

Sous vide-behandling av makrell. Effekt av prosessparametere og tilsatte antioksidanter på stabilitet til proteiner og lipider.

Kari Cecilie Aftret

Industriell kjemi og bioteknologi

Innlevert: juni 2018

Hovedveileder: Turid Rustad, IBT

Medveileder: Janna Crobotova, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

Forord

Masteroppgaven ble utført ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim. Oppgaven er en del av det større prosjektet ProHealth, som inkluderer flere samarbeidspartnere. Veileder for masteroppgaven, Turid Rustad, ble valgt før temaet for oppgaven. Turid Rustad var min foreleser våren 2017. Hun virket som ei kul dame, så jeg bare måtte ha henne som veileder på masteren. Jeg vil takke deg Turid for all veiledning og hjelp jeg har fått gjennom hele prosessen.

Takk til Janna Cropotova for mange fine stunder og god hjelp gjennom arbeidsperioden, og takk til Siri Stavrum for hjelp med blant annet autoklaving av utstyr. En stor takk til Veronica Hjellnes for all hjelp på laboratoriet og med annen praktisk informasjon. Du har gjort arbeidsdagen mye lettere. Jeg er veldig takknemlig for hjelp og assistanse jeg har fått av Toril Fagerli og Guillaume Bolland. Til dere jeg har delt laboratorium med vil jeg uttrykke en takk for et flott arbeidsmiljø og fint selskap.

Takk til Revilija Mozuraityte og Inger Beate Standal for blant annet bistand ved vakuumpakking av makrellfileter.

Jeg vil også takke min venninne, Marte B. Langseth, for at hun stilte opp som korrekturleser på kort varsel. En siste takk går til Steve Gernbacher fra Minnesota som ordnet opp i mine engelskkunnskaper.

Sammenheng

Atlantisk makrell er en pelagisk fisk som er rik på viktige næringsstoffer som omega-3-lipider, proteiner, D-vitamin og selen. Disse næringsstoffene har dokumentert positiv effekt på helsa. Dermed kan makrell bidra til et sunt kosthold. De verdifulle komponentene kan ødelegges eller gå tapt ved prosessering og lagring av fiskekjøtt. Utvikling og optimalisering av prosesseringsteknologier er derfor viktig for å bevare de sunne næringsstoffene og å opprettholde høy kvalitet i fiskekjøttet.

Formålet med dette arbeidet har vært å se hvordan ulike prosessparametere innvirket på atlantisk makrell ved sous vide-behandling. Prosessparametere som temperatur, koketid og tilsetning av antioksidanter varierte. Etter sous vide-behandling ble fisken lagret i 15 dager. Det ble gjort fire uttak underveis som ble analysert. Over lagringsperioden ble det sett på endringer i mikrobiell status, farge, koketap, vanninnhold, aske, totalt lipidinnhold, proteininnhold og oksidasjon av lipider (peroksidverdi (PV) og tiobarbitursyre-reaktive-stoffer (TBARS)) og proteiner (karbonyler).

Proteinløselighet ble analysert ved biorad-metoden og proteinoksidasjon ble bestemt ved ELISA. Analyse benyttet for bestemmelse av totalt lipidinnhold var «Bligh and Dyer»-analysen. Metoder benyttet for bestemmelse lipidoksidasjon var iodometrisk titrering (PV) og spektrofotometri (TBARS).

Sous vide-behandling av makrellfileter førte til koketap, noe som førte til reduksjon av vanninnhold. Tekstur ble målt som hardhet, og varmebehandling reduserte hardheten i makrellfiletene. Prøver kokt ved 80 °C hadde høyere hardhet enn prøver kokt ved 70 °C. I tillegg gav kort koketid og tilsatt antioksidant signifikant lavere hardhet for makrellprøver.

Varmebehandling reduserte løseligheten til sarkoplasma- og myofibrillproteiner. Løseligheten for både vann- og saltløselige proteiner var signifikant lavest ved behandling ved 80 °C. Oksidasjon av proteiner var lavest for prøver behandlet ved 70 °C for både vann- og saltløselige proteiner. Myofibrillproteiner hadde høyere karbonylinnhold enn sarkoplasmaproteiner. Proteinkarbonyler for saltløselige proteiner var signifikant lavest ved temperaturen 70 °C.

Fettinnholdet i råstoffet ble kvantifisert til $28,9 \pm 0,4$ %. Totalt lipidinnhold i sous vide-behandlede makrellprøver varierte mellom 23-30 %. Lipidoksidasjon ble studert ved å analysere PV og TBARS. For begge oksidasjonsproduktene var det ti ganger mer for prøver kokt ved 70 °C og i tillegg var det en minkende mengde produkt utover lagringstiden. Hverken koketid eller tilsatt av antioksidanter hadde noen signifikant effekt på lipidoksidasjon. Prøver

med antioksidanter hadde noe lavere PV og TBARS ved begge koketemperaturene, men gav ingen signifikans. Analyse av PV og TBARS gav ikke tilstrekkelig informasjon. For å få et bedre bilde av lipidoksidasjon i prøvene burde innholdet av flere oksidasjonsprodukter vært analysert.

Varmebehandlingen av makrell førte til fargeendringer. Fiskekjøttet ble lysere og gulere. I løpet av lagringsperioden forekom det litt økning i lyshet. Rødheten varierte for alle prøveuttakene. Gulheten steg gradvis for alle prøvene utenom de som var tilsatt askorbylpalmitat. Gulfargen kan ha indikert proteinoksidasjon eller dannelse av sekundære lipidoksidasjonsprodukter.

Det ble ikke funnet vekst av kolonier for makrell varmebehandlet ved 70 °C. For makrellfileter kokt ved 80 °C var det oppvekst ved ett uttak for to prøver, hvor verdiene var på 2,5 og 3,3 CFU/g. Dette viste at prøvene hadde god mikrobiell holdbarhet.

Samlet sett viste resultatene at koketemperaturen hadde størst innflytelse på kjemisk sammensetning og fysiske egenskaper til makrell gjennom lagringsperioden. For størst proteinløselighet, lavt proteinkarbonylinnhold, lavt koketap og god tekstur var det ideelt å varmebehandle ved 70 °C. Koketiden hadde også effekt. Basert på resultatene fra lipidoksidasjon var temperaturen 80 °C mest ideell og i tillegg tilsetning av antioksidanter. Siden det ikke ble analysert flere sekundære oksidasjonsprodukter kan det ikke trekkes noen konklusjon med hensyn på hvilke prosessparametere som resulterte i lavest lipidoksidasjon.

Abstract

Atlantic mackerel is a pelagic fish rich in important nutrients including omega-3 lipids, protein, Vitamin D, and selenium. These nutrients have proven effects on the health. As a result, mackerel can contribute to a healthy diet; but valuable components can be lost or destroyed during processing and storage of fish meat. Development and optimization of processing technologies are important for preserving healthy nutrients and maintaining high quality in fish meat.

The aim of this work has been to see how different process parameters impacted Atlantic mackerel treated by sous vide. Process parameters such as temperature, cooking time, and additional antioxidants varied. The fillets were stored for 15 days after sous vide treatment. During that period, samples were taken out four times for further analysis. During the storage period, changes in microbial status, color, cooking loss, water content, ash, total lipid content, protein content and oxidation of lipids (Peroxide values (PV) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)), and proteins (carbonyls) were analyzed.

Protein solubility was analyzed by the biorad method, and protein oxidation was determined by ELISA. "Bligh and Dyer" assay was used to determine total lipid content. Assays used to determine lipid oxidation were iodometric titration (PV) and spectrophotometric analysis (TBARS).

Sous vide treatment of mackerel fillets led to cook loss, which caused a reduction in water content. Texture was measured as hardness. Heat treatment reduced the hardness of the mackerel fillets. Samples boiled at 80 °C had a higher hardness than samples boiled at 70 °C. In addition, short cooking time and added antioxidants gave significantly decreased hardness for mackerel samples.

Heat treatment reduced the solubility of sarcoplasmic and myofibrillar proteins. Solubility for both water and salt soluble proteins were significantly lower when treated at 80 °C than at 70 °C. Oxidation of proteins was lowest for samples treated at 70 °C for both proteins. Myofibrillar proteins had higher carbonyl content than sarcoplasmic proteins at both temperatures. Protein carbonyls for salt soluble proteins were significantly lowest at a temperature of 70 °C.

The fat content of the raw material was quantified at 28.9 ± 0.4 %. Total lipid content in sous vide treated mackerel samples ranged between 23-30 %. Lipid oxidation was studied by analyzing PV and TBARS. For both oxidation products, there were ten times higher values for samples cooked at 70 °C. In addition, there was a decreasing amount of product during storage.

Neither cooking time nor additions of antioxidants resulted in any significant effect on lipid oxidation. Samples with antioxidants showed less PV and TBARS at both temperatures, but with no significance. Analysis of PV and TBARS gave inadequate information. To get a better illustration of lipid oxidation in the samples, the amount of other lipid oxidation products should also be analyzed.

Heat treatment of mackerel caused color changes. The fish meat became lighter and more yellow. During storage, the brightness had a small increase. The redness varied for all samples. The yellowness gradually increased for all samples except those that were added ascorbyl palmitate. The yellow color may have indicated protein oxidation or formation of secondary lipid oxidation products.

No growth was found for mackerel heat-treated at 70 °C. For mackerel fillets cooked at 80 °C, there was a growth at one outtake for two samples, and the values were 2.5 and 3.3 CFU/g. This showed that the samples had a good microbial shelf life.

Overall, the results demonstrated that the cooking temperature had the greatest influence on chemical composition and physical properties of mackerel throughout the storage period. For highest protein solubility, low protein carbonyl content, low cook loss and good texture, it was ideal to heat-treat at 70 °C. The cooking time also had effect. Based on the results of lipid oxidation, an 80 °C temperature and the addition of antioxidants were best. Since no other secondary oxidation products were analyzed, no conclusion can be drawn as to which process parameters resulted in low lipid oxidation.

Innhold

Forord	i
Sammendrag.....	ii
Abstract.....	iv
1 Innledning	1
1.1 Bakgrunn	1
1.2 Atlantisk makrell (<i>Scomber scombrus</i>)	1
1.3 Kjemisk sammensetning av fiskemuskel	3
1.3.1 Lipider i fiskemuskel	3
1.3.2 Proteiner i fiskemuskel	5
1.4 Varmebehandling og lagringsmetoder	6
1.4.1 Sous vide – Lav varmebehandling av fisk	6
1.4.2 Varmeeffekt på proteiner	6
1.4.3 Kjølig lagring av fisk	7
1.5 Oksidasjon av marine lipider	8
1.5.1 Mekanismer for oksidasjon	8
1.5.2 Primære og sekundære oksidasjonsprodukter	12
1.5.3 Bestemmelse av lipidoksidasjon.....	13
1.6 Proteinoksidasjon.....	14
1.6.1 Bestemmelse av karbonylgrupper	15
1.7 Naturlige antioksidanter	16
1.7.1 Rosmarin og askorbylpalmitat.....	17
1.8 Formålet med arbeidet.....	18
2 Materialer og metoder.....	19
2.1 Kjemikalier	19
2.2 Metoder	20
2.2.1 Sous vide-behandling av makrellfileter	20
2.2.2 Koketap	21
2.2.3 Vanninnhold og aske	21
2.2.4 Teksturmåling.....	21
2.2.5 Proteinløselighet.....	21
2.2.6 Proteinoksidasjon.....	22

2.2.7 Totalt lipidinnhold	24
2.2.8 Bestemmelse av peroksidverdier ved iodometrisk titrering med SI-analytisk titrator	24
2.2.9 Bestemmelse av TBARS ved spektrofotometrisk analyse.....	25
2.2.10 Fargemåling.....	26
2.2.11 Mikrobiell vekst.....	27
2.2.12 Statistiske analyser.....	27
3 Resultat og diskusjon.....	28
3.1 Råmateriale.....	28
3.2 Koketap	29
3.3 Vanninnhold og aske.....	31
3.3.1 Vanninnhold	31
3.3.2 Aske	33
3.4 Tekstur.....	34
3.5 Proteinløselighet	36
3.6 Proteinoksidasjon.....	39
3.7 Totalt lipidinnhold.....	42
3.8 Lipidoksidasjon.....	43
3.9 Farge.....	47
3.10 Mikrobiologi	51
4 Konklusjon.....	53
Kilder	55
Vedlegg A – Rådata og beregninger for analyser	I

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Pelagisk fisk er rik på omega-3-lipider, proteiner, D-vitamin og selen. Makrell er en pelagisk fisk som fanges i norske farvann. Disse næringsstoffene har dokumentert positiv effekt på helsa. Dermed kan makrell bidra til et sunt kosthold. Lipider og proteiner er utsatt for oksidering ved prosessering og lagring av makrell. Dette resulterer i tap av kvalitet i fiskekjøtt som kan medføre uønsket smak og lukt. I tillegg kan det forekomme mikrobiell kontaminering under prosessering. Utvikling og optimalisering av prosesseringsteknologier er dermed viktig for å bevare sunne næringsstoffer og opprettholde høy kvalitet i fiskekjøttet.

Dette arbeidet er en del av ProHealth-prosjektet som har mål om å utvikle metoder for å optimalisere eksisterende eller nye teknologier for prosessering av fiskeprodukter fra pelagiske fiskearter. Prosjektet har som mål å bevare de helsemessige sunne komponentene. Fiskeproduktene skal være sunne, ha høy kvalitet, være trygge og bærekraftige. Dette er et samarbeidsprosjekt mellom Institutt for bioteknologi og matvitenskap ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU), SINTEF Ocean (Trondheim, Norge), Teagasc Food Research Centre (Dublin, Irland), Department of Fisheries Economics ved National Marine Fisheries Research Institute (Gdynia, Polen) og Nutrition and clinical biochemistry lab, department of Pharmaceutical Sciences University of Perugia (Perugia, Italia). NTNU sin del av prosjektet er å bedre forstå mekanismene for det som skjer i råstoffet under ulike prosesseringsprosesser.

Formålet med dette arbeidet har vært å se hvordan ulike prosessparametere innvirket på atlantisk makrell ved sous vide-behandling. Prosessparametere som temperatur, koketid og tilsetning av antioksidanter varierte. Etter sous vide-behandling ble fisken lagret i 15 dager. Det ble gjort fire uttak underveis som ble analysert. Over lagringsperioden ble det sett på endringer i mikrobiell status, farge, koketap, vanninnhold, aske, totalt lipidinnhold, proteininnhold og oksidasjon av lipider (peroksidverdi (PV) og tiobarbitursyre-reaktive-stoffer (TBARS)) og proteiner (karbonyler).

1.2 Atlantisk makrell (*Scomber scombrus*)

Atlantisk makrell (*Scomber scombrus*) er en fet hurtigsvømmende fisk som tilhører den pelagiske gruppen. Den er rund og har en spoleformet og strømlinjet kropp. Makrellen kan lett gjenkjennes for sine grønne og blåe farger, i tillegg til bølgeførmede tverrbånd nedover sidene på ryggen (se figur 1). Høyst oppnåelig alder er 25 år, og den kan bli opptil 70 cm lang og veie

opptil 3,5 kg. Fisken er varmekjær og trives best i temperaturer over 6 °C (Romotowska et al., 2016a; Havforskningsinstituttet, 2017).

Makrellen er utbredt i Atlanterhavsområder, fra Nord-Afrika og til 78° N (Spitsbergen). Den finnes også i mindre mengder i Middelhavet, Svartehavet, Østersjøen og Skagerrak. Gyteområder for makrellen er Nordsjøen, utenfor sør- og vest-Irland, Portugal og Spania. Mangel på svømmeblære gjør at makrellen må være i konstant bevegelse. Om sommeren etter gyting drar den til næringsrike områder som Norskehavet og Nordsjøen for å bygge opp muskellipider og gjenopprette energikildene etter vandring. Den er en typisk planktonspiser som siler planktonet gjennom gjellene ved å svømme med åpen munn. Den kan også livnære seg på fiskelarver og småfisk (Havforskningsinstituttet, 2017). Makrellen blir hovedsakelig fanget i Norskehavet og Nordsjøen. Norge, Danmark, Island, Storbritannia og Russland står for størsteparten av makrellfangsten (Romotowska et al., 2016a; Bjørndal & Ekerhovd, 2014; Bachiller et al., 2016).

Næringsstoffene i pelagisk fisk er helsefrembringende. Makrell er rik på langkjedede omega-3- flerumettede fettsyrer, proteiner, vitamin D og selen. Bestanddeler som essensielle frie aminosyrer og peptider har dokumenterte gode helsemessige påvirkninger (Standal et al., 2018; Maestre, 2011). Omega-3- flerumettede fettsyrer har positiv effekt på sykdommer som aterosklerose, diabetes, astma, gikt og hjertesykdommer (Hampton, 2014). Vitamin D balanserer kalsiumnivået i kroppen, som gir sterke og sunne bein. Mineralet selen fungerer som en antioksidant i kroppen og bidrar til styrket immunsystem og god kognitiv funksjon (Seafood from Norway, 2017).



Figur 1 Makrell består av mange sunne næringsstoffer blant annet omega-3, vitaminer og mineraler (Seafood from Norway, 2017).

1.3 Kjemisk sammensetning av fiskemuskel

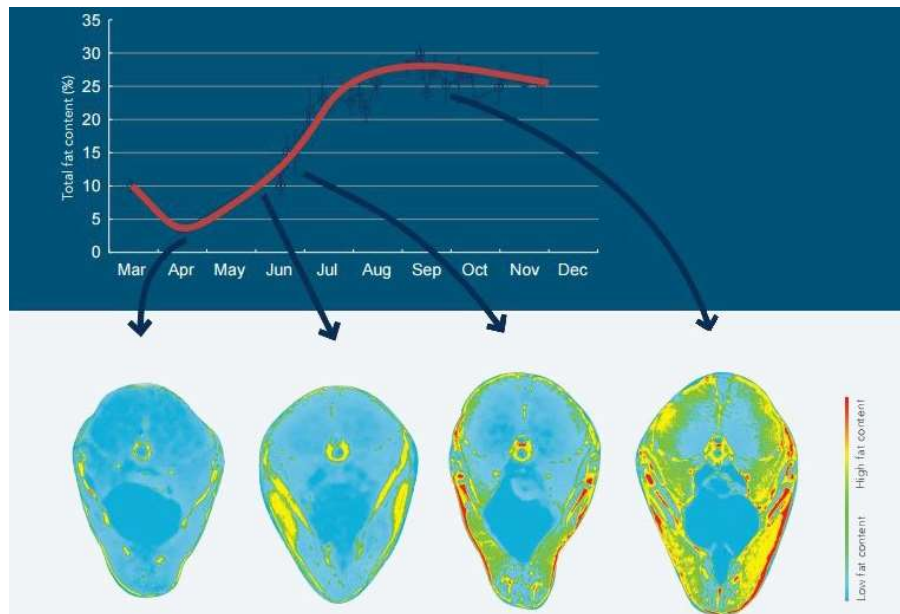
Sammensetning av fiskemuskel varierer med blant annet art, leveområde, kjønn, alder, mattilgang og årstid. Hovedkomponentene i fiskemuskel er vann, fett og proteiner. Proteininnholdet ligger rundt 16-20 % og er relativt stabilt. Det som derimot varierer er fett- og vanninnhold. Til sammen utgjør disse to bestanddelene cirka 80 % av fiskemuskelen. Normalt inneholder rød fisk mer fett enn hvit fisk. For eksempel er fettinnholdet i torskemuskel under 1 %. Fete fiskearter som makrell, lodde og sild har en større andel fett fordelt i muskler og under huden. I mørk muskel ligger fett som gir kraftig smak. (Murray & Burt, 2001; Lynum, 1997). Sammensetning av makrell er gitt i tabell 1 (Murray & Burt, 2001; Leu et al., 1981).

Tabell 1 Hovedkomponentene i makrell er vann, lipider og proteiner. Innholdet av hver komponent er gitt i prosent av våtvekt (Murray & Burt, 2001; Leu et al., 1981).

Makrell Innhold i filet [%]	
Vann	60 – 74
Lipid	1,0 – 24
Protein	16 – 20

1.3.1 Lipider i fiskemuskel

Fettinnholdet i makrell er årstidsavhengig. På vinteren er makrellen på vandring og får i seg lite næring. På sommeren drar den på beite slik at den oppnår maksimalt fettinnhold i løpet av september og oktober. De fire bildene under grafen, i figur 2, er MRI-bilder som viser fettmengden og fordelingen av fett i fisken i løpet av et år. Gule og røde områder indikerer høye fettkonsentrasjoner (Seafood from Norway, 2017). Endringer i kjemisk bestanddel i fiskemuskel påvirker kvaliteten i fersk fisk. Innholdet av vann, lipider og proteiner, bindevev, tekstur, farge og stabilitet påvirker kvaliteten til råmaterialet (Sigurdottir et al., 1997). Ved raskt inntak av føde endres den kjemiske sammensetning i fiskemuskelen. Kvalitet og stabilitet endres når lipidinnholdet øker. Derfor forekommer hovedsakelig fangst av makrell på sommeren og høsten (juni-september) (Romotowska et al., 2016b).



Figur 2 Grafen og MRI-bildene viser fettinnholdet i makrell i løpet av et år. På vinteren er det lite fettinnhold, mens på sommeren og høsten øker det. De gule og røde områdene viser høye konsentrasjoner av fett (Seafood from Norway, 2017).

Lipider i fiskemuskel påvirker spisekvalitet ved smak, lukt, farge og tekstur (Sigurdsson et al., 1997). Noen typer fett har kraftigere smak enn andre og er lettere utsatt for harskning. Sammenlignet med pattedyr, som vanligvis har enkelbundne fettsyrer med 16-18 karboner i kjeden, har fiskefett større variasjoner. Det er hyppigst forekomst av triglyserider med 12-24 karbonatomer i fettsyrene i fiskemuskel. I tillegg har de dobbeltbindinger. Disse umettede fettsyrene kan inneholde 1-6 dobbeltbindinger. Essensielle fettsyrer som linolsyre og linolensyre utgjør kun 2 % av totalt fettinnhold. Derimot kan opptil 50 % av fettene bestå av omega-3-flerumettede fettsyrene eicosapentaensyre (EPA) og docosahexaensyre (DHA). Disse fettsyrene er bevist å ha positiv innvirkning på dannelse av prostaglandin-hormoner, i sammenheng med hjerte- og karsykdommer. (Lynum, 1997; Mozaffarian & Wu, 2012; Seafood from Norway, 2017). Omega-3 flerumettede fettsyrer påvirker også hjernen positivt (Witte et al., 2012).

