0 %). Sulfitt hemmet dannelsen av FFA, mens tilsats av eddiksyre førte til økt FFA. Bruk av en blanding av eddiksyre og sulfitt resulterte også i lavere FFA-dannelse sammenlignet med olje fra ukonservert råstoff. Disse resultatene bekrefter resultater fra tidligere forsøk gjennomført på innmat fra laks ved Nofima (4.3).

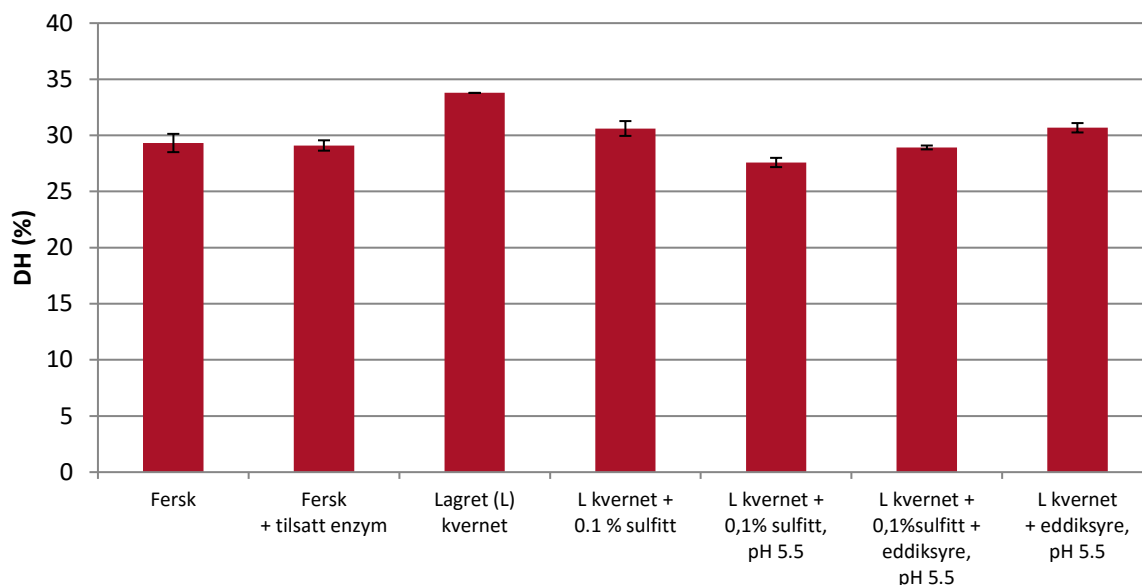


Figur 3: Andel frie fettsyrer (% FFA) i oljer produsert fra fersk innmat, lagret intakt innmat, lagret kvernet innmat, lagret kvernet innmat tilsatt sulfitt, lagret kvernet innmat tilsatt sulfitt og eddiksyre, og lagret innmat tilsatt eddiksyre. Innmaten ble lagret i 24 timer før prosessering ved varmebehandling til olje, limvann og grakse.

Hydrolysegrad

Hydrolysegraden (% frie aminogrupeer) til limvannet produsert fra de ulike kombinasjonene er vist i Figur 4.

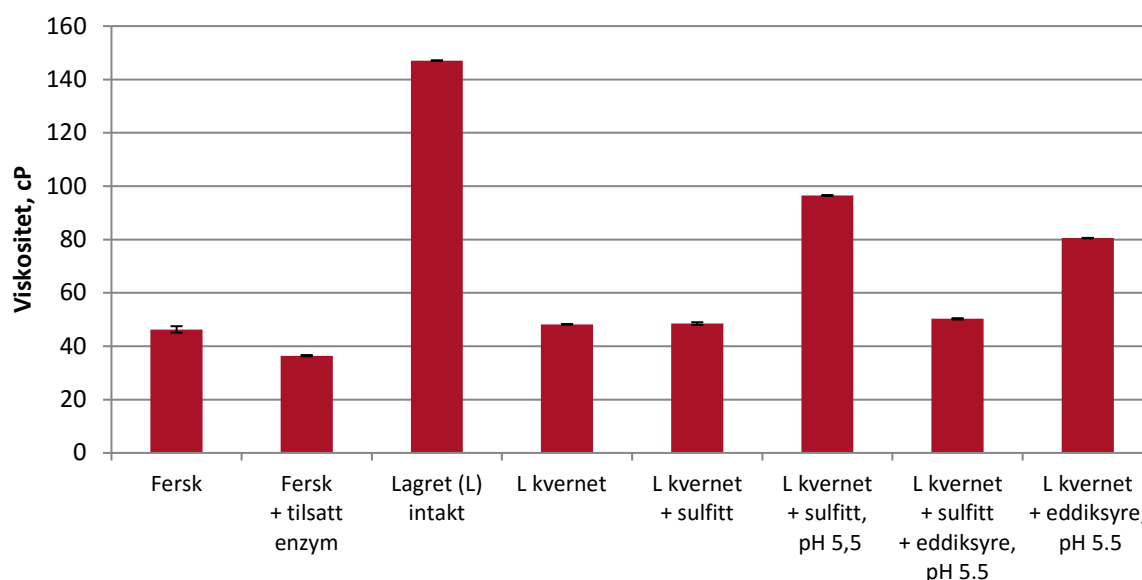
Limvannet produsert fra kvernet lagret innmat hadde høyest hydrolysegrad (33,8 %), mens limvannet produsert fra innmat konservert med natriumsulfitt (pH 5,5) hadde lavest hydrolysegrad (27,6 %). Det ser ut som sulfitt reduserer aktiviteten til de endogene enzymene da sulfitt kan bryte disulfid-bindinger i proteiner. Dette gjaldt også dannelsen av frie fettsyrer i råstoffet konservert med sulfitt. Dette kan dermed også påvirke aktiviteten til kommersielle enzymer og må tas hensyn til hvis enzymatisk hydrolyse er brukt prosesseringsmetode.



Figur 4: Hydrolysegraden (% frie aminogrupper) til limvann produsert fra fersk innmat, lagret intakt innmat, lagret kvernet innmat, lagret kvernet innmat tilsatt sulfitt, lagret kvernet innmat tilsatt sulfitt og eddiksyre, og lagret innmat tilsatt eddiksyre. Innmaten ble lagret i 24 timer før prosessering ved varmebehandling til olje, limvann og grakse.

Effekt av lagringstid på viskositeten til produsert limvann

Erfaringer fra industrien har vist at inndampning av limvann produsert fra dagsfersk (< 24 timer) råstoff kan være vanskelig på grunn av høy viskositet. Viskositeten til limvannet fra de ulike behandlingene ble målt og er vist i Figur 5.



Figur 5: Viskositeten (cP) til limvann (målt ved 4 – 6 °C) produsert fra fersk innmat, lagret intakt innmat, lagret kvernet innmat, lagret kvernet innmat tilsatt sulfitt, lagret kvernet innmat tilsatt sulfitt og eddiksyre, og lagret innmat tilsatt eddiksyre. Innmaten ble lagret i 24 timer før prosessering ved varmebehandling til olje, limvann og grakse.

Limvann produsert fra lagret intakt innmat hadde høyest viskositet, noe som samsvarer med industriens erfaring om at limvann produsert fra fersk råstoff (rundt 24 timer) er vanskelig å dampe inn på grunn av høy viskositet. Prosessering av blodfersk innmat ($t < 1$ time) eller tilsetning av 0,02 % enzym (Protamex) til limvannet ga lavere viskositet sammenlignet med limvann fra intakt lagret råstoff. Det samme gjaldt for limvann fra lagret kvernet råstoff og lagret kvernet råstoff tilsatt sulfitt. Dette kan være mulige løsninger for å hindre at innmaten bør lagres før den kan gå inn i produksjon.

4.5 Sammendrag kjemisk konservering av innmat fra laks

Total flyktige nitrogen (TVN) og mikrobiologi

Bruk av eddiksyre (0,3 %) hindret vekst av bakterier og hadde en positiv konserverende effekt på innmat lagret både i 96 og 120 timer ved 4, 8 og 12 °C. Hemming av bakterievekst ble også oppnådd ved bruk av 0,2 eller 0,1 % natriumsulfitt, samt en kombinasjon av eddiksyre (0,3 %) og natriumsulfitt (0,1 %).

TVN utvikling i fisk skyldes hovedsakelig bakterievekst og både bruk av eddiksyre (0,3 %) og sulfitt (0,1 eller 0,2 %) alene eller i kombinasjon hadde en positiv effekt på TVN under lagring av råstoffet.

Frie fettsyrer (FFA)

Eddiksyre (0,3 %) hadde ingen effekt på dannelsen av FFA når innmat ble lagret i 120 timer ved 4, 8 og 12 °C før prosessering (mars 2015). Natriumsulfitt (0,1 og 0,2 %) alene hadde en moderat hemmende effekt på dannelsen av FFA, mens sammen med eddiksyre førte til mer enn en halvering av FFA utviklingen.

Oksidasjonsstatus

Eddiksyre (0,3 %) har et betydelig negativ effekt på oksidasjonsstatusen i oljer produsert fra lagret innmat. Årsaken til dette er at pro-oxidatene tilstede i råstoffet, hemoglobin og jern, er mer effektive ved lavere pH og dermed fører til økt oksidasjonshastighet. Natriumsulfitt (0,1 og 0,2 %) fungerer som en antioksidant og har en positiv effekt på oksidasjonsstatusen. Det samme er tilfellet når natriumsulfitt (0,1 %) blir benyttet sammen med eddiksyre (0,3 %). Vitalox er en syntetisk antioksidant som benyttes i pet-food industrien og har friradikal scavenger egenskaper. Vitalox (1000 ppm) ble testet sammen med eddiksyre (0,3 %) og hadde en negativ effekt på oksidasjonsstatusen. Årsaken kan være at Vitalox ikke er en kraftig nok antioksidant til å hemme oksidasjon under lagring, spesielt ved redusert pH.

Farge

Lagring av innmaten førte til misfarging på oljen som produseres fra restråstoffet. Misfargingen øker med økt temperatur. Årsaken til dette er mest sannsynlig en reaksjon mellom oksidasjonsprodukter og proteiner. Bruk av eddiksyre som konserveringsmiddel førte til økt misfarging. I laks kan misfargingen være forårsaket av en nedbrytning av astaxanthin, samt en reaksjon mellom oksidasjonsprodukter. Natriumsulfitt hemmer misfargingen både alene og sammen med eddiksyre. Vitalox hadde ingen effekt.

Hydrolysegrad

Hydrolysegraden (% frie aminogrupeer) til limvann produsert fra innmat lagret i 24 timer ble studert for å se på hvordan bruk av konserveringsmidler påvirker hydrolysegraden (juni 2015). Limvann produsert fra innmat kvernet før lagring hadde høyest hydrolysegrad (33,8 %), mens limvann produsert fra innmat konserverert med natriumsulfitt hadde lavest hydrolysegrad (27,6 %). Det ser ut som sulfitt bidrar til å redusere aktiviteten til de endogene enzymene da sulfitt kan bryte disulfid-bindinger i proteiner. Dette kan dermed også påvirke aktiviteten til kommersielle enzymer og bør studeres nærmere og tas hensyn til hvis enzymatisk hydrolyse skal benyttes som prosesseringsmetode.

Viskositet

Erfaringer fra industrien har vist at inndamping av limvann produsert fra dagsfersk (< 24 timer) restråstoff kan være vanskelig på grunn av høy viskositet. Limvann produsert fra lagret intakt innmat i 24 timer hadde høyest viskositet, noe som er i samsvar med erfaringer fra industrien. Prosessering av blodfersk innmat (under 1 time etter produksjon) eller tilsetning av 0,02 % enzym (Protamex) til limvannet ga lavere viskositet sammenlignet med limvann fra intakt lagret innmat. Lavere viskositet ble også funnet i limvann produsert fra lagret kvernet råstoff med og uten tilsatt sulfitt. Dette kan være mulige løsninger for å hindre at innmaten må lagres før videre prosessering.

5 Kjemisk konservering av restråstoff fra sild og makrell (AP2)

5.1 Samfengt avskjær fra NVG sild, Fosnavåg Pelagic AS, februar 2014

Restråstoff: NVG sild samfengt

Forsøk: Laboratorieforsøk

Forsøksvariable: Eddiksyre, CO₂, Na-metabisulfitt/HCl, komm. maursyrebasert middel, temperatur

Måleparametre: Holdbarhet/kvalitet med fokus på bakteriologi

5.1.1 Materialer og metoder

Råstoff

Sildeavskjær ble sendt med Hurtigruten fra Fosnavåg Pelagic 04.02.2014 og mottatt ved Nofima sent dagen etter. Fisken lå ikke på kjølerom under transport som avtalt. Temperatur i råstoffet ved mottak var 9 °C. Råstoffet ble nedkjølt til 0-1 °C med isposer, og oppmalt på kjøttkvern (hullskive 8 mm) neste morgen. Farsen hadde TS: 26,0 %, protein: 16,1 %, fett: 9,1 %, aske: 2,4 %.

Forsøksoppsett

Det oppmalte råstoffet hadde fast konsistens. Det ble derfor brukt elektrisk røreverk for å blande inn konserveringsmidlene. CO₂ gass ble tilsatt gjennom glassrør som ble stukket ned i ulike deler av farsen. Prøvene ble lagret ved 0 °C og 5 °C i 7 dager. Etter endt inkubering ble prøver tatt ut til analyse av flyktige N-forbindelser og mikroorganismer.

Prøver til fettanalyser (FFA, PV, AV) ble tatt ut vha BI&D ekstraksjon istedenfor utsentrifugering som i senere forsøk. Metoden viste seg uegnet for rå fisk og analyseresultatene er derfor ikke tatt med i rapporten.



Figur 6: Prøveflaske med hull i lokk for tilsetning av CO₂ gass

Tabell 12: 1400 gram porsjoner av oppmalt sildeavskjær ble tilsatt konserveringsmidler som vist under. Prøvene ble splittet og inkubert ved hhv 0 eller 5 °C i 7 dager. Sulfitt ble ved en feiltakelse tilsatt fra 3 % istedenfor 30 % stamløsning som ga 1/10 av tilsiktet konsentrasjon i råstoffet

	Fisk	Eddik 30 %	CO ₂ 99,9 %	HCl 10 %	Na-disulfitt 3 %	KMM 100 %
Ukonservert	1400 g					
Eddik 0,2%	1400 g	9,34 ml				
Eddik 0,2% + CO ₂	1400 g	9,34 ml	Flush			
Na metabisulfitt 0,02%	1400 g			50 ml	9,34 ml	
Komm maursyrebasert middel 0,2%	1400 g					2,8 ml

Analysemetoder

Kimtall på Jern Agar, 22,5 °C (NMKL 184, Aerobic counts and specific spoilage organisms in fish and fish products). Kimtall på Long & Hammer Agar, 15 °C (NMKL 184, Aerobic counts and specific spoilage organisms in fish and fish products). Melkesyrebakterier på MRS Agar, 22,5 °C (ISO 15214, Mesophilic lactic acid bacteria). Kimtall på 3M Petrifilm, 30 °C (Afnor 3M 1/1-9/89). Anaerobe sulfittreduerende bakterier, 37 °C (ISO 15213. Sulfite reducing bacteria growing under anaerobic conditions), TVN, TMA, TMAO etter Conway's mikro-diffusjonsmetode (Intern metode).

5.1.2 Resultater

Analyseresultatene i Tabell 13 og Tabell 14 viser at eddiksyre effektivt hemmer vekst av bedervingsbakterier og dannelsen av flyktige N forbindelser som følge av bakteriell aktivitet. Melkesyrebakterier som har høy syretoleranse vokser imidlertid opp i nærvær av eddiksyre når de ikke har konkurranse fra andre, men ikke ved 0 °C der temperaturen hindrer vekst. Melkesyrebakteriene detekteres på MRS agar som er spesifikk for disse bakteriene, men inngår også i floraen som vokser på Jern-agar og L&H agar som er beregnet på bedervingsbakterier i fisk.

Eddiksyre hadde i dette forsøket langt bedre effekt enn det kommersielle maursyrebaserte middelet (KMM) som ble dosert til samme konsentrasjon.

På grunn av feildosering av Na metabisulfitt (1/10 av tilsiktet) ga ikke dette middelet forventet effekt. Effektene som ble registrert skyldes trolig senkningen av pH fra 6,4 til 5,0 pga tilsatt HCl.

Tabell 13: Kjemiske analyser ved start og etter 7 dager lagring ved 5 og 0 °C av ukonserverte og konserverte biprodukter fra filetering av NVG sild.

		TVN mgN/100g	TMA mgN/100g	TMAO mgN/100g
Ukonservert	0 dg	9	2	36
Ukonservert	7 dg, 5 °C	123	53	0
Eddik 0,2%	7 dg, 5 °C	21	3	35
Eddik 0,2%+ CO ₂	7 dg, 5 °C	19	2	35
Sulfitt 0,02% ¹⁾	7 dg, 5 °C	101	46	0
KMM 0,2%	7 dg, 5 °C	98	46	0
Ukonservert	7 dg, 0 °C	87	47	0
Eddik 0,2%	7 dg, 0 °C	15	2	33
Eddik 0,2%+ CO ₂	7 dg, 0 °C	14	1	33
Sulfitt 0,02% ¹⁾	7 dg, 0 °C	63	37	0
KMM 0,2%	7 dg, 0 °C	62	39	0

I dette forsøket ble det benyttet flere mikrobiologiske analysemetoder for å finne hvilke som fanger opp størst andel av totalfloraen i ukonservert og konservert fisk (Tabell 14).

Anaerobe sulfittreduserende bakterier dyrket ved 37 °C og kimtall ved 30 °C er standardmetoder for kvantifisering av hhv anaerob og aerobe bakterier i næringsmidler. Resultatene (Tabell 14) viser at disse to metodene ikke fanger opp den dominerende flora i kjølelagret fisk.

Kimtall på Jern-agar er en metode utviklet spesielt for deteksjon av aerobe bakterier og spesifikke bedervingsbakterier i kjølt og aerobt lagret fisk, f.eks. *Shewanella* spp. Denne floraen har vokst både ved 0 °C og 5 °C, men har ikke nådd et nivå etter 7 dager lagring som kan forklare den betydelige TVN/TMA utviklingen.

Kimtall på Long & Hammer agar ved 15 °C brukes til bestemmelse av aerobe bakterier i fisk og inkluderer kuldetolerante og varmfølsomme bakterier, spesielt *Photobacterium phosphoreum* som er CO₂ resistent og ofte dominerende i kjølt, CO₂ pakket fisk. Denne metoden gir de desidert høyest tellingene og detekterer derfor størst andel av totalfloraen. Størrelsen på denne kuldetolerante floraen står i godt forhold til prøvenes TVN/TMA-innhold.

Tabell 14: Mikrobiologiske analyser ved start og etter 7 dager lagring ved 0 og 5 °C av ukonserverte og konserverte biprodukter fra filetering av NVG sild. Resultatene er gitt som kolonidannende enheter pr g (CFU/g)

Prøve		Ana-bakt	Kimtall	Kimtall	H ₂ S-bakt	Kimtall	MS-bakt
		TSC-37,0°C	3M-30,0°C	JA-22,5°C	JA-22,5°C	LH-15,0°C	MRS-22,5°C
Ukonservert	0 dg	<10	25 000	24 000	10 000	230 000	160
Ukonservert	7 dg, 5 °C	40 000	180 000	4 900 000	140 000	89 000 000	210 000
Eddik 0,2%	7 dg, 5 °C	<10	46 000	2 900 000	4 000	2 300 000	3 500 000
Eddik 0,2%+ CO ₂	7 dg, 5 °C	1 100	35 000	1 400 000	2 200	1 100 000	1 100 000
Sulfitt 0,02% ¹⁾	7 dg, 5 °C	5 500	17 000	3 400 000	7 000	43 000 000	4 500
KMM 0,2%	7 dg, 5 °C	4 500	52 000	3 700 000	26 000	81 000 000	97 000
Ukonservert	7 dg, 0 °C	100 000	220 000	1 500 000	500 000	62 000 000	310
Eddik 0,2%	7 dg, 0 °C	3 300	23 000	20 000	7 000	42 000	300
Eddik 0,2%+ CO ₂	7 dg, 0 °C	1 600	4 000	14 000	5 000	31 000	330
Sulfitt 0,02% ¹⁾	7 dg, 0 °C	1 400	15 000	600 000	6 000	50 000 000	160
KMM 0,2%	7 dg, 0 °C	1 600	31 000	2 700 000	23 000	23 000 000	330

1) Det ble ved en feil dosert 1/10 av tilsiktet Na-disulfid konsentrasjon.

