



Kunnskap for en bedre verden

Utnyttelse av bioaktive komponenter fra  
butare (*Alaria esculenta*) for økt kvalitet i  
et filetprodukt av Atlantisk laks (*Salmo  
salar* L) pakket i modifisert atmosfære

**Stian Kopperud**

Mat og teknologi

Innlevert: mai 2018

Hovedveileder: Jørgen Lerfall, IBT

Medveileder: Anita N. Jacobsen, IBT

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Institutt for bioteknologi og matvitenskap



# Forord

Denne masteroppgaven markerer slutten på min masterutdanning i Mat og Teknologi ved Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet, Fakultet for Naturvitenskap, Institutt for Bioteknologi og Matvitenskap. Prosjektperioden har vært krevende, men samtidig svært lærerik.

Jeg vil gjerne rette en stor takk til min veileder, Førsteamanuensis Jørgen Lerfall, samt medveileder, Førsteamanuensis Anita Nordeng Jakobsen for god hjelp og gode faglige råd som har vært nødvendig for å gjennomføre denne masteroppgaven. Jeg vil også takke PhD kandidat Espen Arntzen for god hjelp med litteratursøk og samarbeid på lab.

Til slutt vil jeg takke medstudenter, venner og familie for moralsk støtte, tålmodighet og gode råd underveis.

Trondheim, den 15.05.2018



---

Stian Kopperud

# Sammendrag

I denne masteroppgaven skulle det undersøkes om bioaktive komponenter fra butare (*Alaria esculenta*) har et potensiale som ingrediens i en alginatbasert coating for økt kvalitet i et filetprodukt av Atlantisk laks (*Salmo salar* L). Butaren skulle undersøkes for innhold av bioaktive komponenter herunder polyfenoler og fucoxanthin, samt antimikrobiell effekt mot 10 utvalgte bakteriestammer. Butaren ble frysetørket før det ble laget ekstrakter med etanol og vann (10-50 % etanol). Disse ekstraktene ble undersøkt for innhold av polyfenoler og fucoxanthin for å finne hvilken etanolkonsentrasjon som ga best ekstraksjon av disse forbindelsene. Folin-Ciocalteu metoden ble brukt for å undersøke butareekstraktene for totalt innhold av polyfenoler, HPLC ble benyttet for deteksjon av fucoxanthin, DPPH assay ble utført for å finne ekstraktens antioksidantkapasitet mens agar disc-diffusion metoden ble brukt for å undersøke butareekstraktens antimikrobielle egenskaper. For å undersøke butareekstraktens effekt i en alginatbasert coating på laks ble det utført et lagringsforsøk der biter (ca 10g) med lakseloins ble påført en coating laget med eller uten butareekstrakt. Som kontroll ble det benyttet naturell lakseloin. Alle prøvene ble pakket i modifisert atmosfære (CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>, 60:40) og lagret på 4 °C i 19 dager. Under lagringsforsøket ble det analysert for vekst av bakterier på jernagar, melkesyrebakterier på MRS agar og *Brochotrix thermosphacta* på STAA agar. Nedbrytningsprodukter av ATP og muskelens innhold av laktat ble analysert på HPLC, samt peroksidtall ved ferrothiocyanat-metoden.

Det ble funnet at butareekstraktene med 30 % etanol ga størst utbytte av polyfenoler, butareekstraktene med 50 % ga størst utbytte av fucoxanthin og lavest EC50-verdi (best antioksidantkapasitet) ved DPPH assay. Det ble også funnet at butareekstraktene hadde antimikrobiell effekt mot *Listeria innocua*, *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas salmonicida* og *Staphylococcus aureus*. I lagringsforsøket ble det videre funnet at coating med og uten butareekstrakt ga langsommere nedbrytning av ATP noe som resulterte i lavere innhold av hypoxanthin sammenlignet med kontrollgruppen. Det ble også observert lavere vekst av melkesyrebakterier i prøvene med coating enn for kontrollgruppen. Det ble ikke observert noen effekt av butareekstraktet på vekst av bakterier på jernagar.

Basert på resultatene konkluderes det med at butarekstraktene både har antimikrobielle og antioksidative egenskaper samt at ekstraktet med 30 % etanol har høyest innhold av bioaktive komponenter (sett bort fra fucoxanthin). Ut i fra lagringsforsøket med lakseloins er det vanskelig å konkludere med at en coating med bioaktive komponenter fra butare gir forbedret kvalitet sammenlignet med en ren alginatbasert coating. Alginatbasert coating virker til å gi en positiv effekt på kvalitet i seg selv. Med bakgrunn i utfordringer knyttet til produksjon av coatingen og med tanke på funnene i de rene ekstraktene vil det likevel være hensiktsmessig å arbeide videre med problemstillingen.

# Abstract

In this master thesis, it was investigated whether bioactive components from winged kelp (*Alaria esculenta*) have a potential as an ingredient in an alginate-based coating to increase quality in a Atlantic salmon filet product (*Salmo salar* L). The winged kelp was examined for the contents of bioactive components including polyphenols and fucoxanthin, as well as antimicrobial effect against 10 selected bacterial strains. The kelp was freeze dried before extracts were made with ethanol and water (10-50% ethanol). These extracts were examined for the content of polyphenols and fucoxanthin to determine which ethanol concentration gave the best extraction of these compounds. The Folin-Ciocalteu method was used to investigate the kelp extracts for total polyphenols content. HPLC was used for detection of fucoxanthin, DPPH assay was performed to find the antioxidant capacity of the extracts while the agar disc diffusion method was used to investigate the antimicrobial properties of the kelp extracts.

To investigate the effect of the kelp extracts in an alginate-based coating on salmon, a storage trial was performed in which pieces (about 10g) of salmon loin were applied with a coating made with or without kelp extract. As a control, natural salmon loin was used. All samples were packaged in modified atmosphere (CO<sub>2</sub>: N<sub>2</sub>, 60:40) and stored at 4 ° C for 19 days. During the storage trial, it was analyzed for growth of bacteria on iron agar, lactic acid bacteria on MRS agar and *Brochotrix thermosphacta* on STAA agar. Decomposition products of ATP and muscle lactate content were analyzed by HPLC, as well as peroxide numbers by the ferrothiocyanate method.

It was found that the 30% ethanol kelp extracts gave the highest yield of polyphenols, 50% kelp extracts gave the highest yield of fucoxanthin and lowest EC<sub>50</sub> (best antioxidant capacity) by DPPH assay. It was also found that the kelp extracts have antimicrobial effect against *Listeria innocua*, *Shewanella putrefaciens*, *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus*. In the storage trial, it was further found that coating with and without the kelp extracts gave slower degradation of ATP resulting in lower levels of hypoxanthin compared to the control group. Also, lower growth of lactic acid bacteria was observed in the coatings than in the control group. No effect of the kelp extract was observed on growth of bacteria on iron agar.

Based on the results, it can be concluded that the kelp extracts have both antimicrobial and antioxidant properties and that the 30% ethanol extract gave the highest content of bioactive components (aside from fucoxanthin). Based on the storage trial with salmon loin, it is difficult to conclude that a coating with bioactive components from winged kelp provides improved quality compared to a pure alginate-based coating. Alginate-based coating seems to give a positive effect on quality in itself. In view of the challenges associated with the production of the coating and given the findings in the pure extracts, it will still be appropriate to continue the trials.

# Innholdsfortegnelse

1. Innledning.....	1
2. Teori.....	2
2.1 Makroalger.....	2
2.1.1 Butare.....	2
2.2 Bioaktive komponenter i makroalger .....	3
2.2.1 Phlorotanniner.....	4
2.2.2 Fucoxanthin .....	6
2.2.3 Antimikrobiell effekt.....	7
2.2.4 Antioksidativ effekt.....	8
2.3 Atlantisk laks .....	9
2.4 Forringelse av fisk.....	10
2.4.1 Lipidoksidasjon.....	12
2.4.2 Nedbrytning av adenosintrifosfat .....	12
2.5 Prosessteknologi.....	13
2.5.1 Modifisert atmosfære pakking.....	13
2.5.2 Frysetørking.....	14
2.6 Coating.....	14
2.6.1 Alginat.....	15
2.7 Metodisk teori.....	16
2.7.1 Folin-Ciocalteu metoden .....	16
2.7.2 DPPH assay .....	16
2.7.3 Peroksid tall .....	17
2.7.4 HPLC .....	17
2.7.5 Agar disc-diffusion metoden.....	17
3. Material og metoder.....	18
3.1 Råstoff .....	18
3.2 Tillaging av algeekstrakt .....	18
3.2.1 Ultra turrax .....	18
3.2.2 Minilys.....	18
3.3 Antioksidativ kapasitet.....	19
3.4 Totalt polyfenolinnhold.....	19
3.5 Deteksjon av fucoxanthin .....	20
3.6 Antimikrobiell effekt.....	21



3.7 Lagringsforsøk .....	22
3.7.1 Prøveopparbeidelse.....	22
3.7.2 Mikrobiologi.....	23
3.7.3 Peroksider.....	24
3.7.4 ATP-nedbrytningsprodukter .....	25
3.7.5 Laktat .....	26
3.7.6 pH .....	26
3.7.7 Gassammensetning i headspace.....	26
3.8 Statistiske analyser .....	26
4. Resultater.....	27
4.1 Antioksidativ kapasitet.....	27
4.2 Totalt polyfenolinnhold.....	30
4.1 Fucoxanthin.....	31
4.4 Antimikrobiell effekt.....	32
4.5 Lagringsforsøk .....	35
4.5.1 Gassammensetning i headspace.....	35
4.5.2 pH utvikling.....	36
4.5.3 Mikrobiologi.....	37
4.5.4 ATP-nedbrytningsprodukter .....	40
4.5.5 Laktat .....	42
4.5.6 Peroksidverdi.....	43
5. Vurdering.....	44
5.1 Antioksidativ kapasitet.....	44
5.1.1 Totalt polyfenolinnhold.....	45
5.1.2 Fucoxantininnhold.....	46
5.2 Antimikrobiell effekt av butareekstrakter .....	47
5.3 Lagringsforsøk .....	48
5.3.1 Råstoff.....	48
5.3.2 Coating .....	48
5.3.3 Mikrobiologi.....	49
5.3.4 ATP-nedbrytningsprodukter .....	52
5.3.5 Laktatinnhold.....	53
5.4 Videre arbeid.....	54
6. Konklusjon.....	55
7. Referanseliste .....	56

# Figurliste

Figur 1:	
Oversikt over acetat-malonat metabolismeveien.....	5
Figur 2:	
Den kjemiske strukturen til phloroglucinol (1,3,5-trihydroksybenzen).....	5
Figur 3:	
Molekylær struktur hos fucoxanthin, fucoxanthinol, amarouciaxanthin A og halocynthiaxanthin).....	7
Figur 4:	
Reaksjonsmekanisme for antioksidativ virkning hos polyfenolet catechol.....	9
Figur 5:	
En modell som viser hvordan totalakim, spesifikke forringelses bakterier og kjemiske forringelsesprodukter påvirker holdbarheten i islagret fisk.....	11
Figur 6:	
ATP og dens nedbrytningsprodukter.....	12
Figur 7:	
Oppbygningen av G-blokk, M-blokk og GM-blokk i alginat.....	15
Figur 8:	
EC50 i butarekstraktene ved bruk av 10 % EtOH i løsemiddelet.....	27
Figur 9:	
EC50 i butarekstraktene ved bruk av 20 % EtOH i løsemiddelet .....	28
Figur 10:	
EC50 i butarekstraktene ved bruk av 30 % EtOH i løsemiddelet.....	28
Figur 11:	
EC50 i butarekstraktene ved bruk av 40 % EtOH i løsemiddelet.....	29
Figur 12:	
EC50 i butarekstraktene ved bruk av 50 % EtOH i løsemiddelet .....	29
Figur 13:	
Teoretisk beregnet EC50 i coatingen som ble brukt til lagringsforsøket.....	30
Figur 14:	
Resultater fra analyser på totalt polyfenolinnhold i ekstrakter av butare.....	31

Figur 15:	
	Målt mengde av fucoxanthin i butarekstrakt med 10-50 % EtOH i løsemiddelet.32
Figur 16:	
	Oversikt over gassammensetningen i «head space» av O <sub>2</sub> og CO <sub>2</sub> under lagringsperioden.....36
Figur 17:	
	pH utvikling i prøvene under lagringsforsøket..... 37
Figur 18:	
	Utvikling av kolonitall på jernagar under lagringsperioden..... 38
Figur 19:	
	Utvikling av kolonitall på MRS agar under lagringsperioden..... 39
Figur 20:	
	Utvikling av kolonitall på STAA agar under lagringsperioden..... 39
Figur 21:	
	Målt mengde hypoxanthin i prøvene under lagringsforsøket..... 40
Figur 22:	
	Målt mengde inosin i prøvene under lagringsforsøket..... 41
Figur 23:	
	Målt K-verdi i prøvene under lagringsforsøket..... 42
Figur 24:	
	Målt mengde laktat i prøvene under lagringsforsøket..... 43

## Tabelliste

Tabell 1:	
	Oversikt over bioaktive komponenter som kan finnes i makroalger..... 4
Tabell 2:	
	Oversikt over noen makroalger og mikroorganismer de er rapportert å ha effekt mot.....8
Tabell 3:	
	Mengde gallussyre i hvert rør ved tillaging av standardkurve til TPC analysen.....20

#### Tabell 4:

Oversikt over hvilke bakteriestammer, gramfarging, ID, inkubasjonstemperatur, inkubasjonstid og OD som ble benyttet ved undersøkelse av antimikrobiell effekt av butarekstrakt..... 21

#### Tabell 5:

Tilsetning av Fe(III) løsning og 3,7 % HCl til standardkurve ved peroksidtall..... 24

## Bildeliste

#### Bilde 1:

Butare (*Alaria esculenta*)..... 3

#### Bilde 2:

Antimikrobiell effekt av butarekstrakt på *Aeromonas salmonicida*..... 33

#### Bilde 3:

Antimikrobiell effekt av butarekstrakt på *Listeria innocua*..... 33

#### Bilde 4:

Antimikrobiell effekt av butarekstrakt på *Staphylococcus aureus*..... 34

#### Bilde 5:

Antimikrobiell effekt av butarekstrakt på *Shewanella putrefaciens*..... 35

## Vedleggsliste

#### Vedlegg 1:

Fucoxanthin standard og beregning av RF-verdi.....V1

#### Vedlegg 2:

Standardkurve gallussyre – totalt polyfenolinnhold med beregninger.....V2

#### Vedlegg 3:

ATP-nedbrytningsprodukter, retensjonstid og standardurver.....V3

#### Vedlegg 4:

HPLC kromatogram fra deteksjon av laktat.....V4

#### Vedlegg 5:

formler for beregning av K-verdi, RS% og EC50.....V5

# 1. Innledning

For å øke inntak av sjømat er det behov for å utvikle attraktive, stabile og velsmakende produkter. Det vil si produkter som er enkle å tilberede, har god kvalitet og med tilstrekkelig holdbarhet. Det er en økende trend at forbrukere foretrekker produkter med naturlige ingredienser uten kunstige tilsetninger. Fokuset på havet som matfat er i stadig vekst og med en stor forventet global befolkningsøkning i årene som kommer, samt problemer knyttet til klimaendringer, er en bærekraftig marin ressursutnyttelse viktig. For å på best mulig måte ta vare på ressursene fra havet, forskes det stadig på innovative og nye løsninger for å sikre gode og sunne produkter med god kvalitet og holdbarhet.

Alger har en lang historie som kilde til mat eller som ingrediens til matproduksjon. Interessen for bruk av alger som kilde til bioaktive komponenter i næringsmiddelindustri og helsekost har en stadig økning (Dominguez, 2013).

I denne masteroppgaven var målet å besvare noen forskningsspørsmål som er satt i samarbeid mellom student og veiledere. Følgende forskningsspørsmål ble stilt:

- Hvilket mengdeforhold i ekstraksjonen med vann og etanol gir best utbytte av bioaktive polyfenoler og fucoxanthin i butare?
- Har ekstrakt av butare antimikrobiell effekt?
- Har ekstrakt av butare antioksidativ kapasitet?
- Kan ekstrakt av butare redusere lipidoksidasjon i laks?
- Kan en coating med ekstrakt av butare være effektiv til å øke kvalitet og i et filetoprodukt av Atlantisk laks pakket i modifisert atmosfære?

Begrepet kvalitet i denne sammenhengen vil si mikrobiologisk- og kjemisk kvalitet. Sensorisk kvalitet er ikke en del av denne oppgaven.

Denne oppgaven vil ta for seg relevant teori knyttet til temaet i oppgaven, metoder som har blitt brukt for å løse forskningsspørsmålene, presentasjon av funn og resultater samt vurdering og konklusjon. Målgruppen for denne oppgaven er forskere, studenter og andre med interesse for temaet. Det påberegnes at leseren av denne oppgaven har gode forkunnskaper rundt tematikken, herunder kjemi, mikrobiologi og teknologi.

## 2. Teori

### 2.1 Makroalger

Alger er en heterogen gruppe av planter med en svært lang historie. Det er to hovedkategorier alger; makroalger og mikroalger. På grunn av lavt fettinnhold, høyt innhold av polysakkarider, høyt innhold av vitaminer og mineraler samt innholdet av ulike bioaktive komponenter er marine alger en god kilde til sunn mat (Gupta and Abu-Ghannam, 2011, Barba, 2017). Makroalger har også et potensiale som råstoff for ekstraksjon av polyfenoler, karotenoider, alginat m.m som kan benyttes som bioaktive ingredienser i prosessert mat (Roohinejad et al., 2017).

I motsetning til landplanter har ikke makroalger røtter, blader eller vaskulære system, men tar opp næring ved hjelp av osmose. Makroalgene vokser både i fjæra og på havbunnen i lavvannssonen. Makroalger er delt inn i tre subgrupper, grønnaalger (*Chlorophyta*), rødalger (*Rhodophyta*) og brunalger (*Phaeophyta*). Gruppene skilles på bakgrunn av makroalgens kjemiske komposisjon (Gupta and Abu-Ghannam, 2011). Brunalger, slik som butare (*Alaria esculenta*) har høyere konsentrasjoner av polyfenoler enn rød- og grønnaalger (Dominguez, 2013).

I 2010 ble det produsert og høstet ca. 18 millioner tonn makroalger til en verdi på snaut 6 milliarder USD. Villhøstede makroalger sto for 4,5 %, mens resten kommer fra kommersielt dyrkede makroalger. Land i Sør- og Sør-Øst Asia dominerer produksjonen av makroalger. Kina sto alene for 58 % av produksjonen i 2010, mens andre store produsenter er Indonesia, Fillipinene, Japan og Sør-Korea. De mest dyrkede artene globalt er japantare (*Laminaria japonica*) og wakame (*Undaria pinnatifida*) (Nayar and Bott, 2014).

#### 2.1.1 Butare

Butare er en marin brunalge med gul/brun farge. Butaren kan vokse seg opp til fire meter lang og 25 cm bred. Butaren vokser ofte på steinbunn i bølgeutsatte områder i lavvannssonen. Butare vokser i nordlige områder, og er en av brunalgene som vokser raskest. Dette gjør butaren svært godt egnet til dyrking og kultivering i Norge (Skjeremo et al., 2014a).

Sammen med wakame (*Undaria pinnatifida*) er butare den eneste brunalgen med en distinktiv stilk som går gjennom midten av veksten slik at den er lett gjenkjennelig (bilde 1)

(Seaweed, u.å). Butare er rapportert å ha høye verdier av polyfenoler. I et forsøk utført av Schiener et al. (2015) ble det funnet at butare høstet i mai hadde opp mot tre ganger så høye verdier av polyfenoler enn arter som fingertare (*Laminara digitata*), stortare (*Laminara hyperborea*) og sukkertare (*Saccharina latissima*). Butare har også et høyt proteininnhold med en gunstig aminosyresammensetning, noe som gjør den attraktiv til bruk i næringsmidler og fôr (Skjermo et al., 2014b). I Norge er potensialet for dyrking av makroalger stort, men enn så lenge er det villhøstet tare som dominerer produksjonen i Norge. I 2015 ble det dyrket og omsatt 51 tonn makroalger hvorav 2 tonn butare, mens det i 2014 ble høstet ca. 154 000 tonn viltvoksende makroalger (Stévant et al., 2017b).



Bilde 1: Butare (*Alaria esculenta*)(Seaweed, u.å)

## 2.2 Bioaktive komponenter i makroalger

I sjøen hvor makroalger vokser er det ytre miljøet hardt. Algene er utsatt for sollys og høy oksygenkonsentrasjon, noe som fører til dannelse av frie radikaler og andre oksiderende reaktanter. Likevel ser man sjelden skader på makroalger som følge av UV-stråling og reaksjoner fra frie radikaler. Dette indikerer at makroalgene har virkestoffer som beskytter mot disse ytre påkjenningene (Matsukawa et al., 1997, Steinhoff et al., 2012). Geografisk lokasjon, artstype og sesongvariasjoner påvirker mengden og produksjon av bioaktive komponenter som er tilgjengelig i algen (Dominguez, 2013, Schiener et al., 2015). Av de bioaktive komponentene i makroalger er phlorotanniner og karotenoider dominerende. I tillegg finnes det en rekke andre komponenter som bidrar til makroalgens gode egenskaper (tabell 1).

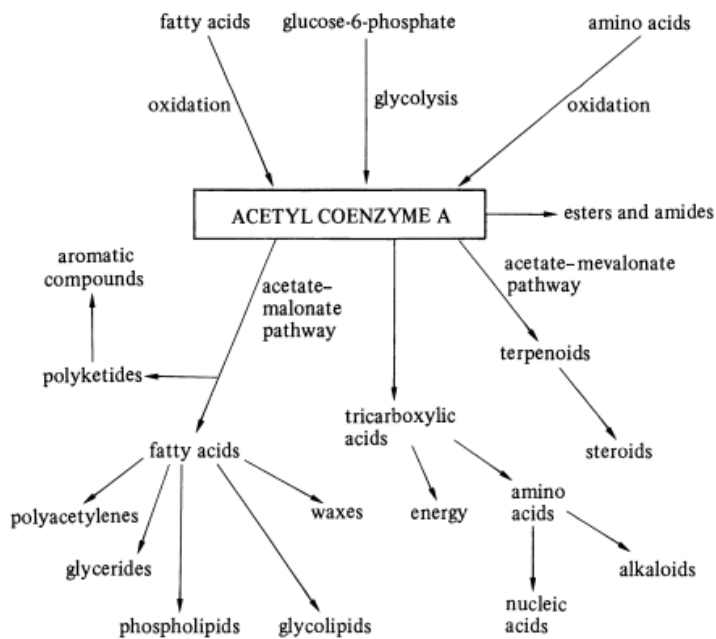
Tabell 1: Oversikt over bioaktive komponenter som kan finnes i makroalger (Dominguez, 2013)

<b>STOFFKLASSE</b>	<b>KOMPONENTER</b>
<b>POLYSAKKARIDER</b>	Alginat, agar, carragenan
<b>LIPIDER</b>	Flerummettede fettsyrer
<b>AMINOSYRER</b>	Essensielle aminosyrer
<b>PHLOROTANNINER</b>	Antioksidativ- og antimikrobiell effekt
<b>PIGMENTER</b>	Klorofyll, karotenoider
<b>VITAMINER</b>	A, D, E, K, B1, B2, B12, C
<b>MINERALER</b>	Ca, Mg, Na, P, K, I, Zn, Fe

### 2.2.1 Phlorotanniner

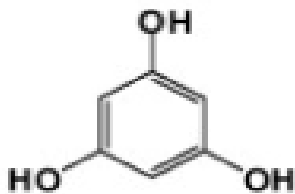
Marine brunalger er rike på phlorotanniner. Phlorotanniner er en klasse polyfenolforbindelser som er sekundære metabolitter biosyntetisert via acetat-malonat veien (figur 1). Brunalgene kan inneholde opp mot 25 % phlorotanniner av biomassen i tørrvekt (Magnusson et al., 2017). Størrelse på phlorotanniner varierer mye. Det er rapportert at phlorotanniner er funnet i størrelsesorden 126–650 kilo Dalton (kDa) (Pérez et al., 2016).





Figur 1: Oversikt over acetat-malonat metabolismeveien til venstre i figuren (Vickery, 1981)

Phlorotanninene er til stede i celleveggene der de har som rolle å blant annet beskytte cellen mot kjemiske farer, beskyttelse mot oksidasjon som skyldes UV-stråling, forandringer i næringstilgang eller interaksjon med mikroorganismer. Phlorotanninene er stort sett bygd opp av phloroglucinol (1,3,5-trihydroksybenzen, figur 2) enheter med ulik grad av polymerisering samt en gruppe av hetrogene polymer forbindelser. På bakgrunn av bindingene er phlorotanninene gruppert i 4 ulike undergrupper. De 4 undergruppene er fuhaloler og phloretoler (eter bindinger), fucoler (fenyl bindinger), fucophloretoler (både eter- og fenyl bindinger) og eckoler (dibenzodioksin bindinger) (Li et al., 2017a, Montero et al., 2016, Magnusson et al., 2017).



Figur 2: Den kjemiske strukturen til phloroglucinol (1,3,5-trihydroksybenzen) (Li et al., 2011)

Phlorotannin sammensetningen i alger er alltid av høy kompleksitet. (Montero et al., 2016) fant i et forsøk 53 ulike phlorotanniner tilhørende fuhaloler og phloretoler i japansk drivtang (*Sargassum muticum*) høstet i Norge. Selv om det er stor aksept for innholdet av phlorotanniner i brunalger er det relativt begrenset med karakterisering av disse komplekse polymere strukturene (Li et al., 2017a, Montero et al., 2016).