Membraner, fettvev og muskelceller består av lipider. Muskelceller består av blant annet fosfolipider, triglyserider og kolesterol (Belitz et al., 2009). Triglyserider er den formen som utgjør mest av fiskefettet. Fosfolipider i fisk består av glyserol, fosfat, en nitrogenholdig hydroksyforbindelse, og flerumettede fettsyrer med høyt antall dobbeltbindinger. De inngår i cellemembranens strukturelle oppbygging. Den vanligste sterolen i fiskemuskel er kolesterol og utgjør 0,05-0,07 %. Det er størst forekomst av kolesterol i fet fisk (Lynum, 1997).

1.3.2 Proteiner i fiskemuskel

Fiskekjøtt er rikt på proteiner og inneholder alle de essensielle aminosyrene. De aminosyrene som forekommer mest i fiskeproteiner er lysin, methionin og cystein. Proteininnholdet i fisk er forholdsvis stabilt og ligger rundt 16-20 % og kan deles inn i tre typer: Funksjonelle muskelproteiner, sarkoplasmaproteiner og bindevevsproteiner. Funksjonelle muskelproteiner utgjør omtrent 50-70 % av vekten av proteiner, sarkoplasmaproteiner ligger rundt 15-30 % og bindevevsproteiner utgjør mellom 10-15 % (Lynum, 1997; Baldwin, 2012). Bakdelen av fiskefileter inneholder mer proteiner og mindre fett enn fremre del (Gökoglu, 2015).

Funksjonelle proteiner

Funksjonelle proteiner består av komplekse fibre som er molekyler parallelt tvunnet sammen. Disse proteinene kalles myofibrillproteiner og er byggesteiner i muskelfibrillene. Dette er saltløselige proteiner som er løselige ved en saltkonsentrasjon over 5 %. Proteiner som går under denne gruppen er aktin, myosin, tropomyosin og troponin. Myosin og aktin er ansvarlig for muskelkontraksjon og avspenning, og er også viktig for vannholdende, emulgerende og bindingskapasitet, og gelling. Myofibrillproteiner danner et nettverk som fritt vann bindes til ved hjelp av elektrostatiske krefter. I tillegg til saltkonsentrasjonen vil pH påvirke hvordan vannet bindes til proteinnettverket. Det isoelektriske punktet til myosin er ved pH 5,0-5,4, hvor nettoladningen er nøytral, og det vil være minimale frastøtningskrefter som resulterer i dårlig vannbindingsevne. (Gökoglu, 2015; Lynum, 1997).

Sarkoplasmaproteiner

Sarkoplasmaproteiner har en struktur som sammenrullede nøster og er vannløselige ved konsentrasjoner under 0,15 M. Slike proteiner er ofte å finne fritt i muskelcellens sarkoplasma og fungerer som enzymer. Disse enzymene finnes det store mengder av i nyrevev. Ved post mortem vil noen enzymer påvirke fisken negativt. Tap av vannbindingsevne og nedsatt frysestabilitet forårsakes henholdsvis av proteaser og ATP-aser. For å forhindre dette post mortem benyttes vasking på kvernet fiskemasse. Slik vasking er vesentlig ved produksjon av frysestabil fiskefarse. Pigmenterte proteiner som inngår i denne klassen proteiner er myoglobin og haemoglobin. Mørk muskel i pelagisk fisk inneholder høye konsentrasjoner av myoglobin som gir rød farge. Innhold av myoglobin øker med alder (Gökoglu, 2015; Lynum, 1997).

Bindevevsproteiner

Bindevevsproteiner er uløselige proteiner som består av kollagen, elastin og gelatin. De har en fiberlignende struktur på samme måte som funksjonelle proteiner. Bindevev hos fisk ligger innleiret i en grunnsubstans i hinnene rundt muskelfibre i skjelett og i skinnet. I grunnsubstansen finnes enzymer og næringsstoffer (Gökoglu, 2015; Lynum, 1997).

1.4 Varmebehandling og lagringsmetoder

1.4.1 Sous vide – Lav varmebehandling av fisk

Sous vide kommer fra fransk og betyr «under vakuum». Denne kokemåten defineres som koking av råmaterialer med eller uten intermediater under kontrollerte forhold, som temperatur og tid, inne i varmestabile vakuumposer. Sous vide-koking har vært brukt i restauranter siden 1970-tallet, men har ikke blitt kjent før midten av 2000-tallet. Denne metoden for tilberedning av råmaterialer baserer seg på å forlenge holdbarheten til prosessert mat. Det finnes flere fordeler med slik prosessering av mat. Vakuumpakking kan blant annet gjøre varmetransporten fra vannet til råmaterialet effektiv, rekontaminering under lagring minker, den forhindrer oksidasjon som kan gi bismak, forhindrer tap av smak ved fordamping, og reduserer mikrobiell vekst. Dette resulterer i smaksrik og næringsrik mat (Baldwin, 2012; Dogruyol et al., 2017).

Vakuumpakking ved kjølig lagring virker konserverende hos fet fisk. Det er en billig og enkel metode for å redusere oksidative reaksjoner (Mbarki et al., 2009). Vakuumpakking hindrer tilgang på oksygen som bidrar til harskning. All oksygen fjernes ikke. Det er fortsatt tilgang på oksygen i fisken som påvirker oksidasjon og aerob bakterievekst. Etter oksygenet er oppbrukt oppstår anaerobe forhold. Dette hemmer videre vekst av aerobe mikroorganismer. Derimot gir det fordelaktige forhold for bakterier som produserer H₂S (Lynum, 1997).

Etterspørselen for ferdigretter har økt den siste tiden. I Norge i dag produseres det ferdigmåltider som selges i butikk. Flere av disse er sous vide-behandlet. Holdbarheten til ferdigmat varierer med 1 til 4 uker. Maten skal være lett anvendelig, sunn og sensorisk god (Rosnes et al., 2011).

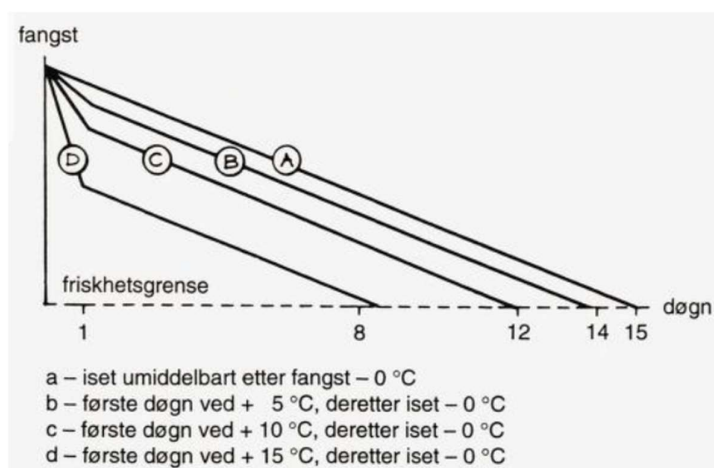
1.4.2 Varmeeffekt på proteiner

Koking er påføring av varme for å endre råmaterialer til å bli spiselige. Sous vide gjør det mulig å kontrollere hvorvidt endringen skal forkomme raskt eller sakte. Ved varmetilførsel vil proteiner i mat denatureres. Graden av denaturering og hvilke proteiner som denatureres vil avhenge av temperatur og tid. Myofibrillprotein, sarkoplasmprotein og bindevev reagerer

forskjellig på varmetilførsel. Fiberproteiner krymper lineært fra temperaturene 35-40 °C og opp til 80 °C. Akkumulering og gelatinering av sarkoplasmaproteiner forekommer mellom temperaturene 40 og 60 °C. Bindevev begynner å minske ved 60 °C, og ved 65 °C oppstår det en mer intensiv forminskning. Ved sakte forandringer, ved at kollagen løses i gelatin, vil bløtheten øke og klebing av proteiner minke (Baldwin, 2012).

1.4.3 Kjølilig lagring av fisk

Alle biokjemiske reaksjoner avhenger av temperatur (Lynum, 1997). Temperatur er en viktig faktor for mikrobiell vekst og oksidasjon av matprodukter. Ved bestemmelse av holdbarhet til et produkt må lagringstemperaturen vurderes. (Huang et al., 2011). Ved å senke temperaturen med 10 °C antas det at alle biokjemiske reaksjonstider i fisk fordobles. På denne måten virker temperaturnedsettelse konserverende. Nedsenket temperatur virker både på mikroorganismer og enzymaktivitet, men har størst effekt på mikroorganismer. Lagringstemperaturen det første døgnet etter fangst påvirker holdbarheten for resten av lagringsperioden. Nølefasen og generasjonstiden hos bakterien er årsaken til dette. Figur 3 viser at høyere lagringstemperaturen første døgnet etter fangst gir mikroorganismene et forsprang som ikke innhentes ved resten av lagringen på smeltende is ved 0 °C. Den kjemiske komposisjonen og størrelsen på fisken påvirker også holdbarheten (Lynum, 1997; Pedersen, 1980).



Figur 3 Holdbarheten hos fisk avhenger av den lagringstemperatur første døgnet etter fangst. Lagring på is (0 °C) rett etter fangst forlenger holdbarheten med omtrent 7 dager enn ved en temperatur på 15 °C (Lynum, 1997; Pedersen, 1980).

Det er ønskelig å ha konstant temperatur ved lagring av fisk. Smeltende is er hensiktsmessig å bruke fordi lagringstemperaturen holdes stabil ved 0 °C. Fiskekjøtt har ingen eksakt frysepunkt på grunn av flere typer oppløste stoff i vevsvæskene som gir en saltkonsentrasjon på cirka 1 %. Utkrystallisering av is vil skje ved – 1,0 til – 1,5 °C. Slik utkrystallisering unngås ved å lagre fisk på smeltende is (Duun & Rustad, 2007).

1.5 Oksidasjon av marine lipider

Dårlig matkvalitet kommer av forandringer primært i smak og aroma, og sekundært i farge og tekstur (Kolanowski & Laufenberg, 2006). Marine lipider er komponenter som raskt nedbrytes post mortem. Varme, metaller og lys kan blant annet forårsake oksidasjon av lipider (Salodoye et al., 2015). Dette forårsaker uønsket smak og lukt, som for konsumenten ikke er akseptabel. Et høyt innhold av umettede fettsyrer og prooksidanter kan føre til enzymatisk og ikke-enzymatisk harskning av fettsyrer (Vázquez et al., 2013). Mengder prooksidanter varierer mellom lys og mørk muskel. Lys muskel inneholder lave nivåer av prooksidanter. Derimot inneholder mørk muskel store mengder hemoproteiner, lavmolekylærvekts-metaller og mikrosomale enzymer (Undeland et al., 1998). Det finnes forskjellige kategorier av oksidasjon, hvor den høyst forekommende oksidasjonen er autooksidasjon (Morales-Medina et al., 2017). Hvor enn det er umettede fettsyrer kan oksidasjon oppstå. Dette innebærer molekyler som triglyserider, fosfolipider, frie fettsyrer, og esterifiserte fettsyrer (Schaich et al., 2013).

For å unngå eller senke grad av oksidasjon er det viktig å forstå mekanismer som inngår i oksidasjon av langkjedede omega-3-umettede fettsyrer. Det er utallige mekanismer for oksidasjon av marine lipider. Noen mekanismer er beskrevet i de påfølgende avsnittene. Oksidasjonsveiene påvirkes av faktorer som katalysator, oksidasjonsmål og antioksidanter, noe som gjør veiene kompliserte å beskrive (Schaich et al., 2013; Hægermark, 2013).

1.5.1 Mekanismer for oksidasjon

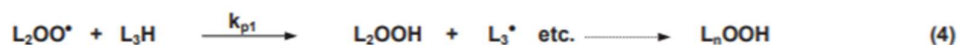
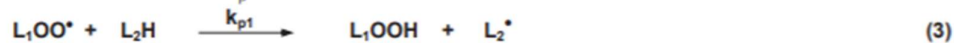
Oksidasjon av lipider er på kjedereaksjoner med frie radikaler drevet av hydrogenfjerning. Det dannes lipid hydroperoksider som utgjør stabile oksidasjonsprodukter. Mekanismer for oksidasjon involverer de tre stegene, initiering, propagering og terminering, som vist i figur 4 (Indrasena & Barrow, 2010; Schaich, 2016).

Initiation (formation of ab initio lipid free radical)

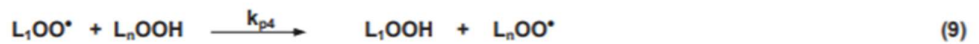
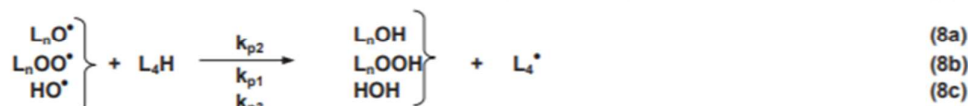
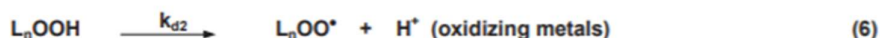


Propagation

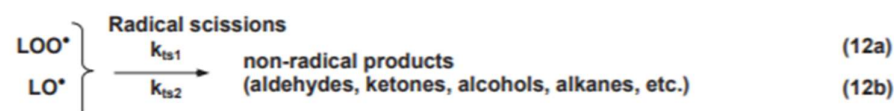
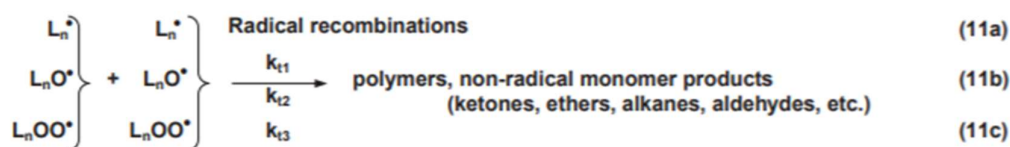
Free radical chain reaction established



Free radical chain branching (initiation of new chains)



Termination (formation of non-radical products)



i - initiation; **o**-oxygenation; **β**- O₂ scission; **p**-propagation; **d**-dissociation; **t**-termination; **ts**-termination/scission

Figur 4 Klassiske mekanismer av kjedereaksjoner for frie radikaler ved lipidoksidasjon (Schaich, 2016).

Initiering

Initiering i lipidoksidasjon er formering av frie radikaler (L^{*}) fra en umettet fettsyre (LH). Selv om lipidoksidasjon blir sett på som spontan er ikke reaksjonen termodynamisk spontan. Oksygen er normalt i en tilstand med triplett spinn der elektronene spinner samme vei, som vist i figur 5. Elektronene i dobbeltbindinger spinner motsatt i forhold til hverandre. For at det skal oppstå oksidasjon er det nødvendig med en form for katalysator som fjerner elektronet på oksygenet eller lipidet for å skape en fri radikal. En annen måte er å endre spinnretningen på elektronene på dobbeltbinding som gjør det mulig for oksygenet å danne et hydroperoksid, som da kan brytes ned til et radikal. Katalysatorer som bidrar til lipidoksidasjon er metaller som jern,

kobber og kobolt, og enzymer som lipoksygenase og xantinoxidase. Uansett hva som katalyserer oksidasjonen resulterer det til formering av lipidalkyl radikaler, som igjen reagerer med oksygen som starter prosessen. For hver initiering produseres det flere hydroperoksider og flere lipider oksideres samtidig (Schaich et al., 2013).

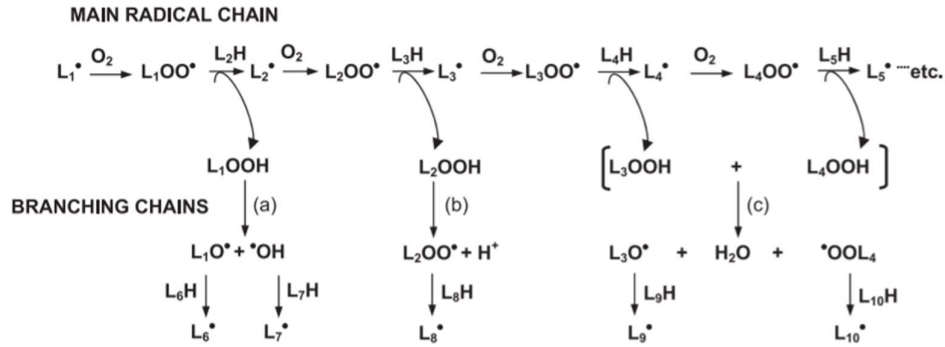


Figur 5 Oksygen med triplett spinn kan ikke reagere med dobbeltbindinger i singlet tilstand for å danne hydroperoksider. Det trengs en katalysator som enten fjerner elektronet på lipidet eller oksygenet, eller endrer spinnretning av elektronene i dobbeltbindingen (Schaich et al., 2013).

Propagering

Frie radikaler dannet under initiering reagerer raskt med oksygen og danner peroksy radikaler (LOO^{*}), som da konverteres til hydroperoksider (LOOH) ved å ta til seg hydrogenatomer fra andre lipider. Dette gir opphav til en ny fri radikal som igjen tar til seg hydrogenatom og genererer hydroperoksid. Nye frie radikaler fortsetter å angripe umettede fettsyrer i systemet og propageringen fortsetter eksponentielt til det ikke er igjen noen hydrogenatomer. I makrell er det store mengder flerumettede fettsyrer, EPA og DHA. Disse inneholder flere dobbeltbindinger. Det gjør de svært utsatt for reaksjon med frie radikaler (Indrasena & Barrow, 2010; Schaich et al., 2013).

Hydroperoksidet utgjør det primære produktet fra autooksidasjon i starten. Denne perioden med reaksjoner er langsom. Ved lave konsentrasjoner av hydroperoksider brytes de ned én og én som vist i reaksjonslikning 5-7 i figur 4. Derimot opphoping av hydroperoksid forårsaker en akselerasjon i prosessen hvor hydroperoksid nedbrytes av metaller, varme og UV-stråling. Reaksjon med metaller er heterolytiske og gir et radikal og et ion. Varme og UV-stråling forårsaker homolytisk deling som gir to radikaler, alkoksyl (LO^{*}) og hydroksyl (HO^{*}). Figur 6 viser hvordan propagering forlenger lipidoksidasjon i en primær kjede og i tillegg danner sekundære forgrenede reaksjoner. Disse forgrenede kjedene går raskere, hvor kjedene som inkluderer LO^{*} er de raskeste. Ett fritt radikal kan gi opphav til mange molekyler i den primære og de sekundære kjedene (Schaich et al., 2013).



Figur 6 Lipidoksidasjon er en kjedereaksjon med forgreninger. Hovedkjeden viser reaksjonen fra ett fritt radikal til dannelse av peroksyldradikal. Peroksyldradikalet stjeler til seg et hydrogenatom fra et lipid som gir et nytt fritt radiakal. Hydroperoksidet som er dannet nedbrytes i sidekjeder ved reduksjon (a), oksidasjon (b) eller bimolekylær dismutasjon (c) (Schaich et al., 2013).

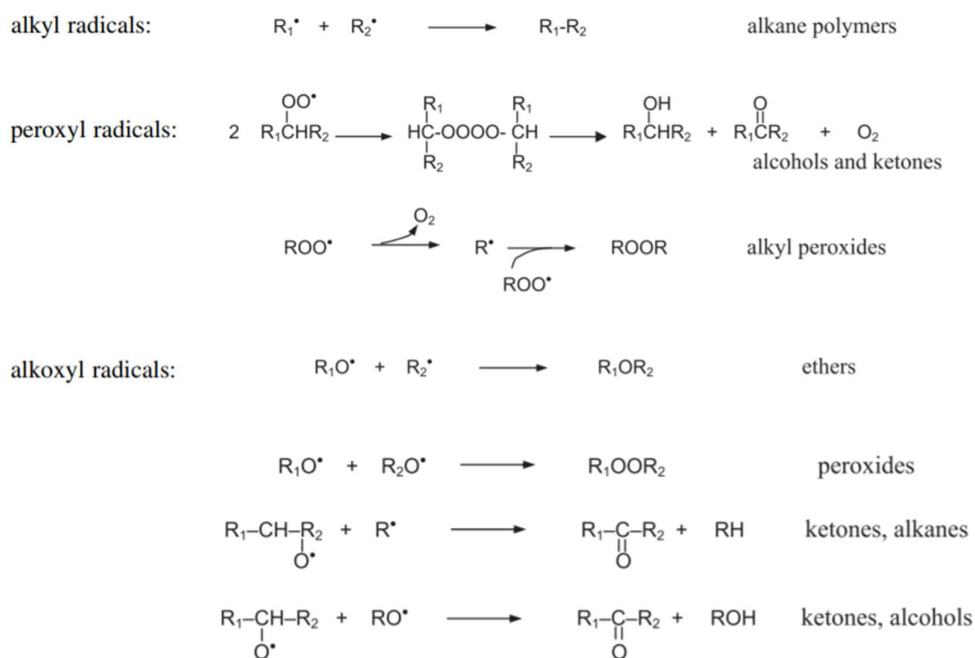
Terminering

Lipidoksidasjon har ikke en fullstendig avslutning. Nettooksidasjon går langsommere da radikal propagering og forlenging av reaksjonskjeder bremses ned. I stedet dannes det stabile produkter. Frie radikaler reagerer med hverandre og formerer ikke-radikaler ($L^\bullet + L^\bullet \rightarrow LL$). Etter dekomponering av hydroperoksider dannes blant annet produkter som alkoholer, syrer, aldehyder og ketoner. Termineringssteget er det siste steget for lipidoksidasjonssyklusen. Syklusen vil likevel repeteres bare mye saktere enn tidligere (Indrasena & Barrow, 2010; Schaich et al., 2013).

Det er forskjellige mekanismer for dannelse av ikke-radikaler. Det finnes forskjellige faktorer som påvirker hvilke mekanismer som dominerer, for eksempel konsentrasjon av radikal, temperatur, oksygentrykk og løsemiddel. I følge Schaich et al. (2013) dannes det ikke-radikaler ved fire hovedmekanismer:

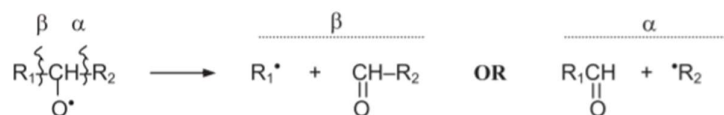
- Radikal rekombinasjon
- α - og β -spaltingsreaksjon av alkoksyldradikaler når en protonkilde er tilstede for å stabilisere produktet, for eksempel vann.
- Med-oksidasjon av ikke-lipid molekyler, for eksempel proteiner.
- Gruppeeliminering eller dismutasjon.