5.2 Samfengt avskjær fra NVG sild, Grøntvedt Pelagic, februar 2016

Restråstoff:	Samfengt avskjær fra NVG sild
Forsøk:	Laboratorieforsøk
Forsøksvariable:	Temperatur, tid, eddiksyre, natriumsulfitt
Måleparametere:	Effekt av eddiksyre og natriumsulfitt på produksjonsprosessen og kvalitet på olje og vannløselig protein (limvann) produsert fra restråstoff lagret ved 4 og 12 °C

5.2.1 Materialer og metoder

Råstoff og forsøksdesign

Samfengt avskjær fra NVG-sild ble tatt ut fra fileteringslinja til Grøntvedt Pelagic (Ørlandet) og transportert kaldt til SINTEF Fiskeri og havbruk sine lokaler i Trondheim rett etter uttak. Tre timer etter uttak ble råstoffet klargjort for konserveringsforsøkene. Intakt råstoff (2 kg) ble fordelt i plastbøtter (2,5 L) og tilsatt konserveringsmiddel (eddiksyre, natriumsulfitt eller en kombinasjon av begge) i henhold til forsøksdesignet vist i Tabell 15. Samtidig ble noe av råstoffet kvernet (10 mm hullskive) før tilsetning av konserveringsmiddel. Dette for å se om effekten av konserveringsmiddelet avhenger av at det blandes inn i kvernet råstoff. Det ukonserverte og konserverte råstoffet ble lagret ved 4 eller 12°C og prøver ble tatt ut etter 96 og 168 timer for videre prosessering.

Etter 0, 96 og 168 timers lagring, ble råstoffet kvernet og fordelt i 50 mL sentrifugerør og varmebehandlet ved > 90 °C for 15 min i vannbad. Kvernet råstoff ble direkte fordelt i rørene. For å oppnå en rask temperaturøkning ble råstoffet først varmet opp til rundt > 80 °C i mikrobølgeovn. Etter varmebehandling ble råstoffet sentrifugert og separert i tre fraksjoner: olje, limvann og grakse.

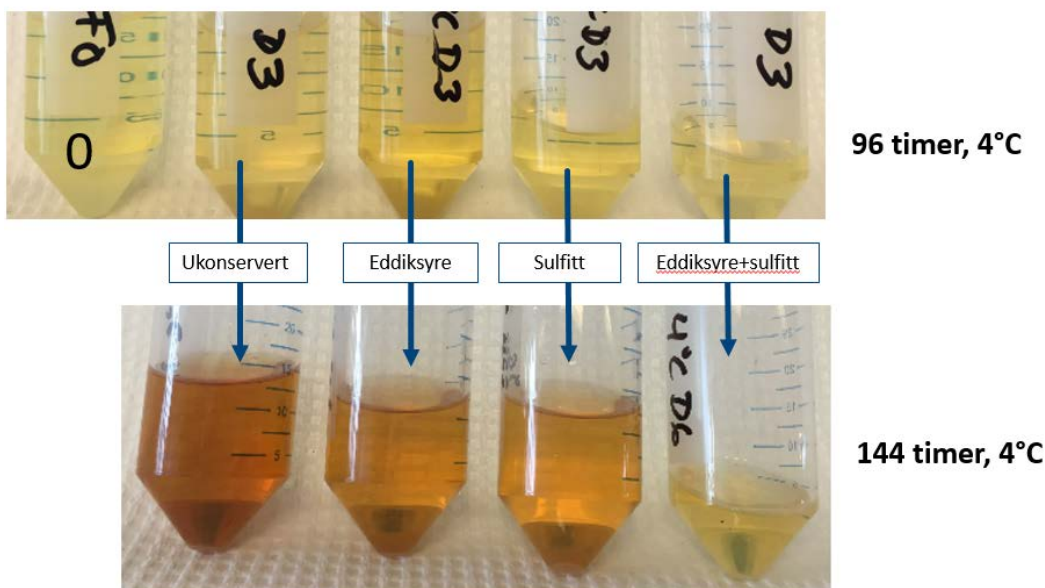
Tabell 15: Forsøksdesign for konservering av restråstoff fra NVG-sild. Konserveringsmidler (eddiksyre, natriumsulfitt eller en kombinasjon av disse) ble tilsatt til intakt eller kvernet restråstoff. Ukonserverte og konserverte restråstoff ble lagret ved 4 eller 12 C. Prøver ble tatt ut etter 96 og 168 timer for videre prosessering til olje, limvann og grakse.

Forsøk #	Forsøksbeskrivelse	Konserveringsmidler			Temperatur [°C]		Lagringstid [timer]		
		Uten	Eddiksyre 0.2 %	Natriumsulfitt 0.1 %	4	12	0	96	168
1	Ukonserverte dag 0	X					X		
2	Ukonserverte, lagret v/4 °C i 3 dg	X			X			X	
3	Ukonserverte, lagret v/4 °C i 6 dg	X			X				X
4	Ukonserverte, lagret v/12 °C i 3 dg	X				X		X	
5	Ukonserverte, lagret v/12 °C i 6 dg	X				X			X
6	Eddiksyre, lagret v/4 °C i 3 dg		X		X			X	
7	Eddiksyre, lagret v/4 °C i 6 dg		X		X				X
8	Eddiksyre, lagret v/12 °C i 3 dg		X			X		X	
9	Eddiksyre, lagret v/12 °C i 6 dg		X			X			X
10	Sulfitt, lagret v/4 °C i 3 dg			X	X			X	
11	Sulfitt, lagret v/4 °C i 6 dg			X	X				X
12	Sulfitt, lagret v/12 °C i 3 dg			X		X		X	
13	Sulfitt, lagret v/12 °C i 6 dg			X		X			X
14	Eddiksyre + sulfitt, lagret v/4 °C i 3 dg		X	X	X			X	
15	Eddiksyre + sulfitt, lagret v/4 °C i 6 dg		X	X	X				X
16	Eddiksyre + sulfitt, lagret v/12 °C i 3 dg		X	X		X		X	
17	Eddiksyre + sulfitt, lagret v/12 °C i 6 dg		X	X		X			X
18	Kvernet råstoff + Eddiksyre + sulfitt, lagret v/12 °C i 3 dg		X	X		X		X	
19	Kvernet råstoff + Eddiksyre + sulfitt, lagret v/12 °C i 6 dg		X	X		X			X

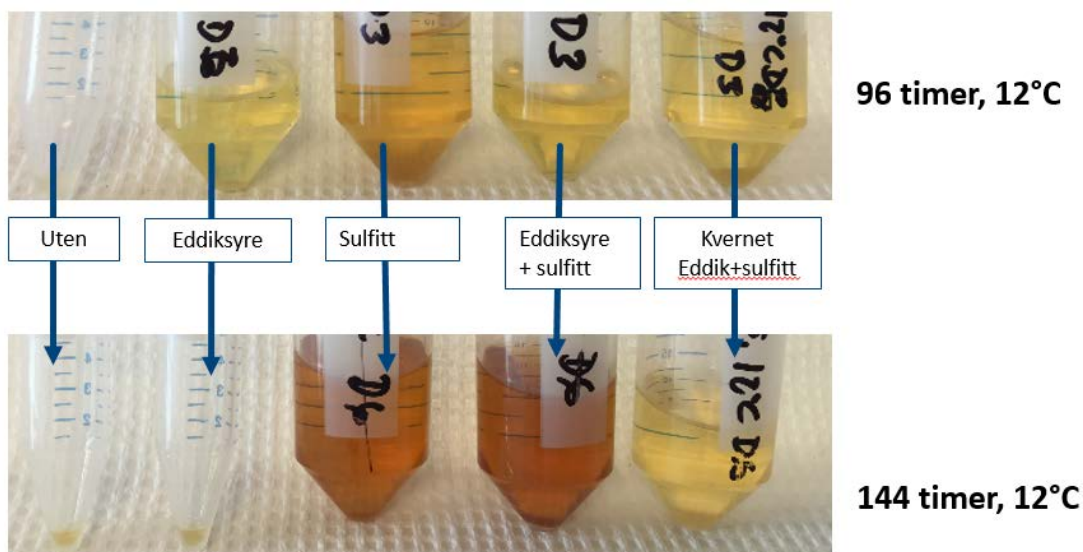
5.2.2 Resultater og konklusjon

Effekt av konserveringsmidler på oljekvalitet

Bilder av oljene produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert restråstoff er vist nedenfor (Figur 7 og Figur 8). Bildene av oljene viser en økende mørkfarging med lagringstid. Bruk av sulfitt sammen med eddiksyre hadde til en viss grad hemmende effekt på mørkfargingen, spesielt ved 96 timers lagring. Imidlertid hadde kombinasjonen av eddiksyre og sulfitt en bedre effekt på å hindre misfarging når konserveringsmidlene hadde blitt bedre innblandet i råstoffet (kvernet råstoff).



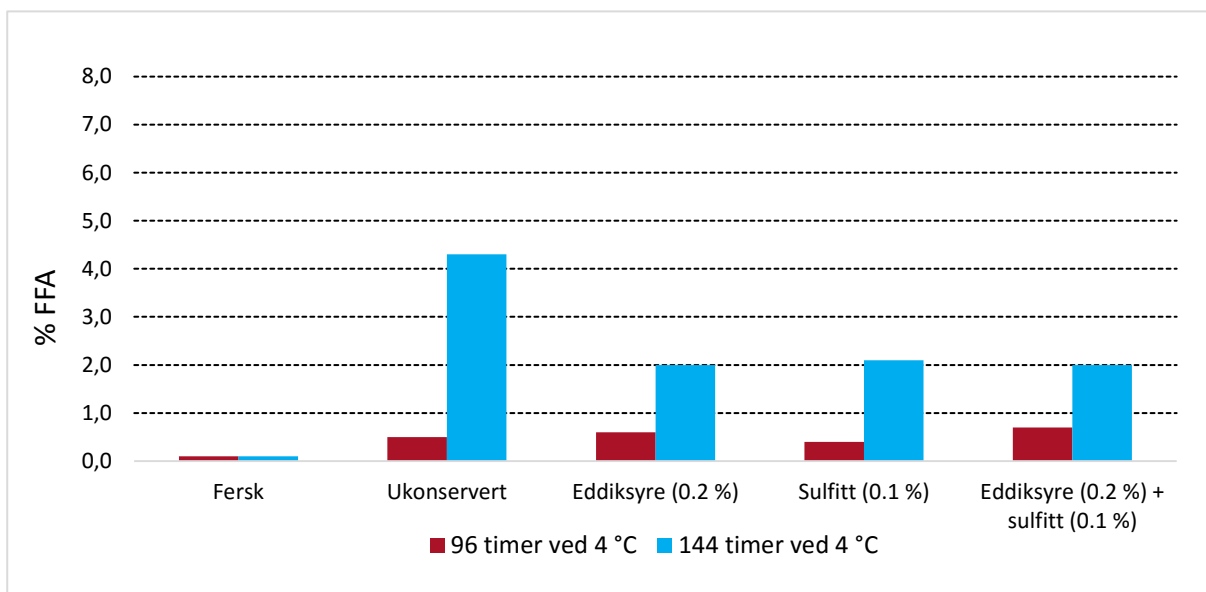
Figur 7: Oljer produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert restråstoff lagret i 96 timer og 144 timer ved 4 °C



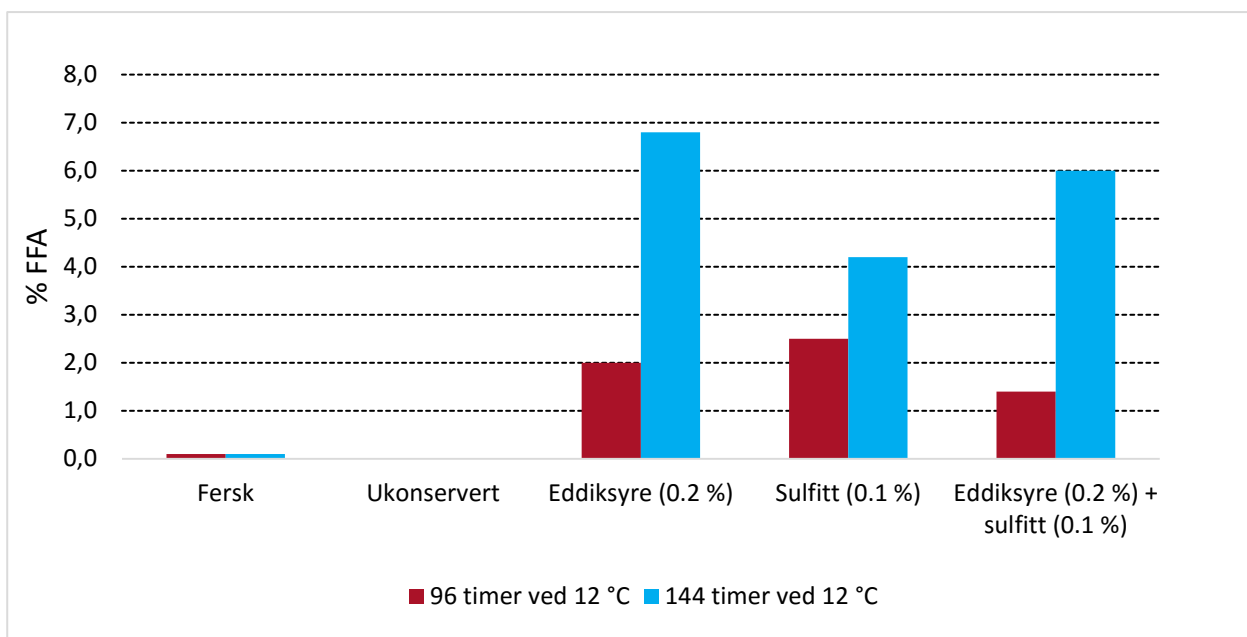
Figur 8: Oljer produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert restråstoff lagret i 96 timer og 144 timer ved 12 °C

Frie fettsyrer

Frie fettsyrer er en viktig kvalitetsparameter for råoljer og sier noe om hvordan kvaliteten på råstoffet er og hva det har blitt utsatt for under lagring, transport og prosessering. Effekten av konserveringsmidlene eddiksyre og natriumsulfitt på å hemme dannelsen av andel frie fettsyrer under lagring av restråstoff og dermed reduserer % FFA i oljen er vist i Figur 9 og Figur 10.



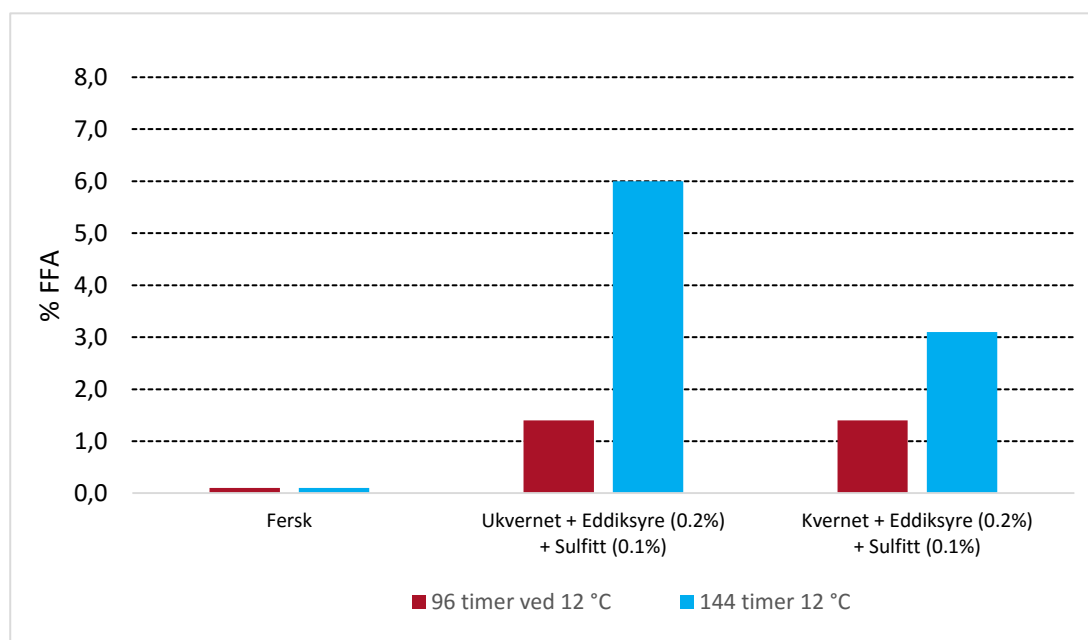
Figur 9: Andel frie fettsyrer (% FFA) i olje produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert råstoff lagret ved 4 °C i 96 og 144 timer



Figur 10: Andel frie fettsyrer (% FFA) i olje produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert råstoff lagret ved 12 °C i 96 og 144 timer.

Oljen produsert fra fersk restråstoff hadde FFA på 0,1 %, noe som tyder på at råstoffet er av høy kvalitet. Forsøket viser ingen signifikant forskjeller i % FFA i oljer ekstrahert fra ukvernet råstoff tilsatt konserveringsmidler ved 4 °C etter 96 timers lagring. Imidlertid hemmet konserveringsmidlene dannelsen av FFA i olje produsert fra lagret råstoff etter 144 timer. Etter 96 timers lagring ga konservering med eddiksyre og sulfitt en olje med lavere FFA sammenlignet med olje fra råstoff kun tilsatt eddiksyre eller sulfitt. Tilsetning av eddiksyre fører til en reduksjon i pH til et pH-område hvor de endogene enzymene har høyere aktivitet. Det vil gi en økt FFA dannelse, men samtidig så vil det hindre bakterievekst. Basert på resultatene er kjøling den mest effektive metoden for å hindre FFA-dannelse i restråstoff fra NVG-sild.

Mekanisk påkjenning på råstoffet slik som kverning kan føre til økt dannelse av FFA, samtidig som det ikke er ønskelig fra industrien sin side å måte kverne pelagisk restråstoff før transport. For å se hvordan innblandingen av konserveringsmidlene i råstoffet påvirket konserveringseffekten ble undersøkt ved å blande inn en blanding av eddiksyre og sulfitt i intakt og kvernet råstoff. Prøvene ble lagret ved 12 °C i 96 eller 144 timer før videre prosessering til olje, limvann og grakse. Andel FFA i oljen er vist i Figur 11.



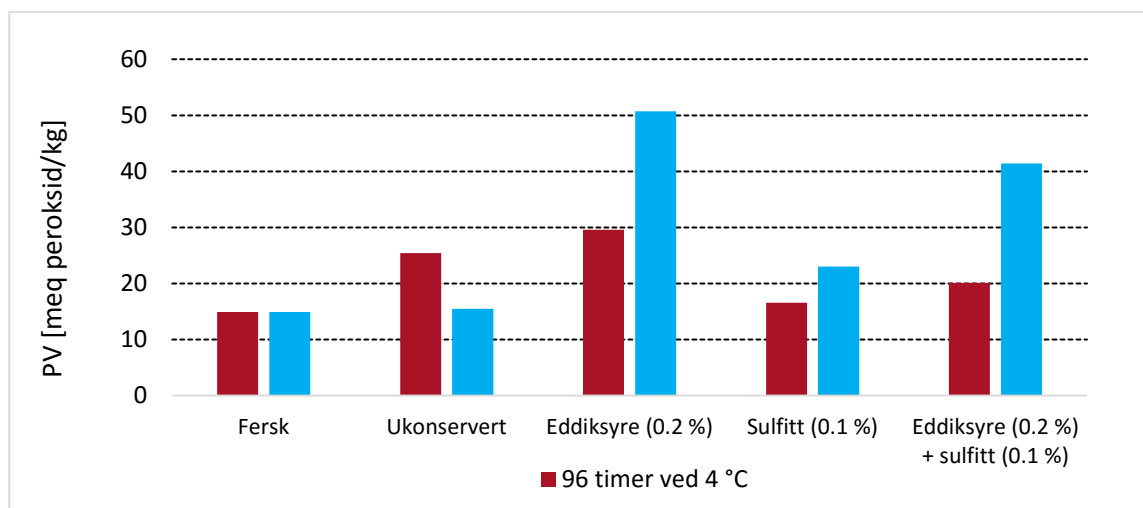
Figur 11: Andel frie fettsyrer (% FFA) i olje produsert ved varmebehandling fra fersk og konservert restråstoff fra NVG sild lagret ved 12 °C i 96 og 144 timer. En blanding av eddiksyre og natriumsulfitt er tilsatt ukvernet og kvernet råstoff.

Resultatene viser at innblanding av konserveringsmidlene har stor betydning for konserveringseffekten og hvor godt de klarer å hemme dannelsen av FFA. Ved 12 °C hadde oljen produsert fra kvernet konservert restråstoff betydelig lavere andel FFA en oljen produsert fra ukvernet restråstoff.