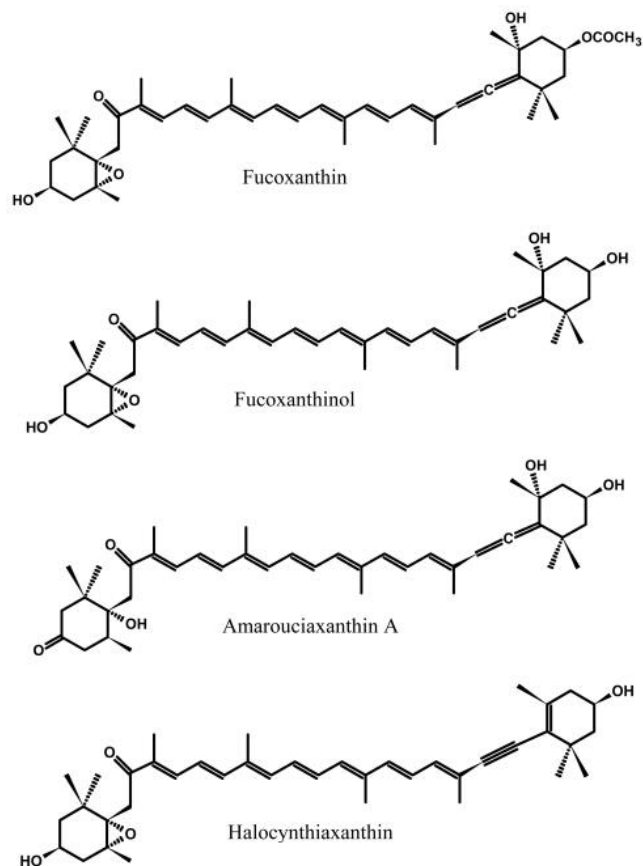
Phlorotanninene har blitt funnet å ha gode egenskaper og er rapportert å ha blant annet antimikrobiell- og antioksidativ effekt (Gupta and Abu-Ghannam, 2011, Gupta et al., 2010, Li et al., 2017a, Rajauria et al., 2012, Mendis and Kim, 2011). Li et al. (2017b) har rapportert at polyfenoler og polysakkarider fra makroalgen *Porphyra yezoensis* økte holdbarheten i stillehavsreker med 3-4 dager på bakgrunn av blant annet mikrobiell vekst, ATP-nedbrytning og sensorisk evaluering. De er også rapportert å ha gode humane helseeffekter som for eksempel antidiabetisk- og antiinflammatorisk effekt (Gupta and Abu-Ghannam, 2011, Li et al., 2017a).

### 2.2.2 Fucoxanthin

Brunalger slik som butare er rik på det marine xanthofyll karotenoidet fucoxanthin som har blitt rapportert å ha en rekke bioaktive egenskaper som for eksempel antioksidative-, antidiabetiske-, antikarsinogene- og antiinflammatoriske effekter (Peng et al., 2011, Zhang et al., 2015, Stévant et al., 2017a).

Fucoxanthin (figur 3) har en unik molekylær struktur som inkluderer en allenisk binding i tillegg til et kromoforsystem bestående av 7 dobbeltbindinger. Fucoxanthin har tre hovedmetabolitter i fucoxanthinol, amarouciaxanthin A og halocynthiaxanthin (figur 3), hvor de to førstnevnte også inneholder en allenisk binding (Peng et al., 2011). Det er rapportert at fucoxanthin og fucoxanthinol har bedre antioksidativ effekt enn halocynthiaxanthin og det antas at det er den alleniske bindingen gir økt effekt (Sachindra et al., 2007). Det er også beskrevet at en fysikalsk mekanisme hvor overskuddsenergi fra singlett oksygen blir transportert til den lange- sentrale kjeden med konjugerte dobbeltbindinger i korotenoidmolekylet utgjør en viktig del av den totale antioksidative effekten (Miyashita et al., 2011).

Strukturen og molekylenes optiske- (kirale) og stereo- (cis og trans) isomeri er derimot ustabil og utsatt for påvirkning fra høy temperatur, oksygen og sollys (Peng et al., 2011).



Figur 3: Molekylær struktur hos fucoxanthin, fucoxanthinol, amarouciaxanthin A og halocynthiaxanthin (Peng et al., 2011)

### 2.2.3 Antimikrobiell effekt

Studier viser at polyfenoler fra makroalger har en antimikrobiell effekt. Eksakt mekanisme er ikke kjent, men den antimikrobielle effekten kan komme av at polyfenolene endrer cellepermeabiliteten, eller forstyrrer membranfunksjonen slik at makromolekyler fra innsiden av bakteriecellen lekker ut og forårsaker celledød (Bajpai et al., 2008, Nagayama et al., 2002). Flere studier har vist at ekstrakter fra makroalger har inhiberende effekt på flere bakterier inkludert patogene bakterier (tabell 2).

Tabell 2: Oversikt over noen makroalger og hvilke mikroorganismer de er rapportert å ha effekt mot

<b>Makroalge</b>	<b>Mikroorganisme</b>	<b>Referanse</b>
<b><i>H. elongata</i></b>	<i>Listeria monocytogenes, Salmonella abony, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis</i>	Gupta et al. (2010)
<b><i>G. longissima</i></b>	<i>Vibrio salmonicida, Vibrio alginolyticus, Vibrio vulnificus, vibrio ordalii</i>	Cavallo et al. (2013)
<b><i>H. musciformis</i></b>	<i>Escherishia coli, Klebsiella pneumoniae E. faecalis, Staphylococcus aureus</i>	Bouhlal et al. (2010)
<b><i>L. variegata</i></b>	<i>Escherishia coli, Aeromonas hydrophila, Salmonaella typhimurium, Bacillus cereus, Micrococcus luteus</i>	Manilal et al. (2012)
<b><i>S. binderi, S. flavellum</i></b>	<i>Bacillus subtilis</i>	Jaswir et al. (2014)

#### 2.2.4 Antioksidativ effekt

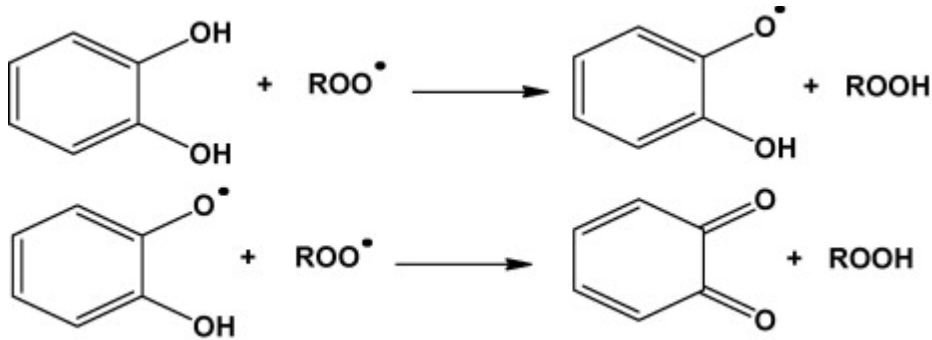
Makroalgenes antioksidantkapasitet er relatert til den kjemiske oppbygningen av komponentene som finnes i taren. Det er likevel vanskelig å fastslå mekanismene som regulerer den eksakte antioksidantkapasiteten, da det er synergieffekter mellom flere komponenter som definerer den totale kapasiteten (Tierney et al., 2010).

Oksidasjon er en av de viktigste årsakene til kjemisk nedbrytning, som gir harskhet og kjemisk fordervelse av mat og råvarer. Oksideringsprosessene kan også ødelegge næringsverdien, samt produktets farge, smak og tekstur, og dermed bidrar til redusert holdbarhet på produktet. Bruk av antioksidanter som tilsetningsstoffer er godt dokumentert, og gir en god effekt mot harskningsprosesser i matvarer (Antolovich et al., 2002).

Dette gjelder spesielt for råvarer og produkter med en høy andel av umettete fettsyrer (som for eksempel fisk og sjømat). Antioksidantene fungerer ved at de inhiberer initiering- eller propageringsreaksjoner ved å inaktivere frie radikaler, slik at lipidoksideringen ikke initieres (Santoso et al., 2004).

Komponenter med antioksidantkapasitet fra makroalger er polyfenoler, karotenoider, klorofyllkomponenter, fosfolipider, bromofenoler og polysakkarider. Det er fenolringene i

polyfenolkomponentene som fungerer som en elektronfanger og hemmer dannelse av frie radikaler (figur 4) (Bendary et al., 2013). Polyfenolene inhiberer hydroksylradikaler og peroksidradikaler. Den unike oppbygningen gjør at polyfenolene også kan fange metallioner. Metallioner kan fungere som pro-oksider og initiere harskningsreaksjone (Santoso et al., 2004, Blanc et al., 2011, De la Coba et al., 2009).



Figur 4: Reaksjonsmekanisme for antioksidativ effekt hos polyfenolet catechol. Phloroglucinol som er et vanlig polyfenol i brunalger inneholder tre hydroksylgrupper mot to hos catechol (figur 2) (Bendary et al., 2013)

## 2.3 Atlantisk laks

Atlantisk laks (*Salmo salar*) finnes naturlig på både de østlige- og vestlige kystområdene i Nord-Atlanteren. Laksen kan leve både som anadrom og ikke-anadrom, det vil si at den kan leve i både ferskvann og saltvann eller utelukkende i ferskvann (Klemetsen et al., 2003).

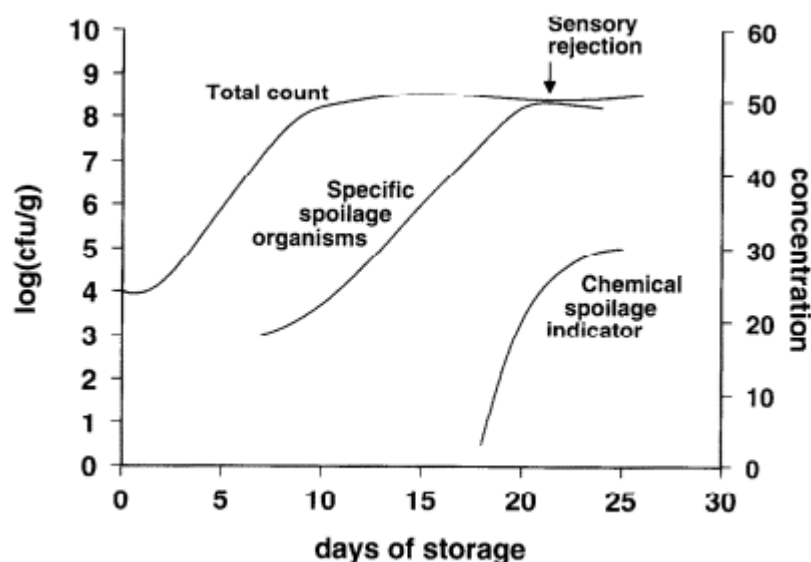
Atlantisk laks er i dag den viktigste oppdrettsarten i Norge der det i 2016 ble eksportert 1,24 millioner tonn oppdrettslaks (SSB, 2017) fra Norge og ut i verden. Den Atlantiske laksen består av vann (60-65 %), protein (18-20 %), lipid (16-19 %) samt noe karbohydrat, vitaminer og mineraler (Shearer et al., 1994, Ytrestøyl et al., 2015).

## 2.4 Forringelse av fisk

Forringelse av mat kan defineres som endringer som gjør produktet uegnet til humant konsum (Huis in't Veld, 1996). Forringelse av fisk skyldes for det meste av lipidoksidasjon, reaksjoner katalysert av fiskens egne enzymer og metabolsk aktivitet i mikroorganismer. Mikrobiell vekst i næringsmidler forringer den generelle kvaliteten til produktet og kan føre til dårlig- lukt og smak samt endringer i farge og tekstur (Corrales et al., 2014).

Fisk er lett-bederverlig på grunn av et høyt innhold av lett-omsettelige næringsstoffer og av autolytiske enzymer, samt muskelens høye vannaktivitet og nøytrale pH. Sjømat er temperatur- og betingelses avhengig og forringelseshastigheten kan senkes ved lagring på lave temperaturer (på is), under modifisert atmosfære (MA), i vakuum eller ved en eller annen form for konservering (salting, røyking, varmebehandling m.fl.). Valg av lagrings- og prosesseringsbetingelser vil avgjøre om fisken i hovedsak vil bli forringet gjennom mikrobiell- eller biokjemisk nedbrytning, eller en kombinasjon av begge (Sivertsvik et al., 2002). Holdbarheten til kjølelagret laks pakket i MA er rapportert til å være mellom to og tre uker (figur 5) (Sivertsvik et al., 2003, Gram and Huss, 1996).

Mikroorganismene befinner seg på fiskens overflate og i innvoller. Mengde mikroorganismer varierer mye og log CFU/g verdier mellom 2 – 9 er vanlig avhengig av hvor på fisken prøvene blir tatt (Sivertsvik et al., 2002). Fiskekjøttet er i utgangspunktet sterilt ved slaktetidspunktet, men blir raskt kontaminert fra skinn og innvoller under håndtering og prosessering (Sivertsvik et al., 2002).



Figur 5: En modell som viser hvordan totalmikroorganismer, spesifikke forringelses bakterier og kjemiske forringelsesprodukter påvirker holdbarheten i islagret fisk (Gram and Huss, 1996)

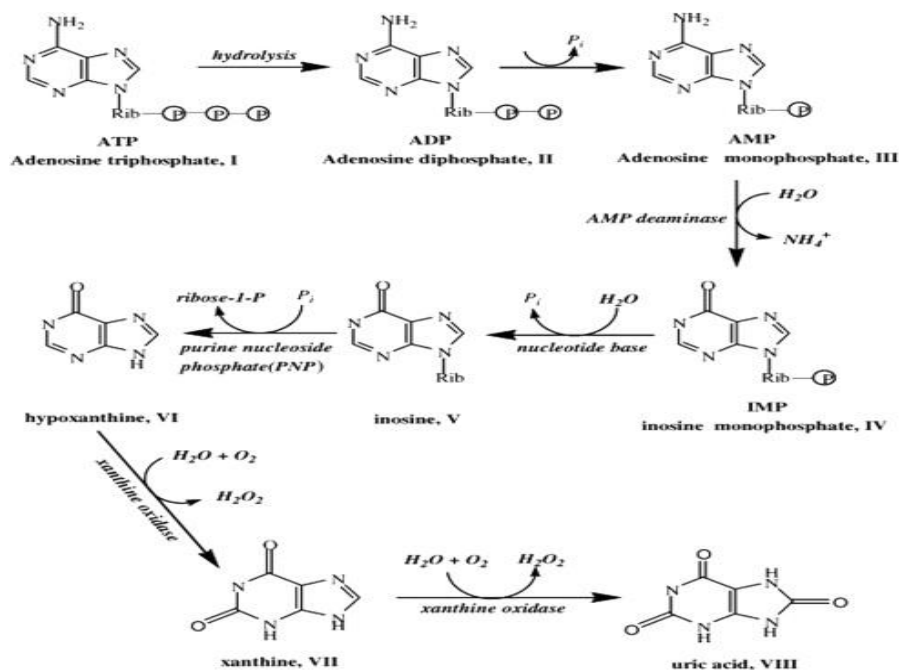
Forringelsesfloraen i fisk vil i de fleste tilfeller gjenspeile floraen i miljøet fisken lever i (Horsley, 1973). I kalde farvann er mikrofloraen dominert av psykrotrofe, aerobe og fakultativ anaerobe, Gram-negative stavbakterier, blant annet av *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella putrefaciens*, *Flavobacterium*, *Photobacterium* og *Aeromonas* (Horsley, 1973). Variable mengder Gram-positive organismer som for eksempel *Brochotrix thermosphacta*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* og *Bacillus* er også isolert fra sjømat (Gram and Huss, 1996, Sivertsvik et al., 2002). I laks dominerer ofte *Pseudomonas* slekten og *S. putrefaciens*. Disse mikroorganismene er ømfintelige for CO<sub>2</sub>, slik at ved pakking av laks i MA med høy CO<sub>2</sub>-konsentrasjon vil andre, CO<sub>2</sub>-tolerante mikroorganismer etter hvert dominere mikrofloraen. Eksempler på slike mikroorganismer er *Lactobacillus* spp., *B. thermosphacta* og *P.phosphoreum*. I de fleste tilfeller er det én bakterieart som er ansvarlig for det meste av den sensoriske forringelsen. I MA-pakket torsk og laks er det funnet at *P. phosphoreum* er dominerende og har størst påvirkning på fiskens forringelse (Sivertsvik et al., 2003, Emborg et al., 2002). Det opereres ofte med en grenseverdi av mengde mikroorganismer på log 6,0 cfu/g for forbrukeraksept i fisk (Fernández et al., 2009), men andre faktorer som for eksempel lipidoksidasjon og nedbrytning av ATP spiller også en viktig rolle for bestemmelse av holdbarhet i fisk.

### 2.4.1 Lipidoksidasjon

Lipidoksidasjon er et resultat av reaksjoner fra frie radikaler. Flerumettede fettsyrer som det er mye av i fisk er spesielt utsatt. Atlantisk laks og andre salmonide arter har et naturlig innhold av karotenoidet astaxanthin (AX) noe de får naturlig fra krepsdyr i kosten. Ved oppdrett av laks og ørret tilsettes AX i fôret slik at kjøttet får sin naturlige rødfarge. AX er et potent antioksidant og er en effektiv radikal «scavenger» i synergi med  $\alpha$ -tocoferol (vitamin E) (Bell et al., 2000). En kombinasjon av muskelens innhold av AX og vitamin E (Scaife et al., 2000, Bell et al., 2000), lagring på lave temperaturer og pakking uten oksygen (MAP eller vakuum) (Flick et al., 1992) bidrar til at lipidoksidasjonen i fersk laks sjeldent har signifikant betydning for produktets kvalitet og holdbarhet.

### 2.4.2 Nedbrytning av adenosintrifosfat

Etter død (post mortem) vil fisken gjennomgå en rekke biokjemiske- og fysiokjemiske endringer. For å kunne bevare fiskens ferskhet så lenge som mulig er det viktig å forstå disse endringene. Nedbrytning av adenosintrifosfat (ATP) er en autolytisk reaksjon og er den mest dominante i fiskemuskel. Nedbrytningen genererer en rekke nedbrytningsprodukter (figur 6) (Cheng et al., 2015).



Figur 6: ATP og dens nedbrytningsprodukter. ATP brytes ned til adenosindifosfat (ADP), ADP til adenosinmonofosfat (AMP), AMP til inosinmonofosfat (IMP), IMP til inosin (In) og In til hypoxanthin (Hx) og så videre til xanthin og urinsyre (Lawal and Adeloju, 2012)



Som et mål på ferskhet i fisk benyttes ofte K-verdi (Simpson et al., 2012), som er et mål på forholdet i mengden ATP, ADP, AMP, IMP med In og Hx (vedlegg 5). Desto høyere K-verdi jo mindre ferskt er produktet. Straks etter fiskens død vil det være en lav K-verdi, mens den vil øke eksponensielt utover lagringstiden (Simpson et al., 2012, Lawal and Adeloju, 2012). Konsentrasjonen av Hx kan også benyttes direkte som en indikasjon på forringelse (Simpson et al., 2012). Dannelse av Hx i fisk er trolig en av grunnene til usmak mot slutten av holdbarhetstiden. Hx kan dannes ved autolytiske prosesser, men også av forringelsesbakterier som *Pseudomonas spp*, *S. putrefaciens* og *P. phosphoreum*. Konsentrasjonen til Hx kan derfor bli brukt som en indikator på ferskhet alene og i tillegg til K-verdi (Hong et al., 2017).

## 2.5 Prosessteknologi

### 2.5.1 Modifisert atmosfære pakking

Modifisert atmosfære pakking (MAP) er en pakketeknologi som er basert på å tilpasse atmosfæren rundt et produkt for å begrense vekst av forringelses- og patogene bakterier og på den måten øke produktets holdbarhet. Luften i pakningen blir fjernet og byttet ut med en kontrollert blanding av gasser som kan optimaliseres for det spesifikke produktet som skal pakkes. Pakningen får så et filmlokk som blir sveiset på ved hjelp av varme. Materialer som brukes til MA-pakking må ha gode barriereegenskaper mot oksygen og fukt (Fellows, 2009b). Gasser som brukes til MA-pakking er karbondioksid (CO<sub>2</sub>), oksygen (O<sub>2</sub>) og nitrogen (N<sub>2</sub>).

Ved bruk av MAP forlenges holdbarheten betraktelig til en rekke næringsmidler. Selv om MAP er mer plasskrevende og har en høyere kostnad enn for eksempel vakuumpakking vil man ha betydelig mindre svinn som følge av bederelse (Macé et al., 2012). På grunn av sin bakteriostatisk effekt er CO<sub>2</sub> den viktigste gassen i MAP. CO<sub>2</sub> inhiberer mange forringelsesbakterier og inhiberingen øker med økt konsentrasjon av CO<sub>2</sub>. Da CO<sub>2</sub> er løselig i vann og fett og løseligheten øker jo lavere temperatur, er effektiviteten av CO<sub>2</sub> avhengig av lagringstemperatur (Abel et al., 2018).

Effekten CO<sub>2</sub> har på bakterievekst kommer av en kombinasjon av fire mekanismer. 1. Endring i cellemembranfunksjon som hindrer effektivt næringsopptak. 2. Direkte inhibering av enzymer eller bremsing av raten i enzymreaksjoner. 3. Penetrering av cellemembranen som

fører til intracellulære pH-endringer. 4. Endringer av egenskapene til cellens proteiner (Sivertsvik et al., 2002).

Nitrogen er en inert gass og brukes som fyll-gass i MA-pakking på grunn av dets lave løselighet i vann og fett. O<sub>2</sub> nivået i MAP er ofte så lavt som mulig for å inhibere aerobe patogene- og forringelsesbakterier og for å forhindre oksidativ harskning. Derimot blir O<sub>2</sub> brukt i noen produkter, som for eksempel i rødt kjøtt og tunfisk. Dette for å opprettholde den røde fargen i kjøttet da oksygen hindrer dannelsen av metmyoglobin. O<sub>2</sub> i MA-pakket fisk vil også forhindre reduksjon av TMAO til TMA (Sivertsvik et al., 2002).

Til MA-pakking av laks benyttes ofte en gassammensetning på 60 % CO<sub>2</sub> og 40 % N<sub>2</sub>. Denne sammensetningen er vist å gi optimal effekt for bedre holdbarhet, ofte i kombinasjon med andre teknologier som for eksempel superkjøling (Hansen et al., 2009, Fernández et al., 2010).

### 2.5.2 Frysetørking

Tørking av mat har tradisjonelt vært og er fortsatt en metode for å redusere vannaktiviteten i et produkt for å øke holdbarheten. Ved tradisjonell tørking må det tilføres varme, noe som kan endre de sensoriske egenskapene og næringsverdien i produktet. Med frysetørking brukes vakuum og svært lave temperaturer (Fellows, 2009a). Enkelt forklart er frysetørking en tørkemetode hvor vann går fra is til damp uten å være innom væskefasen. Dette kalles for sublimasjon. For at en sublimasjon skal kunne oppstå må forholdene ligge til rette for det. Partialtrykket i vannet må senkes under trippelpunktet (ca. 800 mBar ved 0 °C) (Adams, 2007). Frysetørking er i forhold til andre tørkemetoder rapportert å gi et bedre utbytte av næringsstoffer i makroalger (Chan et al., 1997). Polyfenolforbindelser og karotenoider er ømfintlige mot høy temperatur og ettersom tradisjonelle tørkemetoder ofte benytter varme er frysetørking en god metode for tørking av makroalger (Li et al., 2017a).

## 2.6 Coating

En ideel spiselig coating er et tynt lag som dekker overflaten til det aktuelle næringsmiddelet. Coatingen kan ha ulike formål, blant annet å være en barriere mot fukt, drypptap og temperatur (Tavassoli-Kafrani et al., 2016). Den kan også være en effektiv barriere mot oksygen som kan forhindre oksidasjon. Spiselig coating kan også brukes som behandling av innhøstet frukt som tomat, fersken, moreller m.m for å bremse

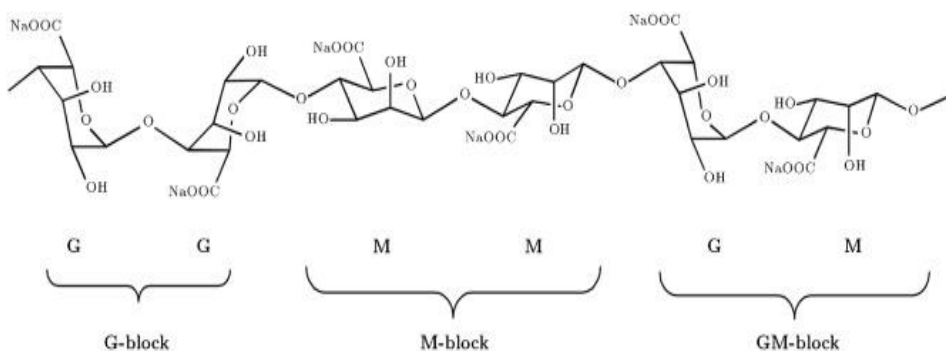
modningsprosessen og dermed øke holdbarheten (Tavassoli-Kafrani et al., 2016). Ved å inkludere bioaktive komponenter fra for eksempel makroalger eller andre naturlige kilder til coatingen vil man kunne få andre egenskaper i tillegg, slik som antimikrobiell- og en økt antioksidativ kapasitet (Campos et al., 2011, Blanco-Pascual et al., 2014). En spiselig coating kan produseres av flere ulike ingredienser, blant annet av polysakkarider som alginat, agarose og karragenan eller proteiner som gelatin, kollagen og planteprotein (Gennadios et al., 1997).