Eksempler på noen av disse mekanismene er vist i figur 7 og 8. Radikal rekombinasjon gir oksidasjonsprodukter som alkaner, alkoholer, ketoner, alkylperoksider, etere og peroksider. Figur 7 viser hvilke produkter forskjellige radikaler kan generere ved radikal rekombinasjon.



Figur 7 Mekanismer for radikal rekombinasjon gir oksidasjonsprodukter som alkaner, alkoholer, ketoner, alkylperoksider, etere og peroksider (Schaich et al., 2013).

α -og β -spaltingsreaksjon av alkoksyldradikaler ved lipidoksidasjon gir produkter som ved sensoriske analyser kan indikere oksidasjon. Produktene gir uønsket lukt og smak. Spaltingen av molekylene foregår mellom to karbonatom bundet med en enkeltbinding på hver sin side av alkoksygruppen. Dette er vist i figur 8. Denne reaksjonen gir to produkter, karbonyler og alkyler (Schaich et al., 2013).



Figur 8 Mekanismen for α og β spaltingsreaksjon av alkoksyldradikaler, oksidasjonsprodukter som gir uønsket lukt og smak (Schaich et al., 2013).

1.5.2 Primære og sekundære oksidasjonsprodukter

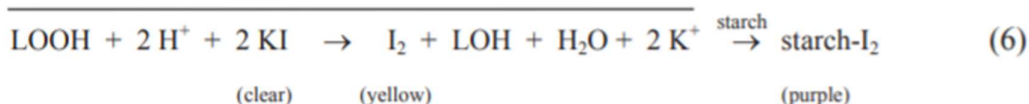
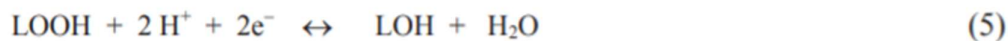
Det første og primære produktet ved lipidoksidasjon er hydroperoksider. Eksperimentelt blir dette produktet brukt mest for å bestemme forekomst av lipidoksidasjon. Kvantitativt er hydroperoksider det best forståtte oksidasjonsproduktet. Hydroperoksidverdiene (PV) korrelerer med sensoriske analyser. Ferske oljer har en PV <1 meq O₂/ kg olje. For industrielle

produkter er øvre grense for PV maksimalt 5 meq O₂/ kg olje. Ved en verdi på 10 meq O₂/ kg olje vil oljen bli sett på som harsk og usmakelig for et smakspanel (Schaich, 2016).

Lav PV kan indikere lite oksidasjon eller mye oksidasjon. Årsaken til dette er at hydroperoksidene genereres til sekundære oksidasjonsprodukter som aldehyder. Sekundære produkter kan oppstå ved høye temperaturer, utsettelse for UV-stråling, og når peroksyldradikaler gir andre produkter. Produksjonen av aldehyder kan foregå parallelt til hydroperoksidene. Derav bør oljen analyseres for produksjon av sekundære produkter for å gi en indikasjon på grad av lipidoksidasjon. I tillegg er aldehyder reaktive produkter som lett reagerer med proteiner (Schaich, 2016; Eymard et al., 2005).

1.5.3 Bestemmelse av lipidoksidasjon

Analyser for bestemmelse av lipidoksidasjon skjer ved spektrofotometri og titrering. Bestemmelse av PV ved iodometrisk titrering benytter mettet kaliumjodidløsning som indikator. Figur 9 viser prinsippet for denne analysen. Dissosiering av kaliumjodid (likning 4) i en syre gir elektroner, som i likning 5 reduserer lipidhydroperoksid til hydroksylderivater (LOH). Netto reaksjon er vist i likning 6 (Schaich, 2016).

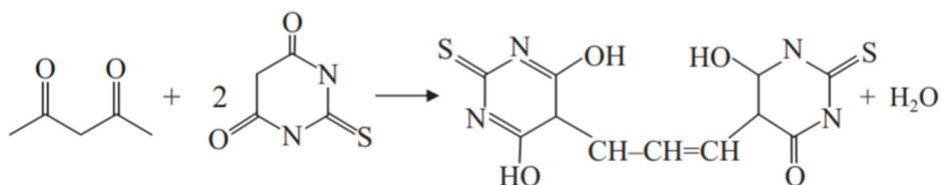


Figur 9 Prinsippet for iodometrisk titrering. I reaksjonslikning 4 foregår det dissosiering av kaliumjodid og i reaksjonslikning 5 reduseres lipidhydroperoksider til hydroksylderivater. Likning 6 er netto reaksjonslikning (Schaich, 2016).

Når elektronene fra jodionene reagerer med lipidhydroperoksidet dannes det jodid som gir en gul farge. Mengde jodid tilsvarer mengden hydroperoksider i oljen. Hvis gulfargen blir mørkere, nærmest brunoransje, indikerer det stor reduksjon av hydroperoksider. Likning 1 viser hvordan løsningen går fra gul til fargeløs når titranten natriumtiosulfat reagerer med utløst jodid (Schaich, 2016).



Analyse av aldehyder som oksidasjonsprodukter er basert på spektrofotometrisk analyse kalt tiobarbitursyre-reaktive-forbindelser (TBARS). Tiobarbitursyre (TBA) reagerer med malonaldehyder under oppvarming og danner et rosa Schiffbasekompleks som kvantifiseres ved 532-535 nm. Forenklet reaksjonsmekanisme er vist i figur 10 (Schaich, 2016; Eymard et al., 2005).



Figur 10 Malonaldehyd reagerer med tiobarbitursyre og danner et rosa kompleks som er synlig ved 532-535 nm (Schaich, 2016).

TBARS-analysen kan gi komplekser synlige ved flere bølgelengder. I tillegg til malonaldehyder dannes blant annet alkaner, alkener og acetylaldehyder. I reaksjon med TBA danner alkaner et gult kompleks som er synlig ved 450-455 nm. Acetylaldehyder reagerer med TBA under varme og gir et oransje kompleks synlig ved 496 nm. For å unngå noen sidereaksjoner er det en fordel å utføre analysen med lipidekstrakt. I analysen utført for dette arbeidet er kloroformfase benyttet. Resultater presenteres vanligvis som $\mu\text{mol TBARS/g}$ (Schaich, 2016).

1.6 Proteinoksidasjon

Tidligere har det vært antatt at hovedårsaken til tap av matkvalitet kommer av lipidoksidasjon og mikrobiell vekst. Dette har medført mindre forskning på hvordan oksidasjon av proteiner påvirker mat. Til tross har senere studier vist at reaktive oksygenforbindelser (ROS) påvirker myofibrillproteiner under lagring (Lund et al., 2011). ROS kan aktiveres ved varmebehandling, som igjen kan forårsake proteinoksidasjon. Kjøttets naturlige antioksidative egenskaper kan hemmes ved varmebehandling, som gjør proteiner lettere utsatt for oksidasjon (Soladoye et al., 2015).

I følge Estévez et al. (2008) er forståelse for hvordan proteinoksidasjon påvirker muskelmat lite forstått, men noen studier har vist en sammenheng mellom oksidasjon og forandring i tekstur i kjølig lagret kjøtt. Proteinoksidasjon fører også til degradering av essensielle aminosyrer og produksjon av proteinkarbynyler (Stadtman & Levine, 2003; Estévez et al., 2008). Proteinkarbynyler kommer fra α - og β -spaltingsreaksjon av alkoksyldradikaler på ryggraden til et peptid. De kan også forekomme ved oksidasjon av sidekjedene til aminosyrer. Proteinkarbynyler er stabile molekyler og kan benyttes som markører for oksidasjon. Det er ingen gitte grenser for hva som er lite eller mye oksidasjon av proteiner. Økt mengde av karbynyler indikerer proteinoksidasjon (Schaich, 2016). Proteinkarbynyler kan lett benyttes for å anslå proteinoksidasjon da mange mekanismer leder til dette oksidasjonsproduktet (Soladoye et al., 2015).

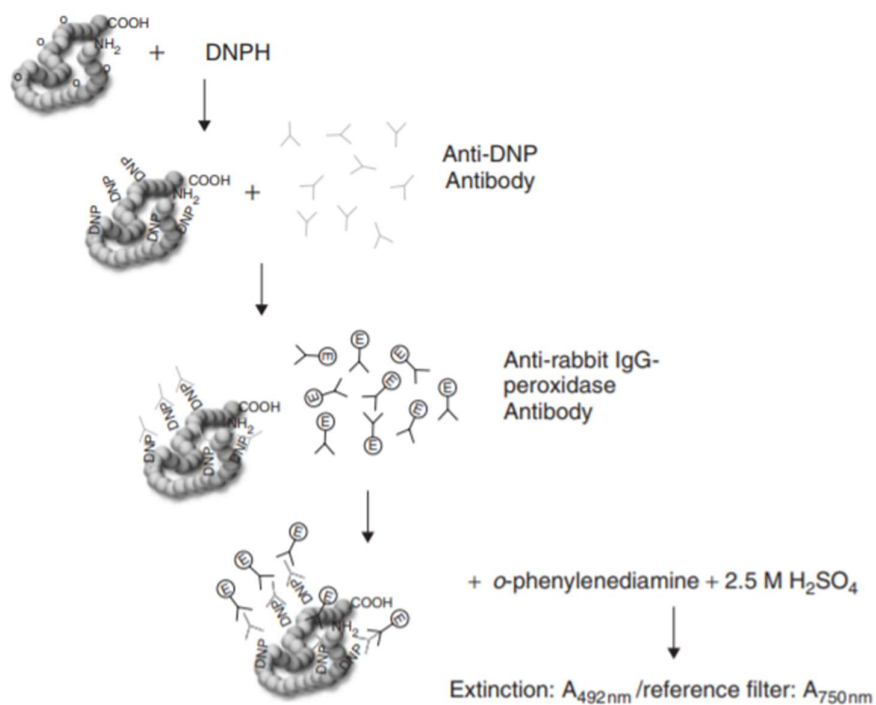
1.6.1 Bestemmelse av karbynylgrupper

Oksidasjon av fiskeproteiner kan gi opphav til proteinkarbynylderivativer som prolin, arginin, lysin og threonin. For å detektere oksidativt stress kan karbynylgrupper benyttes som markører (Buss et al., 1997). Det finnes ulike metoder for bestemmelse av mengde karbynylgrupper, blant annet enzyumbundet immunosorbentanalyse (ELISA), høypresisjonsvæskekromatografi (HPLC) og spektrofotometrisk analyse. Den sistnevnte analysen krever hverken dyrt eller spesialisert utstyr. Ulempen med denne metoden er at den krever større mengder protein enn som er tilgjengelig i kliniske prøver. HPLC derimot er mer sensitiv, men krever kostbart utstyr (Alamdari et al., 2005).

ELISA-metoden, utviklet av Buss et al. (1997), er en kolorimetermetode som måler binding av dinitrophenylhydrazine (DNP). Den er lite sensitiv og krever store mengder proteiner. Først reagerer proteinene med 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) og så adsorberes de til brønnene i ELISA-platen. Et antistoff tilføres brønnene og videre reagerer med streptavidin-biotinylert pepperrot peroksidase for kvantifisering. Metoden ble modifisert av Alamdari et al. (2005) for at prøver med lavere konsentrasjoner skal kunne analyseres. I utgangspunktet krevde metoden en proteinmengde på 60 μ g, men etter modifiseringen er mengden proteiner redusert til 5 μ g (Buss et al., 1997; Alamdari et al., 2005).

Figur 11 viser prosedyren for ELISA-metoden. Før start benyttes biorad-metoden for å kalkulere konsentrasjoner proteiner i ekstrakter slik at riktig konsentrasjon blir brukt ved analysen (Bradford, 1976). Proteiner adsorbent til ELISA-platen tilsettes DNPH som reagerer med karbynylgrupper på proteinene. Dette fører til binding av DNP til karbynylgrupper.

Deretter tilsettes et primært antistoff (Anti-DNP) som reagerer med DNP festet til proteinet, før et sekundært antistoff tilføres (Anti-kanin IgG-peroksidase) og reagerer med Anti-DNP. O-fenylendiamin og 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin dihydroklorid sammen med hydrogenperoksid reagerer med det sekundære antistoffet. Absorbansen måles ved en bølglengde på 450 nm. Basert på standardkurven bestemmes karbonylinnholdet til nmol/mg protein (Alamdari et al., 2005; Catalgol et al., 2011).



Figur 11 Prinsippet for ELISA-analysen (Catalgol et al., 2011)

1.7 Naturlige antioksidanter

Antioksidanter er molekyler som forhindrer oksidasjon av andre molekyler, for eksempel lipider (Morales-Medina et al., 2017). Dette ved å fjerne frie radikaler eller forhindre formering av frie radikaler (Halliwell, 1995). Antioksidanter kan kategoriseres som primære og sekundære avhengig av deres mekanisme. Primære antioksidanter fjerner frie radikaler ved å donere et hydrogenatom. Dette inhiberer initieringsfasen av lipidperoksidering (Akoh & Min, 2002). Sekundære antioksidanter senker raten av lipidoksidering ved å fjerne oksygen. Dette innebærer flere handlinger som chelatering og deaktivering av prooksidant metaller og singletoksygen,

forfremming av aktiviteten i primære antioksidanter, og absorbering av ultrafiolett stråling (Foti et al., 2004). Det finnes også antioksidanter som kan forhindre mer enn én mekanisme (Akoh & Min, 2002).

Det har i senere tid blitt større etterspørsel av naturlige tilsetningsstoffer i mat (Morales-Medina et al., 2017). Antioksidanter kommer i syntetisk og naturlig form. Naturlige antioksidanter er plantebaserte og i hovedsak aromatiske sekundære plantemetabolitter som plantefenoler. Fenolkomponentene har redoks-egenskaper som gjør at de oppfører seg som reduserende midler, hydrogendonorer, fri radikal fjernende og metall-chelaterende (Yesilogu & Şit, 2012). Fenolkomponenter er delt inn i tre grupper: enkle fenoler (består av en fenolenhet), flavonoider (inneholder to fenolenheter) og tannin (inneholder minst tre fenolenheter) (Shahidi et al., 1992). Planter som er rike på fenoler er blant annet urter og krydder. En urt som har gode antioksidierende egenskaper er rosmarin (Clifford, 1999).

1.7.1 Rosmarin og askorbylpalmitat

De viktigste fenolkomponentene i rosmarin er karnosin-, rosmarin-, karnosol-, ursolic- og koffeinsyre. Disse komponentene finnes hovedsakelig i bladene hos planten (Rodríguez-Rojo et al., 2012). I rosmarinekstrakter er det fenolderivatene karnosin- og karnosolsyre som har de beste antioksidierende egenskapene (Zhang et al., 2012). Vanligvis brukes denne urten som smakstilsetning i mat og til medisinske formål. Urten er blitt vurdert som en av de mest effektive for behandling av hodepine, dårlig sirkulasjon, inflammatoriske plager, og fysisk og mental tretthet. Disse effektene kommer av antioksidantaktivitet i rosmarin. Grunnet antioksidierende og antimikrobielle egenskaper forlenger rosmarin matproduktets holdbarhet og kvalitet (Raskovic et al., 2014).

I mat tilsettes urter og krydder for å forbedre organoleptiske egenskaper, farge og aroma, i tillegg til antioksidierende- og conserveringsegenskaper (Tsimidou et al., 1995; Rozentale et al., 2018). Krydderurter er også kjent for sine antimikrobielle egenskaper. Til tross for dette har det vært detektert høye mikrobielle nivåer på opptil 10^8 kolonidannende enheter per gram (CFU/g). Det skal være maks 10^7 CFU/g hos matprodukter for at det skal være trygt å spise. På denne måten kan tørkede urter være årsaken til patogener i matvarer (Dinh Thanh et al., 2018).

I dette arbeidet ble antioksidantekstraktene Fortium TR25 og RPT40 brukt. Fortium TR25 består av solsikkeolje, tokoferolrikt ekstrakt (E 306), naturlig rosmarinekstrakt og lecithin (E 322) (Kemin, 2014). Ekstraktet Fortium RPT40 består av det samme som TR25-ekstraktet, men

inneholder i tillegg askorbylpalmitat (E 304i) (Kemin, 2016). Askorbylpalmitat er en ester med lipofile egenskaper syntetisert fra askorbinsyre (E 300). Denne antioksidanten har en såpelignende smak og lukt av sitrus. Den fungerer mot oksidasjon på den måten at den går over til en oksidert tilstand etter å ha donert et elektron til singletoksygen (Teneva & Dimcheva, 2016).

1.8 Formålet med arbeidet

Formålet med dette arbeidet har vært å se hvordan ulike prosessparametere innvirket på atlantisk makrell ved sous vide-behandling. Prosessparametere som temperatur, koketid og tilsetning av antioksidanter varierte. Fisken ble etter sous vide-behandling lagret over 15 dager. Det ble tatt fire uttak, hvor første var dagen etter koking. Over lagringsperioden ble det sett på endringer i mikrobiell status, farge, koketap, vanninnhold, aske, totalt lipidinnhold, proteininnhold og oksidasjon av lipider og proteiner.

2 Materialer og metoder

2.1 Kjemikalier

Kjemikalier brukt til analyser er gitt nedenfor. De kjemikaliene som det ikke er nevnt noen leverandør, var p. a.

- Fortium TR25 - Kemin
- Fortium RPT40 - Kemin
- Natriumklorid
- Natriumdihydrogenfosfat
- Natriumhydroksid
- Kaliumklorid
- Bovint gamma globulin
- Biorad-fargereagens
- Kaliumhydrogenfosfat
- Etanol (96 %)
- Metanol
- Kloroform
- Kaliumjodid
- Natriumtiosulfid
- Eddiksyre
- 2-tiobarbitursyre (TBA)
- Natriumsulfitt
- Trikloreddiksyre
- 1,1,3,3-tetraethoksypropan
- Butylhydroksytoluen (3 % BHT i etanol)
- OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit – Cell Biolabs, Inc.
 - 10X wash bufferkonsentrat
 - 2X DNPH diluent
 - Blocking reagent
 - DNPH (2,4-dinitrofenylhydrazin)
 - Anti-DNP antistoff
 - Sekundært antistoff
 - Oksidert BSA
 - Redusert BSA

2.2 Metoder

2.2.1 Sous vide-behandling av makrellfileter

Makrellen ble fanget med ringnot i siste halvdel av oktober 2017 av båten Kings Bay. Fisken ble filetert, pakket i vakuumposer i blokker på 10 kg og frosset i frysetunnel ved Pelagia A/S, og lagret ved -30 °C. Fisken ble tatt ut av fryseren og tint først i 5-7 timer ved romtemperatur og så ved +4 °C over natt. Filetene ble tørket med papir og parvis vakuumpakket i «Rolf Bayer»-forseglede poser type BST 90 med en tykkelse på 90 µm, varmeresistent ved -25/+100 °C, O₂-permeabilitet på <60 cm³/m² ved 23 °C/75 % RH, og vanndamp-permeabilitet på <4 g/m² d ved 23 °C/85 % RH. En del makrellfileter ble tilsatt rosmarinekstrakt (Fortium TR25) og askorbylpalmitat (Fortium RPT40). Det ble vakuumpakket (99,6 %) tre parallelle poser for hvert uttak. Fisken ble sous vide-behandlet ved to temperaturer og to tider. Prøvenavn med prosessparametere er gitt i tabell 2. Rett etter koking ble pakkene lagt på is for rask nedkjøling. Etter behandling ble makrellfiletene oppbevart på is (0 ± 1 °C) i kjølerom (2 ± 1 °C) i 15 dager. Uttaksdager var dag 1, 3, 9 og 15, hvor første uttaket var dagen etter koking. Kolonidannende enheter (CFU), farge, tekstur, tørrstoff, aske, lipid- og proteininnhold, og lipid- og proteinoksidasjon ble analysert ved hvert uttak.

Tabell 2 Makrellen ble sous vide-behandlet med varierende temperatur, koketid og tilsats av antioksidant varierte. Navnene på prøvene er gitt utfra type behandling.

Prøvenavn	Temperatur [°C]	Koketid [min]	Antioksidant
T7T10N	70	10	Ingen
T7T10A	70	10	Fortium TR25 (0,4 %)
T7T20N	70	20	Ingen
T7T20A	70	20	Fortium TR25 (0,4 %)
T7T20B	70	20	Fortium RPT40 (0,2 %)
T8T10N	80	10	Ingen
T8T10A	80	10	Fortium TR25 (0,4 %)
T8T20N	80	20	Ingen
T8T20A	80	20	Fortium TR25 (0,4 %)
T8T20B	80	20	Fortium RPT40 (0,2 %)

Koking av makrellfiletene ble utført i to puljer. For første koking ble det brukt én 10 kg-blokk til koking ved 70 °C. For andre koking ble det brukt en annen 10 kg-blokk til koking ved 80 °C. Det var to makrellfileter i hver pose. For hvert uttak ble det brukt tre poser per prøve. Mikrobiell status ble analysert for to makrellfileter. Én fra hver av to poser. Posene ble åpnet med en steril saks. En fiskebit ble skjært av med en steril skalpell. Koketapet ble analysert etterpå. Resten av analysen ble gjennomført etter at koketapet var fjernet. Farge ble analysert etter koketapet på

én filet fra hver pose og deretter ble vanninnhold, aske og proteinløselighet analysert for én makrellfilet fra to poser. Proteinoksidasjon (karbonyler) ble gjennomført på fryste (-20 °C) proteinekstrakter 2-4 uker etter analyse av proteinløselighet. Resterende fileter ble kvernet og fryst ned ved -80 °C før det senere ble analysert totalt lipidinnhold. Kloroformfasen fra denne analysen ble fryst ved -80 °C og brukt til analyse av lipidoksidasjon (PV og TBARS).

2.2.2 Koketap

Væsken som makrellen taper ved tilberedning og lagring defineres som koketap. Vakuumpakken med makrell ble først veid før makrellen ble tatt ut av posen. Makrellen ble klappet med tørkepapir og posen ble tømt for vann og tørket. Tørket tom pose ble veid, før tørket pose med tørket fisk ble veid sammen. Det ble tatt hensyn til fiskebiten fjernet for analyse av mikrobiell status. Mengden koketap ble beregnet i prosent av opprinnelig vekt.

2.2.3 Vanninnhold og aske

Tørrvekt og aske ble gjennomført i duplikater. Prøver av makrellfileter (2 g) ble veid ut nøyaktig i porselensdigler. Diglene ble satt i en ovn (105 °C) over natt og deretter avkjølt i en eksikator i 30 minutter. Vekten av diglene ble avlest og tørrstoffet ble bestemt. Prøvene ble videre satt i en askeovn (600 °C, 12 timer) før de ble avkjølt og mengde aske ble veid og bestemt.