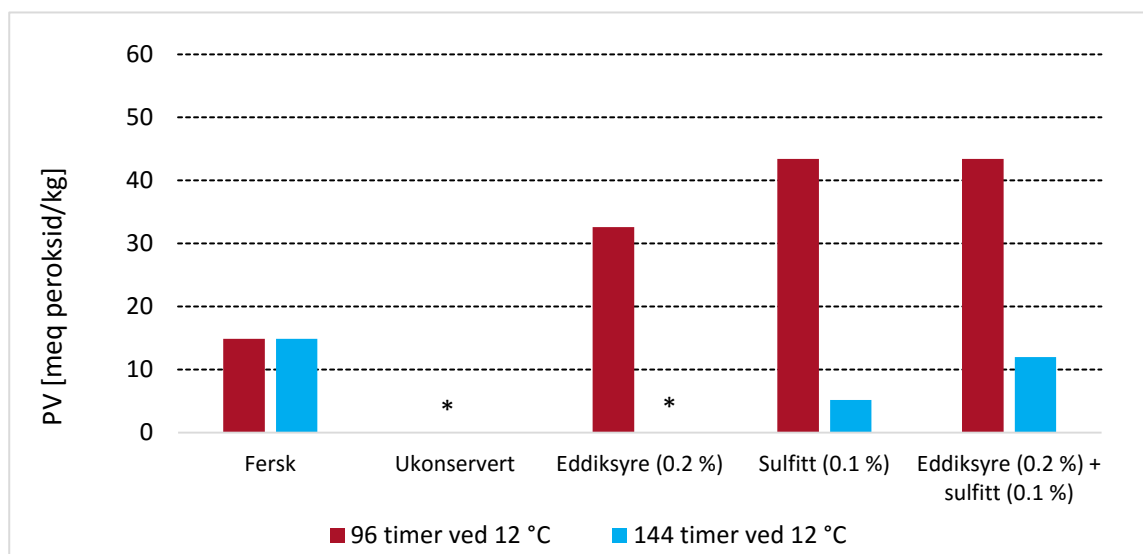
Oksidasjonsstatus i olje produsert fra konservert og ukonservert restråstoff

Oksidasjonsstatus i oljene produsert fra ukonservert og konservert restråstoff lagret ved 4 og 12 °C er evaluert ved å metode peroksidverdi (PV) og anisoverdi (AV). Resultatene er gitt i Figur 12- Figur 15. PV i fersk råstoff var 14,9 meq peroksid/kg, en verdi langt over PV målt i ferskt restråstoff fra NVG-sild i tidligere forsøk (PV < 5 meq peroksid/kg). Årsaken til dette er ukjent, men lavt fettinnhold i råstoffet kan resultere i høyere PV. Sulfitt hadde en positiv effekt på PV i olje fra råstoff lagret ved 4 °C da den fungerer som en antioksidant i miljø hvor hemoglobin er den framtrepende pro-oksianten. Eddiksyre fører til økt

peroksiddannelse, noe som kan være på grunn av at hemoglobin er mer effektiv ved lavere pH. Lavere PV etter 144 timer er forårsaket av nedbrytning av peroksid over tid og dannelsen av sekundære oksidasjonsprodukter.



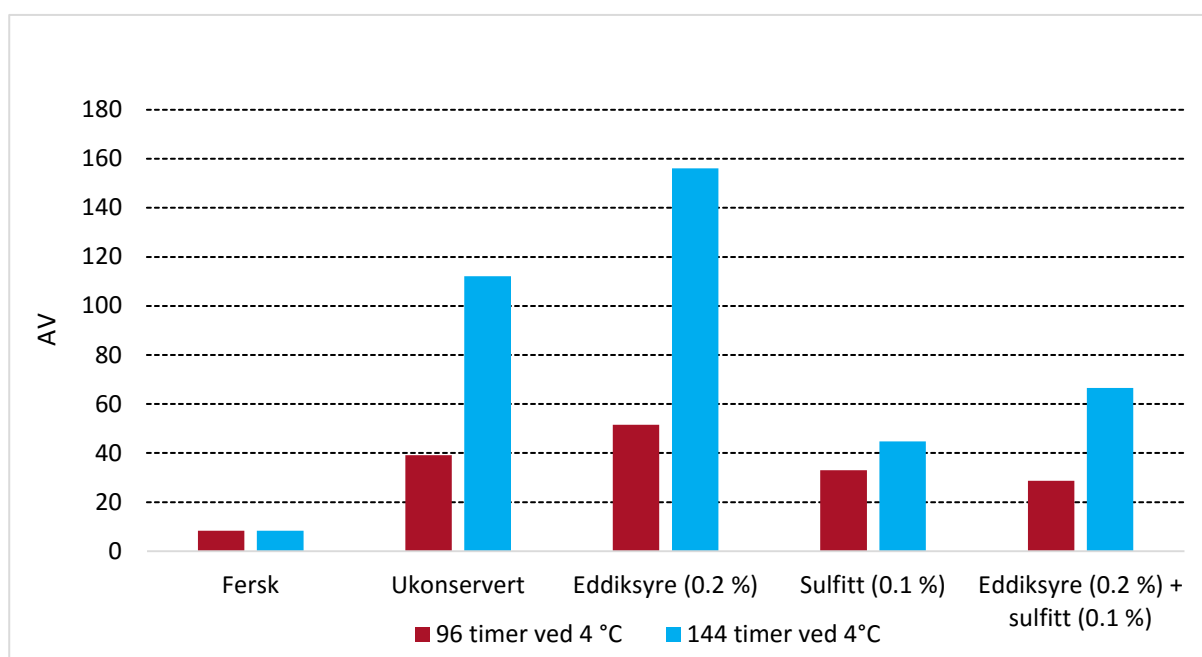
Figur 12: Peroxidverdi (PV) målt i oljer produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert råstoff lagret ved 4 °C i 96 og 144 timer



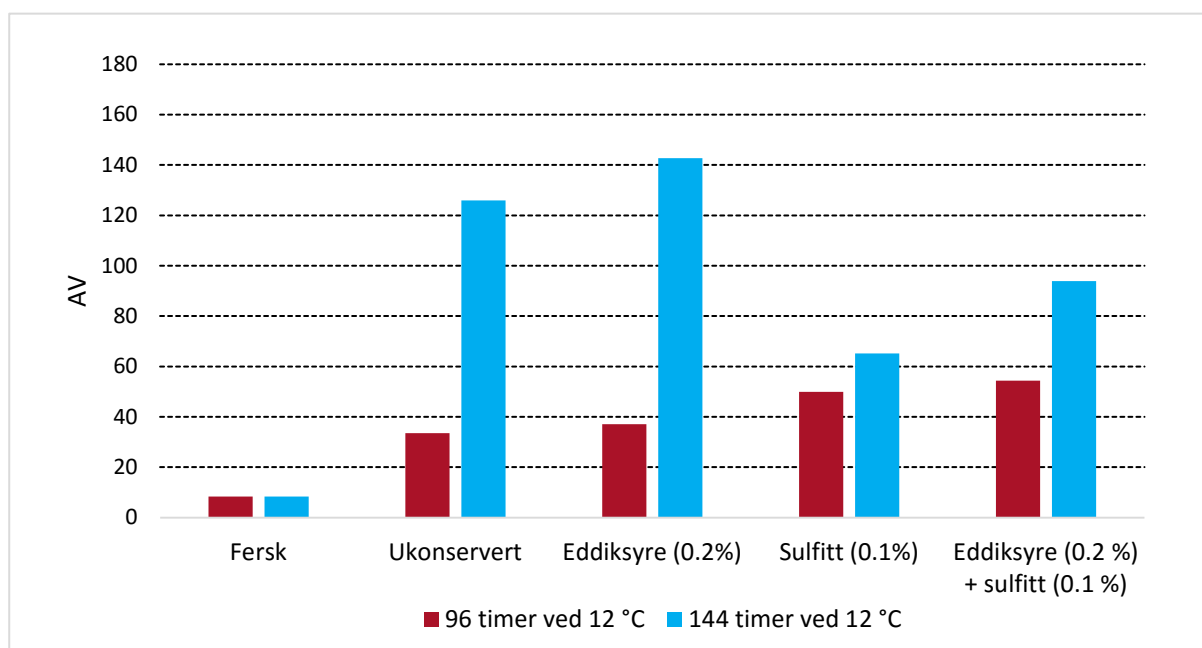
Figur 13: Peroxidverdi (PV) målt i olje produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert råstoff lagret ved 12 °C i 96 og 144 timer. (*) Finnes ikke analyseresultat for den ukonserverte prøven

På grunn av manglende analysedata (tap i prøvemateriale) fra ukonservert råstoff lagret ved 12 °C er det vanskelig å trekke konklusjoner fra konserveringsforsøket. Sammenlignet med prøvene ved 4 °C så skjer dannelsen av peroksider raskere ved 12 °C.

Bruk av natriumsulfitt eller en blanding av natriumsulfitt og eddiksyre hadde en konserverende effekt både ved 4 og 12 °C og ga olje med lavere AV sammenlignet med olje produsert fra ukonservert råstoff. Eddiksyre hadde en negativ effekt på AV, noe som var forventet da en reduksjon i pH kan føre til økt hemoglobin-mediert oksidasjon. Det samme gjaldt også for råstoff lagret ved 12 °C.

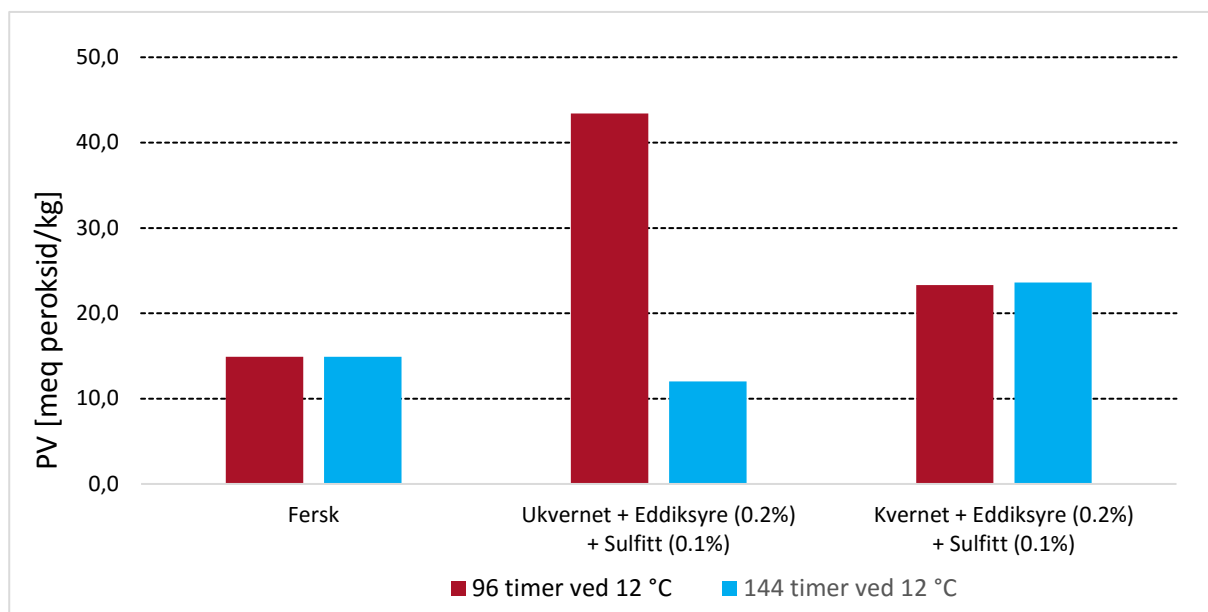


Figur 14: Anisidinverdi (AV) målt i olje produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert råstoff lagret ved 4 °C i 96 og 144 timer.

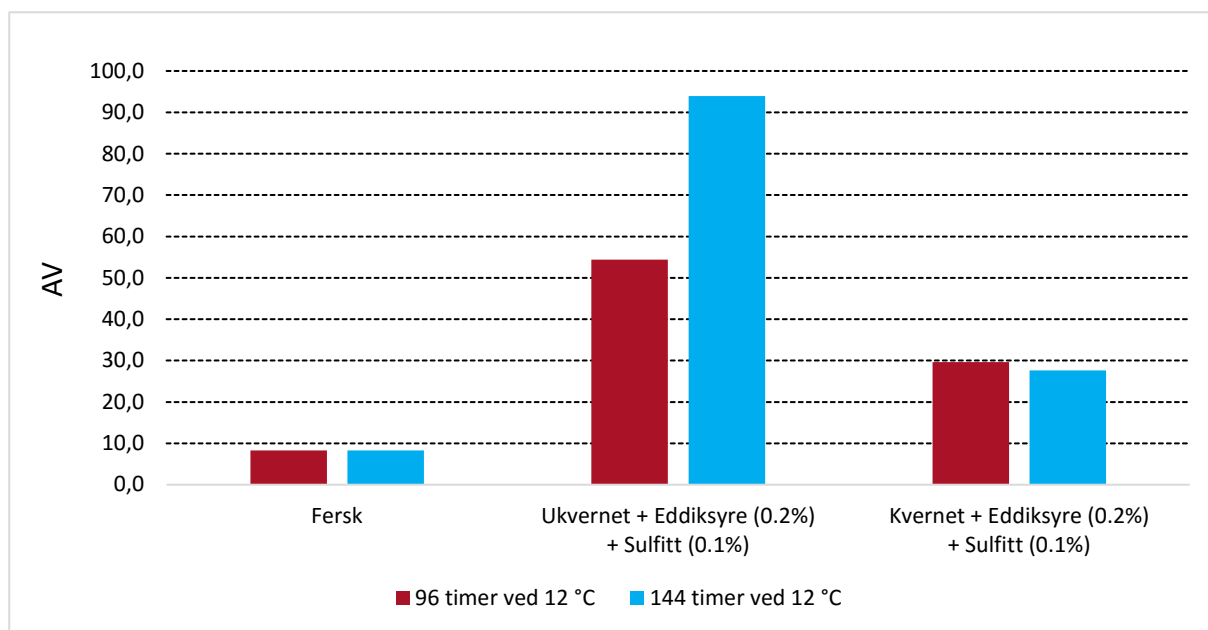


Figur 15: Anisidinverdi (AV) målt i olje produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert råstoff lagret ved 12 °C i 96 og 144 timer.

Olje produsert fra kvernet konservert råstoff hadde lavere oksidasjonsstatus sammenlignet med olje produsert fra intakt konservert råstoff (Figur 16 og Figur 17). Det var uforventet at kvernet råstoff skulle resultere i olje med lavere oksidasjonsstatus, men årsaken kan være en dårligere innblanding av konserveringsmidler og dermed en dårligere konserveringseffekt.



Figur 16: Peroxidverdi (PV) målt i olje produsert ved varmebehandling fra fersk og konservert restråstoff fra NVG sild lagret ved 12 °C i 96 og 144 timer. En blanding av eddiksyre og natriumsulfitt ble tilsatt til ukvernet og kvernet råstoff.



Figur 17: Anisidinverdi (AV) målt i olje produsert ved varmebehandling fra fersk og konservert restråstoff fra NVG sild lagret ved 12 °C i 96 og 144 timer. En blanding av eddiksyre og natriumsulfitt ble tilsatt til ukvernet og kvernet råstoff.

Hydrolysegrad

Hydrolysegrad er et mål hvor stor andel av proteinkjedene som er blitt spaltet til mindre enheter, peptider og aminosyrer. Hydrolysegrad er gitt i % frie aminogruupper. Hydrolysegraden til limvannet produsert fra ukonservert og konservert restråstoff lagret ved 4 og 12 °C er gitt i Figur 18.



Figur 18: Hydrolysegraden til limvann produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert råstoff lagret ved 4 °C i 96 og 144 timer.

Økt lagringstid fører til økt hydrolysegrad, noe som var tilfellet for alle kombinasjonene både ved 4 og 12 °C. Hydrolysegraden var også høyere for kombinasjonene lagret ved 12 °C sammenlignet med 4 °C. Av kombinasjonene sulfitt, eddiksyre og blanding av begge var det bruk av sulfitt som resulterte i lavest hydrolysegrad. En teori kan være at sulfitt påvirker aktiviteten til de endogene enzymene da natriumsulfitt bryter sulfid-bindinger i proteiner. Tilsetning av konserveringsmiddel til intakt eller kvernet råstoff hadde ingen påvirkning på hydrolysegraden.

5.3 Samfengt avskjær fra Nordsjøsil, Pelagia Austevoll AS, juni 2016

Restråstoff: Nordsjøsil, biprodukter fra filetering, losset samme dag som forsøksstart
Forsøk: Laboratorieforsøk
Forsøksvariable: Eddiksyre, Na-metabisulfitt, temperatur, oppmaling, hard behandling, fryst/tint
Måleparametre: Holdbarhet/kvalitet

5.3.1 Materialer og metoder

Råstoff

Biprodukter fra filetering av nordsjøsil ble hentet hos Pelagia Austevoll om morgenen 7. juni 2016. Fisken var losset samme dag, pakket i plastpose og lagt i isoporkasse (flykasse) med is. Råstoffet ble bragt til Nofima for videre behandling samme formiddag. En del av råstoffet ble malt i kjøttkvern med hullskive 8 mm. Prøver av oppmalt råstoff ble vakuumpakket og frosset ned for analyse av sammensetning og kvalitet. Umalt råstoff og resten av det oppmalte råstoffet ble brukt i forsøk for å se på effekt av ulike behandlingsmåter.

Forsøksoppsett

Porsjoner à 750 gram av råstoff ble behandlet som vist i Tabell 16 og overført til plastbeholdere (1 liter) med skrulokk. Prøvene ble lagret 3 dager ved 5, 10 eller 14 °C i inkubatorskap som var kalibrert på forhånd. Forsøket skulle se på effekt av ulik forbehandling av råstoffet (oppmaling, vanntilsetning, hardhendt fysisk behandling, frysing/tining). Hardhendt fysisk behandling besto av klem og risting. Frysing/tining besto av rask innfrysing og tining i romtemperatur av flatpakket vakuumert prøve.

Tabell 16: Forbehandling og lagringsbetingelser for nordsjøsil. Eddiksyre og Na-metabisulfitt ble tilsatt fra 30 % stamløsninger.

	Behandling	Temperatur	Eddik	Na-metabiulfitt
1	Oppmalt	5 °C	-	-
2	Oppmalt	5 °C	0,2 %	0,1 %
3	Oppmalt	10 °C	-	-
4	Oppmalt	10 °C	0,2 %	0,1 %
5	Oppmalt	14 °C	-	-
6	Oppmalt	14 °C	0,2 %	0,1 %
7	Hel	10 °C	-	-
8	Hel	10 °C	0,2 %	0,1 %
9	Hel + vann (20 %)	10 °C	-	-
10	Hel + vann (20 %)	10 °C	0,2 %	0,1 %
11	Hel + hard fysisk behandling	10 °C	-	-
12	Hel + hard fysisk behandling	10 °C	0,2 %	0,1 %
13	Hel + fryst/tint	10 °C	-	-
14	Hel + fryst/tint	10 °C	0,2 %	0,1 %

Lagringen ble stoppet etter 3 døgn, den 10. juni. Helt råstoff (beholder 7-14) ble malt i kjøttkvern med hullskive 8 mm. Prøver ble tatt ut til direkte bakteriologiske analyser. Prøver ble tatt ut til utsentrifugering av olje for FFA, AV og PV analyser. Før sentrifugering ved 11.000 rpm/20 min ble prøve varmebehandlet ved 70 °C/20 min. Utsentrifugerte oljeprøver ble flushet med N₂ gass og fryselaagret ved -30 °C før analyse. Separate prøver til analyse av TVN/TMA og biogene aminer ble vakuumpakket og oppbevart ved -30 °C før analyse.

Analysemetoder

Tørrstoff (ISO 6496), Protein (ISO 5983), Aske (ISO 5984), Fett Bl&D (Intern metode), Vannløselig råprotein (Intern metode), Kimtall på Long & Hammer Agar, 15 °C (NMKL 184, Aerobic counts and specific spoilage organisms in fish and fish products). TVN, TMA, TMAO etter Conway's mikrodifusjonsmetode (Intern metode). Biogene aminer (Intern metode basert på IFOMA), FFA (AOAC Ca 5A-40), Peroksid-tall (AOAC Cd 8b-90), Anisidin-tall (AOAC Cd 18-90).

5.3.2 Resultater og konklusjon

Analysene viser at biproduktene som ble brukt i forsøket hadde god kvalitet i utgangspunktet (Tabell 17). Biproduktene var imidlertid lett bedervelige noe som trolig skyldtes høyt åteinnhold i mage-tarm noe som normalt også følges av rik tarmflora.

Tabell 17: Analyser i oppmalt prøve av biprodukter fra filetering av Nordsjøsild ved Pelagia Austevoll

Analyse	Enhet	Resultat
TS	%	32,7
Råprotein (Nx6,25)	%	14,0
Aske	%	4,1
Fett (BL&D)	%	15,0
Hydrolysegrad (OPA)	%	20,8
Vannløselig råprotein	% av total råprotein	29,4
TVN	mg N/100 g	9
TMA	mg N/100 g	<1
TMAO	mg N/100 g	16
Putrecin	mg/kg	18
Cadaverin	mg/kg	31
Histamin	mg/kg	11
FFA (utsentrifugert olje)	%	1,3
PV (utsentrifugert olje)	meq peroksid/kg	3,7
AV (utsentrifugert olje)		1,7
Totox (2xPV+AV)		9,1

Analysene av TVN og biogene aminer (putrecin, cadaverin og histamin) (Tabell 3) viser at tilsetning av eddik (0,2 %) og Na-metabisulfitt (0,1 %) bidrar til å hindre bederving av råstoffet. Effekten av konservering er klart bedre i oppmalt råstoff enn i helt råstoff. Etter 3 dager holder oppmalt konservert råstoff kravene til TVN og histamin (grense: 200 mg/kg) ved alle lagringstemperaturene mens oppmalt ukonservert råstoff

overstiger kravene ved alle temperaturene. Forsøkene med helt råstoff viser at hardhendt fysisk behandling av råstoffet har negativ effekt mens vanntilsetning har en viss positiv effekt.