Flere studier har vist at en spiselig coating av alginat har gitt god effekt ved å forlenge holdbarheten til blant annet fisk (Song et al., 2011) og kjøtt (Chidanandaiah et al., 2009) Bioaktive ingredienser kan være for eksempel polyfenolforbindelser, karotenoider, flavanoider m.m. (Corrales et al., 2014, Lee, 2014).

### 2.6.1 Alginat

Alginat er et lineært, anionisk polysakkarid som isoleres fra brunalger, ofte fra fingertare (*Laminara diditata*) og grisetang (*Ascophyllum nodosum*). Alginatet befinner seg i celleveggen i form av natrium-, kalsium- og magnesium salter av alginsyre. Alginat består av monomere enheter av 1,4 bundet  $\alpha$ -d-mannuronat og  $\beta$ -l-guluronat (Blanco-Pascual et al., 2014).

Alginatets polymere kjede er satt sammen av tre forskjellige blokker; M, G og MG (figur 7) i ulik mengde og distribusjon i kjeden. M-blokken består utelukkende av d-mannuronsyre, G-blokken utelukkende av l-guluronsyre, mens MG-blokken består av begge. Høyt innhold av G-blokken gir best gel styrke (Tavassoli-Kafrani et al., 2016).



Figur 7: Oppbygningen av G-blokk, M-blokk og GM-blokk i alginat (Daemi and Barikani, 2012)

Alginat er svært funksjonelt og innehar egenskaper som er godt dokumentert. Alginat kan blant annet brukes som fortykningsmiddel, stabilisator, filmdanner, geldanner og emulgator. Alginat er en attraktiv ingrediens til spiselig coating på grunn av sine egenskaper. Alginat er ikke-toksisk, lett nedbrytbart, har god biokompatibilitet og er en forholdsvis rimelig råvare (Tavassoli-Kafrani et al., 2016). Alginat er også rapportert å ha antimikrobiell effekt (Holdt and Kraan, 2011).

## 2.7 Metodisk teori

Dette kapittelet skal gi en enkel teoretisk oversikt over fem metoder som er benyttet i oppgaven. Totalt polyfenolinnhold (Folin-Ciocalteu metoden), antioksidativ kapasitet (DPPH assay), antimikrobiell effekt (agar disc-diffusion metoden), peroksidtall (ferrothiocyanatmetoden) og generelt om HPLC som er blitt brukt til å analysere innhold av fucoxanthin, laktat og ATP-nedbrytningsprodukter.

### 2.7.1 Folin-Ciocalteu metoden

Folin-Ciocalteu metoden er en metode for å måle totalt polyfenolinnhold i en prøve. Metoden er basert på reaksjonen mellom fenoliske komponenter med en fargereagens. Det skjer en overføring av elektroner fra fenoler i et alkalisk medium som utvikler blå fosfomolybden/fosfowolfram syre kompleks (Huang et al., 2005). Folin-Ciocalteu metoden er enkel, rask og reproducerbar og metoden er derfor utstrakt brukt til dette formålet (Prior et al., 2005)

### 2.7.2 DPPH assay

DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) er et stabilt organisk nitrogenradikal og som kan brukes til å måle et antioksidants kapasitet. DPPH assay er en metode som baserer seg på et antioksidants evne til å redusere dette radikalet. Det er foreslått at det skjer en hurtig elektron overføringsprosess fra fenoksidanioner til DPPH (Prior et al., 2005). DPPH har en dyp fiolett farge som reduseres ved reaksjon med antioksidative komponenter. En reduksjon av farge kan måles spektrofotometrisk (Huang et al., 2005).

### 2.7.3 Peroksid tall

En metode for å bestemme lipidoksidasjon i næringsmidler er peroksid tall ved ferrothiocyanat metoden. Metoden er basert på oksidasjon av jern(II) ( $\text{Fe}^{2+}$ ) til jern(III) ( $\text{Fe}^{3+}$ ) av peroksider tilstede i prøven. Jern(III) danner et rødt fargekompleks med thiocyanat og blir bestemt kolorimetrisk (Lips et al., 1943).

### 2.7.4 HPLC

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) eller høytytelsesvæskerkromatografi er en fysisk metode for separasjon hvor komponentene som skal separeres distribueres mellom to faser. Den ene fasen, stasjonærfasen, er polar og består ofte av silica (3-10  $\mu\text{m}$ ). Den andre fasen, mobilfasen, er upolar. Mobilfasen vil variere etter hva det skal analyseres for (Gunstone, 2009). Enkelt forklart består et HPLC-instrument av seks komponenter: reservoar for mobilfase, pumpe, injektor, kolonne, detektor og skriverintegrator (Greibrokk, 1987).

### 2.7.5 Agar disc-diffusion metoden

Denne metoden går ut på at agarplater blir inokulert med et standardisert inokulum av en bestemt bakterie-, sopp- eller muggart. Filterpapir-lapper blir påført et testsubstrat som skal testes for antimikrobiell effekt og plassert på den inokulerte agarplaten. Eventuelle antimikrobielle stoffer diffunderer inn i agaren og inhiberer germinering og vekst av mikroorganismen. Diameteren av vekstfrie soner (hemmingssoner) rundt filterlappene blir normalt målt for kvantifisering av effekt (Balouiri et al., 2016).

## 3. Material og metoder

### 3.1 Råstoff

Til analysene som er beskrevet i dette kapittelet er det benyttet frossen butare (*Alaria esculenta*) fra Seaweed Energy Solutions AS på Frøya. Taren var dyrket på rep i åpent vann og høstet 24.05.2017. Butaren ble oppbevart i fryser på -80 °C frem til bruk.

### 3.2 Tillaging av algeekstrakt

For å utføre analyser på totalt polyfenol innhold, antioksidativ kapasitet (DPPH assay), antimikrobiell effekt og innhold av fucoxanthin ble det laget ekstrakter av butare. Butaren ble frysetørket (Freezone 12, LabConco) i 72 timer før den ble pulverisert med mekanisk morter og pistill (Retsch, RM 200). Den pulveriserte butaren ble oppbevart i tett beholder på -80 °C frem til bruk.

Det ble benyttet to ulike metoder for tillaging av butareekstraktene. Homogenisator (Ultra turrax T25 basic, IKA-Werke) og risting (Minilys, Bertin Technologies). Det ble laget 3 paralleller av alle prøver.

#### 3.2.1 Ultra turrax

Ca. 1 g frysetørket butare ble veid opp og overført til sentrifugerør av plast. 9,0 ml løsemiddel (etanol(EtOH):vann, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60 og 50:50) Ethanol absolute, VWR chemicals, cas: 67-17-5) ble tilsatt før prøvene ble homogenisert med Ultra turrax (13000 rpm) i 20 sekunder. Prøvene ble deretter plassert i et ultralydbad (Branson 5800) i 60 minutter ved 25 °C og maksimum styrke. Prøvene ble så sentrifugert (Kubota 1700, 12000 rpm, 4 °C) i 15 minutter. Væskefasen ble deretter tatt ut og filtrert gjennom sprøytefilter (Sterile syringe filter, 0,2 µm cellulose acetate membrane, VWR Chemicals) og overført til kimaxrør. De ferdige ekstraktene ble fryst ned og oppbevart på -80 °C for videre bruk.

#### 3.2.2 Minilys

Ca. 0,5 g frysetørket butare ble oppveid og overført til prøverør med 10 kuler (Precellys 24, 2,8 mm zirconium oxide beads). 4,5 ml løsemiddel (EtOH:vann, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60 og 50:50) ble tilsatt før prøvene ble ristet med Minilys i 30 sekunder på medium hastighet. Fremgangsmåten var ellers lik som for prøvene som ble homogenisert med Ultra turrax.

### 3.3 Antioksidativ kapasitet

Ekstrakter av butare som tidligere beskrevet ble analysert for antioksidativ kapasitet ved å benytte DPPH assay som beskrevet av HiST (2016). Ekstraktene ble fortynnet til endelige konsentrasjoner mellom 0,25 og 10,0 g AH/g DPPH. Det ble laget 3 paralleller av alle prøver.

Det ble overført 200 µl fortynnet butreekstrakt, 800 µl Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7,4) og 1,0 ml DPPH-løsning (0,2 mg/ml (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl, Sigma Aldrich CAS: 1896-66-4)) til kimaxrør. Prøvene ble satt mørkt i 60 minutter i romtemperatur før absorbansen ble målt spektrofotometrisk ved 520 nm (Shimadzu UV-1800). Det ble laget 3 blankprøver bestående av 800 µl tris-HCl buffer og 1,0 ml DPPH-løsning. Spektrofotometeret ble nullstilt med tris-HCl buffer.

Det ble også laget en standardkurve. En fortynningsserie av trolox-løsning (97 %, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid, Sigma Aldrich, cas: 53188-07-1 løst i 99 % etanol) med seks fortynninger i konsentrasjoner fra 0,0625 til 2,0 mM ble laget. Videre ble samme fremgangsmåte som for selve prøvene benyttet. Resultatene av trolox standardkurve ble ikke benyttet videre. Resultatene av DPPH assay ble uttrykt som EC<sub>50</sub>, som er den konsentrasjonen av antioksidantløsningen som skal til for å redusere 50 % av DPPH radikalene. EC<sub>50</sub> ble beregnet ut av den lineære trendlinjen fra radical scavenging % i Excel (se vedlegg 5).

### 3.4 Totalt polyfenolinnhold

For å måle totalt polyfenolinnhold i butareekstraktene ble det benyttet Folin-Ciocalteu metoden som beskrevet av Prior et al. (2005) med noen endringer. I forbindelse med analysen skulle det lages en standardkurve (se vedlegg 2). En serie på 6 merkede målekolber (100 ml) ble tilsatt 5,0 ml ionebyttet vann og deretter ble følgende mengde og konsentrasjon av gallussyre tilsatt som vist i tabell 3 (Gallic acid monohydrate, Sigma Aldrich CAS: 5995-86-8)

Tabell 3: Mengde gallussyre i hvert rør ved tillaging av standardkurve til TPC analysen

KOLBE NR	KONSENTRASJON GALLUSSYRE MG/L	VOLUM STAMLØSNING
1	0	0
2	0,5	0,5
3	1,0	1,0
4	1,5	1,5
5	3,0	3,0
6	5,0	5,0

Det ble så tilsatt 1,0 ml Folin-Ciocalteu reagens (VWR Chemicals, cas: UN3264) til hver av kolbene. Innholdet ble blandet forsiktig sammen og latt stå i ro i 5 minutter. Det ble deretter tilsatt 10,0 ml, 7 % natriumkarbonat (Sodium carbonate anhydrous, VWR Chemicals CAS: 497-19-8) og fortynnet med ionebyttet vann til 100 ml merket. Prøvene sto så i ro i 2 timer før absorbansen ble målt spektrofotometrisk ved 750 nm (Shimadzu UV-1800).

For betemmelse av total polyfenol ble samme fremgangsmåte som for standardkurven brukt, men hvor gallussyren ble erstattet med 100 µl butarekstrakt. Det ble laget 3 paralleller av alle prøver. Resultatene ble uttrykt som g GAE (Gallic Acid Equivalents)/100 g tørrvekt og ble beregnet i Excel.

### 3.5 Deteksjon av fucoxanthin

For deteksjon av fucoxanthin ble det benyttet HPLC. Butarekstrakter ble tatt ut av fryser (-80 °C) og 1,0 ml ble overført til hvert sitt HPLC-glass. HPLC systemet som ble brukt var en Agilent 1290 koblet til en infinity Diode Array Detektor (Agilent Technologies) med en YMC C-30 karoteniode kolonne (100 x 2,1 mm I.D, s-3 µm). Mobilfasen bestod av metanol (MeOH):aceton (A(60:40)) og aceton:vann (B(60:40)) med gradient på 100 % A og 0 % B til 0 % A og 100 % B i løpet av 10 minutter. Mobilfasen hadde en flow på 0,5 ml/min. Kolonnen hadde en temperatur på 35 °C. Fucoxanthin ble detektert på 450 nm. kommersiell standard (fucoxanthine all-trans analytical standard, Sigma-Aldrich, cas: 3351-86-8) ble benyttet til å finne retensjons tid og for kvantifisering (se vedlegg 1). Resultatene ble uttrykt som mg/g tørrvekt og ble beregnet i Excel.



### 3.6 Antimikrobiell effekt

For å teste algeekstraktene for antimikrobiell effekt ble det utført Agar disc-diffusion på 10 utvalgte bakteriestammer (tabell 4). Metoden er hentet fra Balouiri et al. (2016), med noen endringer. Valg av bakteriestammer ble tatt på bakgrunn av vanlig forringelsesflora i sjømat, vanlige kontaminanter i foredlingsindustri og hva som var tilgjengelig ved instituttet.

Tabell 4: Oversikt over hvilke bakteriestammer, gramfarging, ID, inkubasjonstemperatur, inkubasjonstid og OD som ble benyttet ved undersøkelse av antimikrobiell effekt av butareekstrakt

Bakterie	Gram +/-	ID	ink.temp	ink. Tid	OD660
<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	CCUG 13452	25 °C	48 t	0.231
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	CCUG 369	25 °C	48 t	0.198
<i>Brochotrix thermosphacta</i>	+	CCUG 35132	20 °C	24 t	0.188
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	-	CCUG 16288	20 °C	48 t	0.170
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	CCUG 14551	37 °C	24 t	0.180
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	CCUG 51870	37 °C	24 t	0.181
<i>Escherichia coli</i>	-	CCUG 49263	37 °C	24 t	0.185
<i>Listeria innocua</i>	+	CCUG 15531	37 °C	24 t	0.182
<i>Pseudomonas spp.</i>	-	Miljø (sei)	25 °C	48 t	0.237
<i>Aeromonas salmonicida SU2</i>	-	Miljø (sei)	37 °C	24 t	0.161

Bakteriene som ble benyttet var oppbevart i fryser (-80 °C) og ble dyrket opp i flytende generelt medium (Tryptone soya broth, Oxoid, CMO129) ved inkubasjonstemperatur som vist i tabell 4. Det ble sjekket celletetthet ved OD660 etter 24, 48 og 72 timer. Det var ønskelig med en OD på ca. 0.150 til 0.250. Dette gir i de fleste tilfeller en celletetthet på ca. log 8-9 cfu/g (Balouiri et al., 2016). Bakteriene som ble inkubert ved 37 °C samt *Brochotrix thermosphacta* (20 °C) trengte 24 timer på å komme opp i rett OD, mens resten trengte 48 timer.

Butareekstrakt med 10, 30 og 50 % EtOH ble tilført filterlapper (Whatman grade AA, 6mm discs, GE) i mengde 25 µl, 50 µl, 75 µl og 100 µl. 25 µl ekstrakt ble tilsatt av gangen, før nye 25 µl ble tilsatt etter 45 minutter. Etter at de siste 25 µl var tilsatt lå filterlappene til avdamping i sterilbenk i 2 timer før bruk for å dampe av etanol fra løsemiddelet. Filterlapper med kun løsemiddel (10 %, 30 % og 50 % EtOH) ble benyttet for kontrollprøver.

0,1 ml inokulum ble tilført agarplater med 4,0 mm tykkelse (Müller Hinton agar, Sigma Aldrich, 70191) med platespredningsmetoden som beskrevet i NMKL (2007). Müller Hinton agaren ble laget etter anvisning fra produsent. Filterlappene ble lagt på agarplatene, hvor hver mengde tilsatt ekstrakt hadde hver sin ¼ del av agarplaten. Agarplatene ble inkubert i henhold til tabell 4. For å bestemme antimikrobiell effekt ble en eventuell inhiberingssone rundt filterlappene observert. Agarplatene ble fotografert med videometer (Videometer Lab 2).

### 3.7 Lagringsforsøk

Til lagringsforsøket skulle mikrobiologi, pH, peroksid dannelse, laktatdannelse og nedbrytningsprodukter av ATP analyseres over en periode på 19 dager. Det ble benyttet frøyas sashimi grade lakseloin fra SalMar ASA med slaktedato 4 dager før prøveopparbeidelse til prøvene uten coating og med coating uten ekstrakt, mens det til prøvene med coating med ekstrakt ble benyttet hel laks fra SalMar ASA hvor backloinen ble tatt ut. Slaktedato var også her 4 dager før prøveopparbeidelse. Grunnen til forskjellen i prøvematerialet var av prøvene med coating med ekstrakt måtte gjøres på nytt senere i prosjektperioden på grunn av problemer med muggvekst i prøvene.

#### 3.7.1 Prøveopparbeidelse

Til coating uten algeekstrakt ble det tilsatt 4,0 g alginat (Alginic acid sodium salt, high viscosity, Alfa Aesar cas: 9005-38-3) per 1000 ml vann:EtOH (80:20). Alginatet ble tilsatt under omrøring med magnetrører til fullstendig oppløst i romtemperatur. Til coatingen med algeekstrakt ble 4,0 g alginat tilsatt til 450 ml vann:EtOH (80:20) under omrøring til fullstendig oppløst. Det var nå en tykk gel. 150 ml algeekstrakt med 20 % EtOH ble satt under omrøring og det ble tilsatt små mengder alginatgel om gangen til all gel var tilsatt. Blandingen sto under omrøring i 2 timer til oppløst. Alt utstyr som ble brukt til tillaging av

coating var sterilisert med autoklav (Tomy SX-300E, High-Pressure Steam Sterilizer) 121 °C i 15 minutter.

Til prøvene ble lakseloin skjært i skiver à 10,0 ± 1,0 g. Lakseskivene ble dyppet i alginatløsningen med og uten algeekstrakt i ca. 15 sekunder før de ble dyppet i kalsiumkloridløsning (Calcium chloride dihydrate, VWR Chemicals, 30 % vandig løsning) i 15 sekunder. Lakseskivene ble så lagt i plastskåler (Faerch HICPET, 230 ml) med en absorbent i bunnen (60 x 80 mm) og pakket i modifisert atmosfære (Webomatic Singlechamber Supermax-c) med 60 % CO<sub>2</sub> og 40 % N<sub>2</sub> (PBI Dansensor MAPmix 9000). Det ble også pakket lakseskiver uten coating som referanse. Prøvene ble oppbevart i kjølerom på 4 °C til uttaksdager etter 0, 4, 7, 10, 13, 16 og 19 dager.

### 3.7.2 Mikrobiologi

For å undersøke vekst av bakterier i prøvene ble det gjort mikrobiologiske undersøkelser ved alle uttaksdager i lagringsforsøket. De mikrobiologiske undersøkelsene ble gjort med tre ulike medier. STAA (STAA agar base, Oxoid, CMO0881 + STAA selective supplement, Oxoid, SR0162E) for deteksjon av *Brochotrix thermosphacta*, MRS (MRS agar (de man, Rogose, Sharpe), Oxoid, CMO361) for deteksjon av melkesyrebakterier og jernagar (iron agar (Lyngby) without L-cystein, Oxoid, CMO964) for deteksjon av totalt aerobt, mesofilt kimtall. Mediene ble tillaget etter anvisning fra produsent. Prøvene på 10,0 ± 1,0 g ble veid og tilsatt sterilt peptonvann (Neutralised bacteriological peptone, Oxoid, LP0034) i en stomacherpose. Prøvene ble så homogenisert med en stomacher (Masticator, IUL Instruments). Det ble så laget en fortyningsserie med fortyninger fra 1,0 x 10<sup>-1</sup> til 1,0 x 10<sup>-5</sup>. Det ble benyttet platespredning (MRS og STAA) i henhold til NMKL (2007) og innstøpning (jernagar) i henhold til (NMKL, 2006). Jernagaren ble tilsatt 3,2 ml L-cystein til 400 ml ferdig jernagar før bruk (Sigma-Aldrich cas: 52-90-4). Det ble benyttet sterilteknikker under de mikrobiologiske undersøkelsene. Prøvene ble så inkubert i inkubatorskap (Friocell, MMM Group). Jernagar og STAA agar ble inkubert aerobt og MRS agar ble inkubert anaerobt i et anaerobt system (EZ anaerobe system, BD GasPak) med O<sub>2</sub> absorbent (EZ anaerobe container system with indicator, BD GasPak) på 25 °C. Kolonitall ble avlest etter 2 døgn (STAA agar), 3 døgn (jernagar) og 5 døgn (MRS agar). Kimtall ble uttrykt som log cfu/g prøve og ble beregnet i Excel.

### 3.7.3 Peroksider

For å måle innhold av peroksider i MAP-pakket laks over tid ble ferrothiocyanatmetoden som beskrevet av Lips et al. (1943) med noen endringer benyttet. For å ekstrahere ut lipidene i prøvene ble det benyttet Blich and Dyer metoden (Blich and Dyer, 1959). Laks fra hver uttaksdag som har blitt lagret på  $-80^{\circ}\text{C}$  ble tatt ut og revet med en kjøkkenrasp. 2-3 g prøve ble veid opp og overført til sentrifugerør av plast. Det ble deretter tilsatt 3,0 ml ionebyttet vann, 10,0 ml MeOH (VWR Chemicals, 20864.320) og 5,0 ml kloroform (VWR Chemicals, 22711.324). Prøvene ble så homogenisert med ultra turrax (T25 basic, IKA-Werke 13000 rpm) i 1 minutt før det ble tilsatt ytterligere 5,0 ml kloroform. Prøvene ble igjen homogenisert, denne gang i 20 sekunder. Det ble nå tilsatt 5,0 ml ionebyttet vann og homogenisert igjen i 20 sekunder.

Prøvene ble deretter sentrifugert (Kubota 1700, 12000 rpm,  $3^{\circ}\text{C}$ ) i 10 minutter.

Kloroformfasen (bunnfasen) ble pipettert ut med en pasteurpipette over i kimaxrør. Prøvene ble satt til avdamping med nitrogenflush (Reacti-Therm heating module, Pierce) til all kloroform var avdampet. Det var nå kun olje igjen i rørene. Det ble deretter tatt ut ca. 45 mg olje og fortynnet i 2,0 ml isooktan (2,2,4 trimetylpentan, Lab-scan analytical science, cas: 540-84-7). Prøvene ble oppbevart mørkt og på is til videre bruk.

I mellomtiden ble det satt opp en standardkurve med 5 prøvepunkt. I hvert rør ble det tilsatt 10,0 ml EtOH, 200  $\mu\text{l}$  isooktan samt Fe(III)klorid hexahydrat (i 3,7 % HCl, 0,1 mg Fe(III)/ml, Merck) og HCl (3,7 %, hydrochloric acid fuming, 37 %, Merck) i mengder angitt i tabell 5.

Tabell 5: Tilsetning av Fe(III) løsnings og 3,7 % HCl til standardkurve ved peroksidtall

Rør nr.	Volum Fe(III)-løsning [ $\mu\text{l}$ ]	Volum 3,7 % HCl [ $\mu\text{l}$ ]	Mengde Fe(III) [ $\mu\text{g}$ ]
1	0	200	0
2	50	150	5
3	100	100	10
4	150	50	15
5	200	0	20

Det ble så tilsatt 200  $\mu\text{l}$  ammoniumthiocyanat (30 % vandig løsning, Honeywell) i ett og ett rør. Hvert rør ble ristet i 15 sekunder med vortex mixer. Rørene sto i ro i 2 minutter og 45 sekunder før de ble målt spektrofotometrisk ved 500 nm (Shimadzu UV-1800). Tiden var viktig, slik at det ble brukt stoppeklokker.

Til selve prøvene ble det til hvert sitt kimax rør tilsatt 10,0 ml EtOH, 200 µl oljeprøve løst i isooktan og 200 µl Fe(II)klorid tetrahydrat (i 3,7 % HCl, 20 mM, Merck). Deretter ble det tilsatt 200 µl ammoniumthiocyanat i ett og ett rør. Samme tidsintervall og fremgangsmåte ble brukt som for standardkurven. Det ble tillaget tre blindprøver hvor det ble tilsatt isooktan uten oljeprøve. Det ble laget tre paralleller av alle prøver.

#### 3.7.4 ATP-nedbrytningsprodukter

For hver uttaksdag ble det analysert for nedbrytningsprodukter fra ATP og innhold av laktat. Prøveopparbeidelsen ble utført samtidig og på samme måte for begge analysene.

Fryst prøvemateriale (-80 °C) ble raspet opp på en kjøkkenrasp. Ca. 0,6 g ble overført til sentrifugerør av plast. Det ble så tilsatt 5,0 ml perklorsyre (HClO<sub>4</sub>, 0,42 M, VWR Chemicals, UN1873) før prøven ble homogenisert med Ultra turrax (T25 basic, IKA-Werke, 13000 rpm) i 2 minutter. Deretter ble det tilsatt 1,0 ml kaliumhydroksid (KOH, 1,0 M, Merck, cas: 1310-58-3) før prøvene ble sentrifugert (Kubota 1700, 12000 rpm, 4 °C) i 10 minutter. Supernatanten ble tatt ut og filtrert gjennom sprøytefilter (Chromacol 30 mm, nylon, 0,45 µm). Den filtrerte supernatanten ble fryst inn på -80 °C til videre bruk.

Til HPLC analyse av ATP-nedbrytningsprodukter ble det overført 1,0 ml av supernatanten til HPLC rør. HPLC systemet som ble benyttet var en Agilent 1290 koblet til en infinity Diode Array Detektor (Agilent Technologies) med en Poroshell 120 kolonne (EC-C18 3,0 x 100 mm, porestørrelse 2,7 µm pluss Poroshell 120, 3,0 x 5 mm forkolonne, Agilent Technologies). Dikaliumfosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,215 M) og tetrabutylamoniumhydrogensulfatbuffer (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N, 0,0023 M i 3,5 % vandig Acetonitrill, pH justert til 6,25 med 1,0 M KOH) ble benyttet som mobilfase. En flow på 0,2 ml/min fra 0-2 minutter, 0,8 ml/min fra 2-9 minutter og tilbake til 0,2 ml/min fra 9-10 min ble benyttet. Kolonnen holdt en temperatur på 20 °C. Nedbrytningsproduktene ble detektert ved 210 nm (ATP og ADP) og 260 nm (AMP, IMP, In og Hx).