2.2.4 Teksturmåling

Tekstur hos makrellfiletene ble målt som beskrevet av Hultmann & Rustad (2002). Hardhet ble bestemt med TA.XT2 Texture Analyzer (SMS Stable Micro Systems, Ltd., Surrey, UK) utstyrt med 1 kg belastningscelle. En sylinder med flat ende på 12 mm i diameter ble trykket inn i fiskemuskelen med konstant hastighet på 1 mm/s. Endepunktet for sammenpressingen var når 60 % av høyden til fisken var nådd. Tiden mellom hver kompresjon var på 5 sekunder. Det ble målt opptil 7 punkter per makrellfilet. Gjennomsnittsverdiene ble beregnet fra 1-7 punkter målt på filetene for å bestemme maksimal motkraft i Newton (N).

2.2.5 Proteinløselighet

Metoden benyttet for løselighet av vann- og saltløselige proteiner var modifisert fra Anderson & Ravesi (1968) og Licciardello et al. (1982). Denne analysen ble gjennomført i duplikater. 4 g makrellfilet ble veid i sentrifugeringsbeger og eksakt vekt notert. Fosfatbuffer (80 mL, 0,05 M, pH 7) ble homogenisert med fisken i 30 sekunder ved bruk av Ultra Turrax. Begrene ble

sentrifugert ved 8000 g, 4 °C i 20 minutter. Supernatanten ble filtrert gjennom glassull og over i en målekolbe (100 mL). Volumet ble justert ved tilsats av fosfatbuffer. Dette var vannløselige proteiner. For saltløselige proteiner ble samme prosedyre fulgt, men i stedet ble fosfatbuffer (80 mL, 0,05 M, pH 7) med KCl (0,6 M) brukt.

Mengde proteiner i vann- og saltløselige ekstrakter ble bestemt med biorad-metoden (Bradford, 1976). Bovint gamma globulin ble brukt som standard. Standarder ble analysert i triplikater og proteinekstrakter i duplikater av tidligere duplikater. 100 µL av standarder og prøver med salt- og vannløselige proteiner ble tilsatt hvert sitt reagensrør. Fortynnet (1:4) fargereagens (5 mL) ble tilsatt hvert rør. Løsningene ble godt blandet. Absorbansen ble avlest etter 5 minutter ved 595 nm. Fargen holdt seg stabil i inntil 60 minutter.

2.2.6 Proteinoksidasjon

Analyse av proteinoksidasjon i prøvene ble gjennomført ved å bruke «OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit». Analyseprotokollen gitt i kittet ble brukt ved gjennomføring av prosedyren. Alt av kjemikalier utenom fosfatbuffer salin (PBS) og etanol fulgte med i kittet. Det ble forberedt åtte reagenser til denne metoden: 1X PBS, 1X PBS/Etanol, 1X wash buffer, 1X diluent, blocking solution, DNPH working solution, og anti-DNP antibody og secondary antibody. Tabell 3 viser hvordan reagensene brukt til denne metoden ble laget.

Tabell 3 Oppskriften til reagenser brukt ved analyse av proteinkarbonyler.

Reagens	Metode
1X PBS	Til 100 mL 1X PBS ble NaCl (0,8 g), KCl (0,02 g), Na ₂ HPO ₄ (0,144 g) og K ₂ HPO ₄ (0,24 g) løst i deionisert vann.
1X PBS/Etanol	Etanol og 1X PBS ble blandet 1:1.
1X wash buffer	10X wash bufferkonsentrat ble fortynnet til 1X wash buffer med deionisert vann. Løsningen ble godt blandet.
1X DNPH diluent	2X DNPH diluent ble fortynnet til 1X DNPH diluent med deionisert vann. Løsningen ble godt blandet.
Blocking solution	Blocking reagent (5 g) ble løst i 100 mL 1X PBS. Den kunne lagres kjølig (4 °C) opptil én uke.
DNPH working solution	DNPH stockløsning ble laget ved å løse DNPH (1-5 mg) i 1X DNPH diluent til en konsentrasjon på 1 mg/mL. Denne løsningen var stabil inntil én uke ved mørk og kjølig (4 °C) lagring. Rett før bruk ble DNPH working solution laget ved å fortynne stockløsningen (1 mg/mL) med 1X DNPH diluent til en konsentrasjon på 0,04mg/mL. Løsningen ble godt blandet.

Anti-DNP antibody og secondary antibody	Umiddelbart før bruk ble både anti-DNP antibody og secondary antibody fortynnet 1:1000 med 1X blocking solution. Disse kunne ikke lagres.
--	---

Standarder ble forberedt ved å fortynne 1 mg/mL redusert eller oksidert BSA standarder til 10 µg/mL med 1X PBS. En standardserie karbonyl-BSA ble laget ved å blande oksidert og redusert BSA etter gitte forhold i tabell 4. Vann- og saltløselige proteinekstrakter ble fortynnet med 1X PBS til en konsentrasjon på 10 µg/mL. Standarder ble kjørt i triplikater. Det ble laget duplikater av proteinekstrakter fra hver makrellprøve. Ved denne analysen ble det kjørt duplikater av hvert proteinekstrakt. Dette resulterte i analyse av totalt fire proteinekstraktprøver.

Tabell 4 Blanding av oksidert og redusert BSA ble brukt for å lage en proteinkarbonyl-standardserie med ønskede konsentrasjoner.

Standard	10 µg/mL oksidert BSA [µL]	10 µg/mL redusert BSA [µL]	Proteinkarbonyl [nmol/mg]
1	400	0	7,5
2	320	80	6,0
3	240	160	4,5
4	260	240	3,0
5	80	320	1,5
6	40	360	0,75
7	20	380	0,375
8	0	400	0

100 µL av standarder og proteinekstrakter ble tilsatt brønner på proteinbindende plate og inkubert over natt ved 4 °C eller i 2 timer ved 37 °C. Hver brønn ble vasket tre ganger med 250 µL 1X PBS. For hver vask ble løsningene ristet på en orbital shaker i 2 minutter. Etter hver vaskeprosess gjennom hele analysen ble et tørkepapir lagt over brønnene og platen snudd for å få ut gjenværende væske.

100 µL DNPH working solution ble tilført og platen ble satt til inkubering i mørket ved romtemperatur i 45 minutter. Brønnene ble vasket fem ganger med 1X PBS/Etanol i 5 minutter på orbital shaker.

200 µL blocking solution ble tilført platen og satt til inkubering i 1,5 time ved romtemperatur på en orbital shaker. Brønnene ble vasket tre ganger med 250 µL 1X wash buffer og orbital shaker ble brukt i 2 minutter per vask.

100 µL fortyntet anti-DNP antibody ble tilført prøvene ble inkubert i romtemperatur på en orbital shaker for 1 time. Platebrønnene ble vasket tre ganger med 250 µL 1X wash buffer og orbital shaker ble brukt i 2 minutter per vask.

100 µL fortyntet secondary antibody ble tilført med påfølgende inkubasjon i 1 time ved romtemperatur på en orbital shaker. Brønnene ble vasket 5 ganger med 250 µL 1X wash buffer og orbital shaker ble brukt i 2 minutter per vask.

100 µL romtemperert substratløsning ble tilført og prøvene ble inkubert ved romtemperatur i 2-30 minutter. Inkuberingstiden var avhengig av fargeendringen og ble stoppet ved å tilsette 100 µL stoppløsning for å unngå metning. Absorbansen ble avlest ved 450 nm umiddelbart etter tilførsel av stoppløsning, ved bruk av en plateleser. Den fullstendig reduserte BSA-standarden ble brukt som blank.

2.2.7 Totalt lipidinnhold

Totalt lipidinnhold ble bestemt med «Bligh and Dyer»-metoden (Bligh & Dyer, 1959). Analysen ble utført i duplikater. 10 g makrellfilet ble veid ut i sentrifugekopper. Begrene stod på is under hele prosedyren. Hvert beger ble tilsatt destillert vann (16 mL), metanol (40 mL) og kloroform (20 mL). Væsken og fisken ble homogenisert med Ultra Turrax i 2 minutter. Videre ble 20 mL kloroform og 20 mL destillert vann tilsatt hver for seg og homogenisert i 40 sekunder etter hver tilsats. Løsningene ble sentrifugert ved 4000 g i 15 minutter. Duplikater av 2 mL lipidekstrakt ble overført til forhåndsveide rør og fordampet ved 60 °C under nitrogengass. Avdampede prøver ble satt i eksikator over natt og veid. Totalt lipidinnhold ble bestemt ved å bruke likning 2.

$$\%_{\text{totalt lipidinnhold}} = \frac{m_{\text{fordampet prøve i rør}} [g] - m_{\text{tomt rør}} [g]}{m_{\text{utveid prøve}} [g]} \cdot 100 \% \cdot V_{\text{kloroform}} \quad (2)$$

2.2.8 Bestemmelse av peroksidverdier ved iodometrisk titrering med SI-analytisk titrator

Peroksidverdiene ble bestemt med iodometrisk titrering med SI-analytisk titrator. Dette tilsvarer AOCS Official Method Cd 8b-90(1). SI-analytisk titrator mode TL 6000/7000 bestod av titratorenhet med magnetrører TM 235, 10 mL vekslingsenhet WA 10 med brun glassflaske for titrant, og platinelektrode Pt 62/61 med kabel L 1 A.

Løsninger benyttet var titreringsløsning, løsningsmiddel og mettet kaliumjodidløsning. Titreringsløsningen ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,01 M) ble laget ved å fortynne 0,1 M titrantløsning. Denne løsningen ble lagret i brun glassflaske. Løsningsmiddelet bestod av eddiksyre/kloroform (3:2). Kaliumjodidløsningen ble laget ved å løse 10 g kaliumjodid i 13 g destillert vann.

Lipidekstraktene med olje ble laget ved «Bligh and Dyer»-metoden. 12 mL lipidekstrakt ble overført til begerglass og tilført 18 mL eddiksyre. Dette ble blandet i noen sekunder på magnetrører før blandingen ble tilsatt 0,5 mL kaliumjodidløsning. Etter 60 sekunder ble 30 mL destillert vann tilsatt. Elektroden ble satt i løsningen og titreringsspissen ble plassert over prøveløsningen. Titreringen ble satt i gang med natriumtiosulfidløsning som titrant og tilsatt volum til ekstraktet ble notert for beregning av milliekvivalenter av peroksid per 1 kg olje (meqO_2/kg olje). Prøveløsningen ble konstant rørt under titreringen. For blank ble 30 ml av løsningsmiddelet tilsatt 0,5 mL kaliumjodidløsning, og etter 60 sekunder ble 30 mL destillert vann tilsatt. Resten av titreringen ble fulgt som beskrevet tidligere.

Peroksidverdier (meqO_2/kg olje) ble bestemt utfra likning 3.

$$PV = \frac{(V-B) \cdot T \cdot M \cdot F_1}{w \cdot F_2} \quad (3)$$

Hvor

V – volum av titrant forbrukt ved titrering av prøver, mL.

B – volum av titrant forbrukt ved titrering av blank, mL.

T – konsentrasjon av titreringsløsning (0,01 M)

F_1 – faktor 1 (1)

F_2 – faktor 2 (1)

W – vekt av olje i 12 mL lipidekstrakt, g.

2.2.9 Bestemmelse av TBARS ved spektrofotometrisk analyse

Lipidekstrakter laget med «Bligh & Dyer»-metoden ble også brukt til å måle TBARS. Måling i kloroform ble utført i duplikater. Metoder for tillaging av reagenser er gitt i tabell 5. 5 mL TBA arbeidsløsning ble tilført kimax-rør med 200 μL lipidekstrakt. Løsningene ble blandet godt i 15-20 sekunder med en vortex. Rørene ble inkubert i 45 minutter i kokende vannbad før

de ble avkjølt i kaldt vann. TCA-løsning (2,5 mL) ble tilført hvert rør og blandet før sentrifugering ved 900 g i 7 minutter.

Standardkurven ble laget ved å tilsette 0, 25, 50, 100, 150 og 200 µL TEP stokkløsning i stedet for lipidekstraktet. Duplikater av standardprøvene ble behandlet på samme måte som prøvene.

Absorbansen ble målt ved 538 nm med 10 mm OG glasskvyetter. Destillert vann ble brukt som blank. Likning 4 ble brukt til å beregne mengde TBARS i µmol/g lipid.

$$\frac{\mu\text{mol TBARS}}{\text{g lipid}} = \frac{\text{Absorbans av prøve} - \text{æringpunktet til standardkurven}}{\text{stigningstallet til standardkurven} \cdot \text{total lipid i prøve} \cdot 1000} \quad (4)$$

Tabell 5 Oppskriften til reagenser brukt ved analyse av TBARS

Reagens	Metode
TBA stokkløsning	1,44 g av 2-tiobarbitursyre ble blandet i 50 mL destillert vann og videre fortynnet med ren eddiksyre i en 250 ml målekolbe. Løsningen ble satt på en magnetrører ved svak varme for å få løst opp alt.
Natriumsulfitt (Na₂SO₃)	9,46 g natriumsulfitt ble løst i en målekolbe (250 mL) med destillert vann.
TCA-løsning	11,43 g triklor-eddiksyre ble løst med destillert vann i en 250 mL målekolbe.
TEP stokkløsning	0,22 g av 1,1,3,3-tetraethoksypropan ble løst i 100 mL destillert vann ved hjelp av en magnetrører.
TEP work-løsning	TEP stokkløsning ble fortynnet til 0,1 mM med destillert vann.
TBA work-løsning	Ble laget ved å blande 180 mL TBA stokkløsning, 120 ml kloroform, 15 mL natriumsulfitt og 9,45 mL butylhydroksytoluen (3 % BHT i etanol). Ble laget samme dag som gjennomføring.

2.2.10 Fargemåling

Farge på makrellfiletene ble målt instrumentelt ved å bruke Minolta Chroma meter CR-400 (Konica-Minolta, Osaka, Japan). Instrumentet ble kalibrert med en standard hvit plate. Det ble målt farge på én filet fra tre poser. Målingene ble utført tre steder på makrellfiletens overflate ved romtemperatur. Fargekoordinatene ble notert ifølge «Commission Internationale de l'Éclairage (CIE) Lab scale», L* (lyshet, svart = 0, hvit = 100), a* (+60 = rød, -60 = grønn), og b* (+60 = gul, -60 = blå). Fargeparameterne ble bestemt og gjennomsnittsverdiene beregnet (Karoui & Hassoun, 2017).

2.2.11 Mikrobiell vekst

Bestemmelse av mikrobiell vekst ble gjennomført i duplikater. Arbeidsbenk og utstyr ble sterilisert med etanol. En bit på omtrent 10 g ble skåret ut, veid og overført til mikrobiologipose og tilsatt NaCl (90 mL, 0,9 %). Innholdet ble blandet med Stomacher 400 i 60 sekunder ved 230 rpm. Løsningen ble fortynnet til ønsket konsentrasjon hvor 1 mL ble tilført «Compact Dry TC»-plate og inkubert ved 20 °C i 96 timer. Antall kolonidannende enheter ble talt og mikrobiell vekst ble bestemt.

2.2.12 Statistiske analyser

Statistiske analyser ble utført i Microsoft Excel 2013. Resultater er presentert som gjennomsnittsverdi \pm empirisk standardavvik. Signifikante forskjeller ble analysert ved å benytte tosidig student t-test, med et signifikansnivå på 5 %. Lineær korrelasjonskoeffisient ble bestemt for å finne korrelasjoner mellom resultater.

3 Resultat og diskusjon

3.1 Råmateriale

Formålet med dette arbeidet har vært å se hvordan ulike prosessparametere innvirket på atlantisk makrell ved sous vide-behandling. Rådata og beregninger for oppnå alle resultatene fra analysene er vedlagt i en komprimert mappe (Zip), se vedlegg A. Alle analysene ble også brukt til å karakterisere råstoffet. Makrellen brukt for analyse av råstoffet kom fra 10 kg-blokken brukt ved første sous vide-koking. Det karakteriserte råstoffet er presentert i tabell 6.

Tabell 6 Karakterisering av råstoff inkluderte fett- og proteininnhold, vanninnhold, aske, mikrobiell status, tekstur, farge, lipidoksidasjon (PV, TBARS) og proteinoksidasjon (karbonyl).

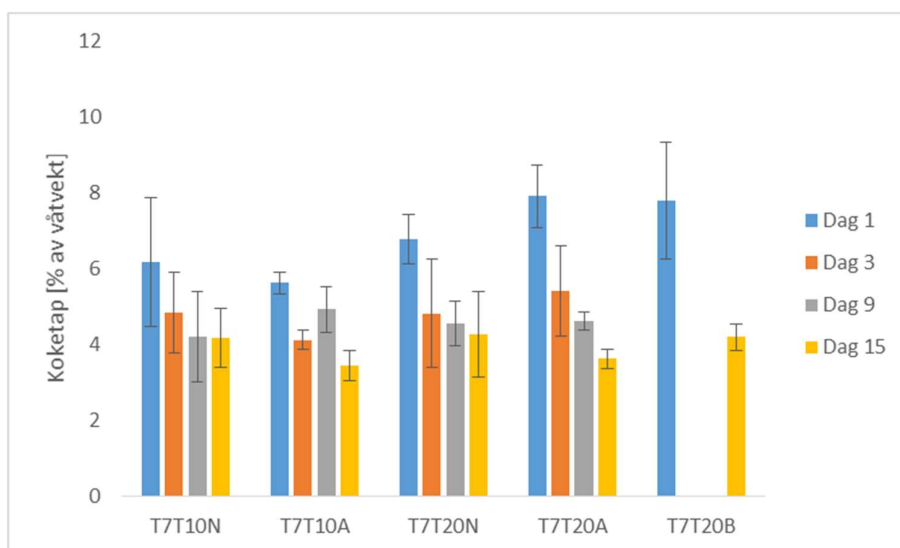
	Verdi
Totalt lipidinnhold [%]	28,9 ± 0,4
Sarkoplasmaproteiner [%]	8,6 ± 1,1
Myofibrillproteiner [%]	4,7 ± 0,9
Vanninnhold [%]	61,4 ± 5,2
Aske [%]	1,3 ± 0,1
Mikrobiell vekst [CFU/g]	4,0 ± 0,6
Hardhet [N]	8,0 ± 1,0
Lyshet	63,0 ± 3,3
Rødhet	1,0 ± 0,5
Gulhet	10,0 ± 0,9
PV [meq O₂/kg olje]	18,0 ± 0,9
TBARS [µmol/g]	2,2 ± 0,3
Proteinkarbonyler [nmol/mg]	11,5 ± 0,4

Makrell består hovedsakelig av vann (60-74 %), fett (1-24 %) og proteiner (16-20 %) (Murray & Burt, 2001; Leu et al., 1981). Fettinnholdet i råstoffet var 28.9 % som var høyt i forhold til det som var oppgitt i tidligere artikler. Løselige proteiner utgjorde 13,3 % av våtvekt. Den kjemiske sammensetningen varierer med blant annet kjønn, årstid og alder, dermed kan innholdet av fett og proteiner avvike fra dokumenterte data.

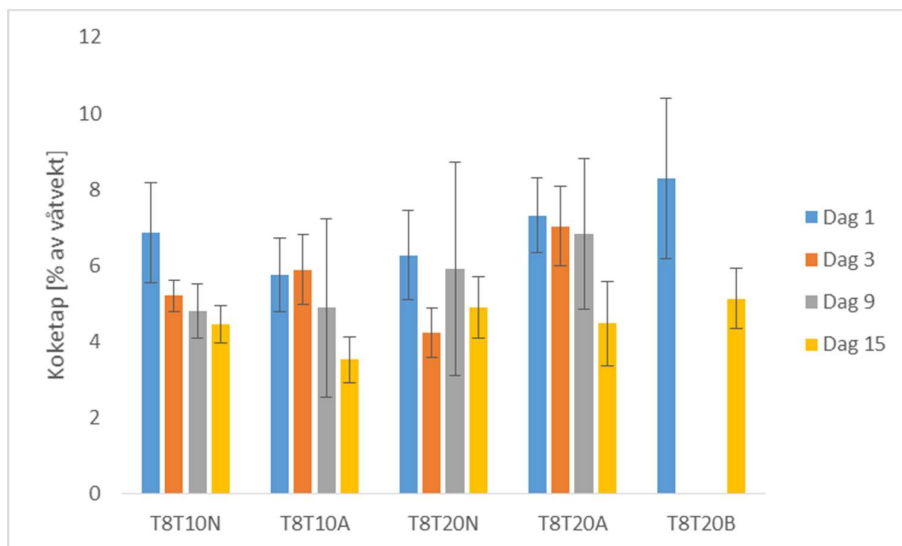
Totalt utgjorde fett, løselige proteiner, vann og aske 104,9 %. I tillegg vil det også være noen prosent uløselige proteiner. Standardavviket for fett er lavt, mens for proteiner og vanninnhold utgjør det 8-12 % av målte data. Det kan antas at noen av parallellene for proteiner og vanninnhold for råstoffet var upresise. For at fett, protein, vann og aske skal utgjøre 100 % av makrellen måtte mengden av disse komponentene vært mindre enn angitt i tabell 6. Stor usikkerhet i vanninnholdet kom av variasjon mellom prøvene. Under analysen burde det vært brukt flere paralleller for et bedre representativt resultat.

3.2 Koketap

Ulike prosesseringer fører til tap av vann, for eksempel frysing, kjølelagring og varmebehandling. Koketap forkommer ved varmebehandling og består hovedsakelig av vann, og små mengder denaturert protein. Endringer i proteinstruktur i myofibrillproteiner gjør at en fraksjon av vann lekker ut. Det meste av vannet i fiskemuskel finnes i myofibrillproteiner (Skipnes et al., 2007; Stormo et al., 2017). Koketap for makrellfileter kokt ved 70 og 80 °C er gitt henholdsvis i figur 12 og 13.



Figur 12 Koketap for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C og lagret i 15 dager er gitt i prosent av våtvekt.



Figur 13 Koketap for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C og lagret i 15 dager er gitt i prosent av våtvekt.