Analysene av oljen (Tabell 18) viser at FFA øker med økende lagringstemperatur og hemmes av konserveringen. FFA dannes hovedsakelig enzymatisk, men i dette forsøket der bakterietallene var svært høye, bidrar trolig lipaseproduserende bakterier til FFA dannelsen.

Konservering med eddik og sulfitt påvirket TOTOX lite. Det er vist i tidligere forsøk at eddik alene har negativ effekt men at sulfitt kan oppveie dette. TOTOX avtar ved økende temperatur (og økende bedervingsgrad) som trolig skyldes at bakterier forbruker luftens oksygen. Frysing/tinging av råstoffet før lagring fører til økt fettharskning.

Tabell 18: Kjemiske og bakteriologiske analyser i biprodukter fra Nordsjø-sild etter 3 dager lagring ved ulike betingelser og etter ulik forbehandling. Mikrobiologiske verdier er gitt i eksponentiell form (eksempel $1,8E4 = 18000$)

	Konser- vering	Temp °C	TVN mgN/100 g	TMA mgN/100 g	Putre mg/kg	Cadav mg/kg	Histam mg/kg	Kim LH KDE/g
Oppmalt	-	5	77	23	325	607	523	7,3E7
Oppmalt	+	5	28	8	19	75	10	1,8E4
Oppmalt	-	10	103	27	384	685	515	7,1E7
Oppmalt	+	10	31	9	18	89	11	9,0E4
Oppmalt	-	14	179	34	603	1010	523	3,1E7
Oppmalt	+	14	40	12	21	326	27	1,9E7
Hel	-	10	114	27	458	1024	567	1,2E8
Hel	+	10	58	21	92	855	246	5,5E7
Hel + vann (20 %)	-	10	92	22	340	919	493	8,0E8
Hel + vann (20 %)	+	10	47	17	80	668	181	1,0E8
Hel + hard fys. beh.	-	10	128	29	544	1050	602	1,6E8
Hel + hard fys. beh.	+	10	67	20	154	933	346	1,7E8
Hel + fryst/tint	-	10	95	26	323	927	503	2,4E8
Hel + fryst/tint	+	10	61	19	87	865	252	6,2E7

Tabell 19: Kjemiske analyser i utsentrifugert olje fra biprodukter fra Nordsjøsilde etter 3 dager lagring ved ulike betingelser og etter ulik forbehandling

	Konservering	Temp °C	FFA %	PV meq/kg	AV	TOTOX
Oppmalt	-	5	4,1	6,3	3,9	16,5
Oppmalt	+	5	3,3	7,7	2,5	17,9
Oppmalt	-	10	5,0	6,5	2,9	15,9
Oppmalt	+	10	3,5	5,8	3,7	15,3
Oppmalt	-	14	5,8	2,0	1,0	5,0
Oppmalt	+	14	3,8	3,6	3,8	11,0
Hel	-	10	5,2	3,7	12,0	19,4
Hel	+	10	3,2	5,6	6,1	17,3
Hel + vann (20 %)	-	10	3,9	3,2	6,1	12,5
Hel + vann (20 %)	+	10	2,9	5,0	3,5	13,5
Hel + hard fys. beh.	-	10	4,3	3,9	4,4	12,2
Hel + hard fys. beh.	+	10	3,6	5,1	5,0	15,2
Hel + fryst/tint		10	3,6	4,1	15,0	23,2
Hel + fryst/tint	+	10	3,2	9,2	10,0	28,4

5.4 Sammendrag kjemisk konservering av restråstoff fra silde

Total flyktig nitrogen (TVN) og biogene aminer

Analyse av TVN og de biogene aminene putrecin, cadavarin og histamin i lagret samfengt restråstoff fra nordsjøsilde (72 timer ved 5, 10 og 14 °C) viser at tilsetning av eddiksyre (0,2 %) og natriumsulfit (0,1 %) bidrar til å hindre bederving i råstoffet. Effekten er klart bedre i oppmalt råstoff enn i helt råstoff på grunn av bedre innblanding. Etter 72 timer lagring holdt restråstoffet kravene til TVN og histamin (> 200 mg/kg) ved alle lagringstemperaturene, mens oppmalt ukonservert råstoff overstiger kravene ved alle temperaturene.

Frie fettsyrer

Konservering med eddiksyre (0,2 %) og natriumsulfit (0,1 %) hadde en konserverende effekt på dannelsen av FFA. Imidlertid var effekten klart bedre i råstoff som hadde blitt oppmalt før innblanding av konserveringsmidler. Dette gjaldt både forsøkene med samfengt avskjær fra NVG-silde og samfengt avskjær fra nordsjøsilde.

Oksidasjonsstatus

Bruk av eddiksyre (0,2 %) til konservering av NVG-silde førte til økt oksidasjonsstatus på oljen produsert fra lagret konservert restråstoff. Konservering med sulfit alene ga en lavere oksidasjonsstatus, mens en blanding av eddiksyre og sulfit førte til økt oksidasjon.

Hydrolysegrad

Hydrolysegraden ble målt på limvann produsert fra lagret ukonservert og konservert restråstoff fra NVG-silde ved 4 og 12 °C i 96 og 144 timer.

Økt lagringstid fører til økt hydrolysegrad, noe som var tilfellet for alle kombinasjonene både ved 4 og 12 °C. Hydrolysegraden var også høyere for kombinasjonene lagret ved 12 °C sammenlignet med 4 °C. Av kombinasjonene sulfitt, eddiksyre og blanding av begge var det bruk av sulfitt som resulterte i lavest hydrolysegrad. En teori kan være at sulfitt påvirker aktiviteten til de endogene enzymene da natriumsulfitt bryter sulfid-bindinger i proteiner. Tilsetning av konserveringsmiddel til intakt eller kvernet råstoff hadde ingen påvirkning på hydrolysegraden.

5.5 Hel makrell – Pelagia Austevoll, august 2015

Restråstoff: Makrell, hel, levert fra brønnbåt samme dag som forsøksstart

Forsøk: Laboratorieforsøk

Forsøksvariable: Eddiksyre, Na-metabisulfitt, temperatur

Måleparametre: Holdbarhet/kvalitet

5.5.1 Materialer og metoder

Råstoff

Hel makrell ble hentet hos Pelagia Austevoll den 26. august 2015. Fisken var pakket i plastpose lagt i isoporkasse (flykasse) med is. Det ble opplyst at fisken var låssatt 21. – 24. august, levert 25. august til brønnbåten Ringaskjær og mottatt av Pelagia Austevoll den 26. august.

Makrellen ble bragt til Nofima og malt på kjøttkvern (hullskive 8 mm) innen ca 2 timer. Prøver av massen ble tatt ut til analyser. Resten av massen ble deretter blandet med vann, 1,66 l til 16,6 kg fisk.

Forsøksoppsett

Vi tok ut porsjoner à 1500 g fortennet masse som ble blandet med konserveringsmidler og delt i to til inkubering ved hhv 4 og 8 °C. Inkubatorskapene ble kontrollert med kalibrerte EBRO loggere og justert før forsøksstart.

Tabell 20: Innblanding av konserveringsmidler i råstoff (oppmalt makrell tilsatt 100 ml vann pr kg fisk). Hver porsjon ble delt på to og inkubert ved 4 og 8 °C i 6 døgn. pH ble målt ved start inkubering

Variant	Råstoff	30 %		Målt pH
		Eddik	Na metabisulfitt	
Ukonservert	1500 g	-	-	6,11
Eddik, 0,1 %	1500 g	5,0 ml	-	5,78
Eddik, 0,2 %	1500 g	10,0 ml	-	5,57
Na metabisulfitt, 0,05 %	1500 g	-	2,5 ml	6,11
Na metabisulfitt, 0,1 %	1500 g	-	5,0 ml	6,12
Eddik, 0,1 %, Na metabisulfitt, 0,05 %	1500 g	5,0 ml	2,5 ml	5,82
Eddik, 0,1 %, Na metabisulfitt, 0,1 %	1500 g	5,0 ml	5,0 ml	5,80
Eddik, 0,2 %, Na metabisulfitt, 0,05 %	1500 g	10,0 ml	2,5 ml	5,57
Eddik, 0,2 %, Na metabisulfitt, 0,1 %	1500 g	10,0 ml	5,0 ml	5,59

Forsøket ble stoppet etter inkubering i 6 dager, den 1. september. Prøver ble tatt ut til direkte bakteriologiske analyser og utsentrifugering av olje for FFA, PV og AV analyser. Før sentrifugering v. 11000 rpm/20 min ble 2 x 160 g porsjoner temperert i vannbad ved 65 °C/20 min. Oljeprøvene ble flushet med N₂ gass og fryselagret ved -30 °C før analyse. Separate prøver til analyse av TVN/TMA og biogene aminer ble vakuumpakket og oppbevart ved -30 °C før analyse.

Analysemetoder

Kimtall på Jern Agar, 22,5 °C (NMKL 184, Aerobic counts and specific spoilage organisms in fish and fish products). Kimtall på Long & Hammer Agar, 15 °C (NMKL 184, Aerobic counts and specific spoilage organisms in fish and fish products). Melkesyrebakterier på MRS Agar, 22,5 °C (ISO 15214, Mesophilic lactic acid bacteria). TVN, TMA, TMAO etter Conway's mikrodifusjonsmetode (Intern metode). Biogene aminer (Intern metode basert på IFOMA), FFA (AOAC Ca 5A-40), Peroksid-tall (AOAC Cd 8b-90), Anisidin-tall (AOAC Cd 18-90).

5.5.2 Resultater og konklusjon

Makrellen som ble brukt i forsøket hadde høyt bakterienivå, antagelig pga beiting og høyt åteinhold i mage/tarm. Høyt innhold av åte og fordøyelsesenzymer kan også forklare det hurtige kvalitetstapet som ble observert under lagring.

Tabell 21: Analyser i oppmalt ufortynnet makrell til konserveringsforsøket

Analyse	Enhet	Resultat
TS	%	36,1
Protein (Nx6,25)	%	17,3
Aske	%	2,3
Fett (BL&D)	%	16,2
TVN	mg N/100 g	12
TMA	mg N/100 g	<1
TMAO	mg N/100 g	10
Putrecin	mg/kg	5
Cadaverin	mg/kg	4
Histamin	mg/kg	3
FFA (utsentrifugert olje)	%	0,4
PV (utsentrifugert olje)	meq peroksid/kg	1,9
AV (utsentrifugert olje)		0,8
Totox (2xPV+AV)		4,6
Kimtall Jern-agar	KDE/g	2,7E5*
Kimtall L&H agar	KDE/g	4,3E6*
Melkesyrebakterier	KDE/g	2,0E2*

* Bakterietall er skrevet på standardform (potens) der 2,7E5 = 270.000, 4,3E6 = 4.300.000, 2,0E2 = 200.

Analysene etter 6 dager (Tabell 22) viser langt fremskreden bederving av ukonservert fisk, særlig ved høyeste lagringstemperatur. Bedervingsgraden står i forhold til bakterietallene. Det ble brukt tre ulike mikrobiologiske analyser for å karakterisere bakteriefloraen. Kimtall på Jern-agar og L&H agar skal begge gi et uttrykk for totaltall av bakterier. L&H agar gir generelt høyest resultat av de to og fanger derfor opp størst andel av totalfloraen. MRS-agar er spesifikk for melkesyrebakterier. Disse bakteriene spiller liten rolle for kvalitet på ukonservert fisk, men kan erfaringsmessig bli anriket i syrekonservert fisk lagret ved temperatur

over ca 5 °C. Når konsentrasjonen av melkesyre bakterier etter hvert blir høy nok bidrar også disse til bederving.

Eddiksyre har god konserveringseffekt: 0,1 og 0,2 % ved 4 °C og 0,2 % ved 8 °C hindret økning i antall bedervingsbakterier, jfr startnivå i tabell 2. Eddik kombinert med høyeste lagringstemperatur ga anrikning av melkesyre bakterier, men disse nådde så vidt et nivå i løpet av 6 dager hvor de vil ha betydning for utvikling av TVN og biogene aminer.

Sulfitt alene har liten effekt på bakterietallene etter 6 dager. Sulfitt kombinert med eddik har imidlertid hemmende effekt på bedervingsfloraen og på utvikling av TVN og biogene aminer. Sulfitt hindrer også effektivt fremveksten av melkesyre bakterier.

Tabell 22: Kjemiske og bakteriologiske analyser i råstoff etter lagring i 6 døgn ved 4 og 8 °C. Mikrobiologiske verdier er gitt i eksponentiell form (eksempel $3,2E6 = 3600000$)

Konservering	Temp °C	TVN mgN/100g	TMA mgN/100g	Putre mg/kg	Cadav mg/kg	Histid mg/kg	Kim JA KDE/g	Kim LH KDE/g	MRS KDE/g
Ukonservert	4	81	18	478	750	292	3,2E6	3,9E7	2,0E2
E:0,1	4	35	9	11	214	28	1,7E5	1,7E5	1,5E3
E:0,2	4	27	10	5	123	25	5,3E4	8,0E4	1,5E3
S:0,05	4	26	6	32	1052	319	3,0E7	3,7E7	4,0E2
S0,1	4	35	12	8	452	76	1,3E7	2,5E7	4,0E2
E:0,1 S:0,05	4	31	6	7	93	18	3,8E4	1,7E5	2,0E2
E:0,1 S:0,1	4	34	10	6	60	19	1,6E4	8,0E4	2,0E2
E:0,2 S:0,05	4	34	11	7	64	23	1,1E4	6,0E4	2,0E2
E:0,2 S:0,1	4	39	7	5	75	23	1,3E4	3,0E4	1,0E2
Ukonservert	8	186	30	918	1165	1430	2,4E6	3,7E7	5,0E3
E:0,1	8	152	28	732	1325	551	3,0E6	4,5E7	1,4E5
E:0,2	8	36	3	23	227	33	5,2E5	1,5E6	1,0E6
S:0,05	8	146	26	1042	1739	1643	1,0E7	5,8E7	5,0E2
S0,1	8	109	19	543	1722	1184	3,4E7	4,7E7	2,5E2
E:0,1 S:0,05	8	106	22	405	1293	187	3,3E7	5,3E7	8,0E2
E:0,1 S:0,1	8	56	17	47	506	64	1,4E6	1,0E7	5,0E1
E:0,2 S:0,05	8	44	8	33	144	24	1,4E5	2,9E5	5,0E2
E:0,2 S:0,1	8	46	13	32	111	26	3,8E4	9,0E4	2,0E1

FFA dannelse i olje regnes som en enzymatisk prosess, der lipaser fra fisken (bl.a. fordøyelsessystemet) spalter frie fettsyrer av triglycider og fosfolipider. I forsøket ga eddiktilsetning en svakt hemmende effekt på FFA dannelsen, mens sulfitt hadde ingen effekt.

TOTOX, beregnet som AV + 2PV, indikerer oljens oksidasjonsstatus. Primære oksidasjonsprodukter (peroxider) måles som PV. Disse kan nedbrytes videre til sekundære oksidasjonsprodukter (aldehyder o.a.) som gir uønsket smak og lukt. Sekundære oksidasjonsprodukter måles som AV.

I forsøket ga eddiktilsetning en klar negativ effekt på totox, mens sulfitt motvirket denne effekten. Den negative effekten av eddik kan skyldes jern- eller hemoglobinmediert oksidasjon som har lavt pH optimum.

Tabell 23: Kjemiske analyser i utsentrifugert olje fra råstoff etter lagring i 6 døgn ved 4 og 8 C. TOTOX er beregnet som 2PV+AV

Konservering	Temp °C	FFA %	PV meq/kg	AV	TOTOX (2PV +AV)
Ukonservert	4	4,8	2,6	3,3	8,5
E:0,1	4	4,5	5,7	8,7	20,1
E:0,2	4	4,1	6,5	10,4	23,4
S:0,05	4	5,5	2,6	4,5	9,7
S0,1	4	5,0	2,7	3,2	8,6
E:0,1 S:0,05	4	5,0	4,2	6,2	14,6
E:0,1 S:0,1	4	4,6	3,8	3,8	11,4
E:0,2 S:0,05	4	4,7	5,4	4,9	15,7
E:0,2 S:0,1	4	4,5	3,9	2,6	10,4
Ukonservert	8	5,4	1,2	2,2	4,6
E:0,1	8	5,5	1,5	6,2	9,2
E:0,2	8	5,1	8,3	9,9	26,5
S:0,05	8	6,1	2,4	3,1	7,9
S0,1	8	6,2	3,0	3,5	9,5
E:0,1 S:0,05	8	5,9	3,2	3,8	10,2
E:0,1 S:0,1	8	5,9	3,9	3,7	11,5
E:0,2 S:0,05	8	5,8	7,8	4,9	20,5
E:0,2 S:0,1	8	5,3	5,7	4,2	15,6

5.6 Hel makrell fersk – Pelagia Austevoll, september 2015

Restråstoff: Samfengt avskjær fra fersk makrell
Type forsøk: Laboratorieforsøk
Forsøksvariable: Temperatur, tid
Måleparametere: Effekt av lagringsbetingelser (tid og temperatur) på kvalitet av olje og vannløselig protein (limvann) produsert fra lagret samfengt makrellrestråstoff.

5.6.1 Materialer og metoder

Råstoff og forsøksoppsett

Fersk hel makrell fra Pelagia Austevoll ble transportert kjølt til SINTEF Fiskeri og havbruk sine lokaler i Trondheim hvor den ble filetert, blandet og gjort klar for lagring. 500 g kvernet samfengt restråstoff ble fordelt i zip-lock poser og lagret ved 4 og 10 °C i 0 til 120 timer. Etter 0, 24, 48, 72 og 120 timers lagring, ble råstoffet fordelt i 50 mL sentrifugerør og varmebehandlet ved > 90 °C for 15 min i vannbad. For å oppnå en rask temperaturøkning ble råstoffet først varmet opp til rundt > 80 °C i mikrobølgeovn. Etter varmebehandling ble råstoffet sentrifugert og separert i tre fraksjoner: olje, limvann og grakse.

5.6.2 Resultater og konklusjon

Kjemisk sammensetning restråstoff

Den kjemiske sammensetningen til restråstoffet som ble benyttet til lagringsforsøket er gitt i Tabell 24, mens fettsyresammensetningen er gitt i Tabell 25.

Tabell 24: Kjemisk sammensetning samfengt makrell restråstoff

	g/100 g restråstoff
Lipid	18,0
Protein	13,0
Aske (Mineraler)	3,0
Vann	66,0

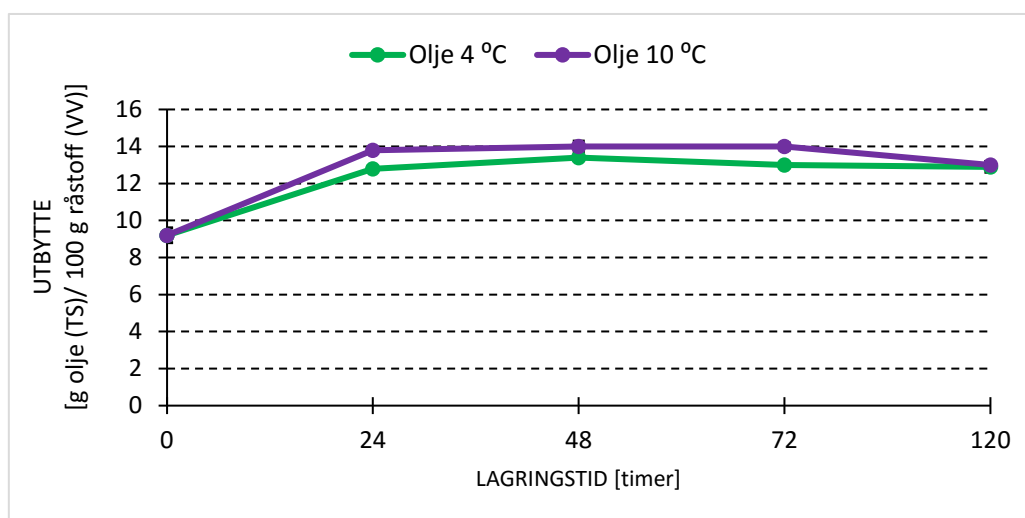
Tabell 25: Fettsyresammensetning i samfengt makrellrestråstoff

	% av total andel fettsyrer
Mettede fettsyrer	22 %
Enumettede fettsyrer	43 %
Flerumettede fettsyrer	30 %
Omega-3 fettsyrer	27 %
EPA, DHA og DPA	19 %

Effekt av lagringsbetingelser på utbytte og kvalitet av olje fra samfengt makrellrestråstoff

Oljeutbytte

Olje ble produsert ved varmebehandling fra restråstoff lagret ved 0, 24, 48, 72 eller 120 timer ved 4 ° eller 10°C. Utbyttet er gitt som g ekstrahert olje per kg samfengt restråstoff (Figur 19).