For å finne nedbrytningsproduktenes retensjonstid og til kvantifisering ble det benyttet kommersielle standarder (se vedlegg 3). ATP (adenosine-5'-triphosphate disodium salt trihydrate, Roche diagnostics, cas: 51963-61-2), ADP (adenosine-5'-diphosphate sodium salt, Sigma-Aldrich, cas: 20398-34-9), AMP (adenosine-5'-monophosphate sodium salt, Sigma-Aldrich, cas: 149022-20-8), kreatin (creatine anhydrous, Fluka Biochemica, ec.no: 2003066),

kreatinin (creatinine standard solution 0,03 mg/ml, Sigma-Aldrich, C3488), IMP (inosine-5'-monophosphate disodium salt hydrate, Sigma-Aldrich, cas: 352195-40-5), In (inosine, Sigma-Aldrich cas: 58-63-9), Hx (hypoxathin, Sigma-Aldrich, cas: 68-94-0). Resultatene ble uttrykt som  $\mu\text{mol/g}$  prøve og ble beregnet i Excel.

### 3.7.5 Laktat

Til HPLC analyse av laktatinnhold i prøvene ble det benyttet samme supernatant som for analysen for ATP-metabolitter. HPLC systemet som ble brukt var en Agilent 1260 koblet til en Infinity Diode Array Detektor (Agilent Technologies) med en Hi-Plex It kolonne (300 x 7,7 mm pluss Hi-Plex guard cartridges 5 x 3 mm forkolonne, Agilent Technologies). Svovelsyre ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,05 M) ble benyttet som mobilfase med en flow på 0,4 ml/min. Kolonnen holdt en temperatur på 45 °C. Laktat ble detektert på 210 nm. Kommersiell standard (L-(+)-Lactic acid, analytical standard, Sigma-Aldrich, cas: 79-33-4) ble brukt til å finne retensjonstid og til kvantifisering (se vedlegg 4). Resultatene ble uttrykt som mg/100 g og ble beregnet direkte i HPLC programvaren.

### 3.7.6 pH

Ved hver uttaksdag ble pH i prøven målt ved hjelp av en muskelelektrode (Testo 206, pH-meter). Det utført 3 målinger på ulike punkt for alle prøver.

### 3.7.7 Gassammensetning i headspace

Ved hver uttaksdag ble gassammensetningen (%) i headspace målt (PBI Dansensor, Checkmate 9900). Det ble målt gass i 3 prøver for hvert uttak. Det ble benyttet et gummiseptum (Nordic supply) for å forhindre luft fra omgivelsene å komme inn i prøven ved måletidspunktet.

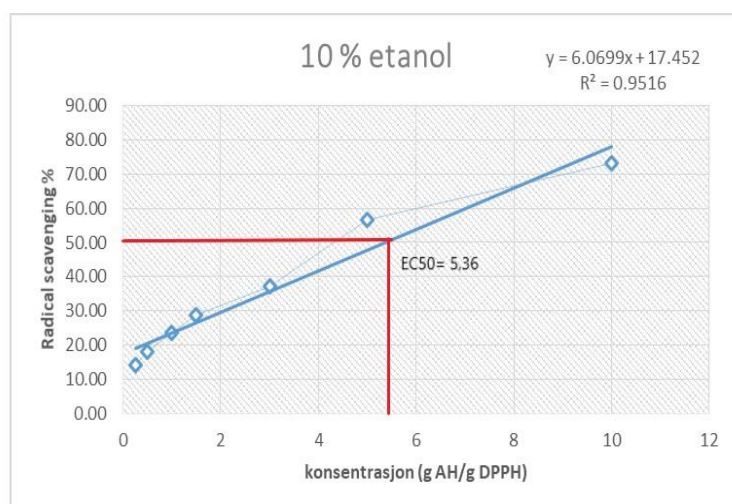
## 3.8 Statistiske analyser

Til statistiske analyser av resultatene ble det benyttet SPSS (IBM SPSS Statistics). Resultatene ble analysert med univariat ANOVA, generell lineær modell (GLM), og med post hoc analysen duncan. For korrelasjonsanalyser ble det benyttet bivariat, Pearson, two-tailed correlation der en korrelasjon på  $< \pm 0,4$  regnes som en liten korrelasjon,  $\pm 0,4-0,7$  regnes som middels sterk korrelasjon og  $> \pm 0,7$  regnes som en sterk korrelasjon. Alle resultater er uttrykt som et gjennomsnitt av tre paralleller (4 paralleller for mikrobiologi)  $\pm$  standardavvik.

## 4. Resultater

### 4.1 Antioksidativ kapasitet

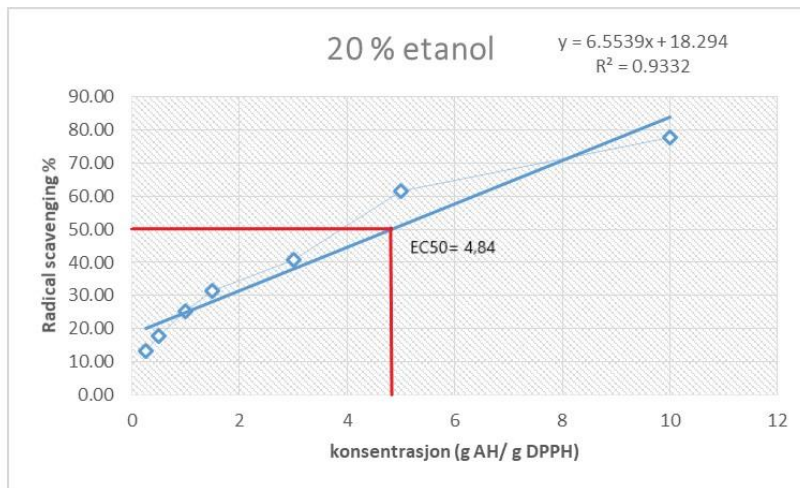
For å bestemme antioksidativ kapasitet ble det benyttet DPPH assay. Det ble gjort DPPH assay på butarekstraktene med 10, 20, 30, 40 og 50 % EtOH. Det ble observert signifikante forskjeller i EC<sub>50</sub>-verdien mellom de ulike konsentrasjonene av EtOH i løsemidlet ( $P < 0,001$ ). Figur 8 viser at butarekstraktene med 10 % EtOH hadde EC<sub>50</sub> ved  $5,36 \pm 0,09$  g AH/g DPPH. Ekstraktet med 10 % EtOH har signifikant høyere EC<sub>50</sub>-verdi enn alle andre konsentrasjoner av EtOH ( $P < 0,05$ ) **(a)**. Signifikante forskjeller mellom de ulike EtOH konsentrasjonene er markert med bokstavene **a-b** i enden av hvert avsnitt i dette kapitlet.



Figur 8: EC<sub>50</sub> i butarekstraktene ved bruk av 10 % EtOH i løsemiddelet

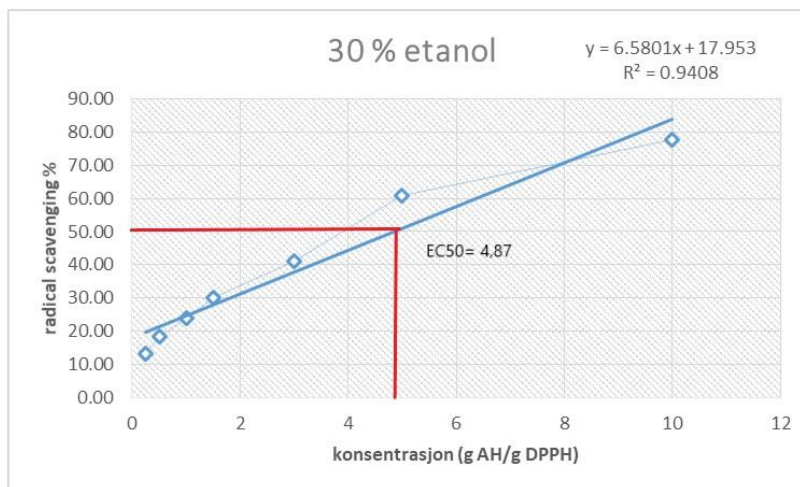
Figur 9 viser at butarekstraktene med 20 % EtOH hadde en EC<sub>50</sub> på  $4,84 \pm 0,09$  g AH/g DPPH. Ekstraktet med 20 % EtOH har signifikant høyere EC<sub>50</sub>-verdi enn ekstraktene med 50 % EtOH ( $P < 0,05$ ) og signifikant lavere EC<sub>50</sub> enn i ekstraktet med 10 % EtOH ( $P < 0,05$ ) **(b)**.





Figur 9: EC50 i butareekstraktene ved bruk av 20 % EtOH i løsemiddelet

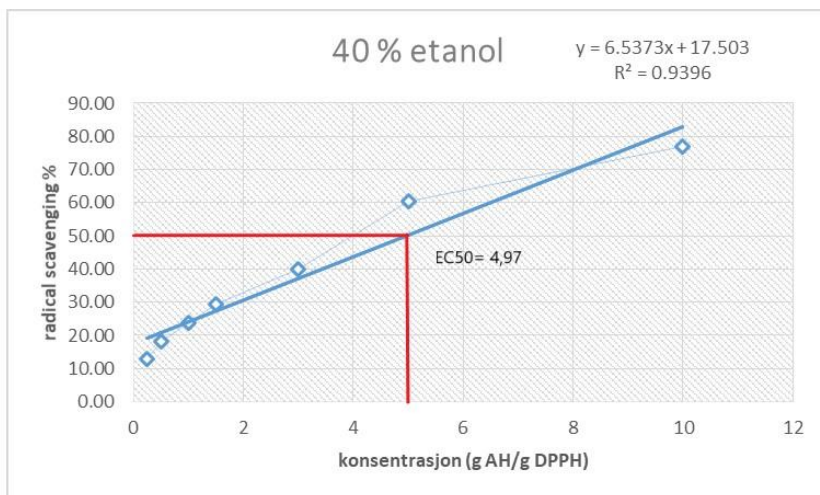
Som vist i figur 10 var det i butareekstraktene med 30 % EtOH en EC50 på  $4,87 \pm 0,07$  g AH/g DPPH. Ekstraktet med 30 % EtOH har signifikant høyere EC50-verdi enn i ekstraktene med 50 % EtOH ( $P < 0,05$ ) og signifikant lavere EC50 enn i ekstraktene med 10 % EtOH ( $P < 0,05$ ) (b).



Figur 10: EC50 i butareekstraktene ved bruk av 30 % EtOH i løsemiddelet

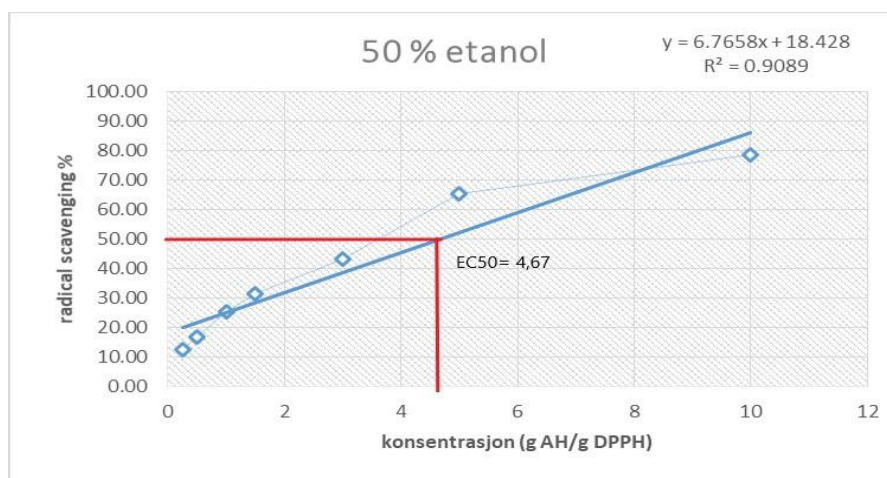
Figur 11 viser at i butareekstraktene med 40 % EtOH var det en EC50 på  $4,97 \pm 0,10$  g AH/g DPPH. Ekstraktene med 40 % EtOH har signifikant høyere EC50-verdi enn i ekstraktene med 50 % EtOH ( $P < 0,05$ ) og signifikant lavere EC50 enn i ekstraktene med 10 % EtOH ( $P < 0,05$ ) (b).





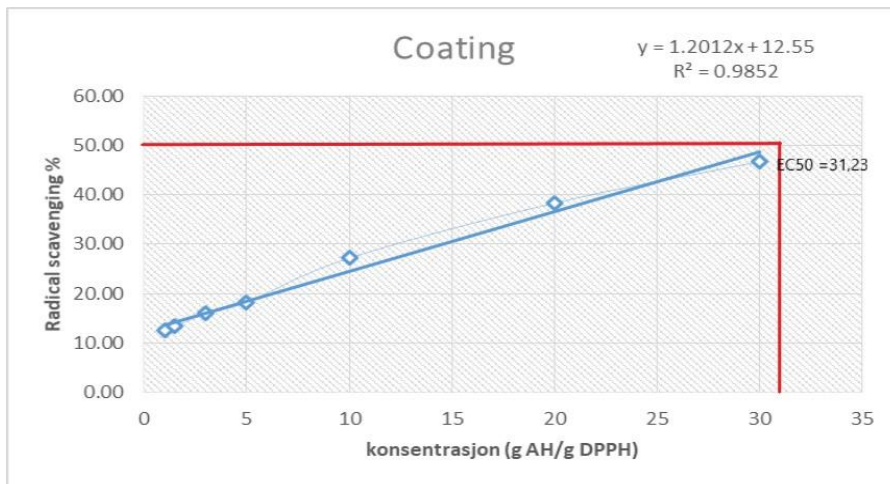
Figur 11: EC50 i butarekstraktene ved bruk av 40 % EtOH i løsemiddelet.

Som vist i figur 12 var det i butarekstraktene med 50 % EtOH en EC50 på  $4,67 \pm 0,06$  g AH/g DPPH. Ekstraktene med 50 % EtOH har signifikant lavere EC50-verdi enn alle andre konsentrasjoner av EtOH ( $P < 0,05$ ) (c).



Figur 12: EC50 i butarekstraktene ved bruk av 50 % EtOH i løsemiddelet

Det ble også gjort en DPPH assay på coatingen som ble brukt til lagringsforsøket. Figur 13 viser at coatingen hadde en EC50 på  $31,23 \pm 1,50$  g AH/g DPPH. EC50 verdien til coatingen er teoretisk beregnet ut i fra den lineære trendlinjen da konsentrasjonene som ble valgt ikke var tilstrekkelig til å nå en radical scavinging % på over 50 %.



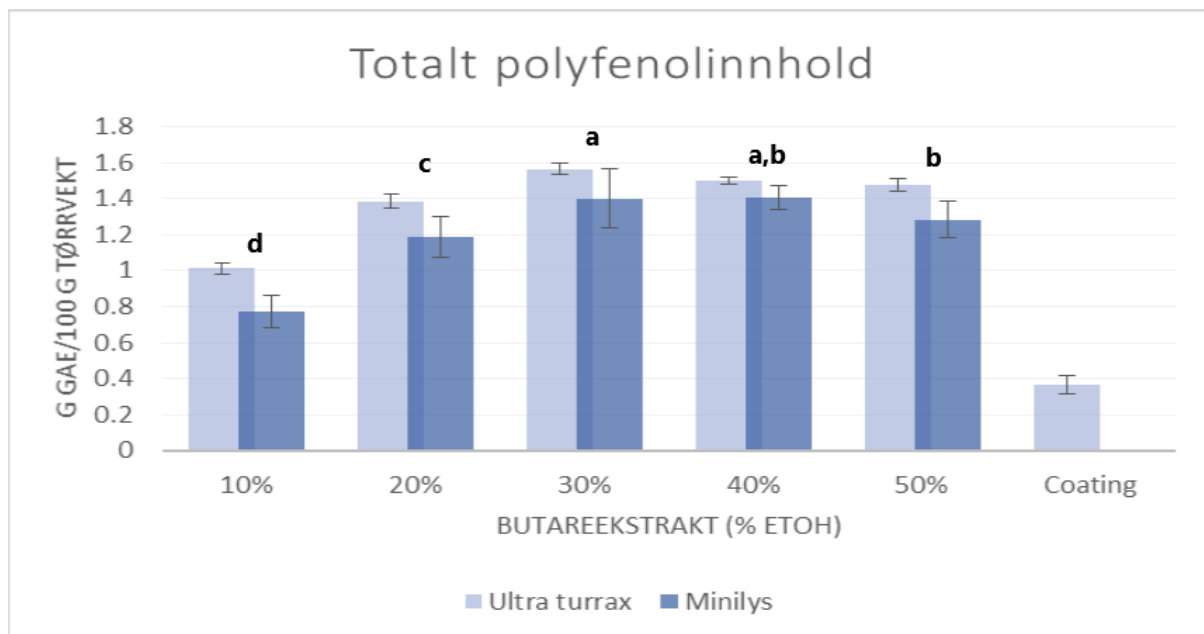
Figur 13: Teoretisk beregnet EC50 i coatingen som ble brukt til lagringsforsøket

## 4.2 Totalt polyfenolinnhold

For å bestemme totalt polyfenolinnhold i butarekstraktene med 10, 20, 30, 40 og 50 % EtOH og med homogenisering (Ultra turrax) og risting (Minilys) som forskjellige grupper ble det benyttet Folin-Ciocalteu metoden. Det ble observert signifikante forskjeller i innholdet av polyfenoliske komponenter ( $P < 0,001$ ). De signifikante forskjellene er knyttet til både ekstraksjonsmetode ( $P < 0,001$ ) og EtOH konsentrasjon i løsemiddelet ( $P < 0,001$ ).

Figur 14 viser at butarekstraktene med 30 % EtOH ga størst utbytte av polyfenoler med  $1,57 \pm 0,03$  g GAE/100 g tørrvekt og  $1,40 \pm$  g GAE/100 g tørrvekt ekstrahert med henholdsvis Ultra turrax og Minilys. Butarekstraktet med 10 % EtOH ga lavest utbytte av polyfenoler med  $1,01 \pm 0,03$  g GAE/100 g tørrvekt og  $0,77 \pm 0,09$  g GAE/100 g tørrvekt ekstrahert med henholdsvis Ultra turrax og Minilys. Ekstraksjon med Ultra turrax ga noe bedre utbytte av polyfenoler enn ekstraksjon med Minilys ved alle konsentrasjoner av EtOH ( $P < 0,001$ ).

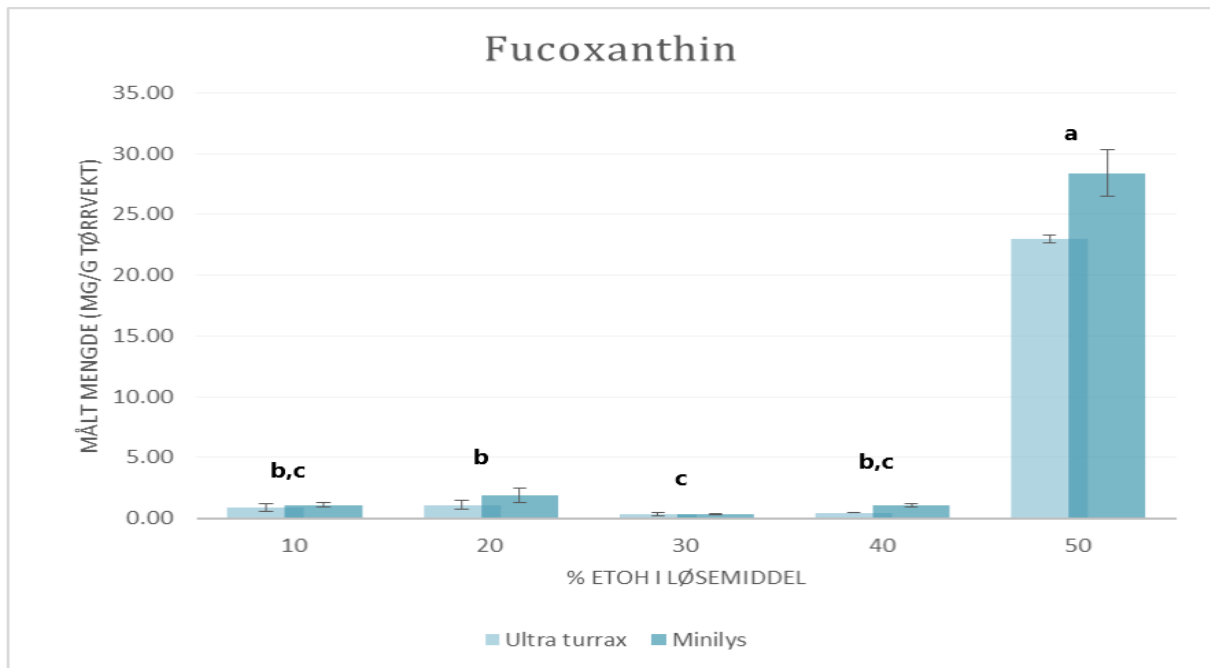
Coatingen som ble brukt til lagringsforsøket hadde et totalt polyfenolinnhold på  $0,40 \pm 0,05$  g GAE/100 g tørrvekt.



Figur 14: Resultater fra analyser på totalt polyfenolinnhold i ekstrakter av butare. Signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom EtOH konsentrasjoner er vist med bokstavene a-d. Feilfelt markerer standardavvik

#### 4.1 Fucoxanthin

Det ble analysert for innhold av karotenoidet fucoxanthin i butarekstraktene med 10, 20, 30, 40 og 50 % EtOH i løsemiddelet og med homogenisering (Ultra turrax) og risting (Minilys) som to ulike metoder for ekstraksjon. Det ble observert signifikante forskjeller i innholdet av fucoxanthin ( $P < 0,001$ ). De signifikante forskjellene er knyttet til både ekstraksjonsmetode ( $P < 0,001$ ) og EtOH konsentrasjon i løsemiddelet ( $P < 0,001$ ). Figur 15 viser at butarekstraktene med 50 % EtOH ga størst utbytte av fucoxanthin med  $22,97 \pm 0,35$  mg/g og  $28,41 \pm 1,91$  mg/g for henholdsvis Ultra turrax og Minilys. Lavest utbytte av fucoxanthin ga butarekstraktene med 30 % EtOH med  $0,32 \pm 0,10$  mg/g og  $0,33 \pm 0,01$  mg/g for henholdsvis Ultra turrax og Minilys. Resultatene viser av butarekstraktene ekstrahert med Minilys har noe høyere utbytte av fucoxanthin enn butarekstraktene ekstrahert med Ultra turrax ( $P < 0,001$ ).

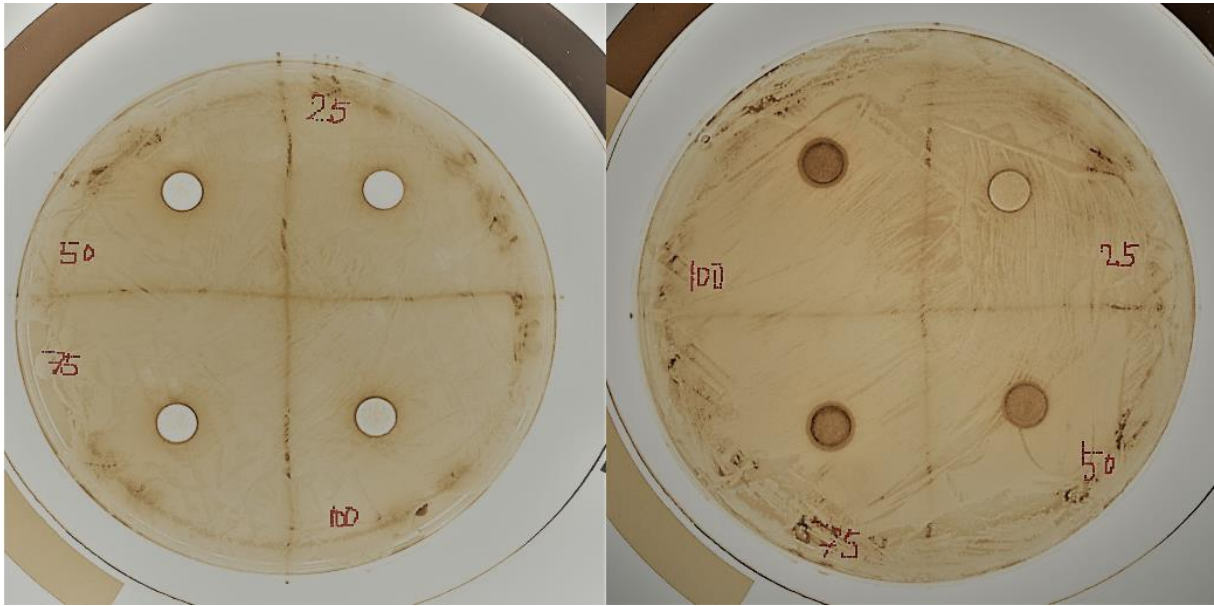


Figur 15: Målt mengde av fucoxanthin i butareekstrakt med 10-50 % EtOH i løsemiddelet. Signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom EtOH konsentrasjoner er vist med bokstavene a-c. Feilfelt markerer standardavvik

#### 4.4 Antimikrobiell effekt

For å undersøke butareekstraktene for antimikrobiell effekt ble det benyttet agar disc-diffusion metoden. Av 10 bakteriestammer var det antydning til antimikrobiell effekt på 4 av dem. Effekten virker å øke med økt mengde tilsatt butareekstrakt.