Koketapet viste en avtagende trend for makrellprøver behandlet ved 70 °C utover lagringsperioden. På første uttaksdag var koketapet størst for prøver kokt i 20 minutter. Mot slutten av lagringsperioden var koketapet jevnt uansett koketid, men prøvene med antioksidant var litt lavere enn prøver uten tilsetninger. Koketapet for prøver kokt ved 80 °C viste også avtagende trender. For disse var variasjonen i koketapet mindre fra dag 1 til dag 3. Koketapet var størst ved høyest temperatur. I et studie av Skipnes et al. (2011) ble størst koketap funnet ved høyest temperatur for atlantisk torsk. Prøver kokt i 10 minutter hadde mindre koketap enn prøver kokt i 20 minutter. Prøvene med rosmarin kokt ved 80 °C viste en signifikant forskjell i koketap ($p < 0,05$), hvor den lengste koketiden gav størst tap. Det ble ikke observert at prøver med antioksidanter gav signifikant mer eller mindre koketap.

I samsvar med Skipnes et al. (2007) ble det for koketap funnet en signifikant korrelasjon ($r = 0,807$) mellom temperaturene. Koketemperaturene utgjorde ingen signifikante forskjeller på koketapet. Stormo et al. (2017) rapporterte heller ingen signifikante forskjeller i koketap ved kjølig lagring av torsk. Ved varmebehandling ved 70 og 80 °C var det ingen signifikant forskjell i koketapet. Kjøling av varmebehandlet fisk kan forårsake at en liten mengde av utdrevet vann absorberes av fiskekjøttet (Skipnes et al., 2011). Dette kan være årsaken til mindre koketap utover lagringsperioden.

Varmebehandling forårsaker denaturering av myofibrillproteiner og bindevev som presser ut vann. Vannet inneholder proteiner som kan koagulere på overflaten av fisken (Skipnes et al., 2011). Under lagringsforsøket ble det observert geldannelse på fisken. Dette kan skyldes kollagenet i bindevevet utskilt med vann ved denaturering av proteiner ved varmebehandling.

3.3 Vanninnhold og aske

3.3.1 Vanninnhold

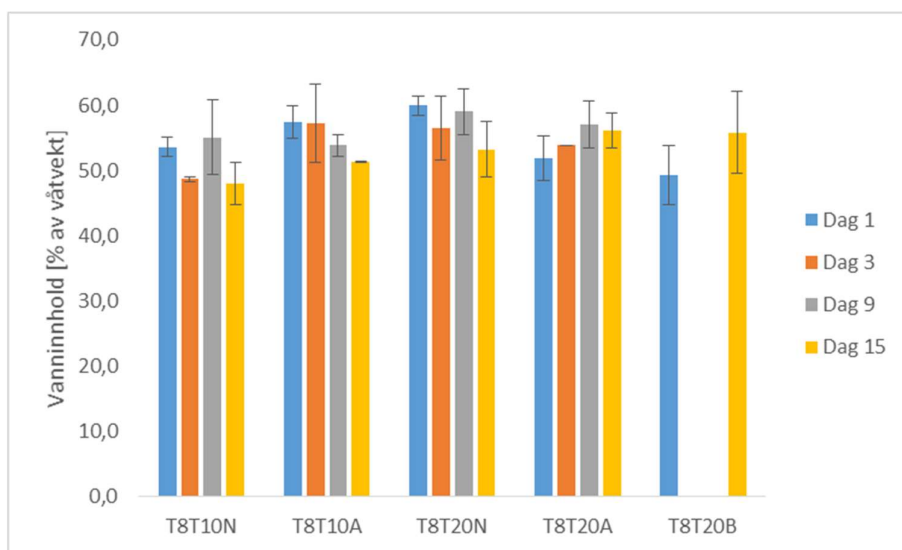
Endringer i vanninnhold over tid kan påvirke kjemiske egenskaper i fiskemuskel. Tidligere studier har vist at vanninnholdet varierer mellom mørk og lys muskel. Chajjain et al. (2004) har rapportert størst mengder av vann i lys muskel for sardiner og makrell. I analysen av vanninnhold i sous vide-behandlede makrellfileter ble det brukt både lys og mørk fiskemuskel. Figur 14 og 15 viser vanninnhold for makrell kokt ved henholdsvis 70 og 80 °C. Vanninnholdet ble bestemt etter at koketapet ble fjernet, derfor kan tapet av vann være større enn observert.



Figur 14 Vanninnhold for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C og lagret i 15 dager er gitt i prosent av våtvekt.

Råstoffet inneholdt 61,4 % vann. Makrell kokt ved 70 °C i 10 minutter viste et økende vanninnhold utover lagringstiden. Det laveste vanninnholdet for disse prøvene de første uttaksdagene var litt høyere enn 50 %. Dette tilsvarte et vanntap på 10-15 %. Vanninnholdet ved uttaksdag 9 hadde steget til en verdi høyere enn målt for råstoffet. Ved siste analysedag hadde vanninnholdet sunket. Prøver kokt i 20 minutter viste en avtagende trend. Vanninnholdet

ved første uttaksdag var 5-8 % lavere enn råmaterialet. Ved dag 9 ble det observert et vanntap opptil 15-20 %. Vanntapet ved siste uttaksdag var derimot minimal. Makrellen med askorbylpalmitat viste en trend til økning av vanninnholdet med et vanntap på 15-20 %. Ingen prosessparameter hadde signifikant påvirkning på vanninnholdet.



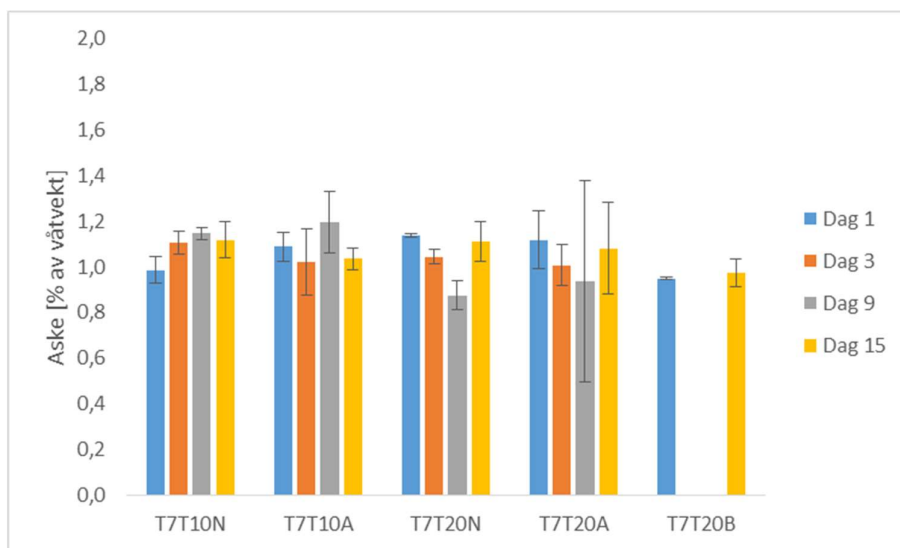
Figur 15 Vanninnhold for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C og lagret i 15 dager er gitt i prosent av våtvekt.

Alle prøver kokt ved 80 °C, utenom prøvene med antioksidanter varmebehandlet i 20 minutter viste en avtagende trend i vanninnholdet utover lagringstiden. Prøvene med avtagende trend hadde lavere vanninnhold ved første analysedag enn råstoffet. Til uttaksdag 15 hadde vanntapet økt til 15-20 %. Prøver uten antioksidant gav signifikant ($p < 0,05$) mindre vanninnhold ved 10 minutter koketid enn ved 20 minutter. Vanninnholdet for prøver kokt i 20 minutter med rosmarin og askorbylpalmitat viste en økende trend utover lagringstiden. Ved første uttaksdag lå vanntapet på 15-20 %, men økte til litt mindre enn 10 % ved siste uttaksdag.

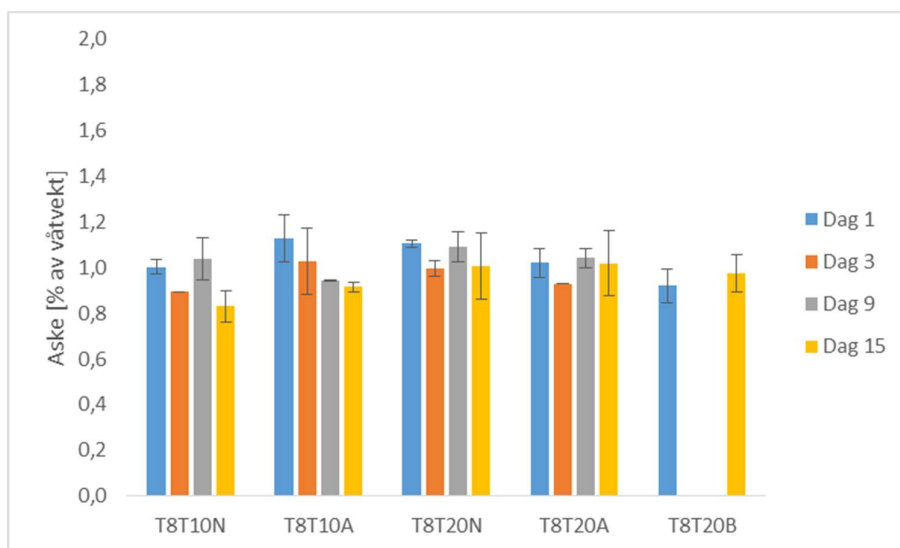
Det forekom variasjoner for prøver kokt ved begge temperaturene. Disse forskjellene i vanninnhold kan være forårsaket av blant annet alder og kjønn. Vanninnholdet varierer utfra hvor mye proteiner og fett makrellen inneholder.

3.3.2 Aske

Aske er et mål på mineralinnhold i fisk. Askeinnholdet i sous vide-behandlede makrellfileter ble beregnet i prosent av våtvekt. Figur 16 og 17 viser askeinnhold for makrell kokt ved henholdsvis 70 og 80 °C.



Figur 16 Aske for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C og lagret i 15 dager er gitt i prosent av våtvekt.

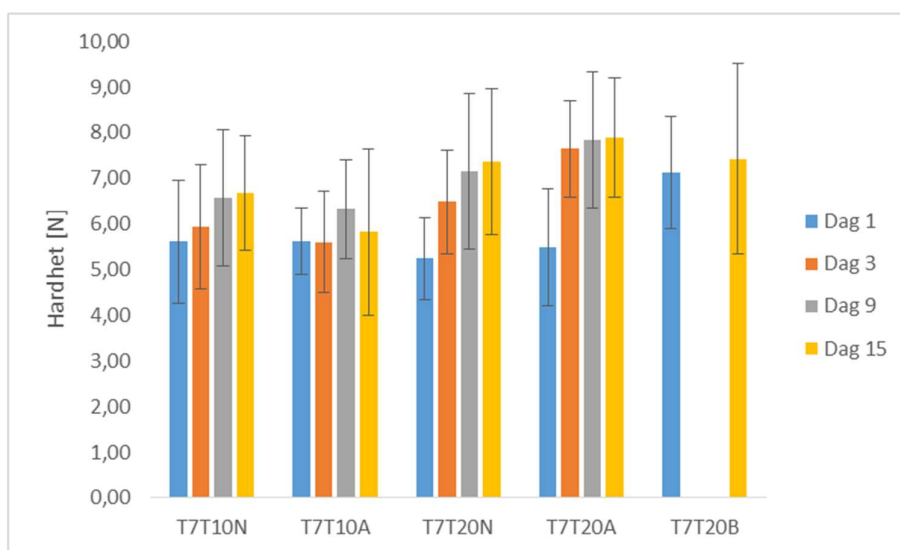


Figur 17 Aske for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C og lagret i 15 dager er gitt i prosent av våtvekt.

Askeinnholdet for makrellprøver kokt ved 70 °C viste små variasjoner over 15 dager lagringstid. Det samme ble observert for prøver kokt ved 80 °C. Den lengste koketiden ved 80 °C viste signifikant forskjell i askeinnholdet ($p < 0,05$). Askeinnholdet var også signifikant høyere ved lavere koketemperatur ($p < 0,05$). Det ble ikke brukt homogeniserte prøver av fisken ved analysen. Faktorer som også kan ha påvirket askeinnholdet var mengde fiskebein i prøvene. Det kan antas at varierende mengde av fiskebein i prøvene for askeinnhold og vanninnhold påvirket resultatene.

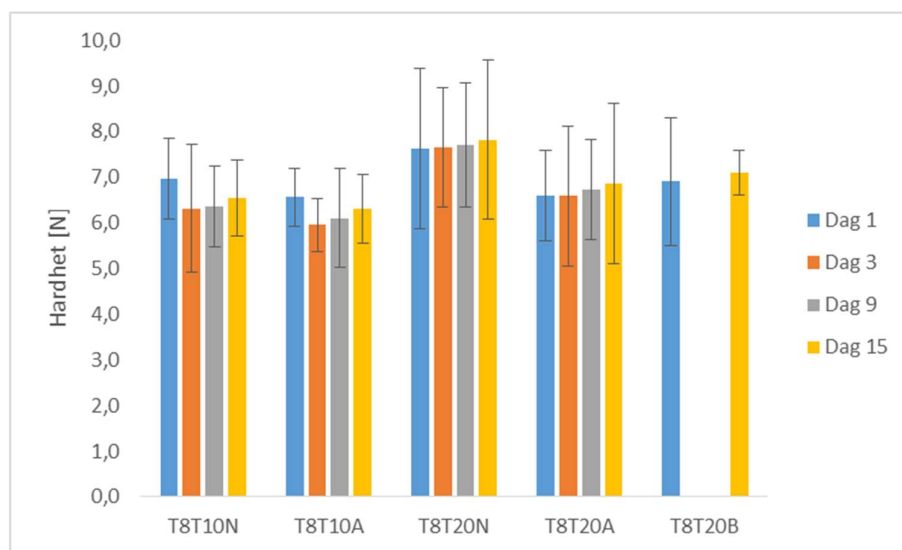
3.4 Tekstur

Tekstur er en viktig sensorisk egenskap i mat. Faktorer som påvirker tekstur er fiskeart, alder, størrelse, og kjemisk komposisjon og distribusjon (Hultmann & Rustad, 2004). Varmebehandling av fiskekjøtt over 45 °C resulterer til proteindenaturering og vanntap som fører til hardere tekstur (Skipnes et al., 2011). Tekstur er målt som hardhet og er gitt i newton (N) for sous vide-behandlede prøver kokt ved 70 og 80 °C som er vist henholdsvis i figur 18 og 19. Hardhet indikerer resistansen til makrellfiletene ved maksimal kompresjon og kan sammenlignes med motstanden ved første bitt (Hultmann, 2003).



Figur 18 Tekstur for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C og lagret i 15 dager er gitt i newton (N).

Utover lagringsperioden viste makrellfileter kokt ved 70 °C en økende trend i hardhet. Hardheten var signifikant større for prøver kokt i 20 minutter med antioksidant enn den som var kokt like lenge uten tilsetninger ($p < 0,05$). Det ble observert at lengst koketid gav høyest hardhet utover lagringsperioden. Koketiden gav ingen signifikant forskjell i tekstur.



Figur 19 Tekstur for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C og lagret i 15 dager er gitt i newton (N).

Hardhetene for makrellfileter kokt ved 80 °C var stabile med små variasjoner innad i samme prøve. Derimot ble det observert forskjeller basert på koketid og tilsetning. Koketiden og tilsats av antioksidant viste signifikante forskjeller. T8T20N og T8T20A var signifikant høyere enn henholdsvis T8T10N og T8T10A ($p < 0,05$). T8T10A, T8T20A og T8T20B var signifikant lavere enn henholdsvis T8T10N ($p < 0,005$), T8T20N ($p < 0,00005$) og T8T20N ($p < 0,005$). Utfra dette ser det ut til at kort koketid og tilsatt antioksidant senker hardheten i makrellfileter.

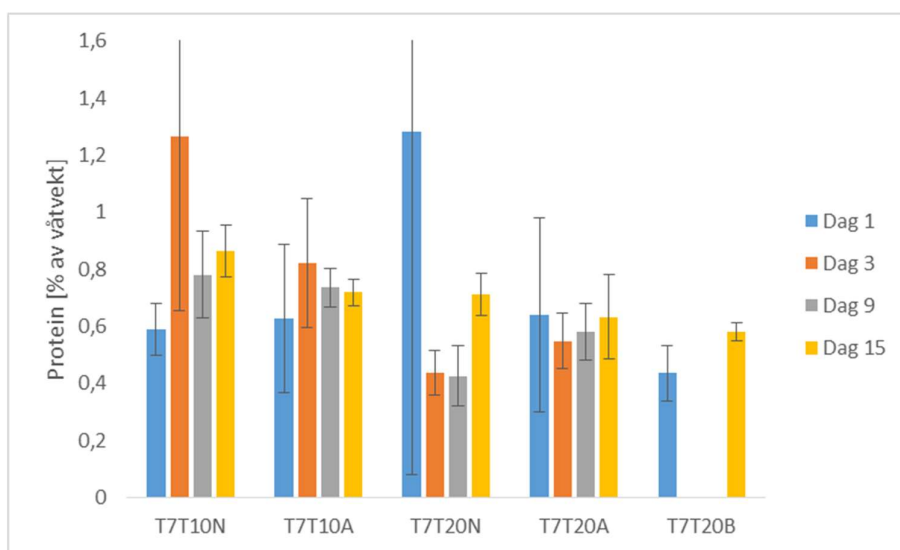
Teksturen til råmaterialet ble målt til 8,0 N som var høyere enn for sous vide-behandlede prøver. Skipnes et al. (2011) fant en sammenheng med økende hardhet og økende temperatur. Dette stemmer overens med at prøvene kokt ved 80 °C hadde hardere tekstur enn de kokt ved 70 °C. Likevel var teksturene lavere enn råmaterialet. Makrellfiletene varmebehandlet ved 70 og 80 °C viste tap i tekstur. Fiskekjøtt som inneholder lite kollagen kan oppnå en svakere tekstur etter varmebehandling (Ayala et al., 2005). Dette kan være en årsak til at teksturen til prøvene var lavere enn for råstoffet. Tekstur varierer også med størrelsen på muskelfibrene. Fiskekjøtt med

tykke muskelfibre kan ha svakere tekstur enn fiskekjøtt med tynnere muskelfibre (Ayala et al., 2005). Dermed kan sous vide-behandlet makrell inneholde lite kollagen og tykke muskelfibre.

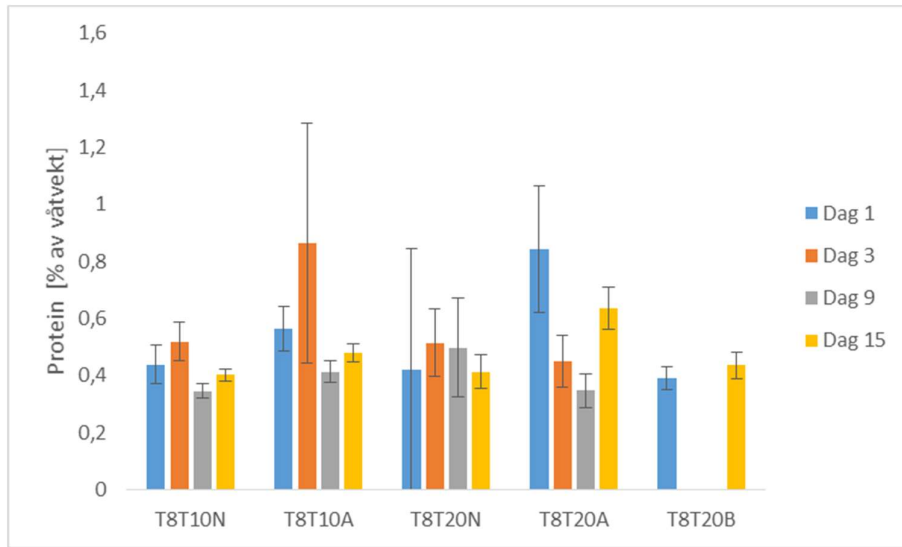
Tekstur kan sees i sammenheng med koketap. Ved et avtagende koketap over tid kan tekstur øke på grunn av at vannet trekkes inn i fiskemuskel. På denne måten blir fiskemuskel mer kompakt og tekstur kan øke. Ved koketemperatur 70 °C var det et avtagende koketap og økende tekstur. Denne økningen kan være forårsaket av inntak av tapt vann ved koking. Denne observasjonen er basert på data fra figurene 12 og 18.

3.5 Proteinløselighet

Analyse av proteinløselighet ble gjennomført for å bestemme effekten varmebehandling og lagring hadde på løseligheten til proteiner. På samme måte som for analyse av vanninnhold og aske ble det brukt både lyst og mørkt fiskekjøtt. Standardavviket var stort for mange prøver. Årsaken til dette kan antas å komme av at mengde proteiner varierer innad i fisken. Resultatet ble bestemt i prosent av våtvekt. Figur 20 og 21 viser proteinløselighet for sarkoplasmaproteiner for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved henholdsvis 70 og 80 °C. Figur 22 og 23 viser proteinløselighet for myofibrillproteiner for fisk kokt ved henholdsvis 70 og 80 °C.

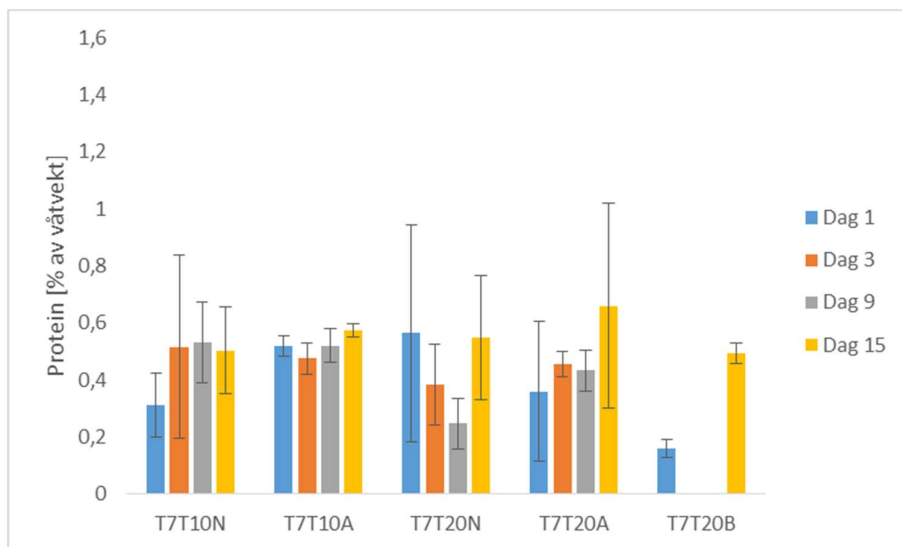


Figur 20 Løselighet for sarkoplasmaproteiner for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C og lagret i 15 dager er gitt i prosent av våtvekt.