Figur 19: Utbytte av olje produsert fra restråstoff lagret ved 4 eller 10 °C i 0, 24, 48, 72 eller 120 timer

Oljen ble separert fra råstoffet ved sentrifugering ved 5500g, en lavere hastighet enn det som benyttes industrielt, men kan benyttes i laboratorieskala for å evaluere forskjeller mellom ulike parametere. Resultatene viser at lagring av restråstoffet i 24 timer gir en økt oljeutbytte fra 9 % til 13 – 14 % uavhengig av lagringstemperatur. Dette tyder på at lagring av råstoffet gjør at de endogene enzymene får tid til å virke, noe som gjør det lettere å frigjøre olje. Et oljeutbytte på 13 – 14 % betyr at 72 – 78 % av tilgjengelig fett i råstoffet har blitt ekstrahert ut (oil recovery), mens i ekstraksjon av olje fra fersk råstoff kun ga en 'oil recovery' på 50 %. Det var ingen endring i oljeutbytte ved lagring av råstoffet fra 24 til 120 timer, og kun noe høyere oljeutbytte fra råstoff lagret ved 10 °C. For å kunne ta ut mest mulig olje vil det være gunstig å lagre restråstoffet i 24 timer før varmebehandling. Imidlertid kan det føre til en reduksjon i oljekvalitet.

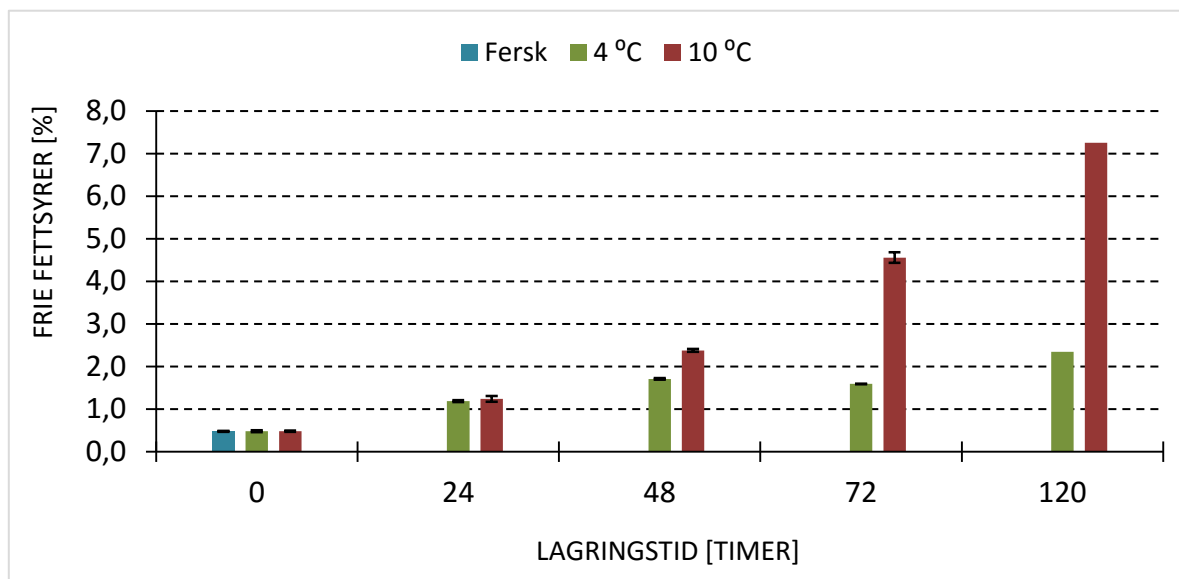
Frie fettsyrer

Frie fettsyrer er en viktig kvalitetsparameter for råoljer og sier noe om hvordan kvaliteten på råstoffet er og hva det har blitt utsatt for under lagring, transport og prosessering. Hvordan andel frie fettsyrer (% FFA) i oljen påvirkes av lagringsbetingelsene til råstoffet er vist i Figur 20.

Både lagringstemperatur og tid påvirker dannelsen av frie fettsyrer. Dannelsen av frie fettsyrer forårsakes av endogene enzymer (lipaser) som er naturlig tilstede i råstoffet. FFA øker med økning i temperatur da enzymer er temperaturavhengige og har høyere aktivitet ved høyere temperaturer.

Resultatene viser en raskere dannelsen av FFA i råstoff lagret ved 10 °C sammenlignet med 4 °C. Lagring av råstoff i 120 timer ved 4 °C resulterte i en økning i FFA fra 0,5 % til 2,3 %, mens lagring ved 10 °C resulterte i en økning i FFA fra 0,5 % til 7,2 %. Imidlertid så er det ingen signifikante forskjeller i % FFA i oljer produsert fra restråstoff lagret i 24 timer ved 4 °C og 10 °C (begge 1,2 %).

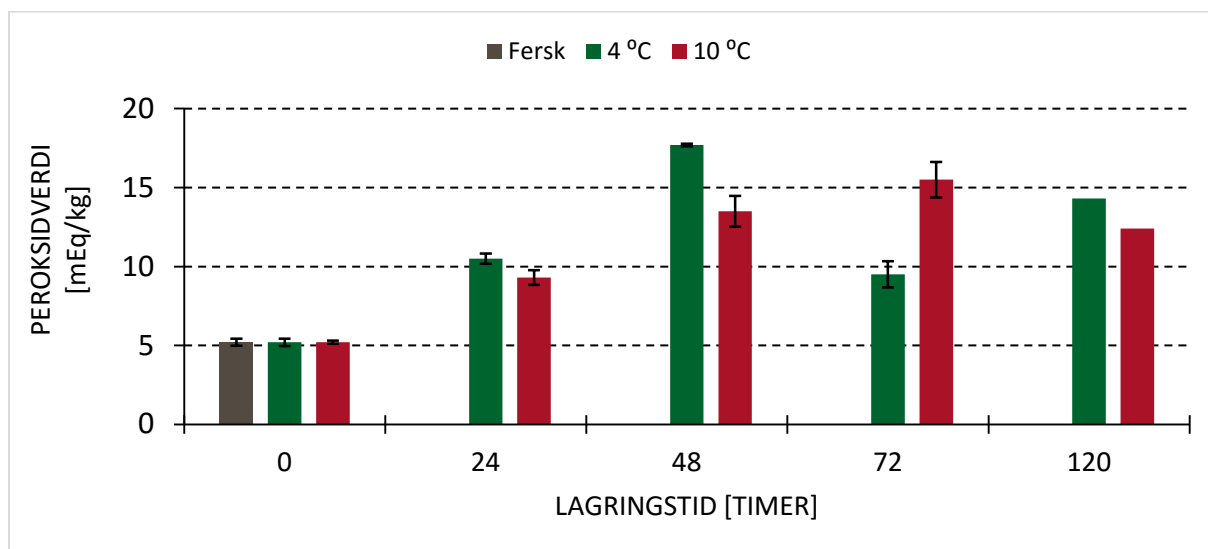
Krav til % FFA varierer mellom de ulike råoljekjøperne, men de fleste ønsker at en råolje som skal benyttes til humant konsum ikke overstiger et FFA-nivå på 2 %. Helst skal den ligge under 1 %.



Figur 20: Andel frie fettsyrer (% FFA) i oljer produsert ved varmebehandling fra restråstoff lagret ved 4 eller 10 °C i 0, 24, 48, 72 og 120 timer.

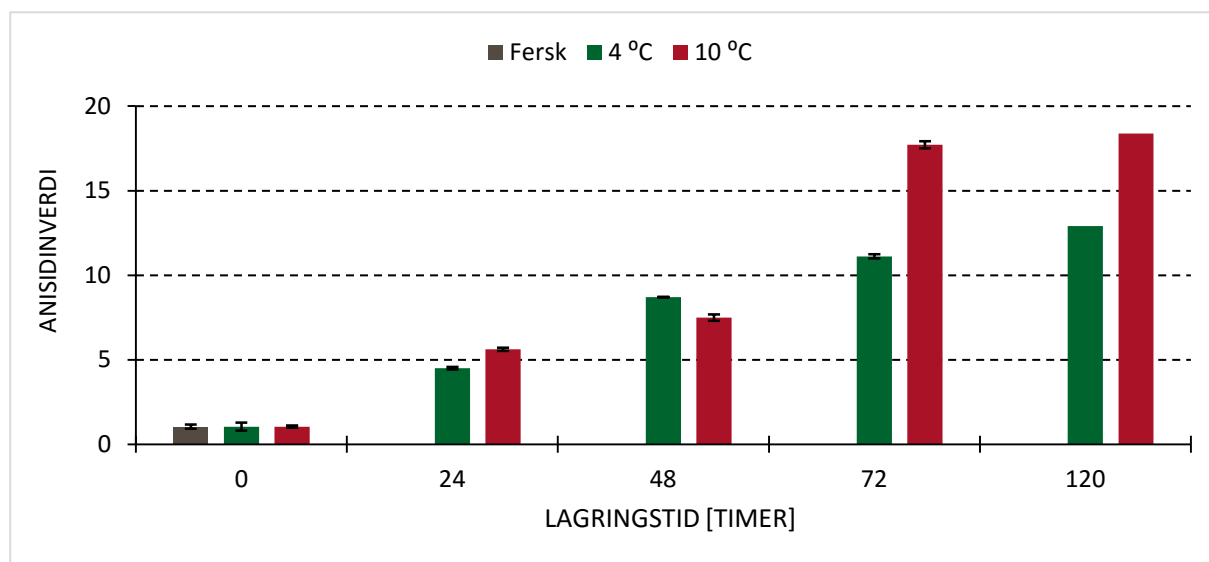
Oksidasjonsstatus på oljer produsert fra lagret restråstoff

Oksidasjonsstatus på de produserte oljene er evaluert ved peroksidverdi (PV) (primære oksidasjonsprodukter) og anisidinværdi (AV) (sekundære oksidasjonsprodukter; aldehyder), to metoder som benyttes industrielt for evaluering av oljekvalitet. Total oksidasjon (TOTOX) kan beregnes ved $TOTOX = 2PV + AV$. PV og AV i oljer produsert fra lagret råstoff ved 4 °C og 10 °C er vist i Figur 21 og Figur 22.



Figur 21: Peroxidverdi (PV) i oljer produsert fra restråstoff lagret ved 4 og 10 °C i 0, 24, 48, 72 og 120 timer.

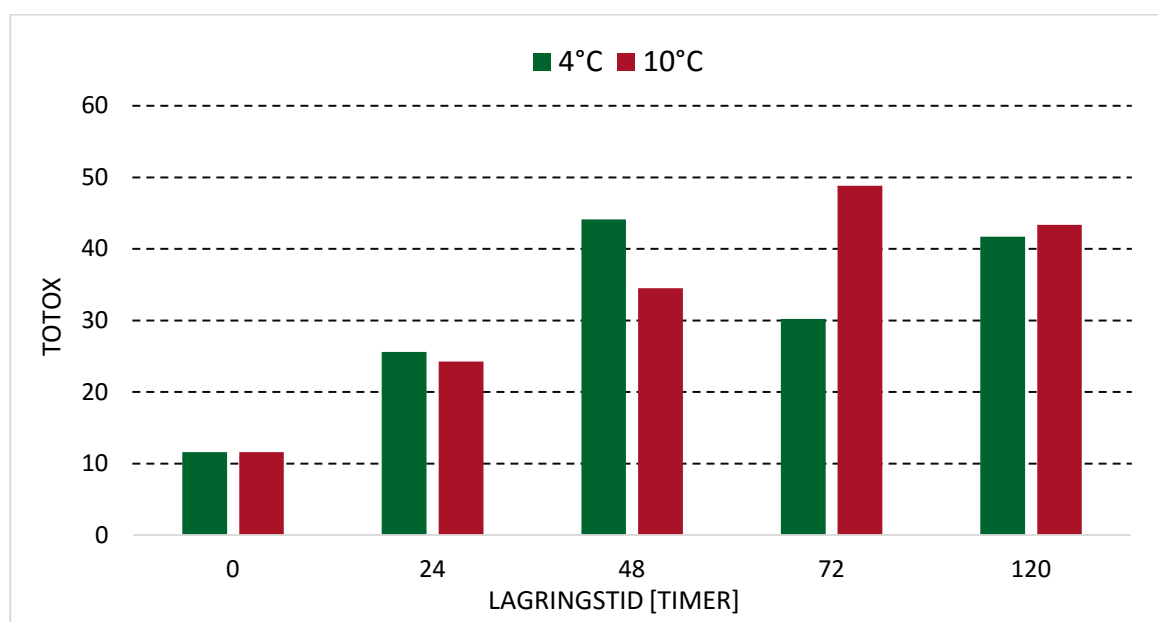
Oljen produsert fra ferskt restråstoff hadde en PV på $5,3 \pm 0,4$ meq peroksid/kg. En rask økning i PV ble observert både for oljer produsert fra lagret restråstoff ved 4 og 10 °C. PV var høyest i oljer produsert fra råstoff lagret ved 48 timer ved 4 °C og 72 timer ved 10 °C. Deretter fulgte en reduksjon i PV forårsaket av at de primære oksidasjonsproduktene brytes ned og danner ulike typer sekundære oksidasjonsprodukter. Årsaken til en raskere økning i PV ved 4 enn 10 °C er at løseligheten av oksygen er høyere ved lavere temperaturer.



Figur 22: Anisidilverdi (AV) i oljer produsert fra restråstoff lagret ved 4 og 10 °C i 0, 24, 48, 72 og 120 timer.

Økning i AV ble observert gjennom hele lagringsperioden. Lagring ved 10 °C førte til høyere dannelse av sekundære oksidasjonsprodukter (målt som alderhyder) sammenlignet med 4 °C.

Total oksidasjon ble beregnet ved $2PV + AV = TOTOX$ og er vist i figur Figur 23.



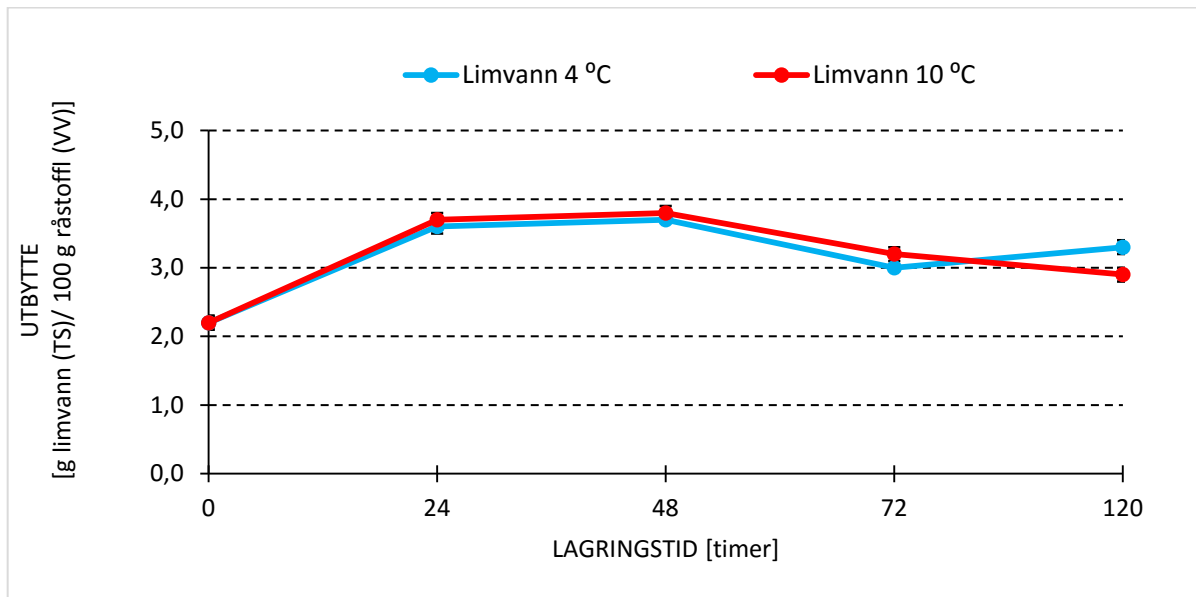
Figur 23: Total oksidasjon (TOTOX = 2PV + AV) i oljer produsert fra restråstoff lagret ved 4 og 10 °C i 0, 24, 48, 72 og 120 timer.

Raskere økning i TOTOX for oljen produsert fra restråstoff lagret ved 4 °C gjenspeiler en raskere økning i PV ved 4 °C enn 10 °C. PV og AV for råoljer ligger vanligvis på henholdsvis 3 – 20 meq peroksid/kg og 4–60. For at råoljen skal kunne benyttes til humant konsum bør oksidasjonsparameterene var så lave som mulig og det er ønskelig at PV skal ligge under 10 meq/kg og AV under 20. Det betyr at olje fra ukonservert restråstoff bør produseres innen 24 timer for å hindre høye peroksidverdier.

Effekt av lagringsbetingelser på utbytte og kvalitet av limvann (vannløselige protein) fra samfengt makrellrestråstoff

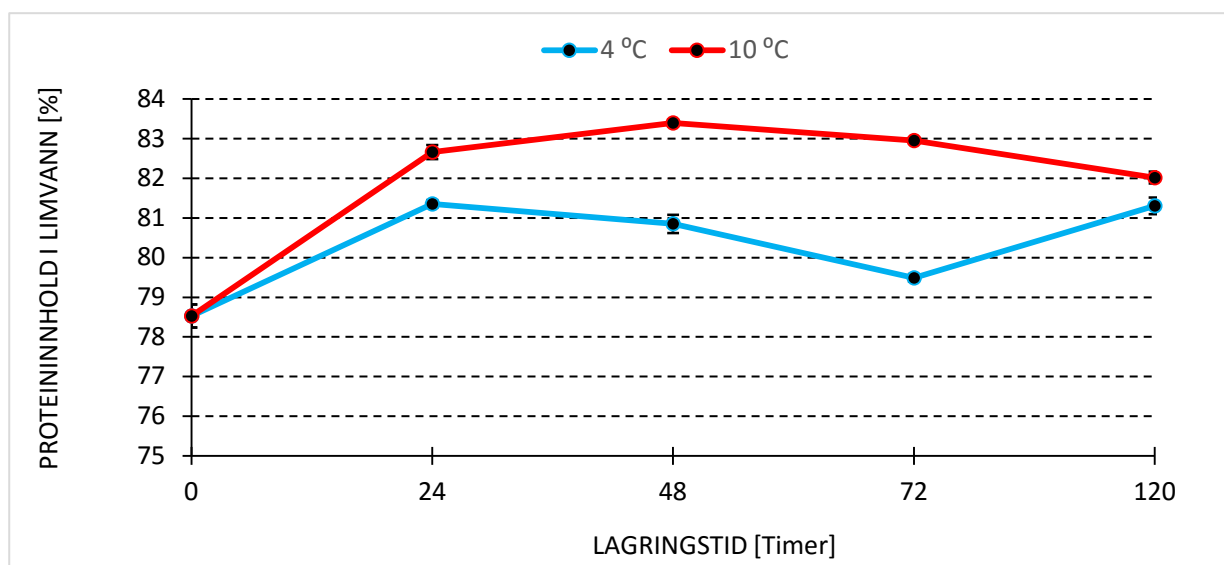
Utbytte og proteininnhold

Utbyttet av limvann viser samme trend som oljeutbyttet, en rask økning i utbytte fra 0 til 24 timers lagring uavhengig av lagringstemperatur (Figur 24). Etter 48 timers lagring av råstoffet observeres en nedgang i utbytte. Årsaken til dette kan være økt nedbrytning av proteinene, høyere emulgeringsevne og dermed økt andel av proteiner som ender opp i graksen.



Figur 24: Utbytte av limvann produsert fra restråstoff lagret ved 4 eller 10 °C i 0, 24, 48, 72 eller 120 timer

Lagringstemperatursbetingelser påvirket også innholdet av protein i limvannet (Figur 25). Limvannet produsert fra restråstoff lagret ved 10 °C hadde et høyere proteininnhold enn limvann produsert fra restråstoff lagret ved 4 °C uavhengig av lagringstid. De endogene enzymene er mer aktiv ved høyere temperaturer, noe som resulterer i høyere nedbrytning av proteinene, økt løselighet og dermed høyere proteininnhold i limvannet.