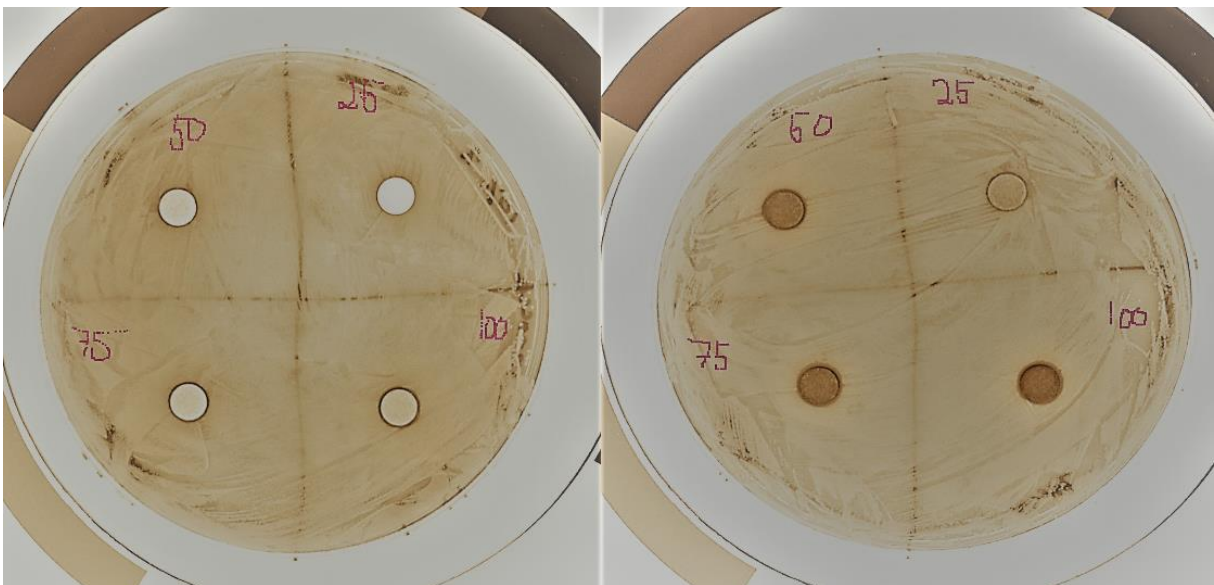
Bilde 2 viser at det tyder på at butareekstraktene hadde antimikrobiell virkning mot *Aeromonas salmonicida* med økning i effekt med økt mengde ekstrakt tilsatt (25-100  $\mu$ l). Det virker også til å være en forskjell i effekt av butareekstraktene med 10 % EtOH og 50 % EtOH.



Bilde 2: Antimikrobiell effekt av butarekstrakt med 10 % EtOH (til venstre) og 50 % EtOH (til høyre) på *Aeromonas salmonicida*

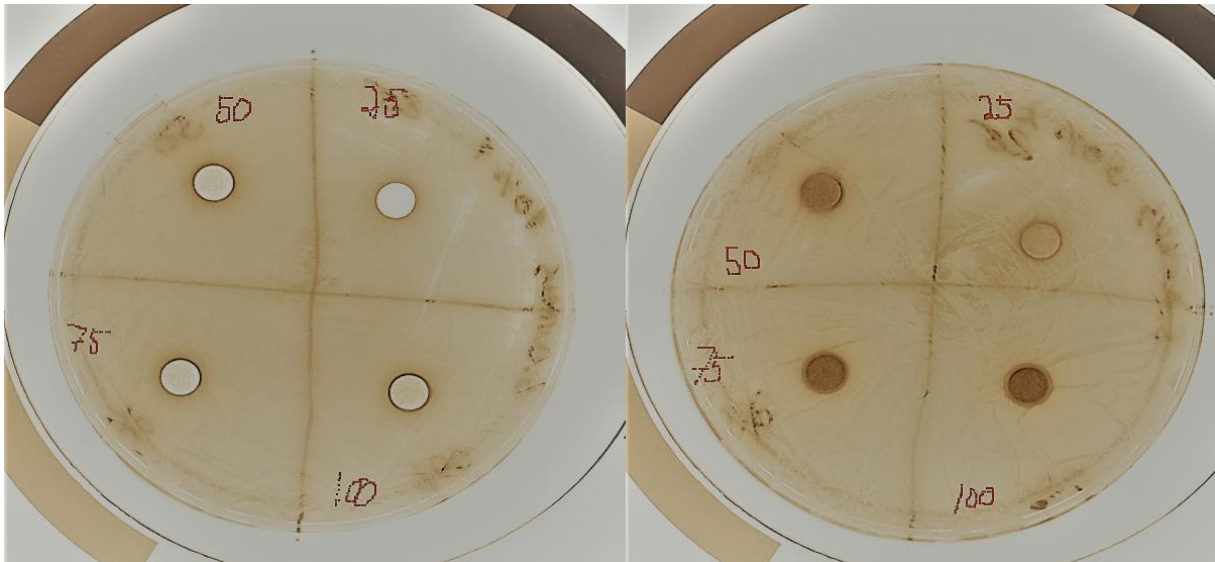
Som bilde 3 viser tyder det på at butarekstraktene hadde antimikrobiologisk effekt mot *Listeria innocua*, men dog noe mindre effekt enn mot *A. salmonicida* (bilde 2).

Hemmingssonene vokser med økt mengde tilsatt ekstrakt. Det virker også til å være en forskjell i effekt av butarekstraktene med 10 % EtOH og 50 % EtOH.



Bilde 3: Antimikrobiell effekt av butarekstrakt med 10 % EtOH (til venstre) og 50 % EtOH (til høyre) på *Listeria innocua*

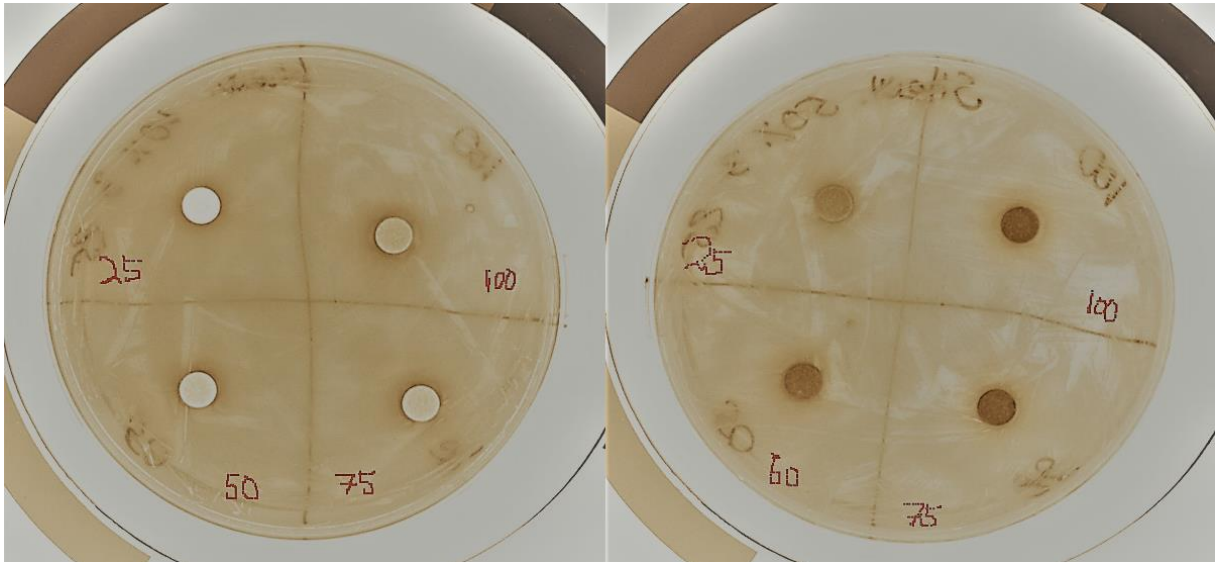
Det var også antydning til antimikrobiell effekt mot *Staphylococcus aureus*. Bilde 4 viser hemmingssoner rundt filterlappene med økning i effekt med økt mengde ekstrakt tilsatt. Det virker også til å være en forskjell av effekt av butarekstraktene med 10 % EtOH og 50 % EtOH.



Bilde 4: Antimikrobiell effekt av butarekstrakt på 10 % EtOH (til venstre) og 50 % EtOH (til høyre) på *Staphylococcus aureus*

Bilde 5 viser antimikrobiell effekt av butarekstraktene på *Shewanella putrefaciens*. Hemmingssonene er vanskelig å se på bildet, men de øker i takt med økt tilsatt mengde butarekstrakt. Det virker også til å være en forskjell av effekt av butarekstraktene med 10 % EtOH og 50 % EtOH.





Bilde 5: Antimikrobiell effekt av butarekstrakt med 10 % EtOH (til venstre) og 50 % EtOH (til høyre) på *Shewanella putrefaciens*

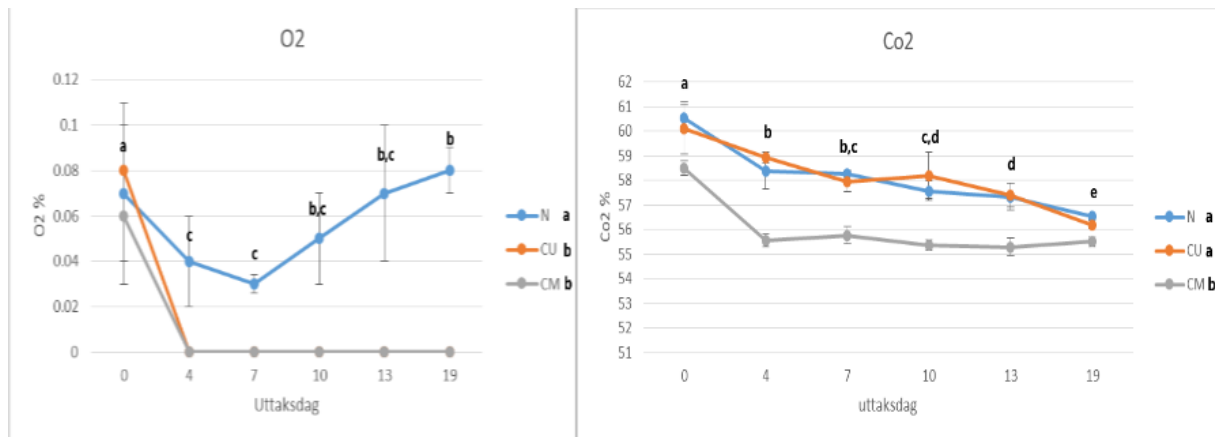
Resultatene fra den antimikrobielle testen viste ingen tegn til effekt av butarekstraktene på *Pseudomonas fluorescens*, *Brochotrix thermosphacta*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas spp.*, *Photobacterium phosphoreum* og *Escherichia coli*.

## 4.5 Lagringsforsøk

### 4.5.1 Gassammensetning i headspace

Under lagringsforsøket over 19 dager skulle det ved hver uttaksdag måles gassammensetning i headspace. Det ble observert signifikante forskjeller i CO<sub>2</sub>- og O<sub>2</sub> konsentrasjonene ( $P < 0,001$ ). De signifikante forskjellene var knyttet til både de ulike uttaksdagene ( $P < 0,001$ ) og de ulike gruppene ( $P < 0,001$ ). Figur 16 viser at naturell (N) prøvene hadde en CO<sub>2</sub>-konsentrasjon som gikk fra  $60,53 \pm 0,55$  % på uttaksdag 0 til  $56,53 \pm 0,12$  % på uttaksdag 19. O<sub>2</sub>-konsentrasjonen i N-prøvene varierte fra  $0,07 \pm 0,04$  % på uttaksdag 0,  $0,03 \pm 0,004$  % på uttaksdag 7 til  $0,08 \pm 0,01$  % på uttaksdag 19. Prøvene med coating uten butarekstrakt (CU) hadde gjennom lagringsforløpet en CO<sub>2</sub>-konsentrasjon på  $60,1 \pm 1,07$  % på uttaksdag 0 og  $56,2 \pm 0,20$  % på uttaksdag 19. CU-prøvene hadde en O<sub>2</sub>-konsentrasjon på  $0,08 \pm 0,02$  %. Konsentrasjonen av O<sub>2</sub> var på 0 % resten av lagringsforløpet. For prøvene med coating med butarekstrakt (CM) var CO<sub>2</sub>-konsentrasjonen på  $58,5 \pm 0,3$  % ved uttaksdag 0 og  $55,5$  %

$\pm 0,20$  ved uttaksdag 19. CM-prøvene hadde en O<sub>2</sub>-konsentrasjon på  $0,06 \pm 0,02$  % og 0 % ved resten av lagringsforløpet.

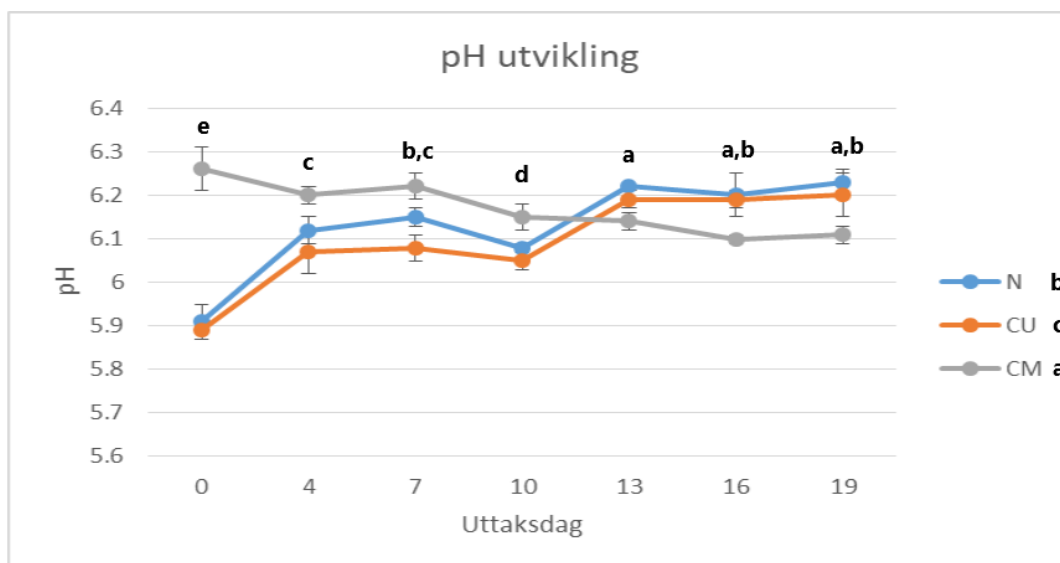


Figur 16: Oversikt over gassammensetningen i «head space» i O<sub>2</sub> og CO<sub>2</sub> under lagringsperioden. Feilfelt markerer standardavvik

#### 4.5.2 pH utvikling

Under lagringsperioden skulle pH måles i prøvene ved hver uttaksdag. Det ble observert signifikante forskjeller i pH utviklingen ( $P < 0,001$ ). De signifikante forskjellene var knyttet til både de ulike uttaksdagene ( $P < 0,001$ ) og de ulike gruppene ( $P < 0,001$ ). Figur 17 viser at pH'en i CU- og CM-prøvene hadde lavere utgangs-pH enn N-prøvene. pH ved uttaksdag 0 i CM-prøvene var på  $6,26 \pm 0,05$ , mens den var på  $5,91 \pm 0,02$  og  $5,89 \pm 0,04$  i henholdsvis N- og CU-prøvene. Etter 10 dager var pH'en jevnere og var på  $6,08 \pm 0,01$ ,  $6,05 \pm 0,02$  og  $6,15 \pm 0,03$  i henholdsvis N-, CU- og CM-prøvene. Etter 19 dager var pH'en på  $6,22 \pm 0,03$ ,  $6,20 \pm 0,05$  og  $6,11 \pm 0,02$  i henholdsvis N-, CU- og CM-prøvene.





Figur 17: pH utvikling i prøvene under lagringsforsøket. Signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom uttaksdager er vist med bokstavene a-e. Signifikante forskjeller ( $P < 0,05$ ) mellom grupper er vist med bokstavene a-c til høyre i figuren. Feilfelt markerer standardavvik

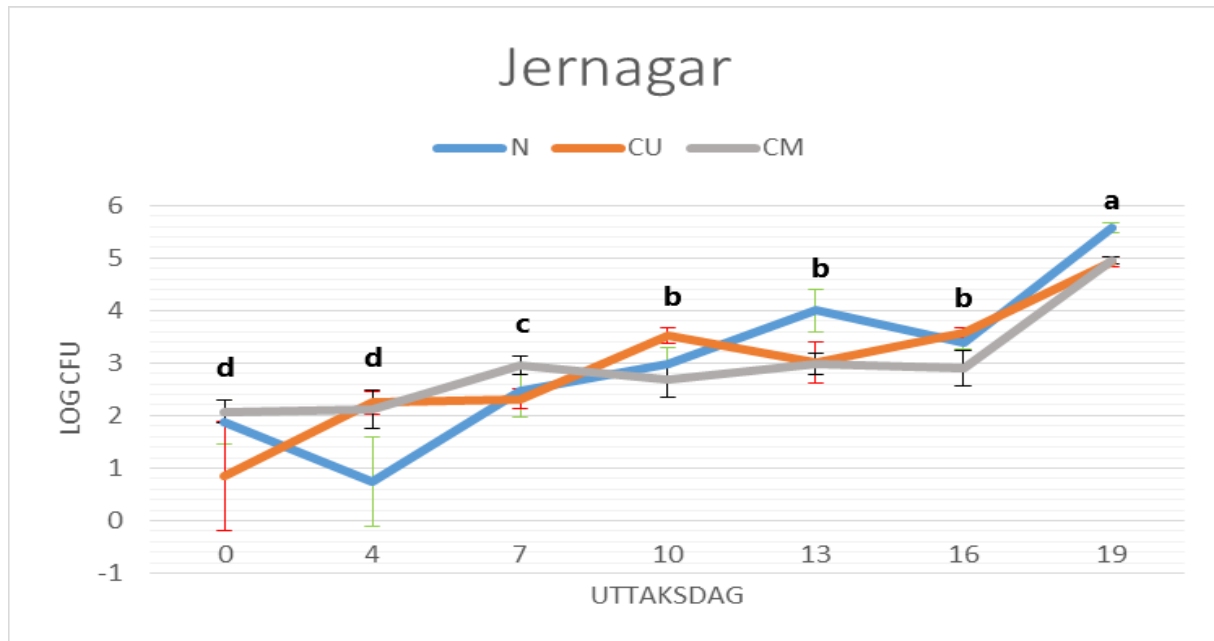
#### 4.5.3 Mikrobiologi

Under lagringsforsøket skulle det analyseres for bakterievekst. Jernagar (aerobt, mesofilt kimtall), MRS agar (LAB) og STAA agar (*Brochotrix thermosphacta*) ble benyttet som medier.

Det ble funnet signifikante forskjeller i vekst på jernagar ( $P < 0,001$ ). De observerte forskjellene er knyttet til faktoren uttaksdag der det er en signifikant økning i vekst fra dag 0 til dag 19 ( $P < 0,001$ ). Det ble derimot ikke funnet signifikant forskjell mellom de ulike gruppene ( $P > 0,743$ ).

Figur 18 viser at N-prøvene hadde en vekst på  $\log 1,88 \pm 0,41$  cfu/g på dag 0 og  $\log 5,57 \pm 0,09$  cfu/g på dag 19. CU-prøvene hadde en vekst på  $\log 0,85 \pm 1,04$  cfu/g på dag 0 og  $\log$

4,93 ± 0,10 cfu/g på dag 19. CM-prøvene viste en vekst på log 2,07 ± 0,21 cfu/g på dag 0 og log 4,96

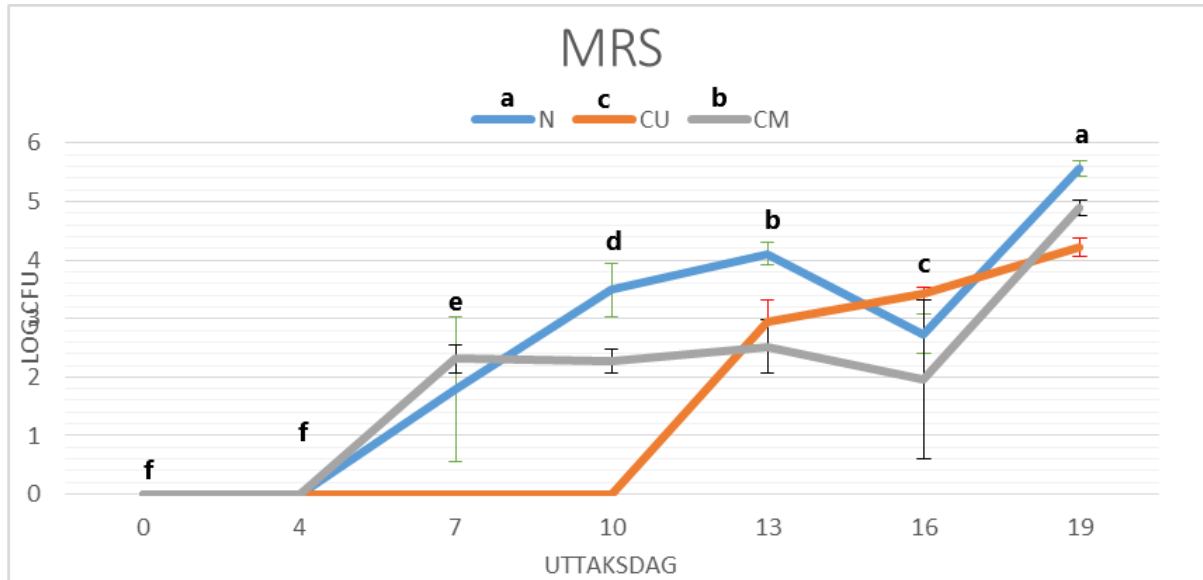


Figur 18: Utvikling av kolonitall på jernagar under lagringsperioden. Signifikante forskjeller ( $P < 0,05$ ) mellom de ulike uttaksdagene er vist med bokstavene a-d. Feilfelt markerer standardavvik

På MRS agar ble det observert signifikante forskjeller ( $P < 0,001$ ). Forskjellene er knyttet til de ulike uttaksdagene ( $P < 0,001$ ) og mellom de ulike gruppene ( $P < 0,001$ ).

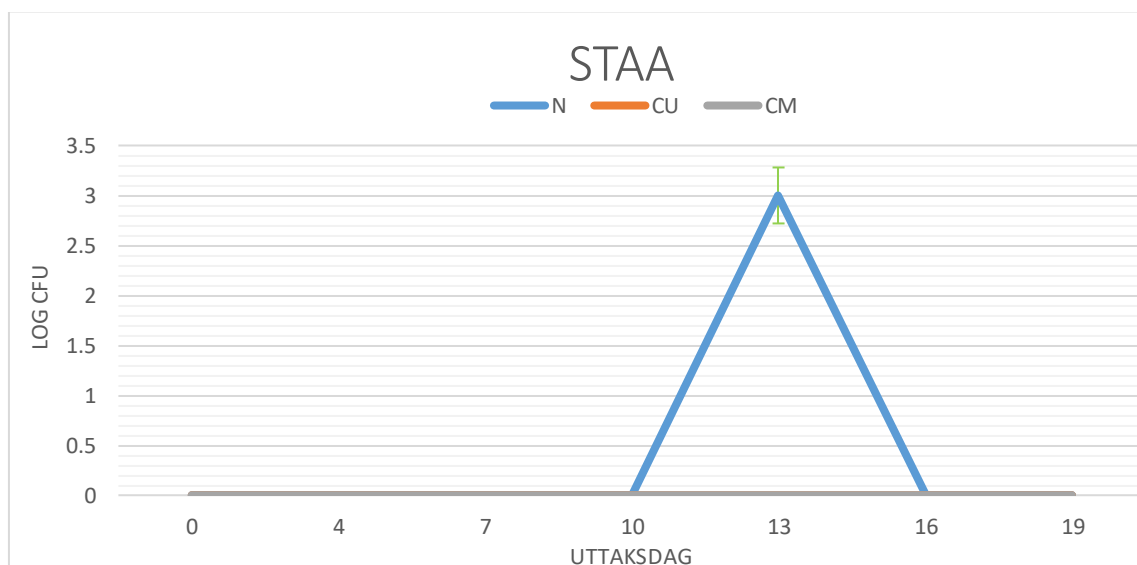
Figur 19 viser at N-prøvene ikke hadde vekst på dag 0 og 4. Resultatene viste en vekst på log 1,79 ± 1,23 cfu/g på dag 7 og log 5,57 ± 0,13 cfu/g på dag 19. CU-prøvene hadde ingen vekst på dag 0, 4, 7 og 10. Resultatene viser en vekst på log 2,94 ± 0,39 cfu/g på dag 13 og log 4,89

± 0,16 cfu/g på dag 19. CM-prøvene hadde ingen vekst på dag 0 og 4. Resultatene viser en vekst på log 2,31 ± 0,23 cfu/g på dag 7 og log 4,89 ± 0,13 cfu/g på dag 19.



Figur 19: Utvikling av kolonitall på MRS agar under lagringsperioden. Signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom uttaksdager er vist med bokstavene a-f. Signifikante forskjeller ( $P < 0,05$ ) mellom grupper er vist med bokstavene a-c øverst i figuren. Feilfelt markerer standardavvik

Resultatene fra kolonitellingen på STAA agar i figur 20 viser at det kun var vekst på N-prøvene ved uttaksdag 13. Antallet var log 3,0 ± 0,28 cfu/g. Det ble ikke påvist vekst av *B. thermosphacta* i CU- og CM-prøvene.