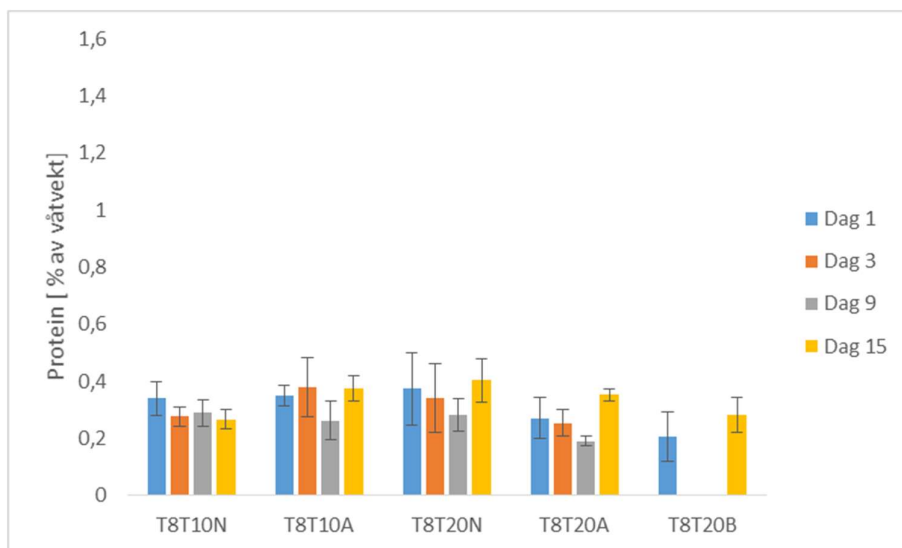


Figur 21 Løselighet for sarkoplasmproteiner for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C og lagret i 15 dager er gitt i prosent av våtvekt.

Løselighet hos sarkoplasmproteiner varierte gjennom lagringsperioden. Det var både avtagende og stigende trender for prøver behandlet ved begge temperaturene. Det var ingen signifikante forskjeller for prøver behandlet ved samme temperatur. Det ble observert litt lavere proteinløselighet blant fiskefiletene med antioksidant ved 70 °C, i motsetning til fileter kokt ved 80 °C hvor det var motsatte trender. Ved 80 °C var proteinløseligheten signifikant lavere enn for makrellen kokt ved 70 °C ($p < 0,005$).



Figur 22 Løselighet for myofibrillproteiner for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C og lagret i 15 dager er gitt i prosent av våtvekt.



Figur 23 Løselighet for myofibrillproteiner for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C og lagret i 15 dager er gitt i prosent av våtvekt.

I likhet med vannløselige proteiner varierte også løseligheten for saltløselige proteiner. Både avtagende og økende løselighet ble observert. Det var ingen signifikante forskjeller mellom prosessparameterne for makrellfiletene varmebehandlet ved 70 °C. Derimot var det signifikant mindre proteinløselighet for prøver med lang koketid og tilsatt antioksidant kokt ved 80 °C. Makrellprøvene med rosmarin gav signifikant negativ ($p < 0,05$) påvirkning på proteinløseligheten ved lengst koketid. For prøvene kokt i 20 minutter var proteinløseligheten signifikant høyere for prøver uten antioksidanter ($p < 0,05$).

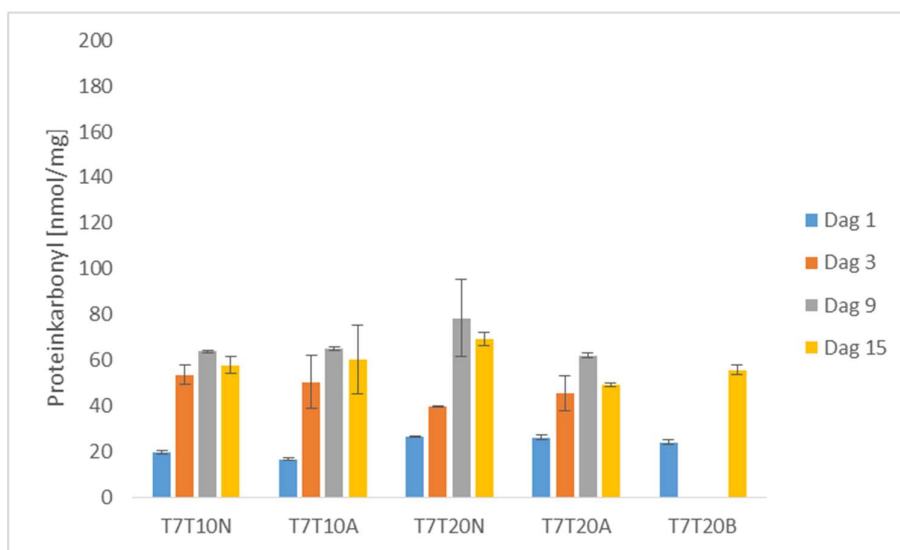
Det kan ikke påstås noe om det var koketiden eller tilsetning av antioksidanter som gav størst påvirkning av løseligheten hos saltløselige proteiner. Det var ingen signifikante forskjeller mellom prøver kokt ved 70 °C. Koketiden til prøver behandlet ved 80 °C viste signifikant innvirkning på prøvene tilsatt antioksidanter, som nevnt i forrige avsnitt.

Varmebehandling ved 70 og 80 °C førte til stort tap av løseligheten til vann- og saltløselige proteiner. Løseligheten av sarkoplasmaproteiner og myofibrillproteiner i råmaterialet ble målt til henholdsvis $8,6 \pm 1,1$ og $4,7 \pm 0,9$ % av våtvekt. Etter koking ble det observert tap av proteinløselighet. Varmebehandling forårsaket denaturering av proteiner som gav lav løselighet hos proteiner. Avtagende proteinløselighet kan komme av proteinoksidasjon. I tillegg kan det være lipidoksidasjonsprodukter som har reagert med proteinene. Temperatur for koking av prøver gav signifikant forskjell i proteinløselighet ($p < 0,00005$). 70 °C gav størst

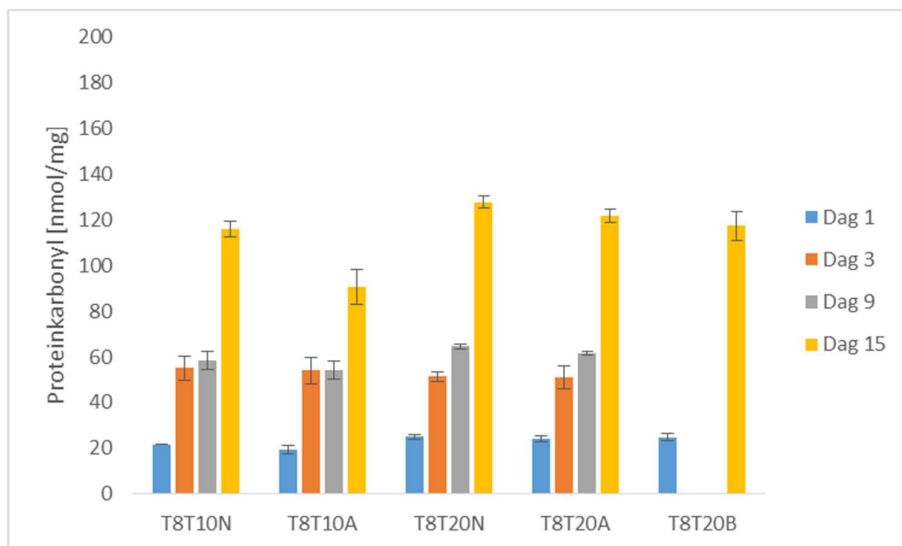
proteinløselighet. På grunn av størst løselighet av sarkoplasmaproteiner i råstoffet var det forventet at løseligheten for myofibrillproteiner ville være lavere også etter koking. I et studie utført av Standal et al. (2018) ble det målt en større mengde sarkoplasmproteiner enn myofibrillproteiner i fyselagret atlantisk makrell. Det samme ble observert av Duun og Rustad (2007) for superkjølt lagret torsk.

3.6 Proteinoksidasjon

Proteinoksidasjon i fiskemuskel kan påvirke egenskaper som proteinløselighet, tekstur og farge. Proteinoksidasjon ble analysert ved ELISA, som viste mengde proteinkarbonyler i sous vide-behandlede makrellfileter. Analysen ble utført på proteinekstraktene med løselige proteiner. Oksidasjon for vannløselige proteiner behandlet ved 70 og 80 °C er gitt henholdsvis i figur 24 og 25. Proteinoksidasjon for saltløselige proteiner behandlet ved 70 og 80 °C er gitt henholdsvis i figur 26 og 27.

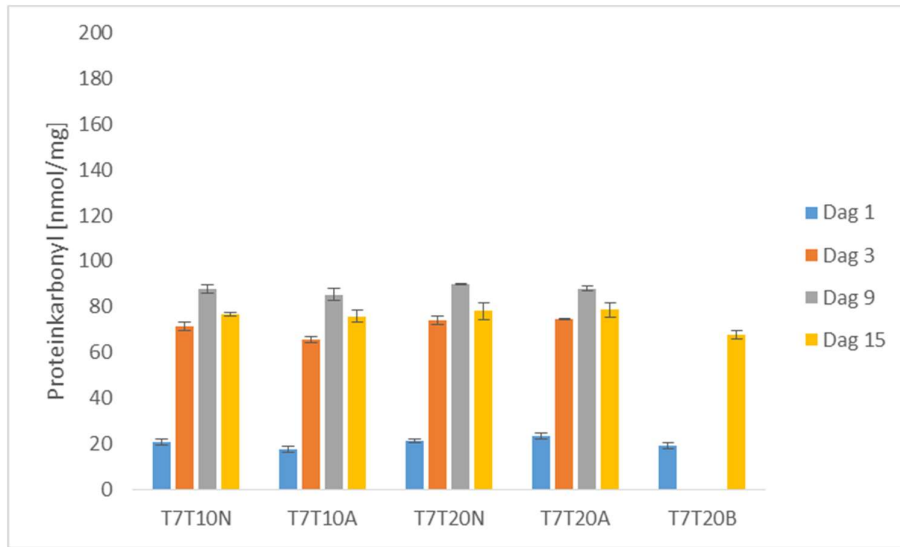


Figur 24 Proteinkarbonylinnhold for vannløselige proteiner for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C og lagret i 15 dager er gitt i nmol/mg.

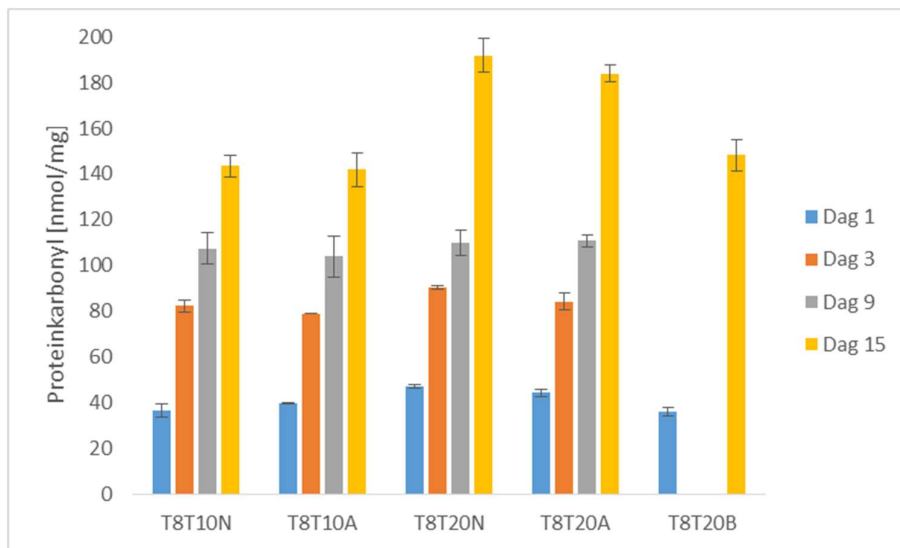


Figur 25 Proteinkarbonylinnhold for vannløselige proteiner for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C og lagret i 15 dager er gitt i nmol/mg.

Oksidasjon av sarkoplasmaproteiner fra sous vide-behandlede makrellfileter økte utover lagringstiden. De første tre uttaksdagene var karbonylinnholdet relativt likt for prøver kokt ved begge temperaturene. Derimot var det større variasjon på uttaksdag 15. For prøver kokt ved 70 °C var det ingen økning av proteinkarbonyler. Det ble observert en økning av karbonyler for prøvene kokt ved 80 °C. Dette kan samsvare med mindre løselige proteiner for prøver behandlet ved 80 °C. Det ble også observert mindre karbonylinnhold for prøvene med antioksidanter. Det kan være at antioksidantene forhindret eller senket hastigheten for dannelse av proteinkarbonyler. Hverken koketid, temperatur eller tilsats av antioksidant gav noen signifikant variasjon i karbonylinnholdet.



Figur 26 Proteinkarbonylinnhold for saltløselige proteiner for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C og lagret i 15 dager er gitt i nmol/mg.



Figur 27 Proteinkarbonylinnhold for saltløselige proteiner for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C og lagret i 15 dager er gitt i nmol/mg.

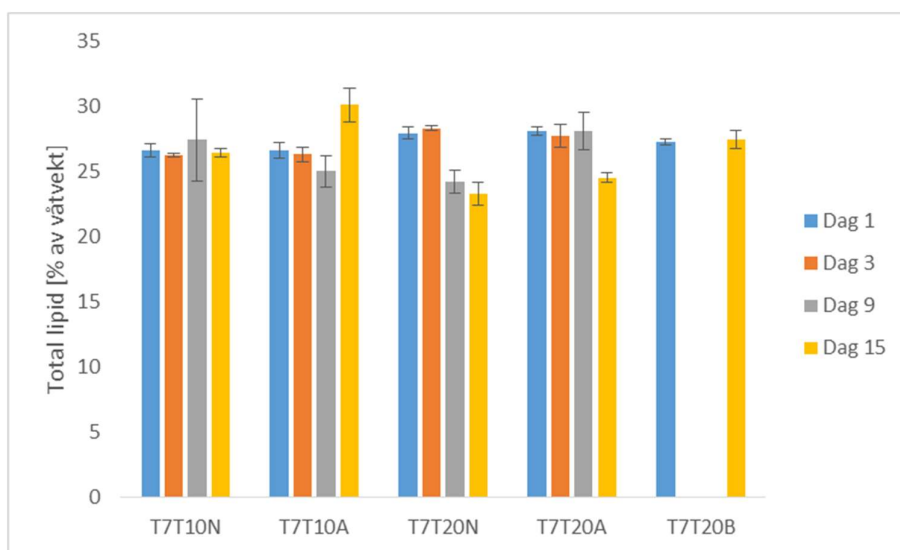
Karbonylinnholdet økte utover lagringstiden for myofibrillproteiner, og viste en signifikant korrelasjon ($r = 0,750$) og signifikant forskjell ($p < 0,05$) mellom begge koketemperaturene. Maksimalt innhold karbonyler saltløselige proteiner behandlet ved 70 °C var 78,3 nmol/mg. Det var lave verdier sammenlignet med makrellen kokt ved 80 °C hvor karbonylinnholdet på dag 15 lå på 141,9-191,9 nmol/mg. Prosessparameteren temperatur hadde stor innvirkning på oksidasjon av saltløselige proteiner. For fiskefiletene kokt ved 70 °C var det en signifikant

forskjell i karbonylinnholdet ved varierende koketid. Karbonylinnholdet for prøver kokt i 20 minutter var signifikant ($p < 0,05$) høyere enn de med kort koketid.

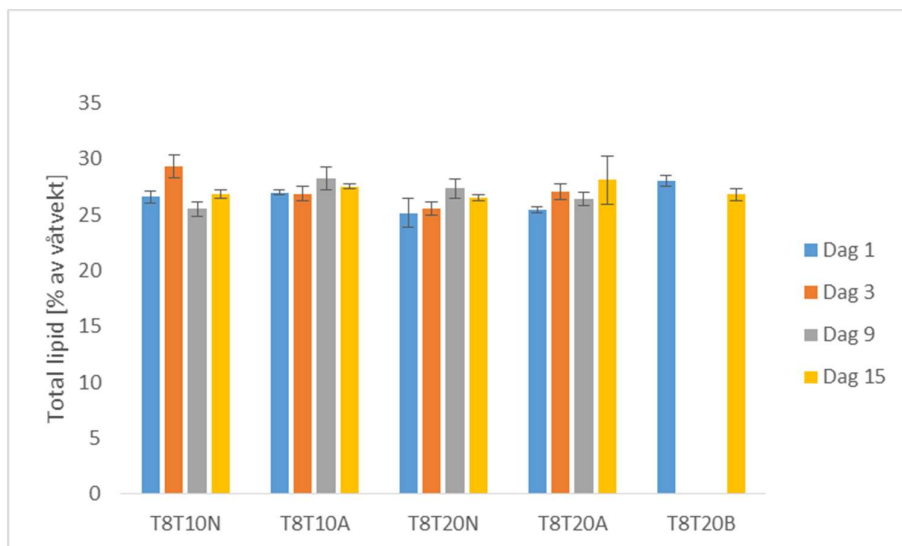
Analysen av proteinløselighet viste høyere innhold av vannløselige enn saltløselige proteiner. Det ble observert høyere oksidasjon av myofibrill- enn sarkoplasmaproteiner. Dette samsvarer med resultater oppnådd av Standal et al. (2018) for proteinoksidasjon av atlantisk makrell. I et studie for proteinoksidasjon av Tynnleppet multe under kjølig lagring var også oksidasjonen størst for myofibrillproteiner. Det ble i tillegg observert et stabilt karbonylinnhold for sarkoplasmaproteiner (Tokur & Polat, 2010). Høy temperatur gav høyest karbonylinnhold.

3.7 Totalt lipidinnhold

Pelagisk fisk er fet fisk hvor fettinnholdet varierer med årstider. Sensommer og høst er perioder hvor fettlageret i makrell fylles opp til maksimalt. Makrellen benyttet i dette arbeidet ble fanget sent oktober 2017. Totalt lipidinnhold i prosent av våtvekt ble kvantifisert for råmaterialet til $28,9 \pm 0,4$ %. Fettinnholdet i sous vide-behandlede makrellfileter lå mellom 23 og 29 % av våtvekt. I figur 28 og 29 er fettinnholdet gitt for henholdsvis temperaturene 70 og 80 °C.



Figur 28 Totalt lipidinnhold for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C og lagret i 15 dager er gitt i prosent av våtvekt.

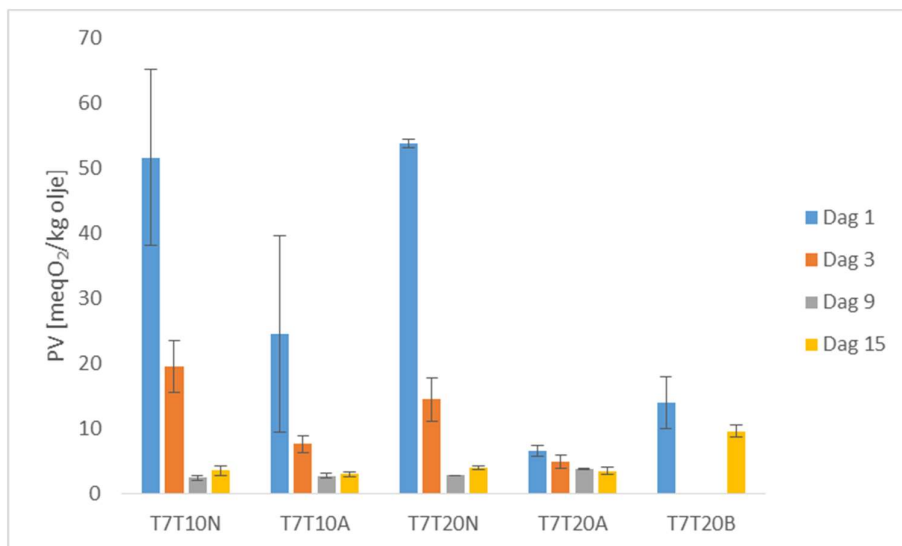


Figur 29 Totalt lipidinnhold for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C og lagret i 15 dager er gitt i prosent av våtvekt.

Tidligere er det blitt rapportert fettinnhold opptil 30 % i atlantisk makrell fanget i september/oktober (Standal et al., 2018). Fettinnholdet i sous vide-behandlede makrellfileter var høye og relativt stabile. Noen variasjon forekom, og i størst grad for makrell kokt ved 70 °C. Ifølge Standal et al. (2018) og Aubourg et al. (2005) er lipidmengden stabil ved både kjølig (4 °C) og frossen lagring. Fiskefiletene ble kvernet sammen før måling av fettmengden. Kverningen ble utført både i delvis frossen og tint tilstand. Noen prøver kan ha vært bedre kvernet for en bedre homogen blanding. Dette kan være årsaken til at noen av prøvene inneholdt mindre fett. Størrelsen på makrellfiletene varierte litt i størrelse, og da trolig fettinnholdet. Dette kan være på grunn av alderen til makrellen. Noe av fettene kan også ha blitt fjernet ved analyse av koketapet, da fisken ble tørket. Det ble observert at hverken koketid, temperatur, eller tilsetning av antioksidant hadde noen signifikant påvirkning på totalt lipidinnhold.

3.8 Lipidoksidasjon

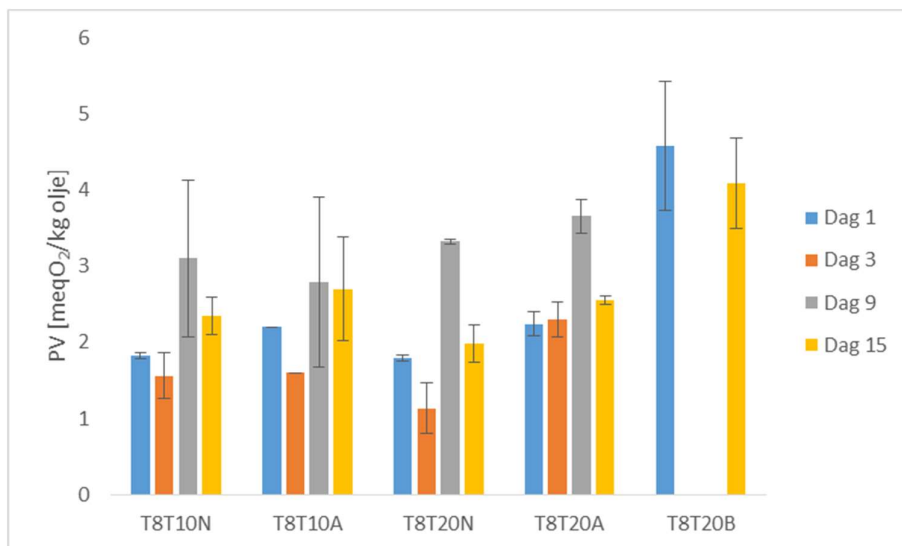
Status for lipidoksidasjon ble målt ved å bestemme PV og TBARS. Når flerumettet fett utsettes for prooksidanter oksideres fettene. Det dannes primære og sekundære oksidasjonsprodukter. PV ble målt i meqO₂/kg olje og TBARS i µmol/g. PV er gitt for makrell kokt ved 70 og 80 °C henholdsvis i figur 30 og 31. TBARS er vist i figur 32 og 33, henholdsvis for 70 og 80 °C.