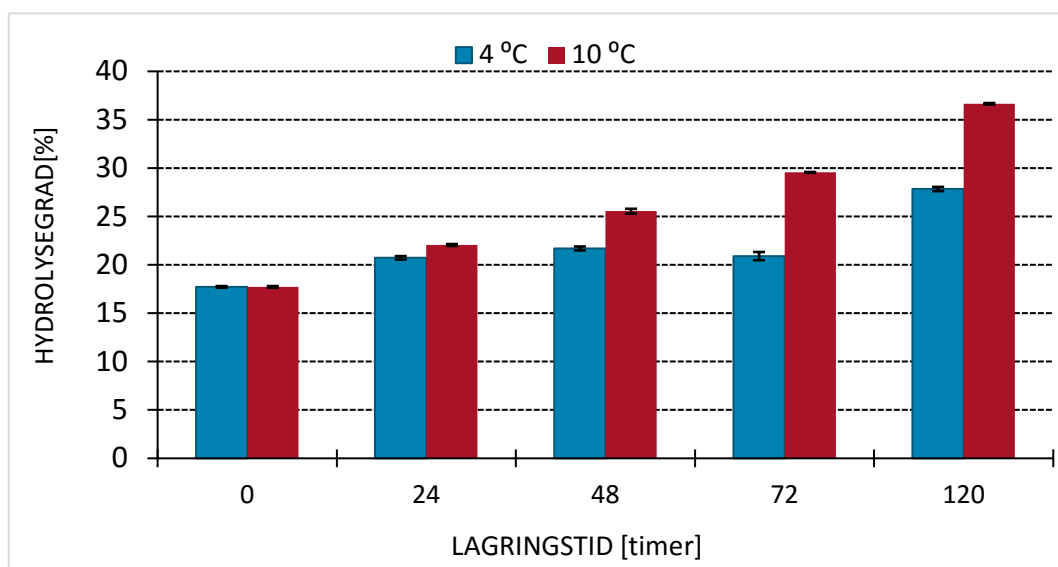


Figur 25: Proteininnholdet i frysetørket limvann produsert fra restråstoff lagret ved 4 og 10 °C i 0, 24, 48, 72 og 120 timer.

Hydrolysegrad

Hydrolysegrad er et mål hvor stor andel av proteinkjedene som er blitt spaltet til mindre enheter, peptider og aminosyrer. Hydrolysegrad er gitt i % frie aminogruupper. Proteaser tilgjengelig i restråstoffet vil bryte ned proteinkjedene over tid og det er forventet at hydrolysegraden vil øke med økt lagringstid.

Hydrolysegraden til limvannet produsert fra lagret restråstoff er vist i Figur 26.



Figur 26: Hydrolysegraden til limvann produsert fra restråstoff lagret ved 4 og 10 i 0, 24, 48, 72 og 120 timer

Hydrolysegraden økt fra $17,7 \pm 0,1$ % til $27,8 \pm 0,4$ % for limvann produsert fra restråstoff lagret ved 4 °C og fra $17,7 \pm 0,1$ % til $36,6 \pm 0,4$ % for limvann fra restråstoff lagret ved 10 °C. Raskere nedbrytning av proteinkjeder ved 10 °C enn 4°C gjenspeiles i raskere økning i hydrolysegrad ved 10 °C.

5.7 Hel makrell fryst – Pelagia Austevoll, september 2016

Restråstoff:	Samfengt avskjær fra frossen makrell
Type forsøk:	Laboratorieforsøk
Forsøksvariable:	Eddiksyre, Natriumsulfitt, Rosmarinekstrakt og Naturox
Måleparametere:	Effekt av konserveringsmidler på kvalitet av olje og vannløselig protein (limvann).

5.7.1 Materialer og metoder

Råstoff og forsøksoppsett

Fryst makrell ble transportert fra Pelagia Austevoll med Hurtigruta til SINTEF Fiskeri og havbruk sine lokaler i Trondheim. Makrellen ble oppbevart på – 25 °C før forsøkskjøring. Makrell ble tint over natt i romtemperatur, før den ble filetert og restråstoffet ble kvernet og gjort klart for innblanding av konserveringsmidler. 11 ulike kombinasjoner ble undersøkt: 1) Ukonservert, 2 og 3) Eddiksyre (0,2 %), 4 og 5) Natriumsulfitt (0,1 %), 6 og 7) Blanding av eddiksyre (0.2 %) og natriumsulfitt (0,1 %), 8 og 9) Rosmarin ekstrakt, og 10 og 11) Naturox. Forsøksoppsettet er vist i Tabell 26. Restråstoffet ble lagret ved 4 og 12 °C i 120 timer. Etter 0, 24, 48, 72 og 120 timers lagring, ble råstoffet fordelt i 50 mL sentrifugerør og varmebehandlet ved > 90 °C for 15 min i vannbad. For å oppnå en rask temperaturøkning ble råstoffet først varmet opp til rundt > 80 °C i mikrobølgeovn. Etter varmebehandling ble råstoffet sentrifugert og separert i tre fraksjoner: olje, limvann og grakse. Prøver etter 0, 48 og 120 timer har blitt analysert.

Tabell 26: Forsøksoppsett konservering av makrellrestråstoff

Forsøk #	Forsøksbeskrivelse	Eddiksyre 0.2 %	Natriumsulfitt 0.1 %	Rosmarinekstrakt	Naturox	Lagringstid [timer]
1	Ukonservert					120
2	Eddiksyre, 4 °C	X				120
3	Eddiksyre, 12 °C	X				120
4	Sulfitt, 4 °C		X			120
5	Sulfitt, 12 °C		X			120
6	Eddiksyre + Sulfitt, 4 °C	X	X			120
7	Eddiksyre + Sulfitt, 12 °C	X	X			120
8	Rosmarinekstrakt, 4 °C			X		120
9	Rosmarinekstrakt, 12 °C			X		120
10	Naturox, 4 °C				X	120
11	Naturox, 12 °C				X	120

Analysemetoder:

Kvalitet på oljen ble analysert ved å måle frie fettsyrer etter metoden til Bernardez et al⁵, mens peroksidverdi er analysert etter metoden AOAC Cd 8b-90 og anisidinverdi etter metoden AOAC Cd 18-90. Hydrolysegrad ble analysert ved formoltitrering etter metoden til Taylor et al.⁶.

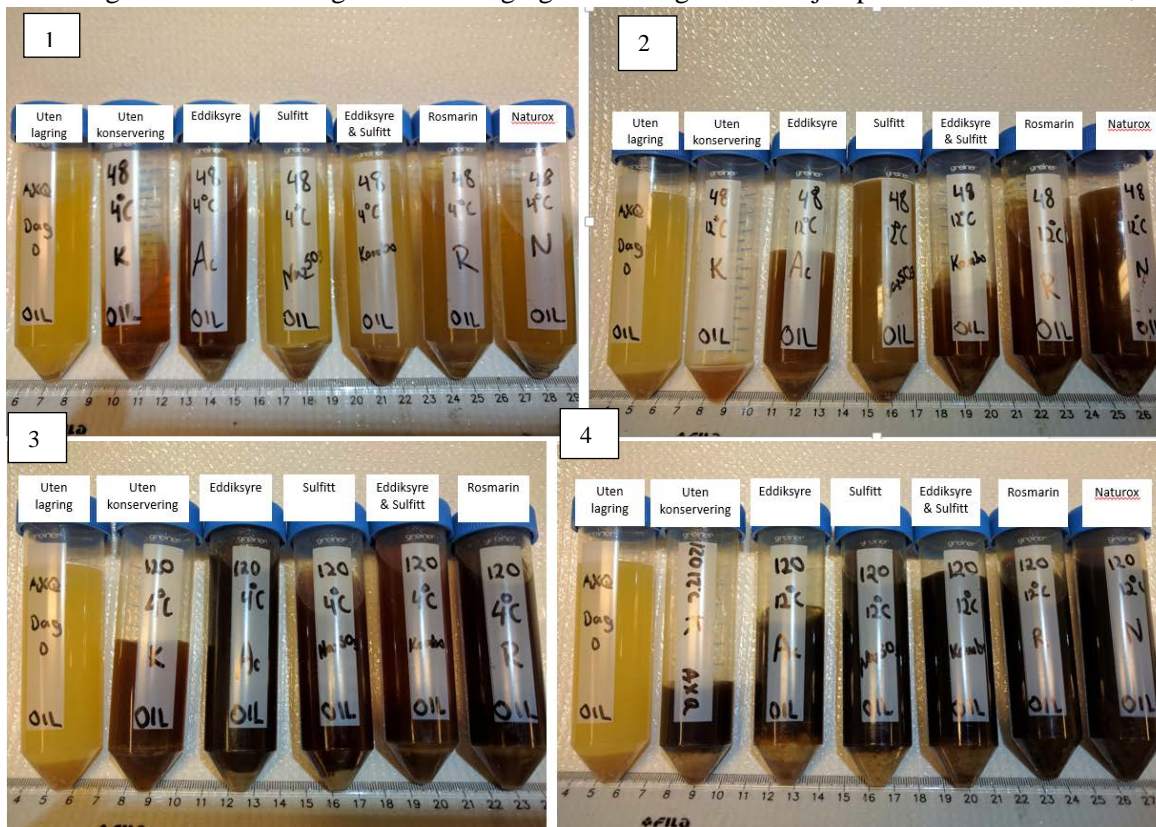
⁵ Bernárdez, M., L. Pastoriza, G. Sampedro, J. J. R. Herrera and M. L. Cabo (2005). "Modified method for the analysis of free fatty acids in fish." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(6): 1903-1906.

⁶ Taylor, W. H. (1957). "Formol titration: An evaluation of its various modifications." *The Analyst*: 488-498.

5.7.2 Resultater og konklusjon

Effekt av konserveringsmidler på oljekvalitet

Oljene produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert råstoff lagret ved 4 og 12 °C er vist i Figur 27. Fargen på oljen påvirkes av både lagringstemperatur, lagringstid og bruk av konserveringsmiddel. Økende misfarging med økende lagringstid og temperatur. Natriumsulfitt bidrar til å hemme misfargingen til en viss grad, mens tilsetning av eddiksyre gir raskere misfarging. Oljer fra restråstoff lagret i 120 timer ved både 4 og 12 °C hadde stor grad av misfarging sammenlignet med oljen produsert fra råstoffet før lagring.

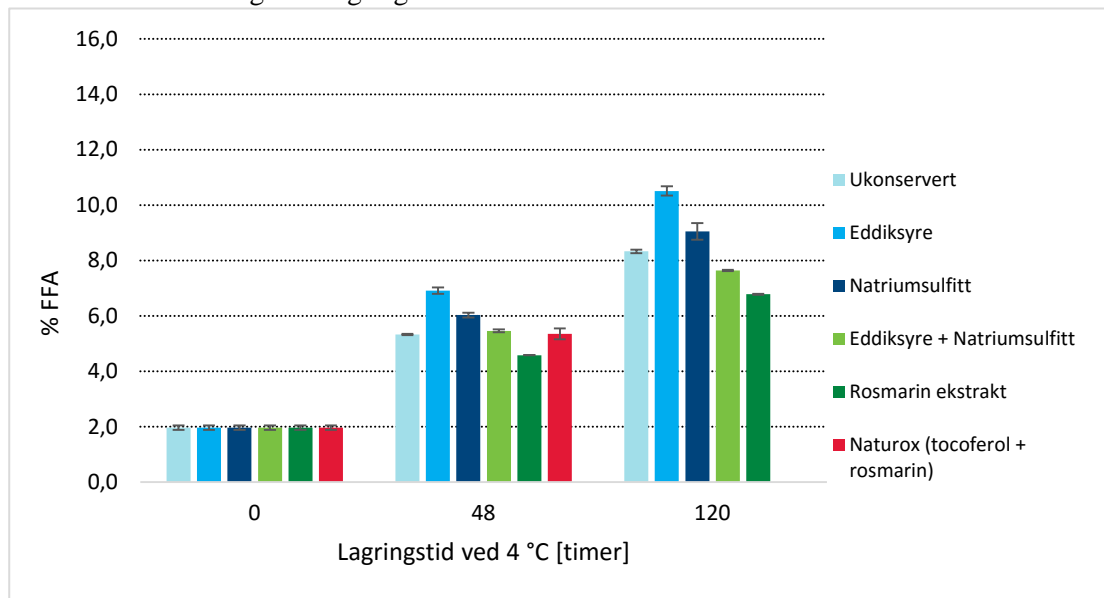


Figur 27: Oljer produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert makrellrestråstoff. Øverst fra venstre: 1) Oljer produsert fra ukonservert restråstoff før lagring, fra ukonservert restråstoff lagret ved 4 °C i 48 timer og fra konservert råstoff lagret ved 4 °C i 48 timer, 2) Oljer produsert fra ukonservert restråstoff før lagring, fra ukonservert restråstoff lagret ved 12 °C i 48 timer og fra konservert råstoff lagret ved 12 °C i 48 timer, 3) Oljer produsert fra ukonservert restråstoff før lagring, fra ukonservert restråstoff lagret ved 12 °C i 48 timer og fra konservert råstoff lagret ved 12 °C i 48 timer og 4) Oljer produsert fra ukonservert restråstoff før lagring, fra ukonservert restråstoff lagret ved 12 °C i 120 timer og fra konservert råstoff lagret ved 12 °C i 120 timer.

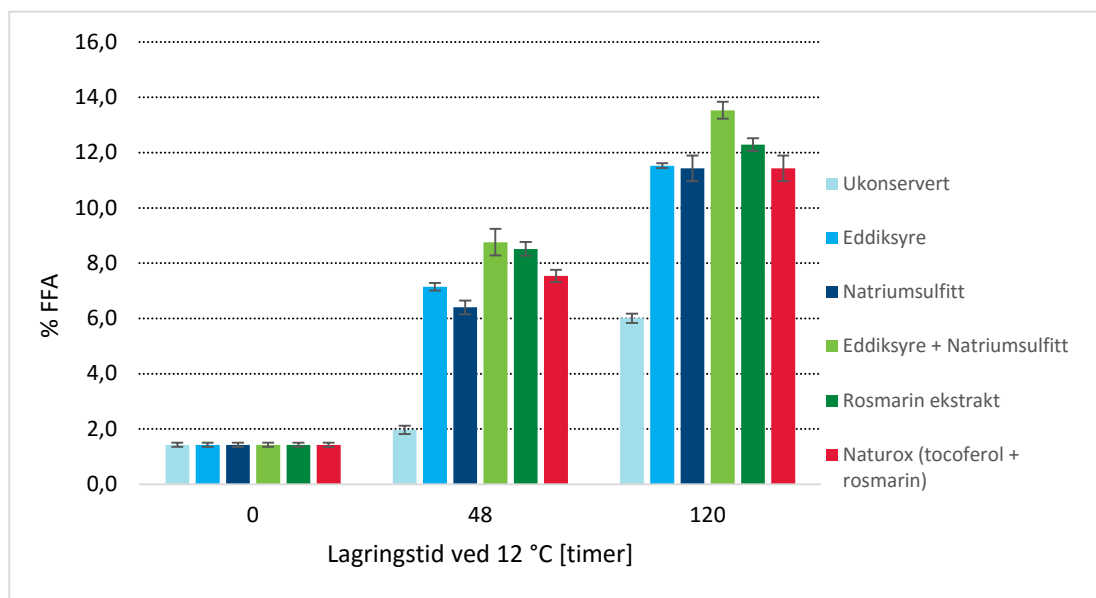
Tidligere studier har vist at høyt innhold av primære og sekundære oksidasjonsprodukter i oljen fører til en misfarging og mørk farge på oljen [8]. Dette er spesielt tilfellet i råoljer hvor proteinrester forekommer. Misfarging av lipidene i en olje med proteinrester skjer ved at 1) dannelsen av lipidperoksider, 2) dannelsen av komponenter som enten er fargeløse eller svakt fargede ved at peroksider reagerer med proteiner og 3) dannelsen av fargeløse eller svakt fargede komponenter som er forløpere til brune pigmenter [9]. Det har blitt vist at oksidasjonsprodukter fra lipider i nærvær av trimetylamin kan gi opphav til rødfargede komponenter [10]. Samtidig er det sett at oksidasjonsprodukter (alkanaler, alkenaler og dialdehyder) kan reagere med aminosyrene lysin og arginin i proteiner, nukleinsyrer og fosfolipider og resultere i dannelsen av fargede produkter som gir en brunfarge i oljen [11].

Frie fettsyrer

Andel frie fettsyrer i oljene produsert fra ukonservert og konservert restråstoff lagret ved 4 og 12 °C i 48 og 120 timer er vist i Figur 28 og Figur 29.



Figur 28: Andel frie fettsyrer (% FFA) målt i oljer produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert restråstoff etter 0, 48 og 120 timer lagring ved 4 °C.

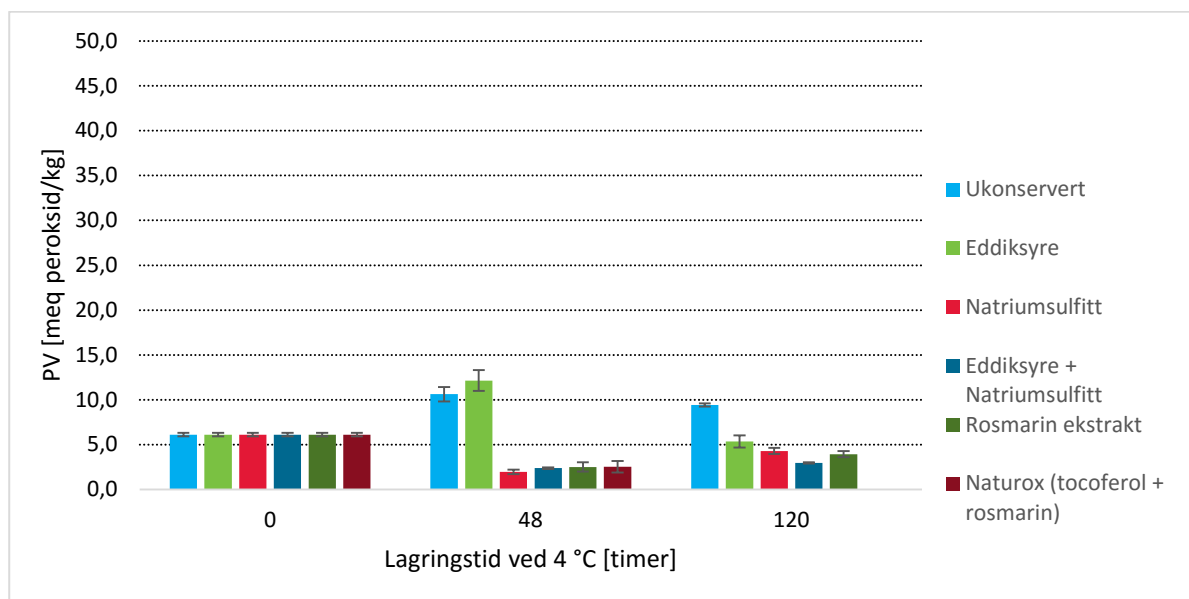


Figur 29: Andel frie fettsyrer (% FFA) målt i oljer produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert restråstoff etter 0, 48 og 120 timer lagring ved 12 °C.

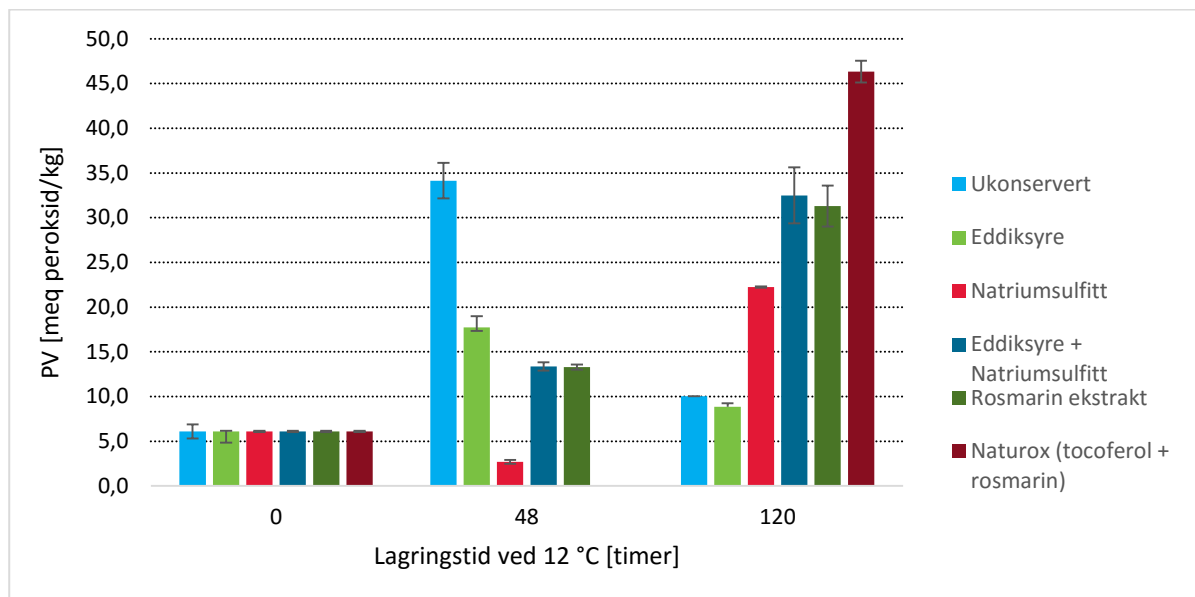
Ingen av konserveringsmidlene som ble testet (natriumsulfitt, eddiksyre, rosmarinekstrakt og Naturox) hadde en hemmende effekt på FFA dannelsen. Generelt raskere FFA dannelse ved 12 °C sammenlignet med oljer produsert fra råstoff lagret ved 4 °C.