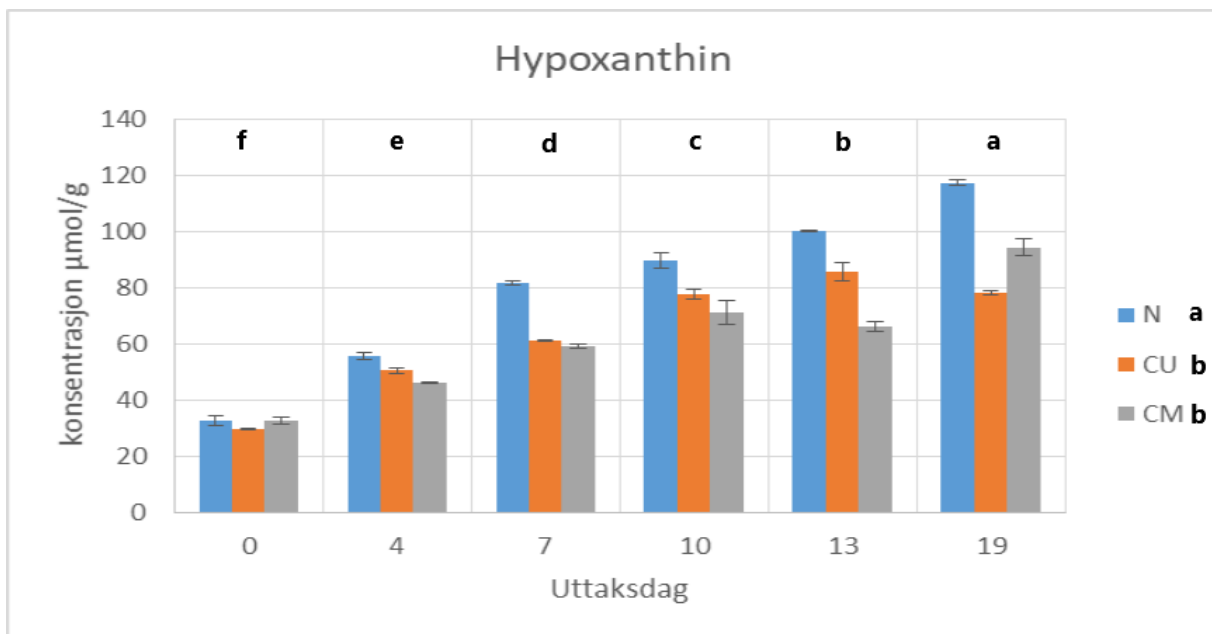
Figur 20: Utvikling av kolonitall på STAA agar under lagringsperioden. Feilfelt markerer standardavvik

#### 4.5.4 ATP-nedbrytningsprodukter

Som en indikator på kvalitet og holdbarhet under lagringsforsøket ble prøvene analysert for innhold av ATP-nedbrytningsprodukter. Konsentrasjonen av hypoxanthin (Hx) og inosin (In) samt K-verdi blir her brukt som resultat.

Det ble funnet signifikante forskjeller i konsentrasjonen av Hx. Forskjellene er knyttet til både uttaksdag ( $P < 0,001$ ) og mellom de ulike gruppene ( $P < 0,001$ )

Figur 21 viser at N-prøvene hadde en Hx-konsentrasjon på  $32,6 \pm 1,58 \mu\text{mol/g}$  på dag 0 og  $117,26 \pm 0,91 \mu\text{mol/g}$  på dag 19. CU-prøvene hadde en Hx-konsentrasjon på  $29,62 \pm 0,46 \mu\text{mol/g}$  på dag 0 og  $78,24 \pm 0,79 \mu\text{mol/g}$  på dag 19. CM-prøvene hadde en Hx-konsentrasjon på  $32,64 \pm 1,05 \mu\text{mol/g}$  på dag 0 og  $94,26 \pm 2,97 \mu\text{mol/g}$  på dag 19.

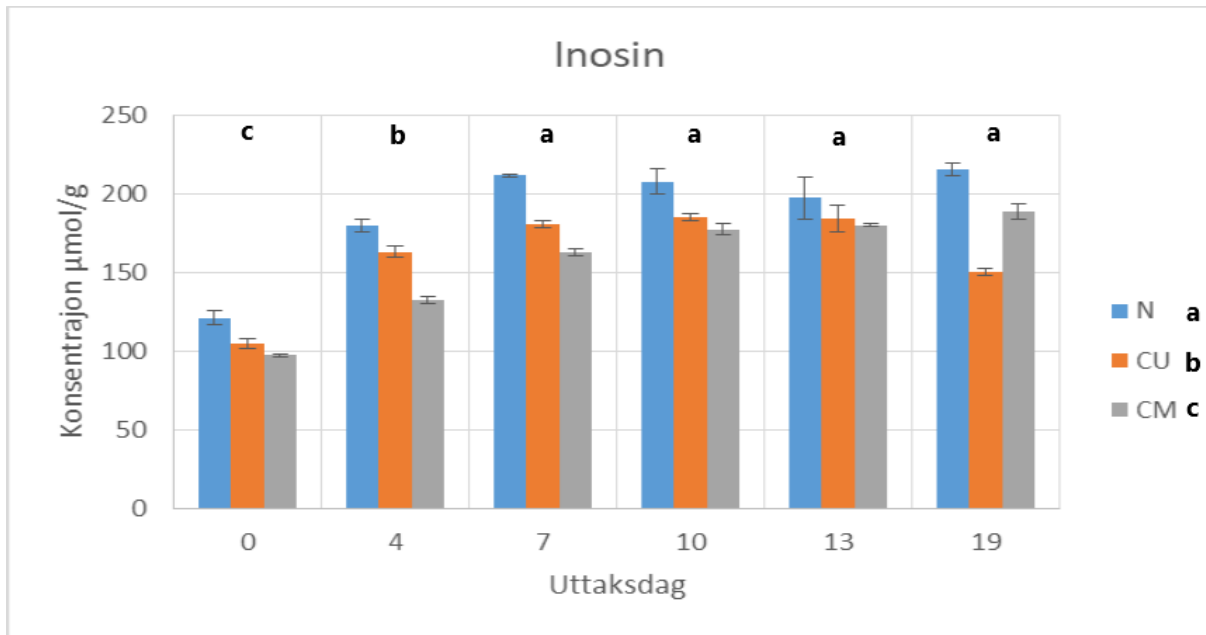


Figur 21: Målt mengde hypoxanthin i prøvene under lagringsforsøket. Signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom uttaksdager er vist med bokstavene a-f. Signifikante forskjeller ( $P < 0,05$ ) mellom grupper er vist med bokstavene a-b til høyre i figuren. Feilfelt markerer standardavvik

Det ble funnet signifikante forskjeller i konsentrasjonen av In ( $P < 0,001$ ). Forskjellene er knyttet til både uttaksdag ( $P < 0,001$ ) og mellom de ulike gruppene ( $P < 0,001$ ).

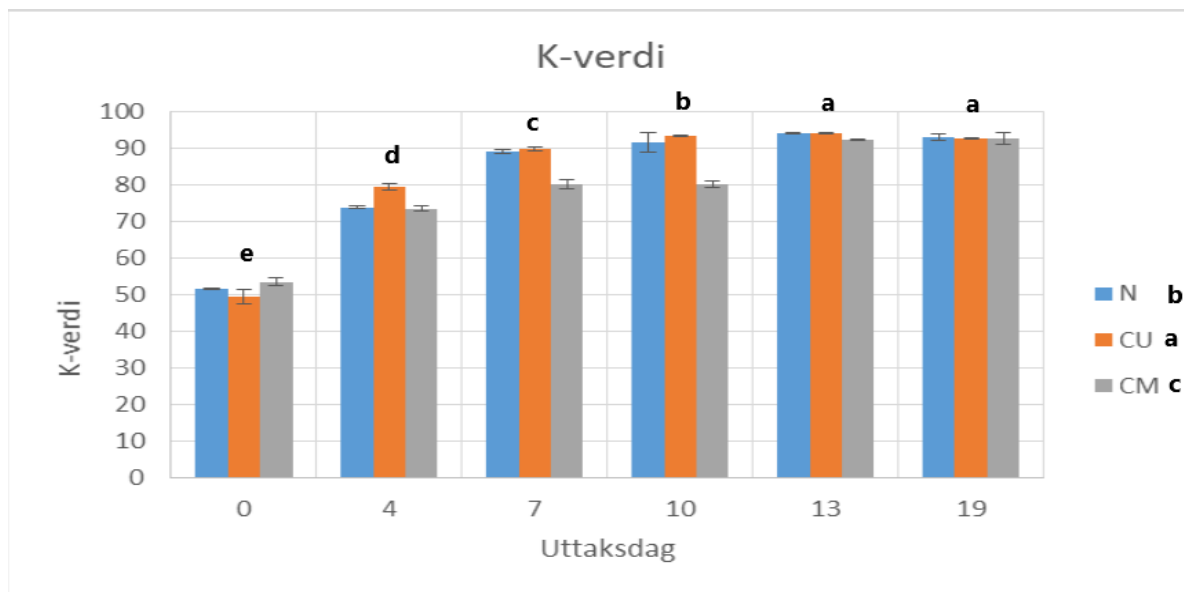
Figur 22 viser konsentrasjonen av inosin (In) i løpet av lagringsforsøket. N-prøvene hadde en In-konsentrasjon på  $121,12 \pm 4,42 \mu\text{mol/g}$  på dag 0 og  $215,52 \pm 4,05$  på dag 19. CU-prøvene hadde en konsentrasjon av In på  $104,30 \pm 3,08 \mu\text{mol/g}$  på dag 0 og  $150,37 \pm 2,36$  på dag 19.

CM-prøvene hadde en konsentrasjon av In på  $97,27 \pm 1,07 \mu\text{mol/g}$  på dag 0 og  $188,32 \pm 5,10$  på dag 19.



Figur 22: Målt mengde inosin i prøvene under lagringsforsøket. Signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom uttaksdager er vist med bokstavene a-c. Signifikante forskjeller ( $P < 0,05$ ) mellom grupper er vist med bokstavene a-c til høyre i figuren. Feilfelt markerer standardavvik

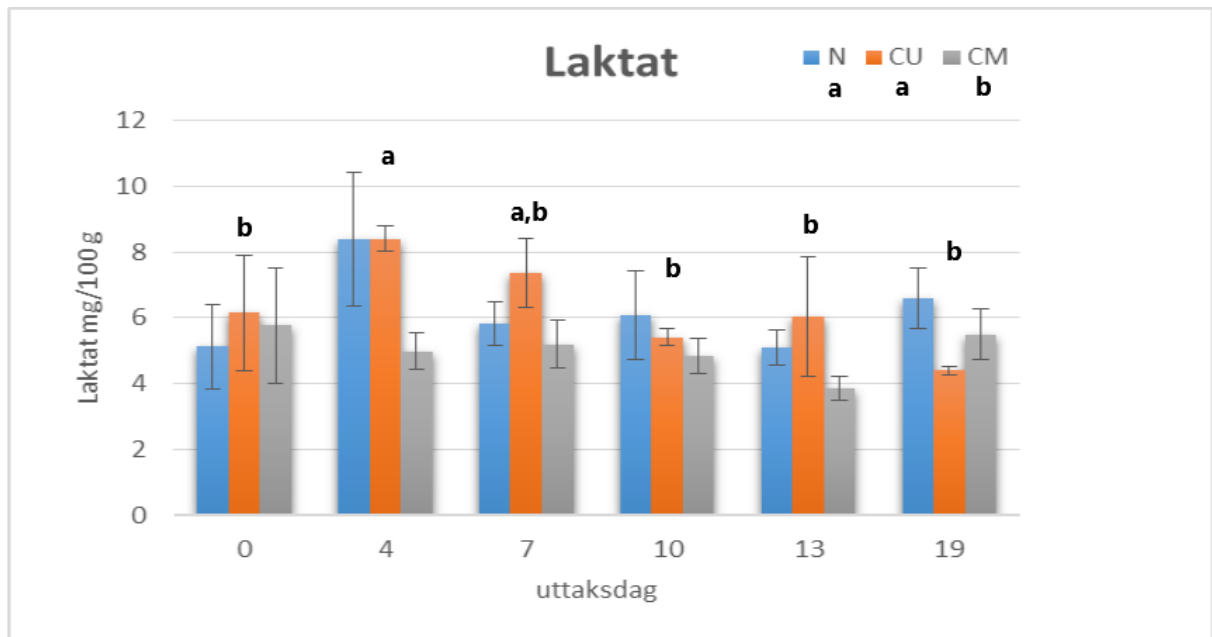
Det ble funnet signifikante forskjeller i K-verdien ( $P < 0,001$ ). Forskjellene ble funnet både mellom de ulike uttaksdagene ( $P < 0,001$ ) og mellom de ulike gruppene ( $P < 0,001$ ). Figur 23 viser utviklingen av K-verdien i løpet av lagringsforsøket. N-prøvene hadde en K-verdi på  $51,58 \pm 0,10$  på dag 0 og  $92,95 \pm 0,87$  på dag 19. CU-prøvene hadde en K-verdi på  $49,51 \pm 1,93$  på dag 0 og  $92,52 \pm 0,26$  på dag 19. CM-prøvene hadde en K-verdi på  $53,41 \pm 1,14$  på dag 0 og  $92,57 \pm 1,53$  på dag 19.



Figur 23: Målt K-verdi i prøvene under lagringsforsøket. Signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom uttaksdager er vist med bokstavene a-e. Signifikante forskjeller ( $P < 0,05$ ) mellom grupper er vist med bokstavene a-c til høyre i figuren. Feilfelt markerer standardavvik

#### 4.5.5 Laktat

Laktatinnholdet ble analysert i prøvene fra alle uttaksdager i lagringsforsøket. Det ble funnet signifikante forskjeller i laktatnivå ( $P < 0,001$ ). Forskjellene er knyttet til både uttaksdag ( $P < 0,01$ ) og mellom de ulike gruppene ( $P < 0,01$ ). Figur 24 viser at N-prøvene hadde et laktatinnhold på  $5,13 \pm 1,28$  mg/100 g på dag 0,  $8,40 \pm 2,03$  mg/100 g på dag 4 og  $6,61 \pm 0,92$  mg/100 g på dag 19. CU-prøvene hadde en laktatverdi på  $6,15 \pm 1,75$  mg/100 g på dag 0,  $8,41 \pm 0,39$  mg/100 g på dag 4 og  $4,39 \pm 0,13$  mg/100 g på dag 19. CM-prøvene hadde en laktatverdi på  $5,76 \pm 1,74$  mg/100 g på dag 0,  $4,98 \pm 0,55$  mg/100 g på dag 4 og  $5,50 \pm 0,79$  mg/100 g på dag 19.



Figur 24: Målt mengde laktat i prøvene under lagringsforsøket. Signifikante forskjeller ( $p < 0,05$ ) mellom uttaksdager er vist med bokstavene a-b. Signifikante forskjeller ( $P < 0,05$ ) mellom grupper er vist med bokstavene a-b øverst i figuren. Feilfelt markerer standardavvik

#### 4.5.6 Peroksidverdi

Det ble ikke detektert peroksider i noen av prøvene. Det er derfor ingen resultater å rapportere.

## 5. Vurdering

### 5.1 Antioksidativ kapasitet

Resultatene fra antioksidativ kapasitet (DPPH assay) viste at det var signifikant lavere EC50 i butarekstraktene med 50 % EtOH enn for resten av ekstraktene ( $P < 0,05$ ) og signifikant høyere EC50 i butarekstraktene med 10 % EtOH enn for alle andre konsentrasjoner av EtOH ( $P < 0,05$ ) (jo lavere EC50 jo bedre antioksidativ kapasitet). Selv om det er signifikante forskjeller i antioksidantkapasitet mellom ekstraktene er EC50 verdiene forholdsvis jevne ( $5,36 \pm 0,09$  g AH/g DPPH i 10 % EtOH til  $4,67 \pm 0,06$  g AH/g DPPH i 50 % EtOH (figur 8-12)). Resultatene kan trolig ses i sammenheng med totalt innhold av polyfenoler og innhold av fucoxanthin, der ekstraktene med 10 % EtOH i løsemidlet ga lavest utbytte av polyfenoler og lavt utbytte av fucoxanthin. Ekstraktene med 50 % ga høyest utbytte av fucoxanthin og blant de bedre i utbytte av polyfenoler. Pearson korrelasjon viste at det var signifikant korrelasjon mellom EtOH konsentrasjonene og målt antioksidantkapasitet ( $r = -0,735$ ,  $P < 0,01$ ). Det ble på grunn av tidspress kun analysert for antioksidativ kapasitet i ekstraktene ekstrahert med Ultra turrax.

Zhang et al. (2006) fant i sin artikkel ingen antioksidantkapasitet i metanoliske ekstrakter av butare. Butaren som ble brukt i forsøket ble høstet i Canada, men det blir ikke nevnt i artikkelen når butaren er høstet. Som tidligere nevnt har lokasjon og høstingstidpunkt betydning for innhold av bioaktive komponenter og følgelig også for antioksidativ kapasitet (Shiener et al., 2015). Forskjellen i egne funn og funnene til Zhang et al. (2006) kan komme av at butaren er høstet ved ulike lokasjoner og muligens til forskjellig tidspunkt. DPPH assay er samtidig mye diskutert på grunn av metodens usikkerhet. Huang et al. (2005) skriver at utilsiktede syrer eller baser som er tilstede i prøven kan påvirke ioniseringen av polyfenoler drastisk, og forårsake en reduksjon eller forbedring i resultatene. Forfatteren mener dette gjør DPPH assay til en minde egnet metode for måling av antioksidantkapasitet.

Metoden som ble brukt var hentet fra HiST (2016), der konsentrasjonen av DPPH løsningen ble oppgitt til å skulle være  $500 \mu\text{M}$  ( $0,2 \text{ mg/ml}$ ). Denne konsentrasjonen av DPPH ga absorbansverdier på ca. 1,0-3,0 i prøvene og 2,5-3,0 i blankprøvene, noe som kan være en feilkilde da så høye absorbansverdier medfører stor måleusikkerhet (Molyneux, 2004). Artikler av blant annet Molyneux (2004) og Kedare and Singh (2011) anbefaler at



absorbansen bør ligge mellom 0,1 og 1,0. For å få absorbanser innen dette spekteret bør DPPH løsningen ha en konsentrasjon på mellom 50- og 100  $\mu\text{M}$  (Molyneux, 2004, Kedare and Singh, 2011). Resultatene fra antioksidativ kapasitet ved DPPH assay som er utført i denne oppgaven er derfor usikre. Det antas allikevel at forholdet mellom de ulike prøvene er riktig.

### 5.1.1 Totalt polyfenolinnhold

Det ble funnet signifikante forskjeller ( $P < 0,001$ ) i innhold av polyfenoliske forbindelser der ekstraktene med 30 og 40 % EtOH hadde et høyere innhold av polyfenoler sammenlignet med ekstraktene med 10, 20 og 50 % EtOH (Figur 14). Dette samsvarer med funnene til Li et al. (2017a) som fant at 30 % EtOH i ekstraktet ga størst utbytte av polyfenoler i brunalgen *S. fusiforme*. Sammenhengen mellom utbytte av polyfenoliske komponenter og konsentrasjonen av EtOH kommer av polariteten til phlorotanninene som er tilstede i algen (Li et al., 2017a). Det at utbyttet av polyfenoler var størst ved 30 % EtOH kan tyde på at phlorotanninene i butare stort sett er polare. Det ble funnet signifikant korrelasjon mellom totalt polyfenolinnhold og EtOH konsentrasjonene ( $r = 0,666$ ,  $P < 0,001$ ) og med ekstraktens antioksidantkapasitet ( $r = -0,782$ ,  $P < 0,01$ ).

Det er vanskelig å sammenligne mengden polyfenoler i prøvene med annen forskning da mangfoldet av ekstraksjonsmetoder og valg av løsemiddel er store. Det er i tillegg gjort få undersøkelser på kjemisk sammensetning i butare. Stévant et al. (2017a) rapporterte om et totalt polyfenolinnhold på 3,43 g/100 g tørrvekt i butare med bruk av aceton:vann (80:20) som løsemiddel. Schiener et al. (2015) fant et polyfenolinnhold i butare på 1,49 % av tørrvekt med bruk av acetonitril:vann:maursyre (50:49,8:0,2) som løsemiddel. Resultatene fra Schiener et al. (2015) samsvarer godt med egne resultater hvis man ser bort i fra forskjellen i løsemiddel.

Til å lage standardkurven ble det brukt gallussyre. Det som går igjen i andre forskningsartikler er at det som regel brukes phloroglucinol som standard i stedet for gallussyre når man analyserer for totalt polyfenolinnhold i brunalger (Stévant et al., 2017a, Tierney et al., 2013, Montero et al., 2016, Magnusson et al., 2017). Dette kommer trolig av at polyfenolene i brunalger stort sett består av phloroglucinol og egner seg derfor bedre til å

kvantifisere polyfenoler i brunalger. Selv om det ble brukt gallussyre som standard i denne oppgaven vil en likevel anta at forholdet mellom ekstraktene er sammenlignbare.

### 5.1.2 Fucoxantininnhold

Det ble funnet at butareekstraktene med 50 % EtOH hadde signifikant høyere innhold av fucoxanthin enn de øvrige konsentrasjonene av EtOH ( $P < 0,001$ ). Med et innhold av fucoxanthin på  $22,97 \pm 0,35$  og  $28,41 \pm 1,91$  mg/g tørrvekt ekstrahert med henholdsvis Ultra turrax og Minilys hadde ekstraktene med 50 % EtOH omtrent 80 ganger så høyt innhold av fucoxanthin som hva ekstraktene med 30 % EtOH hadde (figur 15). Ekstraktene som var ekstrahert med bruk av Minilys hadde signifikant høyere innhold av fucoxanthin enn hva ekstraktene ekstrahert med Ultra turrax hadde ( $P < 0,001$ ). En mulig grunn til forskjellen kan være at fucoxanthin er ustabil (Peng et al., 2011) og noe av fucoxanthinet kan ha blitt denaturert av den tøffe behandlingen cellene får av Ultra turrax.

Det at utbytte av fucoxanthin øker drastisk med høyere EtOH konsentrasjon kan forklares med polariteten til fucoxanthin, som er et upolart karotenoid. Shang et al. (2011) rapporterte om økt utbytte ved bruk av 99 % EtOH enn for lavere EtOH konsentrasjoner. Det ble funnet en signifikant korrelasjon mellom EtOH konsentrasjonen og innhold av fucoxanthin i prøvene ( $r = 0,687$ ,  $P < 0,001$ ).

Stévant et al. (2017a) rapporterte om et fucoxanthininnhold på 871 mg/kg tørrvekt i butare med EtOH:vann (60:40) som løsemiddel. Denne mengden er mye lavere enn egne funn. Det er derimot store forskjeller i ekstraksjonsmetodene, da Stévant et al. (2017a) kun inkuberte frysetørket butare med løsemiddelet i 2 timer på is, før de dekanterte løsningen. I denne oppgaven er det brukt mekaniske hjelpemidler som Ultra turrax, Minilys og ultralyd for ekstraksjon. Dette kan være grunnen til den store forskjellen i utbytte av fucoxanthin. Bruk av Minilys ga som nevnt større utbytte av fucoxanthin, men lavere utbytte av polyfenoler. Til lagringsforsøket ble ekstrakter ekstrahert med Ultra turrax benyttet, da polyfenolene ses på som viktigere i denne sammenheng.

Hvis man ser på sammenhengen mellom antioksidantkapasitet, totalt polyfenolinnhold og fucoxanthininnhold i butareekstraktene er det lite som tilsier at den store forskjellen i fucoxanthininnholdet i ekstraktene med 50 % EtOH i forhold til resten av konsentrasjonene

har hatt veldig stor innvirkning på resultatet av antioksidantkapasitet, da forskjellene i antioksidantkapasiteten er forholdsvis små. Det er allikevel antydning til en liten påvirkning da ekstraktet med 50 % EtOH har lavest EC50 verdi, mens det er ekstraktet med 30 % som har høyest innhold av polyfenoler. Det ble funnet en korrelasjon mellom resultatene fra antioksidantkapasitet og innhold av fucoxanthin ( $r = -0,562$ ,  $P < 0,05$ ).

## 5.2 Antimikrobiell effekt av butareekstrakter

Resultatene fra den antimikrobielle testen ved agar disc-diffusion metoden tyder på at butareekstraktene hadde en antimikrobiell effekt mot fire bakterier; *Shewanella putrefaciens*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas salmonicida* og *Listeria innocua*. Effekten skulle i utgangspunktet ha vært tallfestet ved å måle diameteren til hemmingssonene og trukket fra diameteren til filterlappene. Sonene skulle måles i et dataprogram (Videometer Lab 2), men ble ikke gjort på grunn av dataproblemer. Som resultatene i kap. 4.4 viser var hemmingssonene små, så å måle sonene manuelt ville gitt store måleusikkerheter.

Ved å ha hatt høyere konsentrasjon av butareekstraktene, er det nærliggende å tro at hemmingssonene hadde blitt større og tydeligere. Det virker også tydelig at hemmingssonene er større ved bruk av butareekstrakter med 50 % EtOH enn med 10 % EtOH. Dette samsvarer bra med resultatene fra totalt polyfenolinnhold, der ekstraktene med 50 % EtOH har et høyere polyfenolinnhold. Polyfenoler kan som tidligere nevnt ha antimikrobielle egenskaper (Gupta et al., 2010, Rajauria et al., 2012).