Figur 30 PV for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C og lagret i 15 dager er gitt i meqO₂/kg olje.

Peroksidverdiene for makrellen sous vide-behandlet ved 70 °C varierte med koketid og tilsetning av antioksidant. Prøver uten tilsetning hadde størst PV. Det ble observert at PV var avtagende for alle prøvene. Fra denne trenden kan det antas at primære produkter hadde begynt å omdannes til sekundære produkter. Makrellprøver uten antioksidanter gav høye verdier ved dag 1, og de med antioksidanter gav lavere verdier. Antioksidantene kan ha begrenset dannelse hydroperoksid, eller forårsaket at primære oksidasjonsprodukter i prøvene kan ha startet tidligere med å genereres til sekundære produkter. De kan i tillegg ha reagert med protein og dannet proteinkarbyler eller andre produkter. Andre studier har observert at frie radikaler produsert ved lipidoksidasjon kan iverksette proteinoksidasjon å danne proteinkarbyler (Salodoye et al., 2015). Det er nærliggende å tro at antioksidantene hadde effekt på lipidoksidasjon, men det kan ikke antas. Det var ingen signifikante forskjeller.

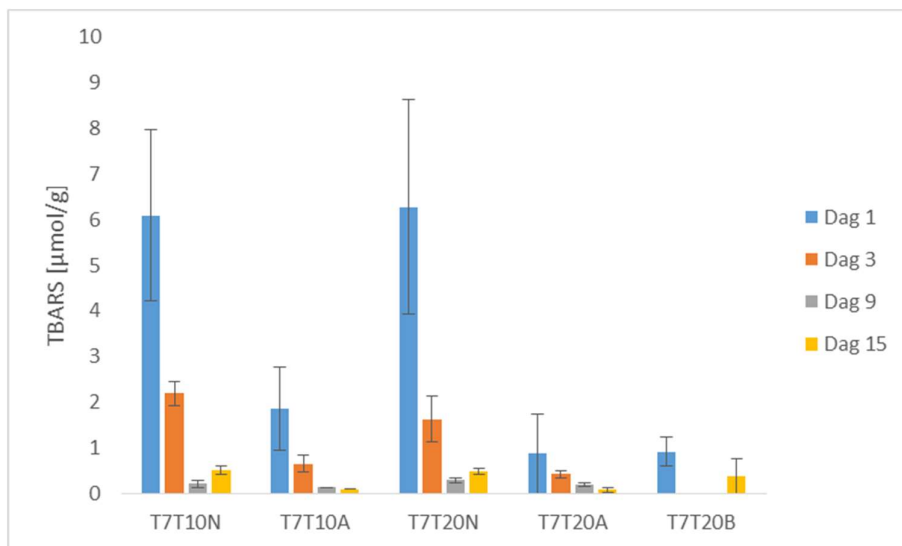
Det var ikke forventet høye verdier og avtagende PV fra starten av lagringsperioden. Årsak til denne forekomsten kan være oksidasjon av råmaterialet før koking. PV for råmaterialet ble målt til $18,0 \pm 0,9$ meq O₂/kg olje. Fiskeolje antas å være for oksidert ved en PV over 10 meq O₂/kg olje (Schaich, 2016). Denne oksidasjonen kan være forårsaket av ugunstig behandling av makrellen etter fangst. For eksempel kan makrellen ikke blitt kjølt ned raskt nok etter fangst. Da det er mangel på informasjon angående fangst og behandling av makrell kan ikke dette bekreftes. I tillegg kan det ha forekommet oksidasjon ved tining av makrellen i romtemperatur og ved 4 °C.



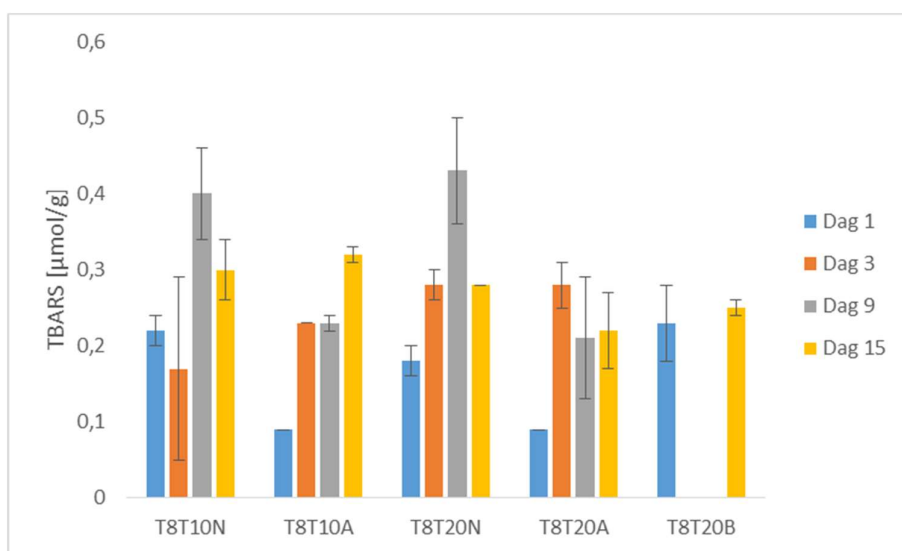
Figur 31 PV for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C og lagret i 15 dager er gitt i meqO₂/kg olje

Peroksidverdiene for makrellfiletene kokt ved 80 °C hadde en økende trend. Utover lagringstiden hadde ingen av målte peroksidverdier gått over 5 meq O₂/kg olje, som er den øvre grensen for PV i industrien (Schaich, 2016). Prøvene med askorbylpalmitat gav høyest peroksidverdier, men generelt var det relativt stabilt mellom prøvene uavhengig av prosessparameter. Prøver kokt i 20 minutter viste at PV var signifikant ($p < 0,05$) større ved tilsetning av rosmarin. Likevel var PV mindre for prøver med rosmarin enn askorbylpalmitat. Det vil si at rosmarin kan ha hatt en bedre effekt enn askorbylpalmitat.

Peroksidverdiene for prøver kokt ved 70 °C var ti ganger større enn de kokt ved 80 °C. På grunn av disse variasjonene kan det diskuteres hvorvidt andre faktorer har påvirket dette resultatet. Kokingen ble utført i to puljer, hvor makrellen kom fra to blokker på 10 kg. Råmaterialet for prøvene kokt ved 70 °C hadde før koking en høy PV. Det kan antas at en del av makrellen fra denne blokken hadde liknende PV. Råmaterialet fra blokken som ble brukt for sous vide-koking ved 80 °C ble ikke analysert. Denne fisken kan ha hatt mindre PV før oppstart av lagringsforsøket. Denne fisken kan ha vært behandlet med bedre forutsetninger for mindre lipidoksidasjon. Dette kan hverken bekreftes eller avkreftes da det ikke ble analysert PV for råmaterialet for makrellen kokt ved 80 °C.



Figur 32 TBARS for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C og lagret i 15 dager er gitt i µmol/g.



Figur 33 TBARS for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C og lagret i 15 dager er gitt i µmol/g.

TBARS er et mål på mengde sekundære oksidasjonsprodukter. TBARS kvantifisert for makrell kokt ved 70 °C hadde en signifikant korrelasjon med PV for samme temperatur ($r=0,987$). For alle prøvene var det minkende mengde av begge oksidasjonsproduktene. Antakelig hadde oksidasjonen kommet til det punktet hvor begge produktene ble dannet til andre sekundære produkter. PV og TBARS for 80 °C viste ingen korrelasjon, men hadde likevel noen likhetstrekk. Begge hadde relativt lave verdier som var ti ganger lavere enn prøvene kokt ved

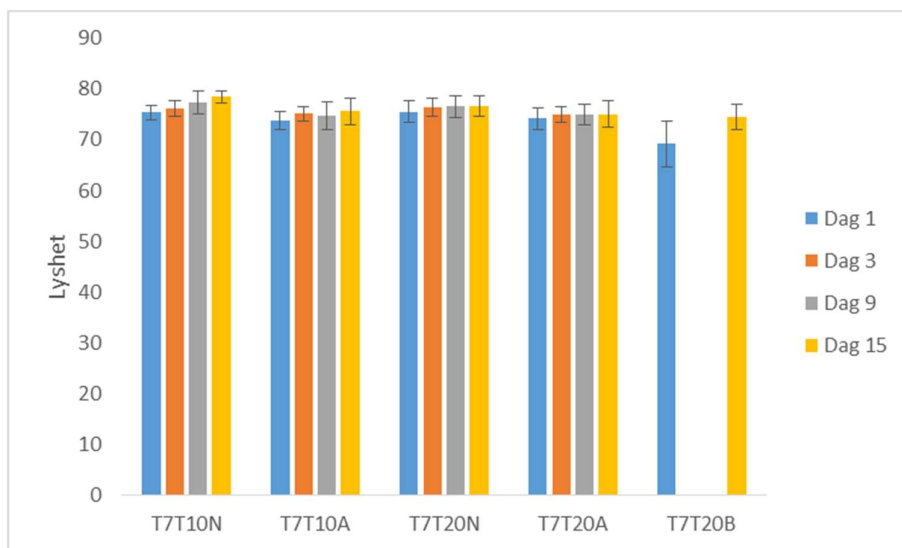
70 °C, og antydninger til økning av oksidasjon. Rosmarin og askorbylpalmitat kan ha bidratt til mindre mengder TBARS. En signifikant ($p < 0,05$) forskjell mellom temperaturene for TBARS var forventet da dette produktet viste samme tendenser som PV. Prøvene med antioksidanter viste også samme effekt for TBARS som for PV. TBARS kan også ha reagert med proteiner og påvirket proteinløseligheten.

Basert på disse resultatene gav ikke PV og TBARS et helhetlig bilde på lipidoksidasjon. Ved å analysere lipidoksidasjon for andre produkter kunne det vært mulig å observere om prosessparameterne hadde noen signifikant effekt på lipidoksidasjon i sous vide-behandlet makrell. Årsaken til at det burde undersøkes for flere sekundære produkter kommer av økende gulhet, som er vist i figur 38 og 39 under avsnittet 3.9., som indikerer oksidasjon.

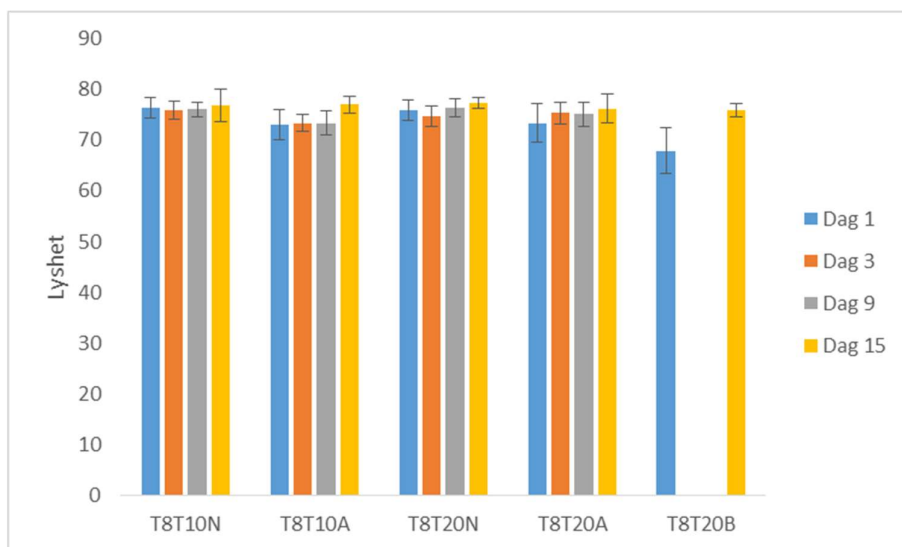
3.9 Farge

Den første sensoriske kvaliteten mat dømmes etter er farge. Fargeendring i fiskekjøtt kan indikere tap av kvalitet (Zamora & Hidalgo, 2005). Varmebehandling av rått kjøtt vil føre til fargeendring (Beltran et al., 2004). Forandring i fargeparameterne L^* (Lyshet), a^* (rødhet) og b^* (gulhet) gir en indikasjon om det over en lagringsperiode har forkommet noe harskning og annen tap av kvalitet. Fargeparameterne for råmaterialet var $L^* = 63,0 \pm 3,3$, $a^* = 1,0 \pm 0,5$ og $b^* = 10,0 \pm 0,9$. Dette viser til litt over middels lyshet av fiskekjøttet med litt rød og gul farge.

Lyshet for sous vide-behandlede makrellfileter er vist i figur 34 og 35, hvor temperaturene var henholdsvis 70 og 80 °C. Verdiene for lyshet lå mellom 65 og 80, hvor de fleste verdiene var over 70. Dette viste at ved koking endret fargen seg i fiskekjøttet og lysnet. For alle prøvene var det en stigning i verdi. Prøvene uten antioksidanter var så vidt lysere enn for prøvene med antioksidanter. Årsaken til dette kan være at selve antioksidanten var mørk i fargen og lå på overflaten av makrellfileten hvor målingene ble utført. Yu et al. (2002) viste at kalkunprøver tilsatt vannløselig rosmarinekstrakter hadde lavere L^* -verdi enn prøver uten. Det var ingen signifikante forskjeller i lysheten basert på prosessparameterne. I lagringsforsøk av spansk makrell utført av Checmarev et al. (2017) sank lysheten i prøvene over en lagringsperiode på sju måneder. Karoui og Hassoun (2017) utførte et lagringsforsøk ved 2 °C av atlantisk makrell var prøvene tilsatt rosmarin og basilikum. Disse prøvene var lysere enn fisken uten tilsatte antioksidanter og etter lagring i 15 dager sank verdien for lyshet. Hvorfor det var slik at sous vide-behandlede prøver var mørkere ved tilsatte antioksidanter og hadde en økning i lyshet kan ikke konstateres.



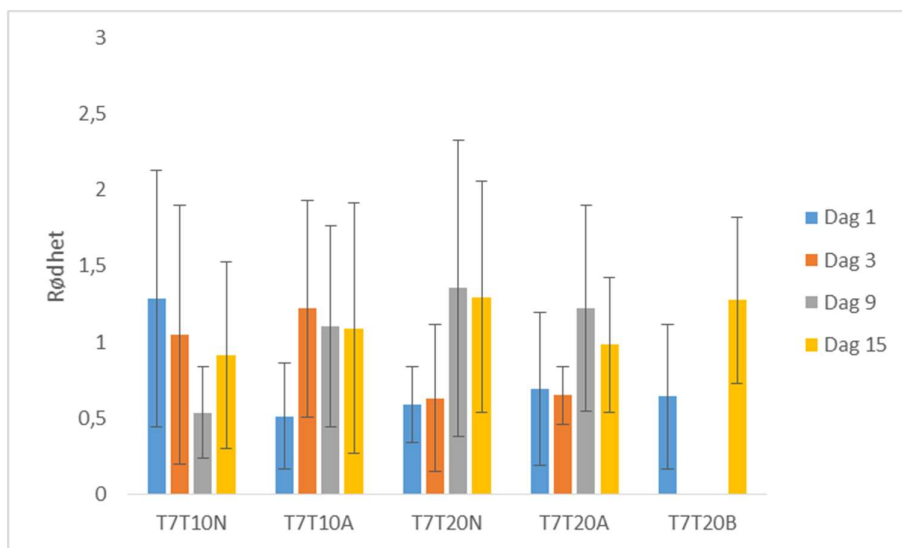
Figur 34 Lyshtet (L^*) målt for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C.



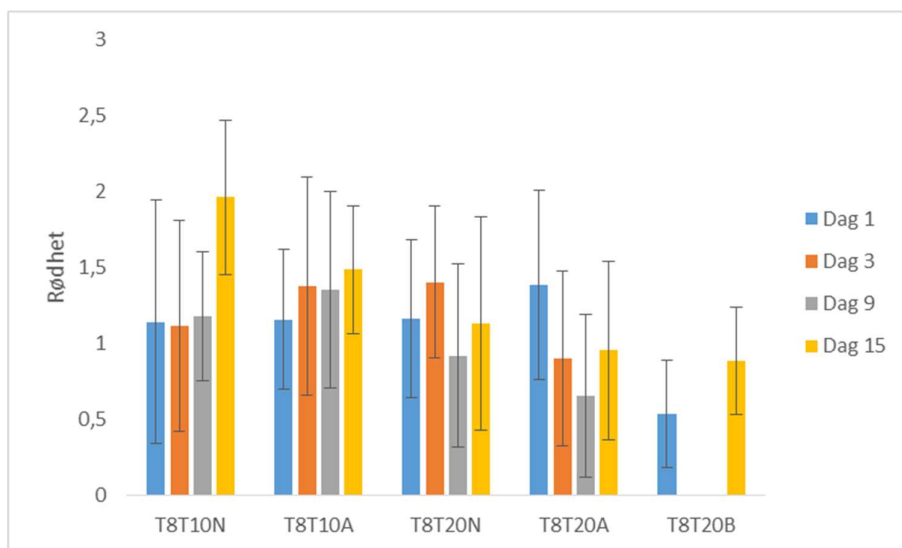
Figur 35 Lyshtet (L^*) målt for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C.

Fargeparameter a^* indikerte rødhet i makrellfiletene. Pigmentet myoglobin er predominant i pelagisk fisk og gir rød farge i fiskemuskel (Checmarev et al., 2017). Figur 36 og 37 viser verdier for rødhet hos sous vide- behandlede prøver ved temperaturer 70 og 80 °C, henholdsvis. Rødhetverdiene lå mellom 0,5 og 2 og varierte gjennom lagringsperioden. Rødhet var gjennomsnittlig større for prøver kokt ved 80 °C. Utenom temperaturen var det ingen andre prosessparametere som gav signifikant påvirkning av fargeverdien. Lagringsforsøket til Karoui

og Hassoun (2017) hadde i likhet med dette arbeidet variasjoner i rødhet, og hadde problemer med å dra noen konklusjon. Det viste seg at det ikke var noen sammenheng mellom temperatur og endring i rødhet.

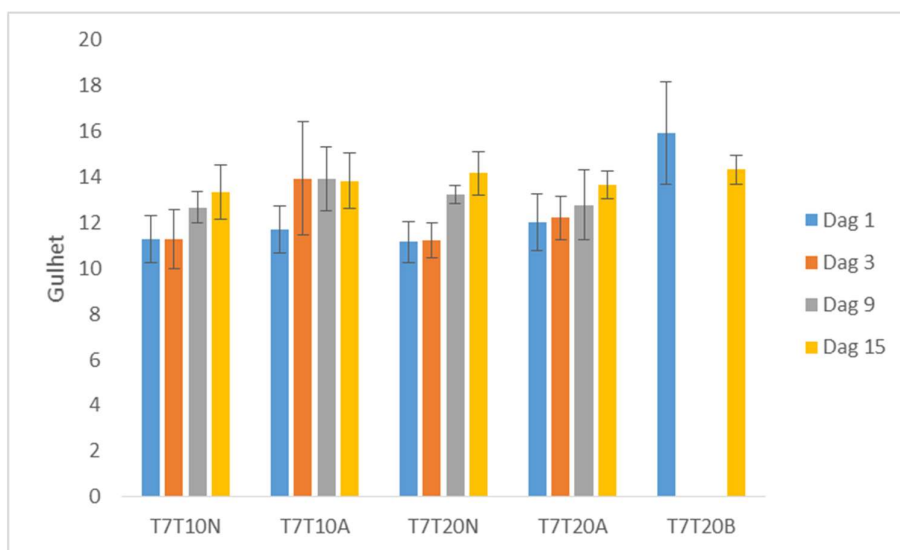


Figur 36 Rødhet (a^*) målt for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C.

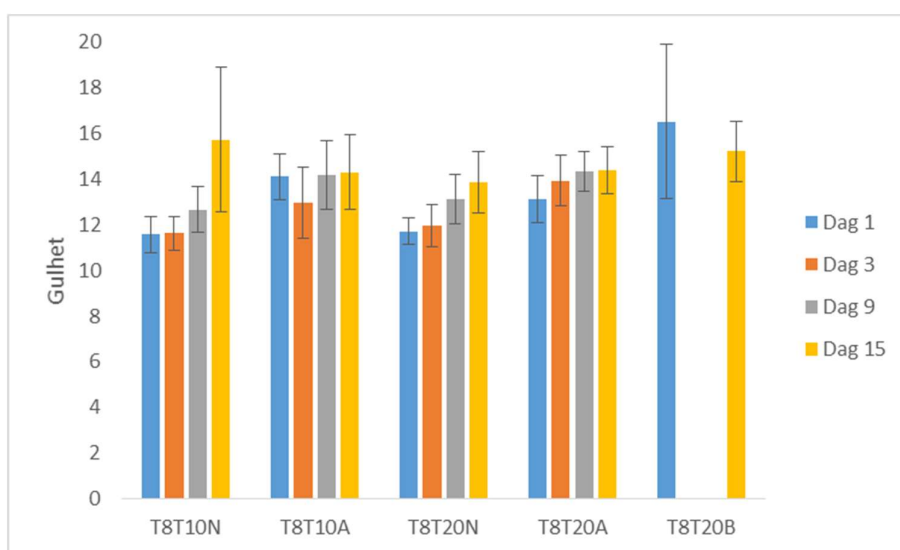


Figur 37 Rødhet (a^*) målt for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C.

Fargeparameter b^* kan setes i sammenheng med lipidoksidasjon, siden oksidasjonsprodukter ofte gir gul-fluorescerende pigmenter (Hamre et al., 2003). En stigning i verdi over en lagringsperiode kan indikere lipidoksidasjon. I løpet av lagringsperioden lå b^* -verdien mellom 11 og 17 som vist i figur 38 og 39, hvor temperaturene er henholdsvis 70 og 80 °C. I studiet av Checmarev et al. (2017) hvor lysheten sank var det en stigning i gulhet. For alle prøvene i dette studiet bortsett fra de med tilsatt askorbylpalmitat var det en stigning i gulhet i fiskekjøttet. Karoui og Hassoun (2017) hadde også en økning i b^* -verdien over tid.