Oksidasjonsstatus

Oksidasjonsstatus på de produserte oljene er evaluert ved peroksidverdi (PV) (primære oksidasjonsprodukter) og anisidinverdi (AV) (sekundære oksidasjonsprodukter; aldehyder), to metoder som benyttes industrielt for evaluering av oljekvalitet. Total oksidasjon (TOTOX) kan beregnes ved $TOTOX = 2PV + AV$. PV og AV i oljer produsert fra lagret råstoff ved 4 °C og 12 °C er vist i Figur 30 - Figur 33.



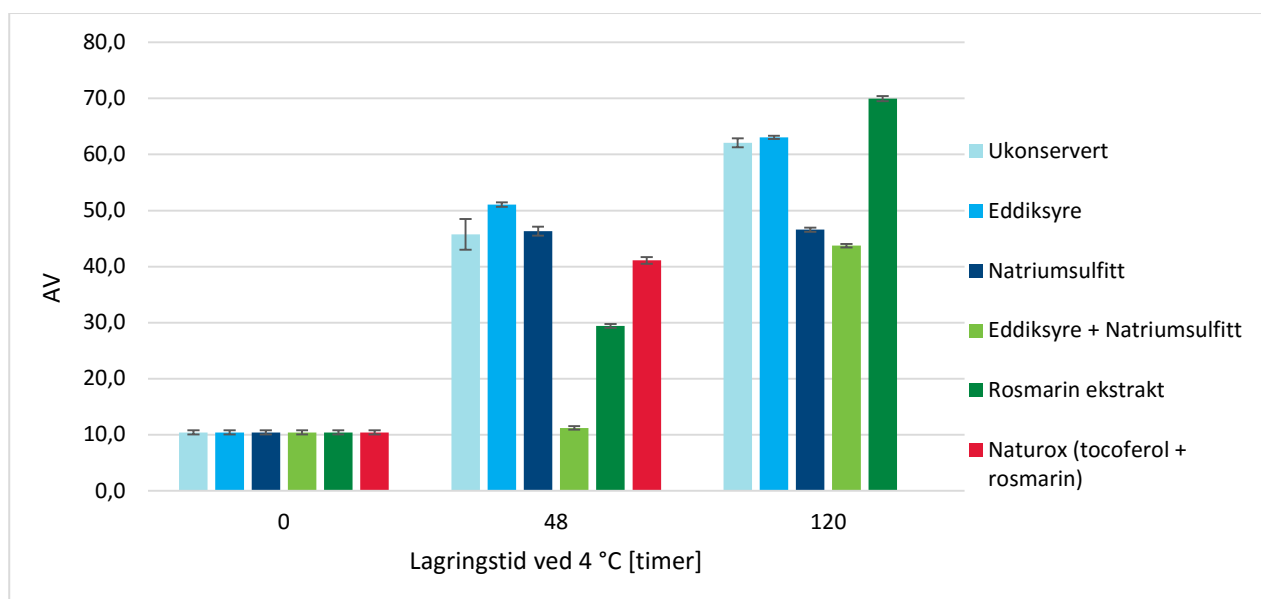
Figur 30: Peroxidverdi (PV) målt i oljer produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert restråstoff etter 0, 48 og 120 timer lagring ved 4 °C.



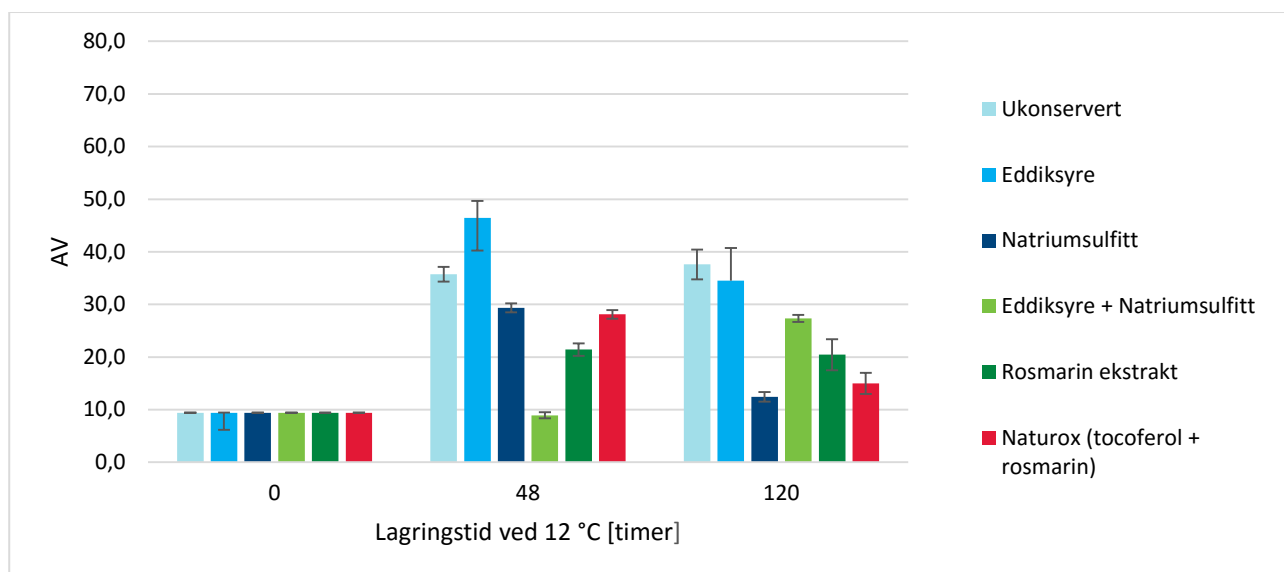
Figur 31: Peroxidverdi (PV) målt i oljer produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert restråstoff etter 0, 48 og 120 timer lagring ved 12 °C.

Bruk av eddiksyre alene som konserveringsmiddel førte til høyere PV (primære oksidasjonsprodukter) sammenlignet med natriumsulfitt, blanding av eddiksyre og sulfitt, rosmarinekstrakt eller Naturox i oljer produsert fra råstoff lagret i 48 timer ved 4 °C. Årsaken til dette kan være at hemoglobin er mer potent pro-oxidant ved lavere pH og dermed bidrar til økt oksidasjonshastighet. Natriumsulfitt, rosmarinekstrakt og naturox har alle antioksidative egenskaper og hemmer oksidasjon.

Primære oksidasjonsprodukter vil etterhvert brytes ned til sekundære forbindelser, noe som gir lavere PV med økt lagringstid. Som forventet ble det observert høyere peroksidverdier ved 12 °C sammenlignet med 4 °C.

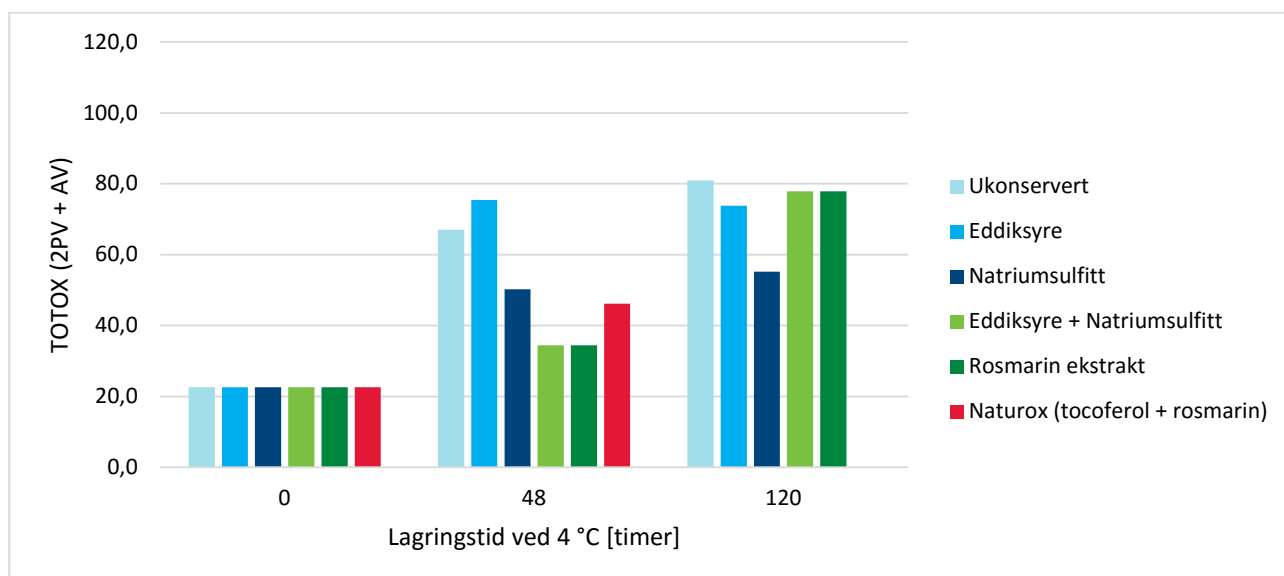


Figur 32: Anisidinverdi (AV) målt i oljer produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert restråstoff etter 0, 48 og 120 timer lagring ved 4 °C.

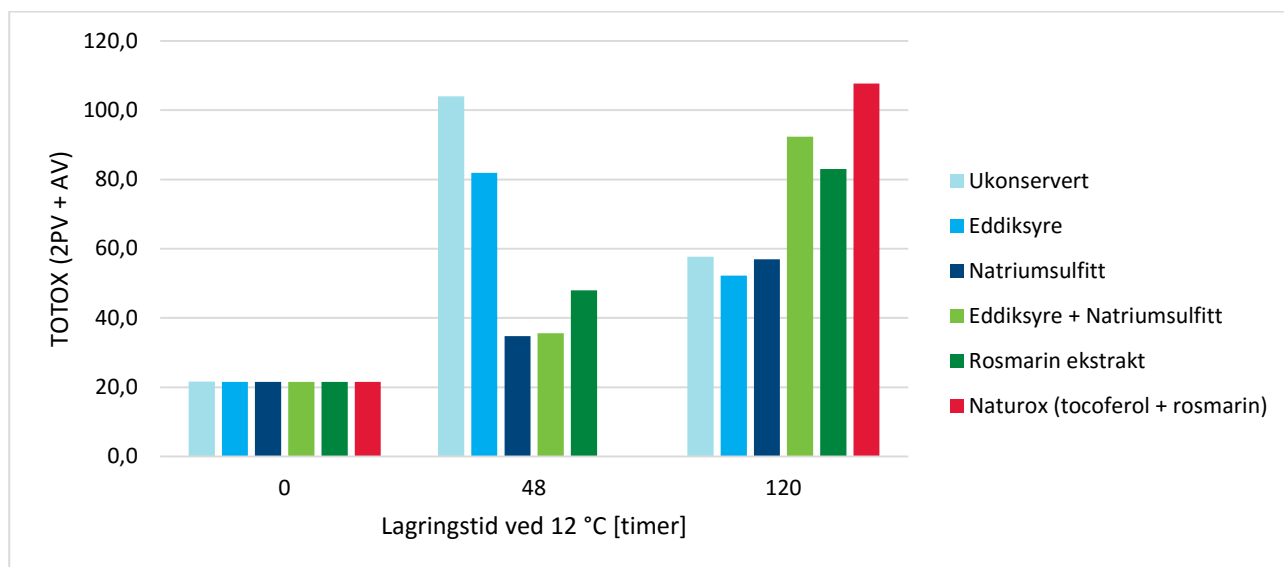


Figur 33: Anisidinverdi (AV) målt i oljer produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert restråstoff etter 0, 48 og 120 timer lagring ved 12 °C.

Eddiksyre hadde også negativ effekt på AV og førte til økt dannelse av sekundære oksidasjonsprodukter, mens sulfitt, rosmarin ekstrakt og naturox hadde en hemmende effekt på lipidoksidasjon og resulterte i lavere AV.



Figur 34: Total oksidasjon (TOTOX = 2PV + AV) målt i oljer produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert restråstoff etter 0, 48 og 120 timer lagring ved 4 °C.

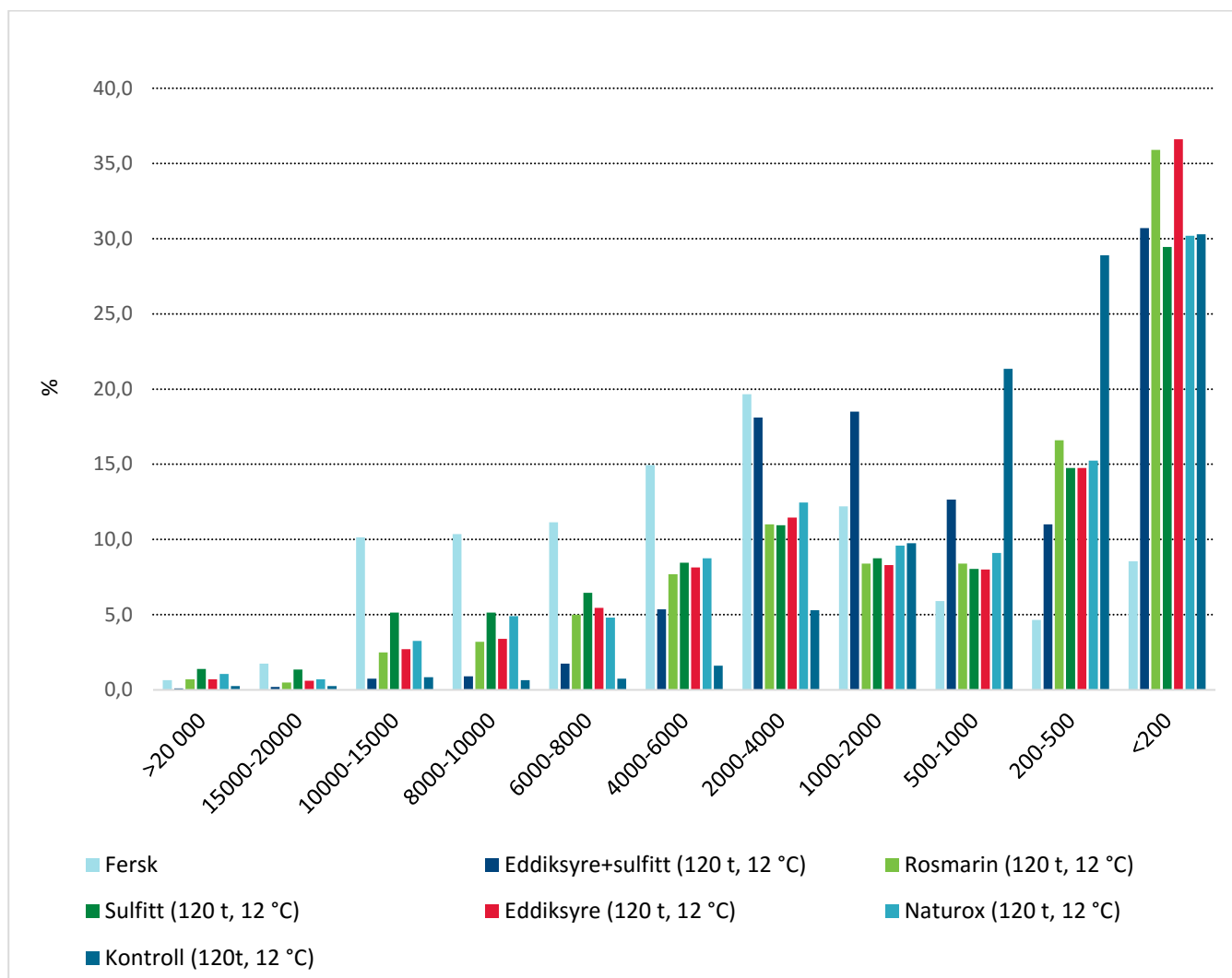


Figur 35: Total oksidasjon (TOTOX = 2PV + AV) målt i oljer produsert ved varmebehandling fra ukonservert og konservert restråstoff etter 0, 48 og 120 timer lagring ved 12 °C.

Ut fra TOTOX-verdiene var det kombinasjonen av eddiksyre og sulfitt som hadde best effekt på lipidoksidasjon og ga en betraktelig reduksjon i oksidasjon i oljen produsert fra lagret råstoff i 48 timer ved både 4 og 12 °C. Rosmarinekstrakt og natriumsulfitt alene hadde også en hemmende effekt på lipidoksidasjonen. Etter 120 timers lagring ved 4 °C hadde oljen produsert fra råstoff konservert med sulfitt lavere TOTOX-verdier sammenlignet med de andre kombinasjonene. Imidlertid var ikke dette tilfellet ved produksjon av olje produsert fra råstoff lagret ved 12 °C.

Molekylvektfordeling

Molekylvektfordelingen i limvann produsert fra restråstoff lagret i 120 timer ved 12 °C ble analysert for å se på hvordan bruk av konserveringsmidler påvirket fordelingen. Resultatene er vist i **Figur 36**. Bruk av konserveringsmidlene forlenger nedbrytningen av proteinkjedene.



Område (Da)	Fersk	Ukonserverte	Eddiksyre	Natriumsulfitt	Eddiksyre + sulfitt	Rosmarin	Naturox
>20 000	0,7 %	0,3 %	0,7 %	1,4 %	0,1 %	0,7 %	1,1 %
15000-20000	1,8 %	0,3 %	0,6 %	1,4 %	0,2 %	0,5 %	0,7 %
10000-15000	10,2 %	0,9 %	2,7 %	5,2 %	0,8 %	2,5 %	3,3 %
8000-10000	10,4 %	0,7 %	3,4 %	5,2 %	0,9 %	3,2 %	4,9 %
6000-8000	11,2 %	0,8 %	5,5 %	6,5 %	1,8 %	5,0 %	4,8 %
4000-6000	15,0 %	1,6 %	8,2 %	8,5 %	5,4 %	7,7 %	8,8 %
2000-4000	19,7 %	5,3 %	11,5 %	11,0 %	18,1 %	11,0 %	12,5 %
1000-2000	12,2 %	9,8 %	8,3 %	8,8 %	18,5 %	8,4 %	9,6 %
500-1000	5,9 %	21,4 %	8,0 %	8,1 %	12,7 %	8,4 %	9,1 %
200-500	4,7 %	28,9 %	14,8 %	14,8 %	11,0 %	16,6 %	15,3 %
<200	8,6 %	30,3 %	36,6 %	29,5 %	30,7 %	35,9 %	30,2 %

Figur 36: Molekylvektfordeling i limvann produsert fra ukonserverte og konserverte restråstoff fra makrell lagret i 120 timer ved 12 °C.

5.8 Sammen drag kjemisk konservering av restråstoff fra makrell

Total flyktige nitrogen (TVN) og mikrobiologi

TVN og mikrobiologi ble analysert i konserverert og ukonserverert makrell lagret i 144 timer ved 4 og 8 °C. Resultatene viste at eddiksyre (0,1 og 0,2 %) hadde en god konserveringseffekt på ved 4 og 8 °C og hindret økning i bakterietallet. Natriumsulfitt (0,1 %) alene hadde liten effekt på bakterietallene etter 144 dager. Sulfitt kombinert med eddiksyre hadde imidlertid en hemmende effekt på bedervingsfloraen og på utvikling av TVN.

Biogene aminer

Eddiksyre (0,2 %), natriumsulfitt (0,1 %) og en blanding av eddiksyre (0,2 %) og natriumsulfitt (0,1 %) hadde en positiv effekt på dannelsen av biogene aminer. Bruk av eddiksyre (0,2 %) og eddiksyre sammen med sulfitt hemmet dannelsen av putrecin, cadaverin og histidin under lagring av makrell ved både 4 og 8 °C. Sulfitt alene ga en hemmet dannelsen av putrecin og histidin ved 4 og 8 °C og dannelsen av putrecin, cadaverin og histidin ved 4 °C. Kombinasjon av eddiksyre (0,2 %) og natriumsulfitt (0,1 %) ga best konserverende effekt.

Frie fettsyrer (FFA)

Et lagringsforsøk på fersk restråstoff fra makrell (etter manuell filetering) ble gjennomført for å studere effekt av lagringstid (0 – 120 timer) og lagringstemperatur (4 og 10 °C) på kvaliteten til olje produsert fra lagret restråstoff (september 2015). Olje produsert fra fersk restråstoff hadde en FFA på 0,5 %. En raskere dannelse av FFA ved 10 °C sammenlignet med 4 °C ble observert. Dette er i overensstemmelse med at aktiviteten til de endogene enzymene påvirkes av temperatur og er høyere ved høyere temperatur. Lagring av restråstoffet i 120 timer ved 4 °C resulterte i en økning i FFA fra 0,5 til 2,3 %, mens lagring ved 10 °C resulterte i en FFA økning fra 0,5 til 7,2 %. Imidlertid var det ingen signifikante forskjeller i % FFA i oljer produsert fra restråstoff lagret i 24 timer ved 4 eller 10 °C (begge 1,2 %).