Det er gjort lite arbeid på antimikrobiell effekt av butare fra før av. Det er mange forskningsartikler om antimikrobiell effekt av forskjellige brunalger, men butare er sjelden med i disse. Flere artikler viser at selv om brunalgeartene kan være forholdsvis lik i kjemisk komposisjon har de ulik antimikrobiell effekt mot ulike mikroorganismer (Cavallo et al., 2013, Bouhlal et al., 2010, Pérez et al., 2016). Dette støtter opp under påstanden om at den antimikrobielle effekten i brunalger er en synergieffekt og er kompleks.

En artikkel av Hornsey and Hide (1974) fant de at butare hadde antimikrobiell effekt mot *S.aureus*, men ingen antimikrobiell effekt mot *E.coli*. Resultatene fra Hornsey and Hide (1974) samsvarer med egne resultater.

## 5.3 Lagringsforsøk

### 5.3.1 Råstoff

Til lagringsforsøket ble det som nevnt i kapittel 3.7 benyttet to ulike råstoff. Årsaken var at det ble oppdaget muggvekst i CM-prøvene fra 1. forsøk, der det ble benyttet samme råstoff til alle prøvene. Det ble deretter forsøkt å benytte det samme råstoffet, som nå hadde vært fryst i 2 uker til å gjøre et gjenforsøk. Gjenforsøket ble mislykket på grunn av store forskjeller i bakterievekst fra dag 0. Det ble derfor besluttet å gjøre et nytt forsøk med hel, fersk laks som hadde kommet inn til prosesslaboratoriet. Laksen hadde samme antall dager fra slaktedato som lakseloinen som ble benyttet i 1. forsøk slik at det ble besluttet å gjøre forsøket en siste gang, men på grunn av lite tid, kun på CM-prøvene. N- og CU-prøvene var da allerede ferdig.

Forskjellen i råstoff kan ha hatt betydning for resultatene, selv om kolonitallet fra 0-prøvene er tilnærmet lik for alle tre gruppene. Det var forholdsvis stor forskjell i pH ved dag 0 mellom de ulike prøvene (figur 17). Det var ikke veldig stor forskjell i laktatnivået eller i vekst av melkesyrebakterier i de ulike prøvene på dag 0, slik at det er nærliggende å tro at det er feil i pH målingene til N- og CU-prøvene. En annen grunn til pH-forskjellen kan være at det er brukt en CO<sub>2</sub> emitter i emballasjen til frøyas loin som ble brukt til N- og CU-prøvene. Det har ikke lyktes i å få et svar fra SalMar ASA om det er blitt brukt CO<sub>2</sub> emitter.

### 5.3.2 Coating

Coatingen som ble brukt til lagringsforsøket ble undersøkt for totalt polyfenolinnhold og for antioksidativ kapasitet (DPPH assay). Resultatene viste et totalt polyfenolinnhold på  $0,40 \pm 0,05$  mg GAE/ml og en teoretisk EC<sub>50</sub> på  $31,23 \pm 1,50$  g AH/g DPPH. Coatingen ble på grunn av vanskeligheter med løselighet fortynnet til 1:3 (ekstrakt:vann/EtOH/alginat) slik at totalt innhold av polyfenoler og antioksidantkapasiteten gikk ned i forhold til ekstraktene i seg selv. Problemet med løselighet kan komme av ulike faktorer, men en mulig forklaring kan være polyvalens i butarekstraktene. Tavassoli-Kafrani et al. (2016) beskriver at en direkte tilsetning av alginat til løsninger med polyvalente metallioner ikke former en homogen gel.

Dette skjer på grunn av hurtige og irreversible kollisjoner mellom de to komponentene som fører til harde- uløselige klumper eller såkalte «fish eyes» (Tavassoli-Kafrani et al., 2016). Problemet ble delvis løst ved at alginatet ble først løst i etanol:vann (20:80) før små mengder ble tilsatt butarekstraktet av gangen. Resultatet ble en noe kornete coating med lav konsentrasjon av butarekstrakt.

Den delen av oppgaven som gikk ut på å utvikle selve coatingen burde trolig fått mer oppmerksomhet tidligere i prosjektperioden. Det ble valgt å benytte butarekstrakt med 20 % EtOH til tillagingen av coatingen. Dette ble gjort på bakgrunn av at det var ønskelig å ha så liten konsentrasjon av EtOH i coatingen som mulig uten at det skulle gå for mye utover innholdet av bioaktive komponenter. Polyfenoler ble sett på som viktigere enn fucoxanthin i denne sammenhengen. Geldannelsen til alginat påvirkes også av EtOH konsentrasjonen til løsningen det skal løses i. Hermansson et al. (2016) beskrev i sin artikkel at en EtOH konsentrasjon på 10-15 % styrker geldannelsen, mens en EtOH konsentrasjon på 25 % og over svekker geldannelsen i høy grad.

### 5.3.3 Mikrobiologi

Under lagringsforsøket ble det undersøkt for bakterievekst i prøvene på jernagar, melkesyrebakterier (LAB) på MRS agar og *Brochotrix thermosphacta* STAA agar. Det ble funnet signifikante forskjeller i vekst av bakterier på jernagar mellom de ulike uttaksdagene ( $P < 0,001$ ), mens det ikke ble funnet signifikante forskjeller mellom de ulike gruppene (N, CU og CM). Det ble funnet signifikante forskjeller i vekst av LAB på MRS agar både mellom de ulike uttaksdagene ( $P < 0,001$ ) og mellom gruppene ( $P < 0,001$ ). Vekst av *B. thermosphacta* på STAA agar ble kun observert på én uttaksdag og kun hos den kontrollgruppen (N,  $\log 3,0 \pm 0,28$  cfu/g). Kimtallet på dag 19 i jernagar var mellom  $\log 4,93$  og  $5,5$  cfu/g i de forskjellige gruppene. Disse tallene samsvarer med Fernández et al. (2009) som fant et totalt aerobt, mesofilt kimtall på ca.  $\log 6,0$  i laks pakket i MA med  $\text{CO}_2:\text{N}_2$  (60:40) etter 20 dager. Det opereres ofte med en grenseverdi på  $\log 6,0$  cfu/g for forbrukeraksept i fisk (Fernández et al., 2009).

Det er flere faktorer som kan ha hatt en påvirkning på de mikrobiologiske resultatene i denne oppgaven. Det at det ble benyttet to ulike råstoff til prøven kan ha hatt en påvirkning selv om det ikke ble observert store forskjeller i kimtall på dag 0. Det ble derimot observert

forskjeller i pH på dag 0, selv om det er mistanke om at pH-målingene på dag 0 er feil. Det ble funnet signifikant korrelasjon mellom pH'en og vekst på jernagar ( $r = 0,422$ ,  $P < 0,01$ ) og MRS agar ( $r = 0,447$ ,  $P < 0,01$ ), men det betyr ikke nødvendigvis at pH har hatt en betydning for veksten.

Gassammensetningen i «headspace» var signifikant forskjellig i de ulike gruppene gjennom lagringsforsøket ( $P < 0,001$ ), hvor CM-prøvene hadde signifikant lavere konsentrasjon av CO<sub>2</sub> enn N- og CU-prøvene. Hvor stor betydning forskjellen i CO<sub>2</sub> konsentrasjonen hadde for resultatene er uvisst. Abel et al. (2018) skriver at inhiberingseffekten av CO<sub>2</sub> er proporsjonal med konsentrasjonen av oppløst CO<sub>2</sub> i produktet, så det kan ikke utelukkes at forskjellen i CO<sub>2</sub> konsentrasjonen hadde betydning for resultatet. Det ble funnet en signifikant korrelasjon mellom CO<sub>2</sub>-konsentrasjon og vekst på jernagar ( $r = -0,482$ ,  $P < 0,001$ ) og MRS agar ( $r = -0,555$ ,  $P < 0,001$ ).

Coatingen hadde en initiell EtOH konsentrasjon på 20 %. Det ble ikke utført måling på EtOH konsentrasjonen før påføring av coatingen til prøvene. Generelt er bakterier lite tolerant for høye konsentrasjoner av EtOH. Ingram (1986) skriver i sin artikkel at *E. coli* typisk blir inhibert av en EtOH konsentrasjon på ca. 5 % w/v, mens noen melkesyrebakterier som for eksempel *Lactobacillus homohiochii* kan vokse med opp til 16 % w/v EtOH (Liu and Qureshi, 2009). Tykkelsen av coatingen kan anslås til å være  $\leq 1$  mm og med en lakseprøve på ca. 10 g vil ikke den totale EtOH konsentrasjonen i prøven være stor. For å få et svar på om eller hvor stor påvirkning EtOH konsentrasjonen i CU- og CM-prøvene var, må det gjøres et nytt forsøk der EtOH i coatingen blir fjernet før bruk.

Ved måling av gassammensetning i «headspace» ble det observert at den lille initielle konsentrasjonen av O<sub>2</sub> i prøvene forsvant etter dag 4 i CU- og CM-prøvene, men ikke i N-prøvene (figur 16), det ble ikke observert noen signifikant korrelasjon mellom O<sub>2</sub>-konsentrasjonen og vekst på jernagar ( $r = -0,093$ ,  $P \geq 0,502$ ) og MRS agar ( $r = -0,111$ ,  $P \geq 0,424$ ). Det at O<sub>2</sub> forsvinner fra CU- og CM-prøvene kan komme av at coatingen favoriserer O<sub>2</sub>-forbrukende mikroorganismer, men at den initielle konsentrasjonen av O<sub>2</sub> var for liten til at det ga utslag på veksten på jernagar og MRS agar.

Ofte består forringelsesfloraen i laks av blant annet *B. thermosphacta* og *P. phosphoreum*, og *P. phosphoreum* er funnet å være spesielt dominerende mot slutten av holdbarhetstiden

(Emborg et al., 2002, Sivertsvik et al., 2003). Det ble ikke funnet noen antimikrobiell effekt av butareekstrakt mot disse to bakteriene (kap. 4.4). På STAA agar som selekterer for *B. thermosphacta* er det ikke observert vekst annet enn på dag 13 for N-prøvene (figur 20). Ettersom det er rapportert at *B. thermosphacta* vanligvis er en del av forringelsesfloraen er det et overraskende resultat med tanke på at den antimikrobielle testen ikke ga effekt mot *B. thermosphacta*. Hva som kan være årsaken til fraværet av *B. thermosphacta* er uvisst.

Selv om det på MRS agar, som selekterer for LAB, ble observert signifikante forskjeller ( $P < 0,001$ ) er det ikke stor forskjell i kimtall på dag 19. Den største forskjellen ligger i vekstkurven i løpet av hele lagringsperioden (figur 19). Det var planlagt at *Carnobacterium maltaromaticum* som er en LAB skulle inkluderes i de antimikrobielle testene, men på grunn av tekniske problemer ble ikke dette gjort. *Carnobacterium* arter er ofte å finne i mage/tarm i laks (Ringø et al., 2000). Det er gjort lite forskning på hvordan polyfenoler fra makroalger påvirker LAB. Tabasco et al. (2011) fant at polyfenoler fra druestein hadde inhiberende effekt på noen arter LAB som for eksempel *Streptococcus thermophilus* og *Lactobacillus fermentum*.

Det er også muligheter for at alginatet i coatingen kan ha hatt en påvirkning på resultatene, da alginat/alginsyre er rapportert å ha antimikrobiell effekt i seg selv (Holdt and Kraan, 2011). Det er mulig at forskjellene man ser i vekst på MRS agar kommer av coatingen i seg selv og ikke nødvendigvis av butareekstraktet.

Med alle ovennevnte faktorer som kan ha spilt en rolle for resultatene er det vanskelig å konkludere om coating tilsatt butareekstrakt har hatt en positiv effekt mot bakterievekst i prøvene eller ikke. For å kunne lettere se en eventuell effekt av butareekstraktene mot mikrobiell vekst bør det antakelig være høyere konsentrasjon av ekstraktene i coatingen, samt at forskjeller i råstoff og lagringsbetingelser må elimineres.

### 5.3.4 ATP-nedbrytningsprodukter

HPLC-analysen av ATP-nedbrytningsprodukter viste at det var signifikant forskjell i konsentrasjonen av In og Hx samt K-verdi mellom de ulike gruppene ( $P < 0,001$ ). Forskjellen i K-verdi ser ut til å være liten mot slutten av lagringstiden, men noe mer markant på dag 7 og 10, der CM-prøvene har lavere K-verdi enn N- og CU-prøvene (figur 23).

Forskjellen i In-konsentrasjonen er mer markant enn for K-verdi i de forskjellige gruppene. Forskjellen kan vanskelig forklares med forskjellig råstoff, da CU-prøvene har lavere In-konsentrasjon enn N-prøvene gjennom hele lagringsperioden (figur 22). CM-prøvene har lavere In-konsentrasjon enn både N- og CU-prøvene i hele lagringsperioden med unntak av på dag 19, da CM-prøvene har høyere In-konsentrasjon enn CU-prøvene. Forskjellen i Hx-konsentrasjon mellom de forskjellige gruppene kan på samme måte som In ikke forklares med forskjellig råstoff. Forskjellen i Hx-konsentrasjonen forløper seg på samme måte som for In-konsentrasjonen, der CU-prøvene har lavere Hx-konsentrasjon enn N-prøven gjennom hele lagringsforløpet (figur 21). CM-prøvene har lavere Hx-konsentrasjon enn både N- og CU-prøvene ved alle uttaksdager med unntak av på dag 19, da har CM-prøvene høyere Hx-konsentrasjon enn CU-prøvene. Det ble funnet signifikant korrelasjon mellom  $\text{CO}_2$ -konsentrasjon i «headspace» og In ( $r = -0,370$ ,  $P < 0,001$ ) Hx ( $r = -0,475$ ,  $P < 0,001$ ) og K-verdi ( $r = -0,580$ ,  $P < 0,001$ ).

Hx kan dannes både ved autolytiske prosesser og av bakteriell aktivitet fra typiske forringelsesbakterier som *P. phosphoreum* og *S. putrefaciens* (Hong et al., 2017). Det kan tyde på at coatingen både med- og uten butareekstrakt har hatt en positiv effekt på dannelsen av Hx i lakseprøvene. Hva som har ført til den positive effekten er derimot usikkert, da det kan være én eller flere faktorer som har påvirket. Ettersom det er signifikant forskjell i dannelsen av Hx i CU- og CM-prøvene kan det være at butareekstraktet eller coatingen i seg selv som har gitt en positiv effekt.

K-verdiene, In- og Hx-konsentrasjonene er høyere enn hva som var forventet. Med en K-verdi på mellom 80 og 90 etter dag 7 (+ 4 dager fra slaktedato til uttaksdag 0) ville i teorien laksen vært uspiselig (Fernández et al., 2009, Souza et al., 2010). En K-verdi på 40 er ofte brukt som grense på forbrukeraksept i fiskefilet, men denne grensen er ikke lik for alle fiskeslag og vil kunne variere en god del (Souza et al., 2010). Fernández et al. (2009)



rapporterte om en K-verdi på ca. 30 etter 10 dager i laks pakket med 60 % CO<sub>2</sub> og lagret på 0 °C, mens Souza et al. (2010) rapporterte om en K-verdi på ca. 40 etter ni dager i laks pakket i plast og lagret på 0 °C.

Det kan ikke utelukkes at K-verdiene, In- og Hx-konsentrasjonene er kunstig høye på grunn feil i utregninger eller feil i konsentrasjonsberegningene til de ulike standardene. Det mistenkes at verdiene er en 10'er potens feil. Tillagingen av standardene ble utført av en fersk ingeniør. Forholdet mellom de ulike gruppene antas allikevel å være riktig. Når de store forskjellene i In-, Hx- og K-verdi i forhold til annen forskning ble oppdaget var det ikke tid til å gjøre et gjenforsøk.

### 5.3.5 Laktatinnhold

HPLC analysene av laktatinnhold viste at CM-prøvene hadde signifikant ( $P < 0,001$ ) lavere laktatinnhold enn hva N- og CU-prøvene hadde (figur 24). Det er forholdsvis store standardavvik i resultatene. Laktatinnholdet på dag 0 sier noe om ulikheter i de to ulike råstoffene som ble benyttet til lagringsforsøket. Det er noe forskjell i laktatinnholdet på dag 0, men på grunn av store standardavvik er det vanskelig å konkludere med hvor store forskjeller det egentlig er. På dag 4 ser man klarere forskjell, hvor CM-prøvene er lavere i laktatinnhold enn N- og CU-prøvene. CM-prøvene holder seg lavest i laktatinnhold ut lagringstiden, med unntak av på dag 19, da er det et høyere laktatinnhold i CM-prøvene enn for CU-prøvene. Laktat produseres også av LAB, noe som gjør sammenhengen mellom laktatinnhold og vekst av LAB på MRS agar mot slutten av lagringstiden interessant. Korrelasjonen mellom laktat og MRS agar er derimot ikke signifikant ( $r = -0,255$ ,  $P \geq 0,056$ ). Forskjellen i laktat kan derfor komme av ulike råstoff da det ikke er signifikant forskjell i laktatinnholdet mellom N- og CU-prøvene ( $P \geq 0,769$ ).

Det ble ikke funnet peroksider i prøvene. Det tyder på at prøvene har hatt gode lagringsbetingelser med MAP og temperatur i forhold til lipidoksidasjon. Det er tidligere nevnt at lipidoksidasjon i laks sjelden er et problem og er sjelden en medvirkende faktor for holdbarhet i MA-pakket laks (Flick et al., 1992, Scaife et al., 2000).

I denne masteroppgaven har det vært mye laboratoriearbeid, mye å sette seg inn i og mye nytt å lære. Den viktigste lærdommen er kanskje at det går sjelden slik man ønsker og at ting

tar tid. Muligens skulle det ha vært fokusert på færre parametere, slik at det hadde vært bedre tid til gjenforsøk der det har vært behov.

## 5.4 Videre arbeid

Bruk av makroalger som bioaktiv ingrediens i sjømatindustrien har et potensiale, men for å kunne bruke det i kommersiell skala kreves det mye forskning og innovasjon for å finne gode løsninger. Skal det brukes coating for eksponere produktet for de bioaktive komponentene er det flere problemer som må løses. Det kan ikke brukes helseskadelige løsemidler til ekstraksjon eller som ingrediens i coatingen, da den må være spiselig. Løseligheten av alginat i algeekstraktet må også undersøkes nøye. En oppkonsentrering av algeekstraktet bør vurderes for å øke effekten av ekstraktet, men med et høyt vanninnhold i ekstraktet må det finnes gode og kostnadseffektive metoder for å fjerne vann. Ettersom varme kan ødelegge effekten av de bioaktive komponentene kan man ikke bruke varmebaserte tørkemetoder.

Det kunne vært interessant å utføre forsøk med coating på andre fete fiskeslag som makrell og sild. Disse fiskeslagene er svært utsatt for lipidoksidasjon på grunn av sitt høye innhold av flerumettede fettsyrer samt fravær av antioksidanter som for eksempel astaxathin som laks er rik på. Trolig ville man lettere sett om de bioaktive komponentene påvirker lipidoksidasjon ved å benytte disse fiskeslagene.

Det vil være nyttig å gjøre sensoriske analyser for å undersøke om eller hvordan de sensoriske egenskapene i laks vil endre seg ved bruk av coating.

## 6. Konklusjon

Basert på resultatene konkluderes det med at butarekstraktene både har antimikrobielle og antioksidative egenskaper. Ekstraktet med 30 % EtOH ga størst utbytte av polyfenoler, mens ekstraktet med 50 % EtOH ga størst utbytte av fucoxanthin samt lavest EC50-verdi (best antioksidativ kapasitet). Ekstrakter av butare viste antimikrobiell effekt mot *Listeria innocua*, *Aeromonas salmonicida*, *Shewanella putrefaciens* og *Staphylococcus aureus*.

Ut i fra lagringsforsøket er det vanskelig å konkludere med at en coating med bioaktive komponenter fra butare gir forbedret kvalitet sammenlignet med en ren alginatbasert coating. Alginatbasert coating virker å gi en positiv effekt på kvalitet i seg selv, med lavere verdier av hypoxanthin og inosin, samt lavere vekst av melkesyrebakterier. Det var ingen dannelse av peroksider i prøvene, slik at det ikke kan konkluderes med om butarekstraktene reduserer lipidoksidasjon i laks eller ikke.

Med bakgrunn i utfordringer knyttet til produksjon av coatingen og med tanke på funnene i de rene ekstraktene vil det likevel være hensiktsmessig å arbeide videre med problemstillingen.

## 7. Referanseliste

- ABEL, N., ROTABAKK, B. T., RUSTAD, T. & LERFALL, J. 2018. The influence of lipid composition, storage temperature, and modified atmospheric gas combinations on the solubility of CO<sub>2</sub> in a seafood model product. *Journal of Food Engineering*, 216, 151-158.
- ADAMS, G. 2007. The Principles of Freeze-Drying. In: DAY, J. G. & STACEY, G. N. (eds.) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.
- ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P. D., PATSALIDES, E., MCDONALD, S. & ROBARDS, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
- BAJPAI, V., RAHMAN, A., DUNG, N., HUH, M. & KANG, S. 2008. In vitro inhibition of food spoilage and foodborne pathogenic bacteria by essential oil and leaf extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *Journal of Food Science*, 73, M314-M320.
- BALOUIRI, M., SADIKI, M. & IBNSOUDA, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71-79.
- BARBA, F. J. 2017. Microalgae and seaweeds for food applications: Challenges and perspectives. *Food Research International*, 99, 969-970.
- BELL, J. G., MCEVOY, J., TOCHER, D. R. & SARGENT, J. R. 2000. Depletion of  $\alpha$ -Tocopherol and Astaxanthin in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Affects Autoxidative Defense and Fatty Acid Metabolism. *The Journal of Nutrition*, 130, 1800-1808.
- BENDARY, E., FRANCIS, R. R., ALI, H. M. G., SARWAT, M. I. & EL HADY, S. 2013. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*, 58, 173-181.
- BLANC, N., HAUCHARD, D., AUDIBERT, L. & GALL, E. A. 2011. Radical-scavenging capacity of phenol fractions in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: an electrochemical approach. *Talanta*, 84, 513-518.
- BLANCO-PASCUAL, N., MONTERO, M. P. & GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. 2014. Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloids*, 37, 100-110.
- 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.

- BOUHLAL, R., HASSANE, R., JOSÉ, M. & BOURGOUGNON, N. 2010. *The antibacterial potential of the Seaweeds (Rhodophyceae) of the Strait of Gibraltar and the Mediterranean Coast of Morocco.*
- CAMPOS, C. A., GERSCHENSON, L. N. & FLORES, S. K. 2011. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 849-875.
- CAVALLO, R. A., ACQUAVIVA, M. I., STABILI, L., CECERE, E., PETROCELLI, A. & NARRACCI, M. 2013. Antibacterial activity of marine macroalgae against fish pathogenic Vibrio species. *Central European Journal of Biology*, 8, 646-653.
- CHAN, J. C. C., CHEUNG, P. C. K. & ANG, P. O. 1997. Comparative Studies on the Effect of Three Drying Methods on the Nutritional Composition of Seaweed Sargassum hemiphyllum (Turn.) C. Ag. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3056-3059.
- CHENG, J.-H., SUN, D.-W., ZENG, X.-A. & LIU, D. 2015. Recent Advances in Methods and Techniques for Freshness Quality Determination and Evaluation of Fish and Fish Fillets: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1012-1225.
- CHIDANANDAIAH, KESHRI, R. C. & SANYAL, M. K. 2009. EFFECT OF SODIUM ALGINATE COATING WITH PRESERVATIVES ON THE QUALITY OF MEAT PATTIES DURING REFRIGERATED (4 ± 1C) STORAGE. *Journal of Muscle Foods*, 20, 275-292.
- CORRALES, M., FERNÁNDEZ, A. & HAN, J. H. 2014. Chapter 7 - Antimicrobial Packaging Systems. *Innovations in Food Packaging (Second Edition)*. San Diego: Academic Press.
- DAEMI, H. & BARIKANI, M. 2012. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles. *Scientia Iranica*, 19, 2023-2028.
- DE LA COBA, F., AGUILERA, J., FIGUEROA, F., DE GÁLVEZ, M. & HERRERA, E. 2009. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *Journal of Applied Phycology*, 21, 161-169.
- DOMINGUEZ, H. 2013. *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*, Cambridge, Woodhead Publishing Ltd.
- EMBORG, J., LAURSEN, B. G., RATHJEN, T. & DALGAARD, P. 2002. Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2°C. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 790-799.

- FELLOWS, P. J. 2009a. 23 - Freeze drying and freeze concentration. *Food Processing Technology (Third edition)*. Woodhead Publishing.
- FELLOWS, P. J. 2009b. 25 - Packaging. *Food Processing Technology (third edition)*. Woodhead Publishing.
- FERNÁNDEZ, K., ASPE, E. & ROECKEL, M. 2009. Shelf-life extension on fillets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) using natural additives, superchilling and modified atmosphere packaging. *Food Control*, 20, 1036-1042.
- FERNÁNDEZ, K., ASPÉ, E. & ROECKEL, M. 2010. Scaling up parameters for shelf-life extension of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) fillets using superchilling and modified atmosphere packaging. *Food Control*, 21, 857-862.
- FLICK, G. J., HONG, G.-P. & KNOBL, G. M. 1992. Lipid Oxidation of Seafood During Storage. *Lipid Oxidation in Food*. American Chemical Society.
- GENNADIOS, A., HANNA, M. A. & KURTH, L. B. 1997. Application of Edible Coatings on Meats, Poultry and Seafoods: A Review. *LWT - Food Science and Technology*, 30, 337-350.
- GRAM, L. & HUSS, H. H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 121-137.
- GREIBROKK, T. K., J. & RASMUSSEN, K. E. 1987. *Kromatografi*, Universitetsforlaget.
- GUNSTONE, F. 2009. *The chemistry of oils and fats: sources, composition, properties and uses*, John Wiley & Sons.
- GUPTA, S. & ABU-GHANNAM, N. 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 315-326.
- GUPTA, S., RAJAURIA, G. & ABU-GHANNAM, N. 2010. Study of the microbial diversity and antimicrobial properties of Irish edible brown seaweeds. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 482-489.
- HANSEN, A. Å., MØRKØRE, T., RUDI, K., RØDBOTTEN, M., BJERKE, F. & EIE, T. 2009. Quality Changes of Prerigor Filleted Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Packaged in Modified Atmosphere Using CO<sub>2</sub> Emitter, Traditional MAP, and Vacuum. *Journal of Food Science*, 74, M242-M249.
- HERMANSSON, E., SCHUSTER, E., LINDGREN, L., ALTSKÄR, A. & STRÖM, A. 2016. Impact of solvent quality on the network strength and structure of alginate gels. *Carbohydrate Polymers*, 144, 289-296.
- HIST 2016. Antioksidantkapasitet i frukt og bær. *Prosedyresamling Doknr: PS 10*.