Figur 38 Gulhet (b^*) målt for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 70 °C.



Figur 39 Gulhet (b^*) målt for sous vide-behandlede makrellfileter kokt ved 80 °C.

Prosessparametere som temperatur, koketid og tilsatt antioksidant viste ingen signifikant påvirkning for fargeendring. Høyest temperatur gav litt høyere b*-verdi. Yu et al. (2002) påviste at rosmarin har effekt mot lipidoksidasjon og da fargeendring. Fargeendringene i dette arbeidet viste ikke om rosmarin hadde noen signifikant endring på fiskekjøttet sammenlignet med prøvene uten antioksidanter. Fargeparameterne i seg selv kan ikke indikere hvor stor oksidasjon som har forekommet, men derimot indikere om det var en økende oksidasjon.

Gulhet i fiskemuskel oppstår ved lipidoksidasjon og kommer av dannelse av sekundære oksidasjonsprodukter. Det var forventet en økende mengde TBARS, men som vist i tidligere avsnitt avtok TBARS for prøver kokt ved 70 °C. Ifølge målt farge på filetene burde det vært mer sekundære oksidasjonsprodukter. Dermed er det sannsynlig at andre sekundære oksidasjonsprodukter som konjugerte diener og triener var generert i makrellprøvene. I tillegg kan proteinkarbyler forårsaket gul farge. Proteinkarbyler økte med lagringsperioden på samme måte som gulheten.

3.10 Mikrobiologi

Detektering av mikrobiell status er nødvendig for å bestemme holdbarheten hos matprodukter. Varmebehandling benyttes for å forsikre at maten er trygg å spise. Ifølge Dinh Thanh (2018) er maksgrensen for 7 log CFU/g. Mikrobiell vekst for råmaterialet ble målt dagen etter vakuumpakking og var på $4,0 \pm 0,6$ log CFU/g. Dette viste gode hygieniske forhold. Mikrobiell status målt for sous vide-behandlede makrellfileter oppbevart på is i 15 dager er gitt i tabell 7.

Tabell 7 Mikrobiell status for sous vide-behandlede makrellfileter. Mikrobiell vekst er gitt i log CFU/g.

Prøve	Dag 1	Dag 3	Dag 9	Dag 15
T7T10N	0	0	0	0
T7T10A	0	0	0	0
T7T20N	0	0	0	0
T7T20A	0	0	0	0
T7T20B	0			0
T8T10N	0	0	0	3,3
T8T10A	0	0	0	0
T8T20N	0	0	0	0
T8T20A	2,5	0	0	0
T8T20B	0			0

Makrellfileter kokt ved 70 °C hadde ingen bakteriell vekst i løpet av lagringsperioden. Prøver kokt ved 80 °C viste ingen vekst, bortsett fra to prøver T8T20A og T8T10N hadde liten vekst henholdsvis dag 1 og 15. Årsaken til vekst for disse prøvene er uviss. Koking etter pakking hindret kontaminering under lagring. Veksten for prøvene kan komme av dårlig sterilisering av utstyret underveis i analysen.

I et studie av sous vide-behandlet laks ved 70 °C utført av Cosansu et al. (2011) ble holdbarheten forbedret ved tilsatt antioksidant. Mikrobiell vekst lå på 5 log CFU/g i femte uke for prøver uten antioksidant og i sjuende uke for prøver tilsatt sitron juice som antioksidant. I dette arbeidet utgjorde antioksidanter ingen forskjell da temperatur dominerte. Stormo et al. (2017) indikerte at prosessering av torsk med varme ved kjølig lagring økte matkvaliteten med hensyn til mikrobiell vekst. Resultatene fra mikrobiell status for sous vide-behandlede makrellfileter indikerer at varmeprosessering forlenger holdbarheten. På grunn av liten og ingen oppvekst er ikke tidsbruk for koking og tilsatt av antioksidanter signifikant ved lagring i 15 dager. For å bekrefte om antioksidantene ville utgjort noen effekt med tanke på bakteriell vekst burde lagringsperioden vært lengre.

4 Konklusjon

Formålet med arbeidet har vært å se hvordan ulike prosessparametere innvirket på atlantisk makrell ved sous vide-behandling. Prosessparametere som temperatur, koketid og tilsetning av antioksidanter varierte. Fisken ble etter sous vide-behandling lagret over 15 dager. Det ble tatt fire uttak, hvor første uttak var dagen etter koking.

Sous vide-behandling av makrellfileter førte til koketap. Koketapet var størst ved første uttaksdag og ble redusert utover lagringsperioden. Varmebehandling ved 80 °C gav høyest koketap. Vanninnholdet ble redusert ved varmebehandling. Det var ingen signifikante forskjeller i vanninnholdet mellom prøvene kokt ved 70 °C. Derimot var vanninnholdet signifikant større for prøver uten antioksidanter med en koketid på 20 minutter ved 80 °C.

Tekstur ble målt som hardhet. Varmebehandling reduserte hardheten i makrellfiletene. Koketiden hadde ingen signifikant effekt på makrellprøver behandlet ved 70 °C. I stedet var hardheten for prøver kokt i 20 minutter høyest ved tilsats av rosmarin. Hardheten økte utover lagringstiden for prøver kokt ved denne temperaturen. Prøver kokt ved 80 °C hadde høyere hardhet enn prøver kokt ved 70 °C. I tillegg gav kort koketid og tilsatt antioksidant signifikant lavere hardhet for makrellprøver.

Varmebehandling reduserte løseligheten til sarkoplasma- og myofibrillproteiner. Løseligheten for både vann- og saltløselige proteiner var signifikant lavest ved behandling ved 80 °C. Løseligheten til myofibrillproteiner ved 80 °C var signifikant lavere ved en koketid på 20 minutter og tilsats av rosmarin. Oksidasjon av proteiner var lavest for prøver behandlet ved 70 °C for både vann- og saltløselige proteiner. Myofibrillproteiner hadde høyere karbonylinnhold enn sarkoplasmaproteiner. Proteinkarbonyler for saltløselige proteiner var signifikant lavest ved temperaturen 70 °C.

Fettinnholdet i råstoffet ble kvantifisert til $28,9 \pm 0,4$ %. Totalt lipidinnhold i sous vide-behandlede makrellprøver varierte mellom 23-30 %. Lipidoksidasjon ble studert ved å analysere PV og TBARS. For begge oksidasjonsproduktene var det ti ganger mer for prøver kokt ved 70 °C og i tillegg var det en minkende mengde produkt utover lagringstiden. Hverken koketid eller tilsats av antioksidanter utgjorde noen signifikant effekt på lipidoksidasjon. Prøver med antioksidanter hadde noe lavere PV og TBARS ved begge koketemperaturene, men gav ingen signifikans.

Varmebehandlingen av makrell førte til fargeendringer. Fiskekjøttet ble lysere og gulere. I løpet av lagringsperioden forekom det litt økning i lyshet. Rødheten varierte for alle prøveuttakene.

Gulheten steg gradvis for alle prøvene utenom de som var tilsatt askorbylpalmitat. Gulfargen kan ha indikert proteinoksidasjon eller dannelsen av sekundære lipidoksidasjonsprodukter.

Det ble ikke funnet vekst av kolonier for makrell varmebehandlet ved 70 °C. For makrellfileter kokt ved 80 °C var det oppvekst ved ett uttak for to prøver, hvor verdiene var på 2,5 og 3,3 log CFU/g. Dette viste at prøvene hadde god mikrobiell holdbarhet.

Samlet sett viste resultatene at koketemperaturen hadde størst innflytelse på kjemisk sammensetning og fysiske egenskaper til makrell gjennom lagringsperioden. For størst proteinløselighet, lavt proteinkarbonylinnhold, lavt koketap og god tekstur var det ideelt å varmebehandle ved 70 °C. Koketiden hadde også effekt. Basert på resultatene fra lipidoksidasjon var temperaturen 80 °C mest ideell og i tillegg tilsetning av antioksidanter. Siden det ikke ble analysert flere sekundære oksidasjonsprodukter kan det ikke trekkes noen konklusjon med hensyn på hvilke prosessparametere som resulterte i lavest lipidoksidasjon.

Kilder

- Anderson, M. L. & Ravesi, E. M. (1968) Relation between Protein Extractability and Free Fatty Acid Production in Cod Muscle Aged in Ice. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 25, 2059–2069.
- Akoh, C. & Min, D. (2002) *Structured lipids. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. Utg. 2, 877-908.
- Alamdari, D.H., Kostidou, E., Paletas, K. et al. (2005) High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein. *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 1362–1367.
- Aubourg, S. P., Rodríguez, A., and Gallardo, J. M. (2005) Rancidity development during frozen storage of mackerel (*Scomber scombrus*): effect of catching season and commercial presentation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 107: 316–323.
- Ayala, M. D., López Albors, O., Blanco, A., García Alcázar, A., Abellán, E., Ramírez Zarzosa, G. & Gil, F. (2005) Structural and ultrastructural changes on muscle tissue of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., after cooking and freezing. *Aquaculture*, 250, 215-231.
- Bachiller, E., Skaret, G., Noettestad, L. & Slotte, A. (2016) Feeding Ecology of Northeast Atlantic Mackerel, Norwegian Spring-Spawning Herring and Blue Whiting in the Norwegian Sea: e0149238. *PLoS ONE*, 11.
- Baldwin, D. E. (2012) Sous vide cooking: A review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1, 15-30.
- Belitz, H. D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009) *Meat. Food Chemistry*. Utg. 4. Berlin: Springer, kapittel 12, 563–614.
- Beltran, E., Pla, R., Capellas, M., Yuste, J. & Mor-Mur, M. (2004) Lipid oxidation and colour in pressure- and heat-treated minced chicken thighs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1285-1289.
- Bjørndal, T. & Ekerhovd, N.-A. (2014) Management of Pelagic Fisheries in the North East Atlantic: Norwegian Spring Spawning Herring, Mackerel, and Blue Whiting. *Marine Resource Economics*, 29, 69-83.
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Buss, H., Chan, T. P., Sluis, K., Domigan, N. & Winterbourn, C. (1997) Protein carbonyl measurement by a sensitive ELISA method. *Free Radic. Biol. Med.*, 23, 361-366.
- Catalgol, B., Grimm, S. & Grune, T. (2011) Protein Carbonyl Measurement by Enzyme Linked Immunosorbent Assay, *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 432-439
- Chaijan, M., Benjakul, S., Visessanguan, W. & Faustman, C. (2004) Characteristics and gel properties of muscles from sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagartha*) caught in Thailand. *Food Research International*, 37, 1021-1030.
- Checmarev, G., Casales, M. R. & Yeannes, M. I. (2017) Kinetics of color change of osmotically dehydrated chub mackerel (*Scomber japonicus*) during storage at different temperatures. *Food Science and Technology*, 37, 119-123.
- Clifford, M. N. (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 362-372.
- Cosansu, S., Mol, S., Alakavuk, D. U. & Ozturan, S. (2011) effect of lemon juice on bonito (*Sarda sarda*, Bloch, 1793) preserved by sous vide packaging. *effect of lemon juice on bonito (Sarda sarda, Bloch, 1793) preserved by sous vide packaging*, 46, 395-401.
- Dinh Thanh, M., Frentzel, H., Fetsch, A., Krause, G., Appel, B. & Mader, A. (2018) Tenacity of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in dried spices and herbs. *Food Control*, 83, 75-84.
- Dogruyol, H. & Mol, S. (2017) Effect of Irradiation on Shelflife and Microbial Quality of Cold-Stored Sous-Vide Mackerel Fillets. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, n/a-n/a.
- Duun, A. S. & Rustad, T. (2007) Quality changes during superchilled storage of cod (*Gadus morhua*) fillets. *Food Chemistry*, 105, 1067-1075.
- Eestévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R. & Heinonen, M. (2008) Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, 80, 1290-1296.

- Eymard S., Carcouët E., Rochet M.-J., Dumay J., Chopin C., Genot C. (2005) Development of lipid oxidation during manufacturing of horse mackerel surimi. *The science of Food and Agriculture*, 1750-1756
- Foti, M. C., Daquino, C. & Geraci, C. (2004) Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH center dot radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.*, 69, 2309-2314.
- Gökoglu, N. (2015) Seafood chilling, refrigeration and freezing : science and technology. *In: Yerlikaya, P. (ed.). Wiley Blackwell.*
- Halliwell, B. (1995) Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 49, 1341-1348.
- Hampton, T. (2014) Mechanism Behind Omega-3 Fatty Acids' Heart Benefits. *JAMA*, 312, 882.
- Hamre, K., Lie, Ø. & Sandnes, K. (2003) Seasonal development of nutrient composition, lipid oxidation and colour of fillets from Norwegian spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.). *Food Chemistry*, 82, 441-446.
- Havforskningsinstituttet. (2017) Makrell. Nedlastet 17.10.2017 fra:
URL: <http://www.imr.no/temasider/fisk/makrell/makrell/nb-no>
- Huang, L., Hwang, A. & Phillips, J. (2011) Effect of Temperature on Microbial Growth Rate–Mathematical Analysis: The Arrhenius and Eyring–Polanyi Connections. *Journal of Food Science*, 76, E553-E560.
- Hægermark, W. A. (2013) Kontroll på fiskeoljekvalitet. *Nofima*. Nedlastet 14.11.2017 fra:
URL: <https://nofima.no/nyhet/2013/11/kontroll-paa-fiskeoljekvalitet/>
- Hultmann, L. (2003) Endogenous proteolytic enzymes - Studies of their impact on fish muscle proteins and texture, Doctoral thesis, Norwegian University of Science and Technology (NTNU).
- Hultmann, L. & Rustad, T. (2002) Textural Changes During Iced Storage of Salmon (*Salmo salar*) and Cod (*Gadus morhua*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 11, 105-123.

- Hultmann, L. & Rustad, T. (2004) Iced storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*) – effects on endogenous enzymes and their impact on muscle proteins and texture. *Food Chemistry*, 87, 31-41.
- Indrasena, W. M. & Barrow, C. J. (2010) *Oxidation and Stability of Food-Grade Fish Oil: Role of Antioxidants*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. *Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications*, 317-334
- Karoui, R. & Hassoun, A. (2017) Efficiency of Rosemary and Basil Essential Oils on the Shelf-Life Extension of Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) Fillets Stored at 2 degrees C. *J. AOAC Int.*, 100, 335-344.
- Kemin. (2014) Fortium TR25 Liquid. Kemin Industries, Inc. and its group of companies
- Kemin. (2016) Fortium RPT40 liquid antioxidants. Kemin Industries, Inc. and its group of companies
- Kolanowski, W. & Laufenberg, G. (2006) Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *European Food Research and Technology*, 222, 472-477.
- Leu, S. S., Jhaveri, S. N., Karakoltsidis, P. A. & Constantinides, S. M. (1981) Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*, L): Seasonal Variation in Proximate Composition and Distribution of Chemical Nutrients. *Journal of Food Science*, 46, 1635-1638.
- Licciardello, J. J., Ravesi, E. M., Lundstrom, R. C., Wilhelm, K. A., Correia, F. F. & Allsup, M. G. (1982) Time-temperature tolerance and physical-chemical quality tests for red hake. *Journal of Food Quality*, 5, 215–234.
- Lund, M., Heinonen, M., Baron, C. P. & Estevez, M. (2011) Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res.*
- Lynnum, L. (1997) *Fisk som råstoff: holdbarhet og kvalitetssikring*, Trondheim, Tapir, 53-60
- Maestre, R., Pazos, M. & Medina, I. (2011) Role of the raw composition of pelagic fish muscle on the development of lipid oxidation and rancidity during storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 6284.
- Mbarki, R., Ben Miloud, N., Selmi, S., Dhib, S. & Sadok, S. (2009) Effect of vacuum packaging and low-dose irradiation on the microbial, chemical and sensory characteristics of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Food Microbiology*, 26, 821-826.

- Morales-Medina, R., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A. & Guadix, E. M. (2017) Multiobjective optimization of the antioxidant activities of horse mackerel hydrolysates produced with protease mixtures. *Process Biochemistry*, 52, 149-158.
- Mozaffarian, D. & Wu, J. H. Y. (2012) (n-3) fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? *The Journal of nutrition*, 142, 614S.
- Murray, J. & Burt, J. R. (2001) The Composition of Fish. Nedlastet 16.12.2017 fra:
URL: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x5916e00.htm#Contents>
- Pedersen, T. (1980) *Prosesser og produkter i norsk fiskeindustri: 1: Råstoffer, hjelpestoffer, førstehandsbehandling, kjøling*. Oslo, Universitetsforlaget.
- Raskovic, A., Milanovi, I., Pavlovi, N. A., Ebovi, T., Vukmirovi, S. A. & Mikov, M. (2014) Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. (Research article). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 225.
- Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D. & Cocero, M. J. (2012) Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109, 98-103.
- Romotowska, P. E., Karlsdóttir, M. G., Gudjónsdóttir, M., Kristinsson, H. G. & Arason, S. (2016a) Seasonal and geographical variation in chemical composition and lipid stability of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) caught in Icelandic waters. *Journal of Food Composition and Analysis*, 49, 9-18.
- Romotowska, P. E., Karlsdóttir, M. G., Gudjónsdóttir, M., Kristinsson, H. G. & Arason, S. (2016b) Influence of feeding state and frozen storage temperature on the lipid stability of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *International Journal of Food Science & Technology*, 51, 1711-1720.
- Rosnes, J., Skåra, T. & Skipnes, D. (2011) Recent Advances in Minimal Heat Processing of Fish: Effects on Microbiological Activity and Safety. *An International Journal*, 4, 833-848.
- Rozentale, I., Yan Lun, A., Zacs, D. & Bartkevics, V. (2018) The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in dried herbs and spices. *Food Control*, 83, 45-53.
- Schaich, K. M., Shahidi, F., Zhong, Y. & Eskin, N. A. M. (2013) Chapter 11 - Lipid Oxidation. *Biochemistry of Foods (Third Edition)*. San Diego: Academic Press.

Schaich, K. M. (2016) Chapter 1 - Analysis of Lipid and Protein Oxidation in Fats, Oils, and Foods A2 - Hu, Min. In: JACOBSEN, C. (ed.) *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*. AOCS Press.

Seafood from Norway. (2017) Nutrition. Nedlastet 14.11.2017 fra:

URL: <https://mackerel.fromnorway.com/norwegian-mackerel/nutrition/>

Shahidi, f., Janitha, P., et al. (1992) Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 32, 67-103.

Sigurdisdottir, S., Øtorrissen, O., Lie, Ø., Thomassen, M. & Hafsteinsson, H. (1997) Salmon quality: Methods to determine the quality parameters. *Reviews in Fisheries Science*, 5, 223–252.

Skipnes, D., Østby, M. L. & Hendrickx, M. E. (2007) A method for characterising cook loss and water holding capacity in heat treated cod (*Gadus morhua*) muscle. *Journal of Food Engineering*, 80, 1078-1085.

Skipnes, D., Johnsen, S. O., Skåra, T., Sivertsvik, M. & Lekang, O. (2011) Optimization of Heat Processing of Farmed Atlantic Cod (*Gadus morhua*) Muscle with Respect to Cook Loss, Water Holding Capacity, Color, and Texture. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 20, 331-340.

Soladoye, O. P., Juárez, M. L., Aalhus, J. L., Shand, P. & Estévez, M. (2015) Protein Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 106-122.

Stadtman, E. R. & Levine, R. L. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25, 207-18.

Standal, I. B., Mozuraityte, R., Rustad, T., Alinasabhematabadi, L., Carlsson, N.-G. & Undeland, I. (2018) Quality of filleted Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) during chilled and frozen storage: changes in lipids, vitamin D, proteins and small metabolites, including biogenic amines. *Journal of Aquatic Food Product Technology*.

Stormo, S. K., Skipnes, D., Sone, I., Skuland, A., Heia, K. & Skåra, T. (2017) Modeling-assisted minimal heat processing of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Food Process Engineering*, 40, n/a-n/a.

- Teneva, O. & Dimcheva, N. (2016) Electrochemical assay of the antioxidant ascorbyl palmitate in mixed medium. *Food Chemistry*, 203, 35-40.
- Tokur, B. & Polat, A. (2010) Myofibrillar and sarcoplasmic protein oxidation and degradation of thin-lipped gray mullet (*Liza Ramada*) during refrigerated storage. *Journal of Muscle Foods*, 21, 102-118.
- Tsimidou, M., Papavergou, E. & Boskou, D. (1995) Evaluation of oregano antioxidant activity in mackerel oil. *Food Research International*, 28, 431-433.
- Undeland, I., Ekstrand, B. & Lingnert, H. (1998) Lipid oxidation in herring (*Clupea harengus*) light muscle, dark muscle, and skin, stored separately or as intact fillets. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 581-590.
- Vázquez, M., Torres, J. A., Gallardo, J. M., Saraiva, J. & Aubourg, S. P. (2013) Lipid hydrolysis and oxidation development in frozen mackerel (*Scomber scombrus*): Effect of a high hydrostatic pressure pre-treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 24-30.
- Witte, V., Kerti, L. & Flöel, A. (2012) Effects of omega-3 supplementation on brain structure and function in healthy elderly subjects. *Alzheimer's & Dementia*, 8, P441.
- Yesiloglu, Y. & Şit, L. (2012) Antioxidant properties of various solvent extracts from purple basil. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 95, 100-106.
- Yu, L., Scanlin, L., Wilson, J. & Schmidt, G. (2002) Rosemary Extracts as Inhibitors of Lipid Oxidation and Color Change in Cooked Turkey Products During Refrigerated Storage. *Journal of Food Science*, 67, 582-585.
- Zamora, R. & Hidalgo, F. J. (2005) Coordinate Contribution of Lipid Oxidation and Maillard Reaction to the Nonenzymatic Food Browning. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 49-59.
- Zhang, Y., Smuts, J. P., Dodbiba, E., Rangarajan, R., Lang, J. & Armstrong, D. (2012) Degradation Study of Carnosic Acid, Carnosol, Rosmarinic Acid, and Rosemary Extract (*Rosmarinus officinalis* L.) Assessed Using HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 9305-9314.

Vedlegg A – Rådata og beregninger for analyser

Rådata og kalkulasjoner benyttet for å oppnå resultatene i dette arbeidet finnes i syv Microsoft Excel-filer vedlagt som komprimert mappe (Zip). Filene er navngitt etter innhold.