Resultater fra to ulike konserveringsforsøk på makrell viste at ingen av de uttestede konserveringsmidlene (eddiksyre, natriumsulfitt, blanding av eddiksyre og natriumsulfitt, rosmarinekstrakt og Vitalox) hadde en effekt på dannelsen av frie fettsyrer. Kontroll på temperatur under lagring og transport er viktig for å bevare kvaliteten på råstoffet og hindre økt dannelsen av FFA.

Oksidasjonsstatus

Olje produsert fra ferskt restråstoff (manuell filetering) hadde en peroksidverdi (PV) på $5,3 \pm 0,4$ meq peroksid/kg og en AV på $1,0 \pm 0,2$, noe som tilsvarer en total oksidasjon (TOTOX) på $11,6 \pm 0,4$ meq. Oksidasjonsstatusen på oljen påvirkes av kvaliteten på restråstoffet og øker med økt tid og temperatur. En rask økning i PV ble observert både ved 4 og 10 °C. Høyest verdier ble funnet i oljer produsert fra restråstoff lagret i 48 timer ved 4 °C og i 72 timer ved 10 °C, etterfulgt av en reduksjon i PV forårsaket av nedbrytning av primære oksidasjonsprodukter og dannelse av sekundære oksidasjonsprodukter. Årsaken til en raskere økning i PV ved 4 enn 10 °C kan være på grunn av økt løselighet av oksygen ved lavere temperaturer. Dette gjenspeilet seg i raskere økning i total oksidasjon ved 4 °C enn 10 °C.

Råolje som skal benyttes til humant konsum bør ha så lave som mulig oksidasjonsverdier og helst er det ønskelig at PV ligger under 10 meq/kg og AV under 20. Basert på dette bør ukonserverert makrellrestråstoff produseres innen 24 timer for å hindre høye peroksidverdier.

I konserveringsforsøket gjennomført på makrell ble det benyttet frossen hel makrell som ble tint og filetert manuelt. Oljen ekstrahert ved varmebehandling før lagring hadde en PV på 6,1 meq peroksid/kg og en AV på 9,4. Restråstoffet ble lagret ved 4 og 12 °C og følgende konserveringsmidler/antioksidanter ble testet:

eddiksyre (0,2 %), natriumsulfitt (0,1 %), blanding av eddiksyre og natriumsulfitt, rosmarinekstrakt og Naturox (rosmarinekstrakt og tocoferol). Bruk av eddiksyre alene førte til økt oksidasjon og en olje med høyere oksidasjonsstatus sammenlignet med olje produsert fra ukonservert restråstoff. Årsaken til dette er at pro-oksideranter tilstede i restråstoffet (hemoglobin og jern) er mer effektive ved lavere pH og dermed forårsaket økt oksidasjonshastighet. Bruk av sulfitt alene, en blanding av eddiksyre og sulfitt, rosmarinekstrakt eller Naturox resulterte i lavere oksidasjonsstatus. Trenden var den samme ved 4 og 12 °C. Imidlertid er oksidasjonshastigheten som forventet høyere ved 12 °C enn 4 °C.

Kvalitetsendringer i makrellrestråstoff skjer raskt og allerede før 48 timers lagring var PV verdiene høyere enn 10 meq peroksid/kg råstoff og AV høyere enn 20 for restråstoff lagret ved 12 °C. Kun oljen fra restråstoff konservert med sulfitt hadde en PV > 10 meq/kg peroksid og kun olje fra restråstoff konservert med sulfitt og eddiksyre hadde en AV < 20.

Farge

Fargen på makrelloljen påvirkes av både lagringstemperatur, lagringstid og bruk av konserveringsmiddel. Natriumsulfitt bidrar til å hemme misfargingen, mens eddiksyre gir raskere misfarging.

Hydrolysegrad og molekylvektfordeling

Hydrolysegraden økte fra $17,7 \pm 0,1$ % til $27,8 \pm 0,4$ % for limvann produsert fra restråstoff lagret ved 4 °C og fra $17,7 \pm 0,1$ % til $36,6 \pm 0,4$ % for limvann fra restråstoff lagret ved 10 °C. Raskere nedbrytning av proteinkjeder (høyere aktivitet på endogene proteaser) ved 10 °C enn 4 °C gjenspeiles i raskere økning i hydrolysegrad ved 10 °C.

Molekylvektfordelingen ble analysert for limvannet produsert fra ukonservert og konservert restråstoff lagret i 120 timer ved 12 °C. Resultatene samsvarer resultatene fra lagringsforsøket (hydrolysegrad) om at det skjer en raskere nedbrytning i ukonservert restråstoff. Konservering med eddiksyre og sulfitt bidrar til å hemme nedbrytning av proteinene under lagring.

6 Diverse forsøk

6.1 Sulfitrester i ferdigprodukter

6.1.1 Bakgrunn

Na-metabisulfit i kombinasjon med syre har vist seg å være effektivt som konserveringsmiddel for restråstoff fra fisk. I følge forskrift om tilsetningsstoffer i næringsmidler kan stoffet regnes som et «teknisk hjelpestoff» dersom restmengdene i sluttproduktet ikke utgjør noen helserisiko eller virker teknisk inn på det ferdige produktet. I motsatt fall er det et «tilsetningsstoff» som bare kan anvendes dersom det er oppført i en liste over godkjente tilsetningsstoffer og er godkjent for anvendelse i aktuelt produkt/produktkategori.

I forsøkene ble sulfitt tilsatt i form av Na-metabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Sulfitt i produktene ble målt som total SO_2 vha Boehringer Mannheim Enzymatic Bioanalysis, Cat.no. 10 725 854 035.

Det ble gjort forsøk i laboratorie- og industriskala der restråstoff ble tilsatt Na-metabisulfit og senere prosessert under standard betingelser. Sulfitrest ble målt i mel og olje produsert fra konserver og ukonservert råstoff.

6.1.2 Resultater og konklusjon

Sulfitrest i mel etter varmluftstørking på lab og etter industriell fiskemelprosess er i snitt mindre enn 1/10 av tilsatt konsentrasjon i råstoffet (Tabell 1). Hvis en tar hensyn til at råstoffet også er konsentrert opp x5 i prosessen så gjenfinnes mindre enn 1/50 av tilsatt sulfitt i produktet. Restnivået er ikke høyere enn bakgrunnsnivået i fiskemel produsert av ikke-konservert råstoff.

Tabell 27: Tilsatt sulfitt (som Na-metabisulfit og omregnet til SO_2) og målt restkonsentrasjon av SO_2 i fiskemel

	Råstoff	pH	$\text{Na}_2\text{O}_5\text{S}_2$ g/l	SO_2 g/l		SO_2 rest g/kg
Lab	Mel+vann (1+4)	6,0	0,45	0,30	Varmluft, kons.x5, 105 °C	0,05
Lab	Mel+vann (1+4)	5,0	0,45	0,30	Varmluft, kons.x5, 105 °C	0,04
Fabrikk BO	NVG-sild avskjær	-	0,25	0,17	Industriprosess	0,00
Fabrikk BO	NVG-sild avskjær	-	1,00	0,67	Industriprosess	0,04
Fabrikk BI	Laks hode/rygg	5,4	1,30	0,90	Industriprosess	0,08
Fabrikk XX	-	-	-	-	Industriprosess	0,06
Fabrikk BO	-	-	-	-	Industriprosess	0,02
Fabrikk BI	-	-	-	-	Industriprosess	0,08

Sulfitrest i fiskeolje etter industriell fiskeoljeprosess er ikke målbar med den brukte metoden. Det var heller ikke forventet at sulfitt skulle gå over i oljefasen ettersom stoffet er lite fettløselig.

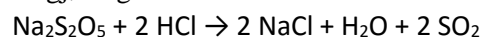
Tabell 28: Tilsatt sulfitt (som Na-metabisulfitt og omregnet til SO₂) og målt restkonsentrasjon av SO₂ i fiskeolje

	Råstoff	pH	Na ₂ O ₅ S ₂ g/l	SO ₂ g/l		SO ₂ rest g/l
Fabrikk BO	NVG-sild avskjær	-	0,25	0,17	Industriprosess	0,00
Fabrikk BI	Laks hode/rygg	5,4	1,30	0,90	Industriprosess	0,01
Fabrikk VE	-	-	-	-	Industriprosess	0,00

Sulfittrest i konsentrerte proteinhydrolysater fra konservert råstoff er høyere enn i tilsvarende konsentrater fra ikke-konservert råstoff. Sulfittkonsentrasjonen i konsentrat fra surgjort råstoff er betydelig lavere enn i konsentrat fra nøytralt råstoff.

Etter prosessering av råstoff med pH 5,0 er sulfittkonsentrasjon i produktet omtrent samme som i råstoffet, men hvis det forutsettes at vannfasen etter hydrolysen er x10 oppkonsentrert i inndampingstrinnet så er likevel rundt 90 % av sulfitten avdrevet i prosessen.

Frigjøring av SO₂ fra Na-metabisulfitt er pH avhengig;



Tabell 29: Restkonsentrasjon av sulfitt (SO₂) i konsentrert proteinhydrolysat

	Råstoff	pH	Na ₂ O ₅ S ₂ g/l	SO ₂ g/l		SO ₂ rest g/l
Lab	Hydrolysat+vann (1+9)	6,2	0,45	0,30	Vakuuminnd., kons.x10, 75 °C	1,03
Lab	Hydrolysat+vann (1+9)	5,0	0,45	0,30	Vakuuminnd., kons.x10, 75 °C	0,38
Fabrikk BI	Laks hode/rygg	5,4	1,30	0,90	Industriprosess	0,79
Fabrikk BI	Laks hode/rygg	5,4	1,30	0,90	Industriprosess	0,63
Fabrikk BI	-	-	-	-	Industriprosess	0,28
Fabrikk BI	-	-	-	-	Industriprosess	0,17
Fabrikk BI	-	-	-	-	Industriprosess	0,14
Fabrikk BI	-	-	-	-	Industriprosess	0,16
Fabrikk BI	-	-	-	-	Industriprosess	0,08

Konklusjon

Sulfitt som tilsettes i restråstoff fra fisk drives av i en standard fiskemelprosess slik at det ikke finnes restkonsentrasjon i mel eller olje som overstiger bakgrunnsnivået i produkter av ukonservert råstoff.

Sulfitt som tilsettes i restråstoff fra fisk drives ikke fullstendig av ved produksjon av inndampet proteinhydrolysat. Surgjøring før prosessering gir økt avdriving.

6.2 Molekylærbiologiske undersøkelser av bakterieflora

6.2.1 Bakgrunn

Sammensetning av bakteriefloraen i fisk er vanskelig å bestemme kun med dyrkingsbaserte analyse-metoder. Bakterier kan stille vidt forskjellige krav til dyrkingsbetingelser og ingen metoder vil derfor fange opp alle bakterietyper. I våre forsøk har det blitt brukt flere ulike dyrkingsbaserte metoder og i to av forsøkene ble det i tillegg benyttet en molekylærbiologisk metode som gir detaljert informasjon om mengdeforholdet mellom ulike bakterietyper men som ikke sier noe om floraens størrelse

6.2.2 Materialer og metoder

Dyrkingsbaserte metoder

Long & Hammer Agar, 15 °C

Metoden ga de høyeste resultatene noe som betyr at den detekterer størst andel av totalfloraen. Metoden skal detektere kuldetolerante og varmesensitive bakterier som *Photobacterium phosphoreum*.

Jern-Agar, 22,5 °C

Metoden ga i de fleste tilfeller betydelig lavere resultater enn Long & Hammer Agar. Denne metoden skal detektere ikke-varmesensitive bakterier, f.eks. *Shewanella* arter som er kjent for å bidra sterkt til bederving av fisk selv om de ikke er tallmessig dominerende.

M.R.S. Agar, 22,5 °C

Metoden detekterer melkesyrebakterier som normalt har liten betydning for holdbarheten av kjølt fisk, men som kan anrikes og bidra til bederving i syrekonservert fisk, særlig ved temperaturer over 5 °C.

Jernsulfittagar, 37 °C

Metoden detekterer sulfittreduerende bakterier som kan vokse anaerobt (uten oksygen), særlig clostridier.

MiSeq analyse

MiSeq er en DNA sekvensieringsteknologi som anvendes på bakterie-DNA ekstrahert fra komplekse prøver som f.eks. næringsmidler. MiSeq skiller ikke mellom levende og døde bakterier eller mellom dyrkbare og ikke-dyrkbare bakterier.

MiSeq analyser ble utført på prøver fra to konserveringsforsøk, et med innmat fra laks og et med makrell. 2 ml av primærsuspensjonene (x10 fortykning) av prøver som ble brukt til bakteriologisk analyse ble sentrifugert og pelletet frosset ned for senere MiSeq analyse. DNA ble rensset fra pelletet vha MoBio Powersoil Kit kolonner før PCR V4 på 16S rDNA med barcodes. PCR produkt ble så kjørt på gel og kvantifisert vha picogreen. Noen prøver viste seg å ha for lav konsentrasjon av PCR produktet til å bli analysert på MiSeq.

Figur 37 viser bakteriefloraens sammensetning på slektsnivå (genus). Alle slekter med gjennomsnittsverdi i alle prøver over 0,1 % er tatt med.

6.2.3 Resultater og konklusjon

Innmat laks (kapittel 4.3)

Råstoffet som ble brukt hadde i utgangspunktet lave bakterietall målt med dyrkingsbaserte metoder. Etter lagring i 5 dager hadde alle ukonserverte prøver høye bakterietall og MiSeq analysene viste at floraen hovedsakelig besto av *Photobacterium* ($\geq 87\%$) med et lite innslag av *Aliivibrio* og familie *Mycoplasmatacea*.

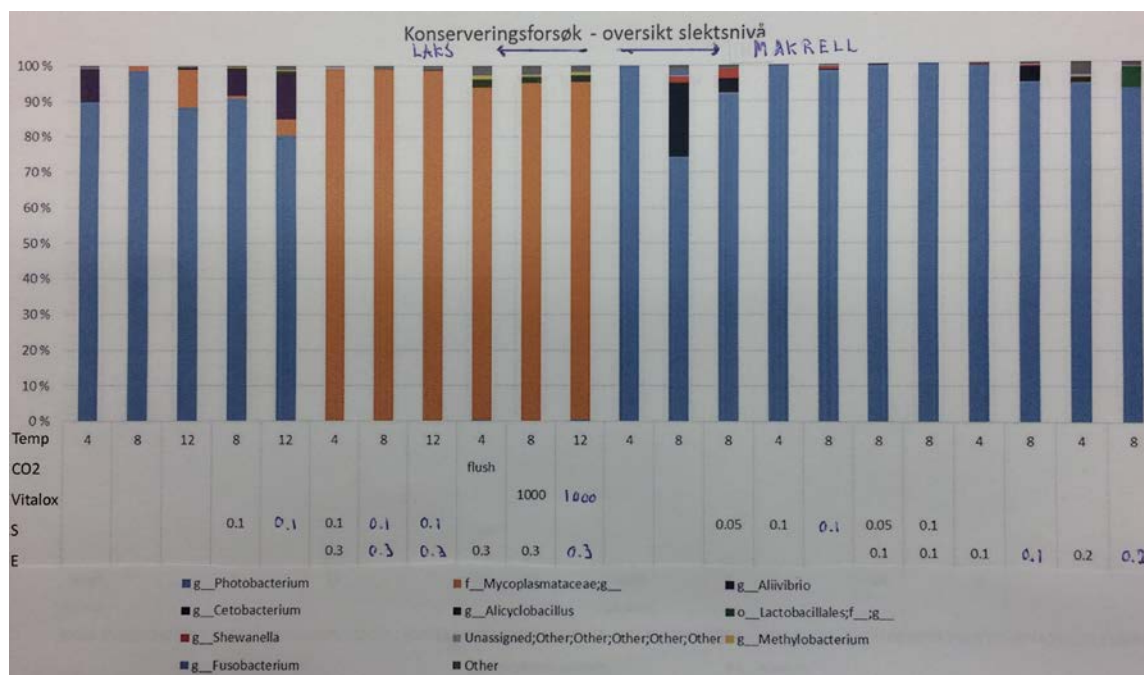
Prøvene som var konserverte med eddiksyre (0,3 %) hadde etter 5 dager lagring svært lave bakterietall, lavere enn startprøven. MiSeq analysene viste at floraen her var sterkt dominert av familie *Mycoplasmatacea* ($\geq 93\%$). Når sulfitt ble brukt som konserveringsmiddel i tillegg til eddiksyre ble denne dominansen forsterket. Antioksidant og CO₂ påvirket ikke floraen vesentlig. Siden det ikke ble registrert bakterievekst under lagring av eddikkonserverte råstoff kan det se ut som familie *Mycoplasmatacea* dominerte floraen i innmaten fra den nyslaktede laksen.

Makrell (kapittel 5.5)

Råstoffet hadde i utgangspunktet høyt bakterieinnhold allerede ved mottak. Årsaken til dette var høyt åteinhold som følges av rik tarmflora.

Ukonserverte prøver hadde etter 6 dager lagring høyere bakterietall på Long & Hammer Agar enn på Jern-Agar og MRS agar. MiSeq analysen viste at *Photobacterium* var sterkt dominerende etter lagring ved 4 °C mens også *Cetobacterium* og *Shewanella* gjorde seg gjeldende etter lagring ved 8 °C.

Alle prøver konserverte med eddiksyre var sterkt dominert av *Photobacterium* mens *Cetobacterium* og *Shewanella* her var hemmet. Eddiksyre (0,2 %) ved 8 °C hadde i tillegg et innslag av *Lactobacillus* (melkesyrebakterier). Disse ble også påvist på M.R.S.-agar.



Figur 37: Oversikt over alle slekter som utgjør mer enn 0,1 % i alle prøver. De 11 søylene til venstre er innmat laks etter lagring 5 døgn, mens de 11 stolpene til høyre er makrell etter lagring 6 døgn. Flere unike sekvenser kan gi samme taksonomiske plassering, dvs at de kan være ulike arter eller stammer innen samme slekt. Tegnforklaring: E: Eddiksyre, S: Na metabisulfitt, CO₂: flush m. CO₂ gass, Vitalox: antioksidant

Photobacterium

Photobacterium er varmesensitive og kuldeterante bakterier som ofte dominerer bedervings-floraen i ferske marine fisk, særlig i vakuum og modifisert atmosfærepakket fisk og oppmalt fisk.

Shewanella

Shewanella er en hydrogensulfid produserende bakterie som ofte er hovedansvarlig for bederving av marin fisk.

Mycoplasmataceae

Gruppe av bakterier med meget komplekse næringskrav og som mangler cellevegg. Bakteriene er derfor svært vanskelig å dyrke og fanges ikke opp med konvensjonelle dyrkingsbaserte metoder. En tror at bakterien utgjør en naturlig del av tarmfloraen i fisk.

Cetobacterium

Bakterien er funnet i flere fiskearter og er funnet å være blant de dominerende i king mackerel.

Aliivibrio

En marin bakterie som ofte inngår i bedervingsfloraen til marin fisk.

7 Referanser

1. Richardsen, R., R. Nystøyl, and G. Strandheim, *Analyse marint restråstoff*, 2015. 2016, SINTEF
2. Bernardéz, M., et al., *Modified Method for the Analysis of Free Fatty Acids in Fish*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**: p. 1903-1906.
3. AOCS, *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*. 4 ed. 1994, Champaign: IL, AOCS.
4. Taylor, W.H., *Formol titration: An evaluation of its various modifications*. The Analyst, 1957. **82**.
5. Wang-Andersen, J. and B.O. Haugsgjerd, *Forbedret analysemetodikk for peptidstørrelsesfordeling i marine proteinhydrolysater*. 2011, Nofima. p. 30p.
6. Carvajal, A., et al., *Production of high quality fish oil by thermal treatment and enzymatic protein hydrolysis from fresh norwegian spring spawning herring by-products*. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2015. **24**(8): p. 807-823.
7. Carvajal, A.K., et al., *Antioxidants in fish oil production for improved quality*. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society, 2014. **91**(9): p. 1611-1621.
8. Tambunan, J.E., S.H. Suseno, and B. Ibrahim, *Improved quality of sardines oil (Sardinella sp.) using centrifugation*. Global Journal of Biology, Agriculture and Health Sciences, 2013. **2**(4): p. 196-202.
9. Azhar, K.F. and K. Nisa, *Lipids and their oxidation in seafood*. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 2006. **28**(3): p. 298-305.
10. Tsuchiya, T., *CHAPTER 7 - Biochemistry of Fish Oils A2 - BORGSTROM, GEORG*, in *Fish As Food*. 1961, Academic Press. p. 211-258.
11. Zamora, R. and F.J. Hidalgo, *Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2005. **45**(1): p. 49-59.



Teknologi for et bedre samfunn

www.sintef.no