- HOLDT, S. L. & KRAAN, S. 2011. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23, 543-597.
- HONG, H., REGENSTEIN, J. M. & LUO, Y. 2017. The importance of ATP-related compounds for the freshness and flavor of post-mortem fish and shellfish muscle: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57, 1787-1798.
- HORNSEY, I. S. & HIDE, D. 1974. The production of antimicrobial compounds by British marine algae I. Antibiotic-producing marine algae. *British Phycological Journal*, 9, 353-361.
- HORSLEY, R. W. 1973. The Bacterial Flora of the Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) in Relation to its Environment. *Journal of Applied Bacteriology*, 36, 377-386.
- HUANG, D., OU, B. & PRIOR, R. L. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- HUIS IN'T VELD, J. H. J. 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 1-18.
- INGRAM, L. O. 1986. Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *Trends in Biotechnology*, 4, 40-44.
- JASWIR, I., TOPE, A.-H. T., RAUS, R. A., MONSUR, H. A. & RAMLI, N. 2014. Study on anti-bacterial potentials of some Malaysian brown seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 42, 275-279.
- KEDARE, S. B. & SINGH, R. P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 412-422.
- KLEMETSEN, A., AMUNDSEN, P. A., DEMPSON, J. B., JONSSON, B., JONSSON, N., O'CONNELL, M. F. & MORTENSEN, E. 2003. Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish*, 12, 1-59.
- LAWAL, A. T. & ADELOJU, S. B. 2012. Progress and recent advances in fabrication and utilization of hypoxanthine biosensors for meat and fish quality assessment: A review. *Talanta*, 100, 217-228.
- LEE, D. S. 2014. Chapter 6 - Antioxidative Packaging System A2 - Han, Jung H. *Innovations in Food Packaging (Second Edition)*. San Diego: Academic Press.
- LI, Y.-X., WIJESEKARA, I., LI, Y. & KIM, S.-K. 2011. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochemistry*, 46, 2219-2224.

- LI, Y., FU, X., DUAN, D., LIU, X., XU, J. & GAO, X. 2017a. Extraction and Identification of Phlorotannins from the Brown Alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell. *Marine Drugs*, 15, 49.
- LI, Y., YANG, Z. & LI, J. 2017b. Shelf-life extension of Pacific white shrimp using algae extracts during refrigerated storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 291-298.
- LIPS, A., CHAPMAN, R. A. & MCFARLANE, W. D. 1943. The application of the ferric thiocyanate method to the determination of incipient rancidity in fats and oils. *Oil & Soap*, 20, 240-243.
- LIU, S. & QURESHI, N. 2009. How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotechnology*, 26, 117-121.
- MACÉ, S., CORNET, J., CHEVALIER, F., CARDINAL, M., PILET, M.-F., DOUSSET, X. & JOFFRAUD, J.-J. 2012. Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR–TTGE. *Food Microbiology*, 30, 164-172.
- MAGNUSSON, M., YUEN, A. K. L., ZHANG, R., WRIGHT, J. T., TAYLOR, R. B., MASCHMEYER, T. & DE NYS, R. 2017. A comparative assessment of microwave assisted (MAE) and conventional solid-liquid (SLE) techniques for the extraction of phloroglucinol from brown seaweed. *Algal Research*, 23, 28-36.
- MANILAL, A., SELVIN, J., THAJUDDIN, N., SUJITH, S., PANIKKAR, M., IDHAYADHULLA, A. & KUMAR, R. S. 2012. Biopotentials of marine alga, *Lobophora variegata* collected from the south Indian littoral. *Thalassas*, 28, 47-54.
- MATSUKAWA, R., DUBINSKY, Z., KISHIMOTO, E., MASAKI, K., MASUDA, Y., TAKEUCHI, T., CHIHARA, M., YAMAMOTO, Y., NIKI, E. & KARUBE, I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 9, 29-35.
- MENDIS, E. & KIM, S. K. 2011. Present and future prospects of seaweeds in developing functional foods. *Adv Food Nutr Res*, 64, 1-15.
- MIYASHITA, K., NISHIKAWA, S., BEPPU, F., TSUKUI, T., ABE, M. & HOSOKAWA, M. 2011. The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1166-1174.
- MOLYNEUX, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26, 211-219.



- MONTERO, L., SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P., GARCÍA-CAÑAS, V., TANNIOU, A., STIGER-POUVREAU, V., RUSSO, M., RASTRELLI, L., CIFUENTES, A., HERRERO, M. & IBÁÑEZ, E. 2016. Anti-proliferative activity and chemical characterization by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry of phlorotannins from the brown macroalga *Sargassum muticum* collected on North-Atlantic coasts. *Journal of Chromatography A*, 1428, 115-125.
- NAGAYAMA, K., IWAMURA, Y., SHIBATA, T., HIRAYAMA, I. & NAKAMURA, T. 2002. Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 889-893.
- NAYAR, S. & BOTT, K. 2014. Current status of global cultivated seaweed production and markets. *World Aquac*, 45, 32-37.
- NMKL 2006. Kimtal og specifikke fordævelsesbakterier i fisk og fiskevarer. Nr. 184. Nordisk metodikkomité for næringsmidler.
- NMKL 2007. Melkesyre bakterier. Bestemmelse i næringsmidler i forbindelse med bederving. Nr. 140 2. utgave. Nordisk metodikkomité for næringsmidler.
- PENG, J., YUAN, J.-P., WU, C.-F. & WANG, J.-H. 2011. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. *Marine Drugs*, 9, 1806-1828.
- PÉREZ, M. J., FALQUÉ, E. & DOMÍNGUEZ, H. 2016. Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Marine Drugs*, 14, 52.
- PRIOR, R. L., WU, X. & SCHAICH, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 53, 4290-302.
- RAJAURIA, G., JAISWAL, A. K., ABU-GANNAM, N. & GUPTA, S. 2012. ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND FREE RADICAL-SCAVENGING CAPACITY OF BROWN SEAWEED HIMANTHALIA ELONGATA FROM WESTERN COAST OF IRELAND. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 322-335.
- RINGØ, E., BENDIKSEN, H., WESMAJERVI, M., OLSEN, R., JANSEN, P. & MIKKELSEN, H. 2000. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 89, 317-322.
- ROOHINEJAD, S., KOUBAA, M., BARBA, F. J., SALJOUGHIAN, S., AMID, M. & GREINER, R. 2017. Application of seaweeds to develop new food products with enhanced shelf-life,

- quality and health-related beneficial properties. *Food Research International*, 99, 1066-1083.
- SACHINDRA, N. M., SATO, E., MAEDA, H., HOSOKAWA, M., NIWANO, Y., KOHNO, M. & MIYASHITA, K. 2007. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *J Agric Food Chem*, 55, 8516-22.
- SANTOSO, J., YOSHIE-STARK, Y. & SUZUKI, T. 2004. Anti-oxidant activity of methanol extracts from Indonesian seaweeds in an oil emulsion model. *Fisheries science*, 70, 183-188.
- SCAIFE, ONIBI, MURRAY, FLETCHER & HOULIHAN 2000. Influence of  $\alpha$ -tocopherol acetate on the short- and long-term storage properties of fillets from Atlantic salmon *Salmo salar* fed a high lipid diet. *Aquaculture Nutrition*, 6, 65-71.
- SCHIENER, P., BLACK, K. D., STANLEY, M. S. & GREEN, D. H. 2015. The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *Journal of Applied Phycology*, 27, 363-373.
- SEAWEED. u.å. *Alaria esculenta* (Linnaeus) Greville [Online]. Available: [http://www.seaweed.ie/descriptions/alaria\\_esculenta.php](http://www.seaweed.ie/descriptions/alaria_esculenta.php) [Accessed 08.03.2018].
- SHANG, Y. F., KIM, S. M., LEE, W. J. & UM, B.-H. 2011. Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchell. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111, 237-241.
- SHEARER, K. D., ÅSGÅRD, T., ANDORSDÖTTIR, G. & AAS, G. H. 1994. Whole body elemental and proximate composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during the life cycle. *Journal of Fish Biology*, 44, 785-797.
- SIMPSON, R., ALMONACID, S., NUÑEZ, H., PINTO, M., ABAKAROV, A. & TEIXEIRA, A. 2012. Time-Temperature Indicator to Monitor Cold Chain Distribution of Fresh Salmon (*Salmo Salar*). *Journal of Food Process Engineering*, 35, 742-750.
- SIVERTSVIK, M., JEKSRUD, W. K. & ROSNES, J. T. 2002. A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science & Technology*, 37, 107-127.
- SIVERTSVIK, M., ROSNES, J. T. & KLEIBERG, G. H. 2003. Effect of Modified Atmosphere Packaging and Superchilled Storage on the Microbial and Sensory Quality of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets. *Journal of Food Science*, 68, 1467-1472.

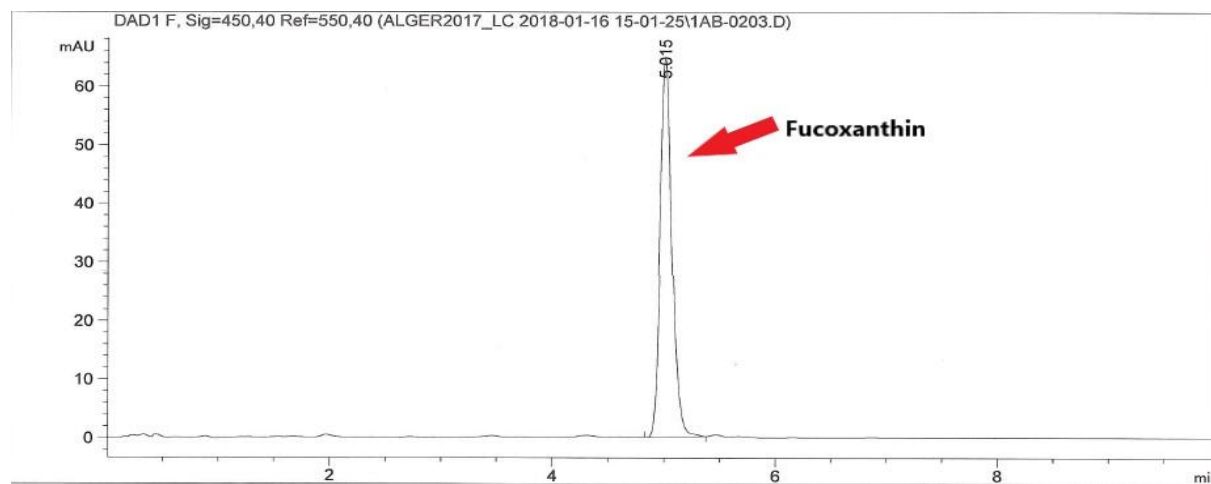
- SKJERMO, J., AASEN, I. M., ARFF, J., BROCH, O. J., CARVAJAL, A., CHRISTIE, H., FORBORD, S., OLSEN, Y., REITAN, K. I. & RUSTAD, T. 2014a. A new Norwegian bioeconomy based on cultivation and processing of seaweeds: Opportunities and R&D needs. *SINTEF Fisheries and Aquaculture*.
- SKJERMO, J., FORBORD, S., STEINHOVDEN, S. & HANDÅ, K. 2014b. Tilrettelegging for dyrking av butare i Trøndelag. Sintef.
- SONG, Y., LIU, L., SHEN, H., YOU, J. & LUO, Y. 2011. Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). *Food Control*, 22, 608-615.
- SOUZA, B. W. S., CERQUEIRA, M. A., RUIZ, H. A., MARTINS, J. T., CASARIEGO, A., TEIXEIRA, J. A. & VICENTE, A. A. 2010. Effect of Chitosan-Based Coatings on the Shelf Life of Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11456-11462.
- SSB. 2017. *Nytt rekordår for oppdrettslaks* [Online]. Available: <http://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/artikler-og-publikasjoner/nytt-rekordar-for-oppdrettslaks> [Accessed 20.03.2018].
- STEINHOFF, F. S., GRAEVE, M., BARTOSZEK, K., BISCHOF, K. & WIENCKE, C. 2012. Phlorotannin Production and Lipid Oxidation as a Potential Protective Function Against High Photosynthetically Active and UV Radiation in Gametophytes of *Alaria esculenta* (Alariales, Phaeophyceae). *Photochemistry and Photobiology*, 88, 46-57.
- STÉVANT, P., MARFAING, H., RUSTAD, T., SANDBAKKEN, I., FLEURENCE, J. & CHAPMAN, A. 2017a. Nutritional value of the kelps *Alaria esculenta* and *Saccharina latissima* and effects of short-term storage on biomass quality. *Journal of Applied Phycology*, 29, 2417-2426.
- STÉVANT, P., REBOURS, C. & CHAPMAN, A. 2017b. Seaweed aquaculture in Norway: recent industrial developments and future perspectives. *Aquaculture International*, 25, 1373-1390.
- TABASCO, R., SÁNCHEZ-PATÁN, F., MONAGAS, M., BARTOLOMÉ, B., VICTORIA MORENO-ARRIBAS, M., PELÁEZ, C. & REQUENA, T. 2011. Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism. *Food Microbiology*, 28, 1345-1352.

- TAVASSOLI-KAFRANI, E., SHEKARCHIZADEH, H. & MASOUDPOUR-BEHABADI, M. 2016. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 137, 360-374.
- TIERNEY, M. S., CROFT, A. K. & HAYES, M. 2010. A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae. *Botanica Marina*, 53, 387-408.
- TIERNEY, M. S., SMYTH, T. J., RAI, D. K., SOLER-VILA, A., CROFT, A. K. & BRUNTON, N. 2013. Enrichment of polyphenol contents and antioxidant activities of Irish brown macroalgae using food-friendly techniques based on polarity and molecular size. *Food Chemistry*, 139, 753-761.
- VICKERY, M. L., VICKERY, BRIAN 1981. The Acetate-Malonate Pathway. *Secondary Plant Metabolism*. London: Macmillan Education UK.
- YTRESTØYL, T., AAS, T. S. & ÅSGÅRD, T. 2015. Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*, 448, 365-374.
- ZHANG, H., TANG, Y., ZHANG, Y., ZHANG, S., QU, J., WANG, X., KONG, R., HAN, C. & LIU, Z. 2015. *Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient*.
- ZHANG, Q., ZHANG, J., SHEN, J., SILVA, A., DENNIS, D. A. & BARROW, C. J. 2006. A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 18, 445-450.

## Vedlegg 1: Fucoxanthin standard og beregning av RF-verdi

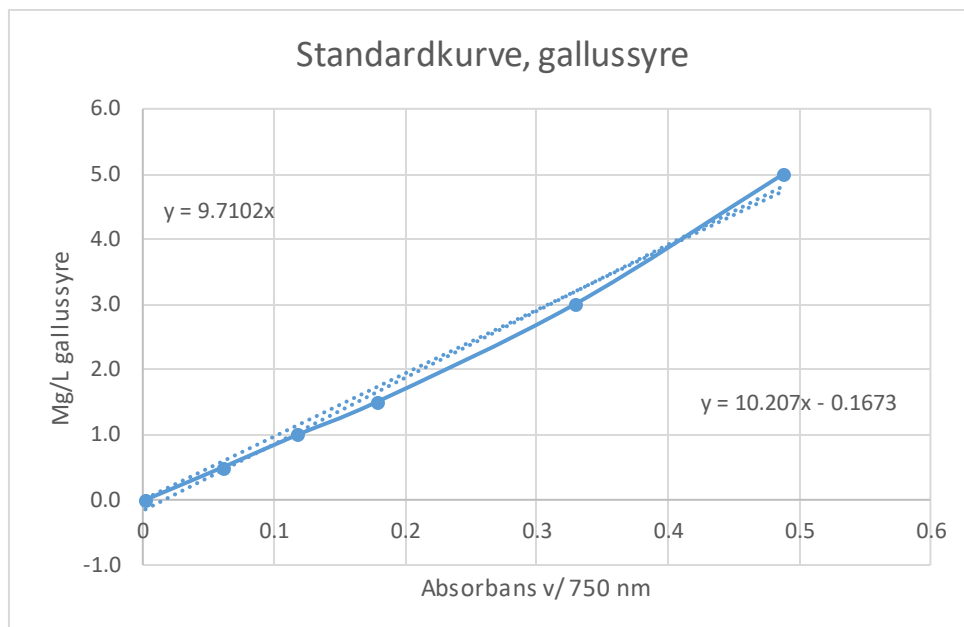
Tabell V1.1: Beregning av RF-verdi fra fucoxanthin standard

Sample	A <sub>max</sub>	A <sub>320</sub>	A <sub>584</sub>	A	C'	C	RF
1	0.582	0.000	0.000	0.582	0.701	701.205	0.69
2	0.579	0.000	0.000	0.579	0.698	697.590	0.69
3	0.579	0.000	0.000	0.579	0.698	697.590	0.69
Parallell	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	Average	
A <sub>allE</sub> =	482.815	482.625	481.219			482.219667	
A <sub>9Z</sub> =	0	0	0			0	
A <sub>13Z</sub> =	0	0	0			0	
$A = A_{\lambda_{\max}} - \frac{A_{320} - A_{584}}{2}$		$C' = \frac{10 \cdot A \cdot V \cdot F}{2100}$		$C = \frac{C' \cdot 1000}{V}$		$RF = \frac{A_{allE} + 1,2A_{9Z} + 1,6A_{13Z}}{C}$	



Figur V1.1: Kromatogram fra fucoxanthin standard. RT= 5,015 min

## Vedlegg 2: Standardkurve gallussyre - totalt polyfenolinnhold



Figur V2.1: Standardkurve for kvantifisering av totalt polyfenolinnhold

Total fenol innholdet er standardisert mot gallussyre og uttrykt som mg/L gallussyre ekvivalenter og regnes ut etter følgende formel:

$$\text{GAE} = a \cdot \text{Abs}$$

$$\text{GAE/L ekstrakt(filtrat)} = \text{GAE} \cdot F1$$

$$\text{GAE/100g råstoff} = \frac{\text{GAE/L ekstrakt(filtrat)}}{K1} \cdot 100$$

F1 = Fortynning

K1 = Konsentrasjon i ekstraktet g/L

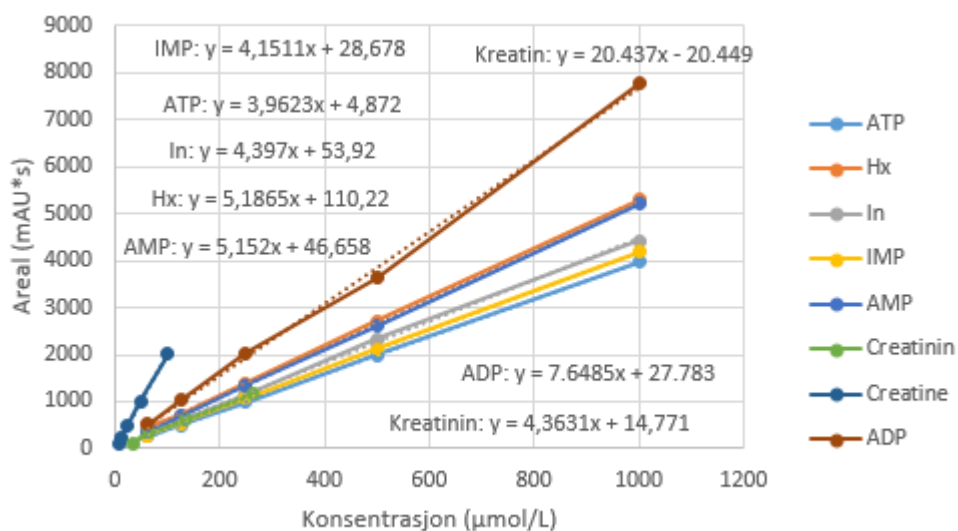
Stigningstall til standardkurven ( $y = ax$ )  
Abs er absorbansen ved 750 nm

Figur V2.2: Beregninger av totalt polyfenolinnhold

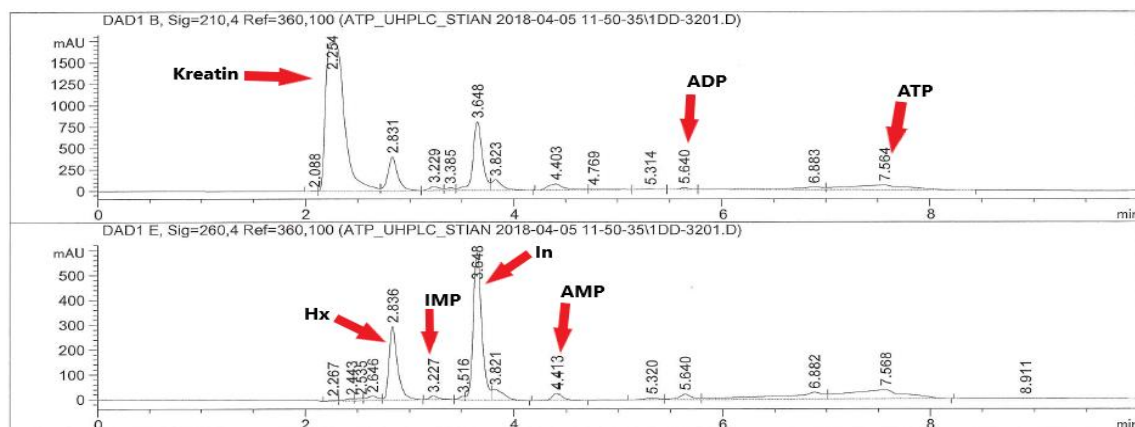
## Vedlegg 3 ATP-nedbrytningsprodukter, retensjonstid og standardurver

Tabell V3.1: Oversikt over ATP-metabolitt standardenes retensjonstid, deteksjonsgrense,  $y = ax-b$  og  $R^2$

Standard	Retensjonstid (min)	Deteksjon (nm)	$y = ax-b$	$R^2$
Kreatin	2,2	210	$y = 20,437x - 20,449$	1,0000
Kreatinin	2,4	210	$y = 4,3631x - 14,771$	0,9923
ATP	7,5	210	$y = 3,9673x - 4,872$	1,0000
ADP	5,6	210	$y = 7,6485x - 27,783$	0,9979
AMP	4,4	260	$y = 5,152x - 46,658$	0,9999
IMP	3,2	260	$y = 4,1511x - 28,678$	1,0000
In	3,5	260	$y = 4,379x - 53,92$	0,9994
Hx	2,8	260	$y = 5,1865x - 110,22$	0,9998

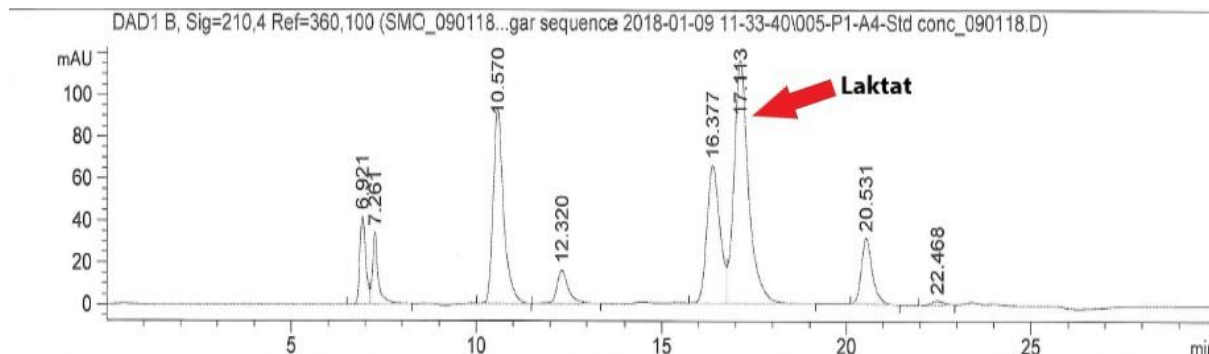


Figur V3.1: Standardkurver fra ATP-metabolittenes standarder



Figur V3.2: kromatogram fra HPLC analysen som viser hvor ATP-nedbrytningsproduktene kommer

## Vedlegg 4 HPLC kromatogram fra deteksjon av laktat



Figur V4.1: Kromatogram av laktatstandard. Andre topper er signal fra diverse karbohydrater og syrer og er ikke viktige i denne sammenheng



## Vedlegg 5: formler for beregning av K-verdi, RS% og EC50

$$\text{K-verdi (\%)} = \frac{[\text{HxR}] + [\text{Hx}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}] + [\text{IMP}] + [\text{HxR}] + [\text{Hx}]} \times 100$$

Formel V5.1: Beregning av K-verdi

$$\text{Radical scavenging \%} = \left[ 1 - \frac{\text{absorbans av prøve}}{\text{absorbans av blank}} \right] \times 100$$

Formel V5.2: Beregning av radical scavenging %

$$EC50 = X = \frac{y - b}{a}$$

$$y = 50 \% (y = ax + b)$$

$$x = EC50$$

Formel V5.3: Beregning av EC50